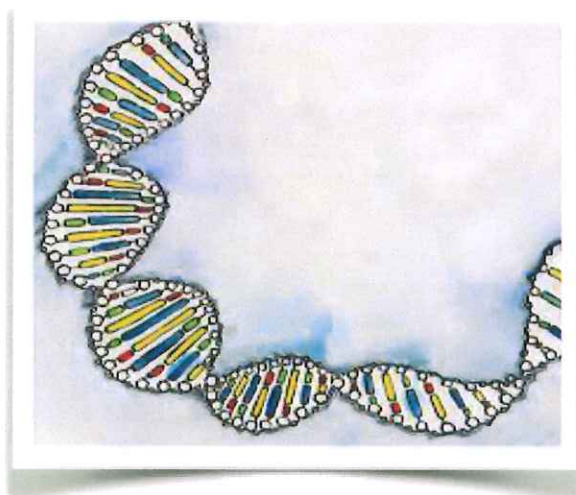




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΟΥ KDM2B ΣΤΗΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ



Διδακτορική Διατριβή

Ζαχαροπούλου Νεφέλη

Ηράκλειο, 2019



UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF MEDICINE
DIVISION OF BASIC SCIENCES
LABORATORY OF BIOCHEMISTRY



**ROLE OF THE NOVEL ONCOGENE KDM2B IN THE
EPIGENETIC REGULATION OF THE**



PhD Thesis

Nepheli Zacharopoulou

Heraklion, 2019

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του Καθηγητή Στουρνάρα Χρήστου, στο Εργαστήριο Βιοχημείας, υπό την επίβλεψη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων Ερευνητής: Στουρνάρας Χρήστος, Ομότιμος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Στουρνάρας Χρήστος, Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Καμπράνης Σωτήριος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Σουρβίνος Γεώργιος, Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Στουρνάρας Χρήστος, Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Καμπράνης Σωτήριος Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Σουρβίνος Γεώργιος, Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Καρδάσης Δημήτριος, Καθηγητής Βιοχημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Παλακωνσταντή Ευαγγελία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Τσατσάνης Χρήστος, Καθηγητής Κλινικής Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Κρετσόβαλη Ανδρονίκη, Κύρια Ερευνήτρια, IMBB-FORTH, Ηράκλειο Κρήτης



Ευχαριστίες...

Και κάπως έτσι ξεκίνησαν όλα. Με εμένα, πριν από 3 και κάτι χρόνια να αποφασίζω να πάρω τον ανηφορικό δρόμο του διδακτορικού. Έναν δρόμο γεμάτο έντονες στιγμές και συγκινήσεις, όπου οι απογοητεύσεις ήταν περισσότερες από τις χαρές. Το άγχος και η πίεση πάντα παρόντα να με κάνουν να αμφιβάλλω συχνά για την επιλογή μου. Ένας δρόμος όμως, που τώρα, φτάνοντας στο τέλος του και παρόλες τις δυσκολίες που αντιμετώπισα κατά την πορεία του, συνειδητοποιώ πως δεν θα τον άλλαζα, και πως πάλι προς αυτή τη μεριά της διασταύρωσης θα πήγαινα.

Φτάνοντας λοιπόν στο τέλος της πορείας αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής.

Το μεγαλύτερο και πιο θερμό ευχαριστώ, δικαιωματικά το χρωστώ στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Χρήστο Στουρνάρα. Είναι από τους ανθρώπους που πίστεψε σε εμένα όσο ελάχιστοι άνθρωποι και δέχτηκε από την πρώτη στιγμή να με προστατέψει κάτω από τις επιστημονικές του φτερούγες. Τον ευχαριστώ για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης, για την αμείωτη εμπιστοσύνη του στις ικανότητες μου ακόμα και στις περιόδους ανασφάλειας και απογοήτευσης που είχα. Χωρίς αυτόν αυτή η εργασία αυτή δεν θα είχε ολοκληρωθεί. Ελπίζω μόνο να μην τον απογοήτευσα. Είναι ο επιστημονικός μου πατέρας, ο μέντοράς μου.

Σειρά έχει ο κ. Σωτήριος Καμπράνης, χωρίς την παρουσία του οποίου δεν θα είχα ξεκινήσει το διδακτορικό αυτό. Με δέχτηκε χωρίς δεύτερη σκέψη στην επιστημονική του οικογένεια και τον ευχαριστώ για τις πολύτιμες και καθοριστικές για τη δουλειά μου συμβουλές.

Ιδιαίτερος θα ήθελα να ευχαριστήσω την Άννα Τσαπάρα. Ό,τι κι αν πω για την Άννα λίγο θα είναι. Είναι ο άνθρωπος για όλες τις δουλειές, με αστείρευτη υπομονή, που όσο κουρασμένη ή εκνευρισμένη να είναι θα σε βοηθήσει όσο καλύτερα μπορεί. Χωρίς αυτήν δεν ξέρω πώς θα επιβίωνε το εργαστήριο αυτό. Ενδιαφέρθηκε για μένα από την πρώτη κιόλας στιγμή και πραγματικά της εύχομαι μέσα από την καρδιά μου να είναι ευτυχισμένη.

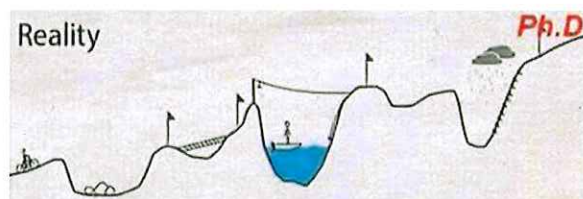
Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τον κ. Σουρβίνο Γεώργιο, τον κ. Καρδάση Δημήτρη, και τις κυρίες Παπακωνσταντή Ευαγγελία και Κρετσόβαλη Ανδρονίκη, για τις συμβουλές και για την κριτική μελέτη της διατριβής μου.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που εργάζονταν στο δικό μας εργαστήριο ή σε γειτονικά και μοιράστηκαν μαζί μου αγωνίες, απογοητεύσεις και χαρές, παράπονα και γνώσεις και με βοήθησαν σε επιστημονικά ή πρακτικά θέματα. Δεν θα τους ονοματίσω γιατί σίγουρα θα ξεχάσω κάποιον..

Ένα ιδιαίτερο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει επίσης στον καθηγητή κ. Florian Lang, ο οποίος με υποδέχτηκε στο εργαστήριό του στη Γερμανία κατά το 3ο έτος της διατριβής μου. Πάντα ενθουσιώδης στα καινούρια αποτελέσματα που του παρουσίαζα, με εμπιστεύτηκε, μου ανέθεσε νέες αρμοδιότητες και με άφησε ελεύθερη να πειραματιστώ σε καινούρια μονοπάτια και επιστημονικούς χώρους. Δεν θα ξεχάσω ποτέ τη φιλοξενία του και το ενδιαφέρον που έδειξε για το μέλλον μου και την επαγγελματική μου πορεία.

Τέλος, δεν μπορώ να μην αναφερθώ σε μερικά ακόμα άτομα που ομόρφυναν τη ζωή μου κυρίως εκτός εργαστηρίου και έκαναν την παραμονή μου στο Ηράκλειο όσο πιο γλυκιά θα μπορούσε να είναι. Μοιραστήκαμε μέρες αξέχαστες, συγκινήσεις, μυστικά, καρδιοχτύπια, γέλια και κλάματα, στιγμές μοναδικές. Χαίρομαι πολύ που αν και νιώθω την ανάγκη να γράψω αυτά τα λόγια δεν είμαι αναγκασμένη να τους αποχαιρετήσω, γιατί η χιλιομετρική απόσταση που θα με χωρίζει από τα άτομα αυτά δεν έχει καμία σημασία. Πάντα θα κατέχουν μία από τις σημαντικότερες θέσεις στην καρδιά μου και πάντα θα επικοινωνούμε μεταξύ μας με τον δικό μας μυστικό και μοναδικό τρόπο. “Εχταγή” μου σε αγαπά..

Η παρούσα εργασία είναι αφιερωμένη στους γονείς μου και τη γιαγιά μου.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. Περίληψη (Σελίδα 12)
Abstract (Σελίδα 15)

B. Σκοπός της μελέτης (Σελίδα 18)

Γ. Εισαγωγή

1. Χρωματίνη - Ιστονες - Επιγενετική (Σελίδα 20)

A. Μεθυλίωση Ιστονών και Δομή Χρωματίνης
Μεθυλίωση Ιστονών

B. Η αναστρέψιμη φύση της μεθυλίωσης των ιστονών

Η οικογένεια των απομεθυλασών που περιέχουν την περιοχή Jumonji (Jumonji-domain-containing demethylases)

Καταλυτικός Μηχανισμός και Υποστρώματα δράσης για τις απομεθυλάσες της οικογένειας JmjC

Μεθυλίωση και Απομεθυλίωση των Ιστονών και Καρκίνος

Οι απομεθυλάσες των ιστονών ως θεραπευτικοί στόχοι - Αναστολείς των απομεθυλασών της οικογένειας JmjC

2. Ο κώδικας των ιστονών και η επιγενετική ρύθμιση από τις πρωτεΐνες Polycomb (Σελίδα 31)

i) Πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1 (polycomb repressive complex 1, PRC1).

Κανονικά και Μη-κανονικά PRC1 σύμπλοκα

ii) Πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2)

Πρωτεΐνες PcG: επιγενετικά ογκογονίδια - μεταλλάξεις και απαισιόφες του PRC2 συμπλόκου στον καρκίνο

Η πρωτεΐνη Polycomb BMI1

Η πρωτεΐνη Polycomb EZH2

Υπερέκφραση της EZH2 στον καρκίνο του προστάτη - miRNAs

3. Διαφορετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για απομεθυλάσες ιστονών κατά την ογκογένεση - Το γονίδιο KDM2B (Σελίδα 41)

Οι απομεθυλάσες ιστονών κωδικοποιούνται από γονίδια που είναι στόχοι ενσωμάτωσης προ-ϊών. Οι όγκοι που προκαλούνται είναι αποτέλεσμα της ένθεσης του ρετροϊού στην αλληλουχία των γονιδίων-στόχων

KDM2B και PRC1: Δύο αντίθετοι "παίχτες" της επιγενετικής ρύθμισης

NDY1/KDM2B and NDY2/KDM2A

Οικογένεια KDM2 - Μοριακός Χαρακτηρισμός των NDY1 και NDY2

Βιολογικές λειτουργίες της KDM2B

Η KDM2B καταστέλλει την κυτταρική γήρανση (cell senescence) και προάγει τον πολλαπλασιασμό, την αθανατοποίηση και τη μετανάστευση των κυττάρων

-Ο μοριακός μηχανισμός της κυτταρικής γήρανσης και ο ρόλος της KDM2B

Η KDM2B καταστέλλει την έκφραση του γονιδιακού τύπου Ink4a-Arf-Ink4b

Η KDM2B αναστέλλει την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HeLa κυττάρων μέσω

JmjC-εξαρτώμενου και μη-JmjC-εξαρτώμενου μηχανισμού

Η KDM2B εμποδίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων

Η KDM2B αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή του επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων

Η KDM2B/NDY1 δρα είτε ως ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο

Ο πολύπλευρος ρόλος της KDM2B σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο

KDM2B και αιματολογικοί καρκίνοι

KDM2B και γυναικολογικοί καρκίνοι

KDM2B στον καρκίνο του παγκρέατος και του στομάχου

Ρύθμιση των κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον καρκίνο από την KDM2B

Η KDM2B ως πιθανός θεραπευτικός αντι-καρκινικός στόχος

Συμπεράσματα για την KDM2B

4. Κυτταροσκελετός (Σελίδα 61)

Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων

Τα ενδιάμεσα ινίδια - νημάτια

Ινίδια Ακτίνης - Μικροϊνίδια

Κυτταροσκελετός και EMT

Οικογένειες πρωτεϊνών που συνδέονται και ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης κατά την

EMT

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B (Σελίδα 73)

i) Οι πρωτεΐνες Rho

Η υπο-ομάδα των RhoA, RhoB, RhoC

Μετα-μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων RhoA, RhoB και RhoC από miRNAs

Rho GTPάσες και κυτταροσκελετός

Rho GTPάσες, κυτταρική μετακίνηση και μετανάστευση των κυττάρων

Rho GTPάσες πολλαπλασιασμός των κυττάρων και αγγειογένεση

Rho GTPάσες και Καρκίνος

ii) Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι FAK/PI3K/Rac1/AKT/SGK1

Κινάση Εστιακής Προσκόλλησης, FAK

Κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3 PI3K

Η κινάση AKT

Η κινάση σερίνης/θρεονίνης SGK1

6. Επιθηλιακά και Μεσεγγυματικά κύτταρα (Σελίδα 91)

Επιθηλιο-μεσεγγυματική μετατροπή (epithelial mesenchymal transition, EMT)

Ορισμός και ιστορική αναδρομή

EMT κατά την φυσιολογική ανάπτυξη

Μοριακά δίκτυα που ρυθμίζουν την EMT

EMT και Καρκίνος

Partial EMT: συσχετισμός με την επούλωση πληγών (Wound Healing)

7. Μόρια Διακυτταρικής Προσκόλλησης (Σελίδα 98)

Το γονίδιο της E-Καδερίνης (CDH1)

Ο ρόλος της E-καδερίνης στα φυσιολογικά κύτταρα

Ο ρόλος της E-καδερίνης στα καρκινικά κύτταρα

Παράγοντες που επηρεάζουν την απώλεια της έκφρασης της E-καδερίνης στην ογκογενετική διαδικασία -

Απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της E-καδερίνης στον καρκίνο

E-καδερίνη και μικρές Rho GTPάσες

Το γονίδιο της N-καδερίνης

Πρωτεΐνη Οκλουδίνης ZO-1

Δ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ (Σελίδα 108)

1. Υλικά και Αντιδραστήρια

2. Μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες

Κατάψυξη και Απόψυξη των Κυττάρων

Αναπαραγωγή ανασυνδιασμένων ιών και επιμόλυνση των κυττάρων

Απομόνωση RNA με το αντιδραστήριο TRizol

Φωτομέτρηση του RNA

Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA)- Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής (reverse transcription)

Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR)

Ποσοτική PCR με τη χρήση SYBR Green I

Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών πρωτεϊνών

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου υπό συνθήκες αποδιάταξης παρουσία

SDS (SDS-PAGE)

Προετοιμασία δειγμάτων

Προετοιμασία πηκτώματος

Ηλεκτροφόρηση

Ανοσοαποτύπωση - Western Blot

Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (western blot)

κατά Towbin et al. 1979

Αντιστρεπτή χρώση της μεμβράνης με Ponceau S

Διαδικασία Ανοσοανίχνευσης

Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (Stripping)

Ανοσοφθορισμός

Προετοιμασία καλυπτρίδων
Άμεσος Ανοσοφθορισμός - Χρώση Ροδαμίνης/Φαλλοϊδίνης
Έμμεσος Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)
Κατακρήμνιση της ενεργής Rho-GTP πρωτεΐνης από κυτταρικό εκχύλισμα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης GST-RBD (GST-RBD Rhotekin assay)
Προσδιορισμός της ενεργοποίησης των μικρών RhoGTPασών πρωτεϊνών, RhoA και RhoB
Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Cell proliferation)
Δοκιμασία Τραυματισμού Μονοστοιβάδας- Πείραμα Επούλωσης Πληγής (Scratch Wound Healing Assay)
Προσδιορισμός Απορρόφησης Ασβεστίου- Ca²⁺ measurements- SOCE

E. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (Σελίδα 138)

Η απομεθυλάση Ιστονών KDM2B στις καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη DU-145 και παχέος εντέρου HCT-116

Έκφραση του γονιδίου KDM2B σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές

i. Καρκινική κυτταρική σειρά DU-145, ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη

Αποσιώπηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145

Το γονίδιο KDM2B είναι λειτουργικά ενεργό στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 και ρυθμίζει την έκφραση Polycomb πρωτεϊνών

Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης, E-καδερίνης και ZO-1

Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και τις μικρές Rho GTPάσες

Η KDM2B ρυθμίζει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145

Το γονίδιο KDM2B ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες FAK και PI3K που ελέγχουν την κινητικότητα των κυττάρων

Το γονίδιο KDM2B και οι κινάσες προ-επιβίωσης και πολλαπλασιασμού AKT και SGK1

Η απομεθυλάση KDM2B και η ομοιόσταση του κυτοσολικού ασβεστίου

ii. Καρκινική κυτταρική σειρά HCT-116, ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου

Αποσιώπηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116

Το γονίδιο KDM2B είναι λειτουργικά ενεργό στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 και ρυθμίζει την έκφραση Polycomb πρωτεϊνών

Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των δεικτών της επιθηλιακής-μεσεγγυματικής μετάβασης (EMT markers) E-καδερίνης, ZO-1 και N-Καδερίνης

Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των μικρών Rho GTPασών, RhoA, RhoB, RhoC και Rac1

Η KDM2B και το σηματοδοτικό μονοπάτι FAK/PI3K στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116

Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει καίρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και της EMT

ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ (Σελίδα 191)

Z. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - HIGHLIGHTS (Σελίδα 202)

Η. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΙΔΕΕΣ - ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (Σελίδα 203)

Θ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (Σελίδα 206)

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: 1. Χρωματίνη- Ιστόνες- Επιγενετική,

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: 2. Ο κώδικας των ιστονών και η επιγενετική ρύθμιση από τις πρωτεΐνες Polycomb,

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: 3. Διαφορετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για απομεθυλάσες ιστονών κατά την ογκογένεση- Το γονίδιο KDM2B

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: 4. Κυτταροσκελετός

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: 5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, i) Οι πρωτεΐνες Rho

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: 5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, ii) Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι FAK/PI3K/Rac1/AKT/SGK1

Βιβλιογραφία Κεφαλαίων: 6. Επιθηλιακά και Μεσεγχυματικά κύτταρα, Επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και 7. Μόρια Διακυτταρικής Προσκόλλησης
Βιβλιογραφία Κεφαλαίων: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος δεν οφείλεται μόνο σε γενετικά αίτια. Μη-γενετικές κληρονομικές αλλαγές που επηρεάζουν την δομή της χρωματίνης και την έκφραση των γονιδίων, μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου. Μέχρι τώρα, έρευνες δείχνουν ότι αλλαγές στους ρυθμιστές της χρωματίνης, όπως είναι μεθυλοτρανσφεράσες και οι απομεθυλάσες των ιστονών, μπορούν να απορρυθμίσουν τις λειτουργίες του κυτταροσκελετού και της διακυτταρικής προσκόλλησης, καθώς και να συμμετάσχουν στη διαδικασία της μετάστασης. Στον καρκίνο, πολλές φυσιολογικές κυτταρικές διαδικασίες μεταβάλλονται, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη δυνατότητα ενισχυμένης επιβίωσης και το διαφοροποιημένο κυτταρικό σχήμα. Η ελαττωματική κυτταρική μορφογένεση παρέχει στα καρκινικά κύτταρα τα χαρακτηριστικά εκείνα που τους προσδίδουν αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα και διηθητικότητα, χαρακτηριστικά απαραίτητα για την εξέλιξη της νόσου. Κατά τη μεταστατική διαδικασία, τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητα τους και τη διακυτταρική προσκόλληση και αποκτούν μεσεγχαυματικά χαρακτηριστικά, σε μια διαδικασία που ονομάζεται επιθηλιακή- μεσεγχαυματική μετάβαση (EMT). Κατά την EMT, παρατηρείται μία δραματική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, η οποία συνοδεύεται από το σχηματισμό μεμβρανικών προεξοχών.

Πολλά ευρήματα μέχρι στιγμής, υποδηλώνουν ότι ο κυτταροσκελετός της ακτίνης ρυθμίζεται από διάφορους επιγενετικούς μηχανισμούς. Επιπλέον, αλλοιώσεις των ρυθμιστών της χρωματίνης έχουν συνδεθεί με απορρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών του κυττάρου. Ωστόσο, οι λεπτομερείς μηχανισμοί πίσω από αυτές τις διαδικασίες δεν είναι ευρέως γνωστοί. Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο η ρύθμιση της χρωματίνης και οι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν την εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου. Για το λόγο αυτό, επικεντρωθήκαμε στην επιγενετική ρύθμιση ενός από τα κυριότερα κυτταρικά συστήματα που εμπλέκονται στη μεταστατική διαδικασία, τον κυτταροσκελετό. Η βασική μας υπόθεση είναι ότι, στον καρκίνο, οι επιγενετικές αλλοιώσεις συχνά οδηγούν στην απορρύθμιση των μηχανισμών που διατηρούν την φυσιολογική οργάνωση και λειτουργία του κυτταροσκελετού, γεγονός που με τη σειρά του προάγει την κινητικότητα και την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων.

Προκειμένου να διασαφηνίσουμε την υπόθεσή μας, εξετάσαμε την επίδραση του ρυθμιστή της χρωματίνης KDM2B. Το γονίδιο KDM2B κωδικοποιεί για μία ειδική απομεθυλάση ιστονών που στοχεύει τη τριμεθυλιωμένη λυσίνη K4 και τη διμεθυλιωμένη λυσίνη K36 της ιστόνης H3 (H3K4me3 και H3K36me2), σημάδια που οδηγούν σε μεταγραφική καταστολή. Απομονώθηκε σε μία μελέτη για προσδιορισμό νέων ογκογονιδίων, έπειτα από πρόκληση μεταλλαξογένεσης μέσω ένθεσης ρετροϊών στο γονιδίωμα τρωκτικών. Η λειτουργία της εξαρτάται από την περιοχή CxxC-ZF της αλληλουχίας της, η οποία διαμεσολαβεί τη δέσμευσή της σε μη μεθυλιωμένες CpG νησίδες κατά μήκος όλου του γονιδιώματος. Εκτοπική έκφραση της KDM2B οδηγεί τους εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικών (MEFs) σε αθανатоποίηση παρακάμπτοντας τη διαδικασία της κυτταρικής γήρανσης (senescence), μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού κατά τον οποίο συνεργάζονται τα σύμπλοκα καταστολής γονιδίων PRC. Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί στην καταστολή του γονιδιακού τόπου *Ink4a-Arf-Ink4b* και περιλαμβάνει τη δράση της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2, που είναι μέλος του PRC2 συμπλόκου και καταλύει τη δι- και την τρι-μεθυλίωση της λυσίνης K27 (H3K27), σημάδι που αναγνωρίζεται από το PRC1 σύμπλοκο, το οποίο περιλαμβάνει την KDM2B.

Στη μελέτη μας, εστιάζοντας στο ρόλο του επιγενετικού παράγοντα KDM2B, αποσαφηνίσαμε το ρόλο του στην επιγενετική ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, τη διακυτταρική προσκόλληση, την κυτταρική ανάπτυξη, την κινητικότητα και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145 και των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου HCT-116. Ειδικότερα, στις κυτταρικές αυτές σειρές, οι οποίες εκφράζουν είτε ένα ειδικό shKDM2B

έναντι της KDM2B είτε υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο, βρήκαμε ότι η απομεθυλάση αυτή των ιστονών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των κυττάρων και οδηγεί στη διαφορετική έκφραση αρκετών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού, τη διακυτταρική προσκόλληση και την ομοιόσταση του Ca^{2+} . Συγκεκριμένα, η KDM2B εκφράζεται λειτουργικά και στις δύο κυτταρικές σειρές και ενεργοποιείται από τον FGF-2. Επιπλέον, ρυθμίζει τις πρωτεΐνες των PRC συμπλόκων EZH2 και BMI1, αυξάνοντας την έκφρασή τους τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης έπειτα από την υπερέκφραση της, ενώ αντίθετα οδηγεί στη μείωση των επιπέδων τους μετά την αποσιώπησή της. Η αποσιώπηση της KDM2B προκάλεσε ισχυρή αύξηση της έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών E-Καδερίνης και ZO-1, ενώ η υπερέκφραση της KDM2B μείωσε τα επίπεδά τους. Αντίθετο πρότυπο έκφρασης παρουσίασε ο μεσεγχυματικός δείκτης N-Καδερίνη, υποδεικνύοντας τον έλεγχο της EMT από την KDM2B. Αυτά τα αποτελέσματα καθιερώνουν έναν σαφή λειτουργικό ρόλο του επιγενετικού παράγοντα KDM2B στη ρύθμιση της EMT στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου και περαιτέρω υποστηρίζουν τον ογκογονικό ρόλο αυτής της απομεθυλάσης των ιστονών σε διάφορους όγκους. Επίσης παρατηρήσαμε μία σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της οικογένειας των Rho GTPασών. Ειδικότερα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των RhoA, RhoB και RhoC μειώθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση την KDM2B, ενώ και οι τρεις μικρές GTPάσες αυξήθηκαν στους κυτταρικούς κλώνους DU-145 και HCT-116 που υπερεκφράζουν KDM2B. Ενώ τα επίπεδα μεταγραφής των τριών μικρών GTPασών παρέμειναν αμετάβλητα, η δραστηριότητα των RhoA και RhoB ελαττώθηκε στους κλώνους με αποσιωπημένη της έκφραση της KDM2B ενώ αυξήθηκε στους κυτταρικούς κλώνους που υπερεκφράζουν KDM2B. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα επίπεδα της Rac1 GTPάσης εμφάνισαν αντίθετο πρότυπο έκφρασης από αυτή των μικρών Rho GTPασών, όντας αυξημένα στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο τον επιγενετικό παράγοντα και μειωμένα στα κύτταρα με υπερεκφρασμένη την KDM2B. Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης έγινε επίσης εμφανής, με σχηματισμό ινιδίων του στρες σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B. Η αναδιοργάνωση αυτή δεν πραγματοποιήθηκε παρουσία της τρανσφεράσης C3 του αναστολέα των Rho. Επιπλέον, κύτταρα DU-145 που υπερεκφράζουν την KDM2B εμφάνισαν αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα, η οποία μειώθηκε παρουσία του αναστολέα της τρανσφεράσης C3. Η επιβράδυνση της κυτταρικής μετανάστευσης που παρατηρήθηκε σε κύτταρα με αποσιωπημένη KDM2B, ενισχύθηκε ακόμα παραπάνω όταν επωάστηκαν με τον αναστολέα αυτό, υποδηλώνοντας συμμετοχή σηματοδότησης των Rho-GTPασών στη διαδικασία της μετανάστευσης. Εκτός από τη σηματοδότηση μέσω των Rho-GTPασών, αναλύσαμε περαιτέρω εάν η KDM2B μπορεί να ελέγξει πρόσθετους μηχανισμούς που ρυθμίζουν την αναδιοργάνωση της ακτίνης, την κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα. Για το λόγο αυτό, εστίασαμε στο μεταβολικό μονοπάτι σηματοδότησης FAK/PI3K και αναλύσαμε τον υποκείμενο μηχανισμό κατά την αποσιώπηση ή/και την υπερέκφραση της KDM2B. Η υπερέκφραση ή η σίγηση της απομεθυλάσης ελέγχει τη δραστηριότητα της κινάσης FAK στα κύτταρα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζει τη γονιδιακή μεταγραφή ή την πρωτεϊνική έκφραση αυτής της κινάσης. Μετά την υπερέκφραση της KDM2B σε κύτταρα DU-145, παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη μετανάστευση των κυττάρων αυτών, η οποία αναστάλη όταν τα κύτταρα αυτά επωάστηκαν με τον αναστολέα της φωσφοϊνσιτίνης-3 κινάσης (PI3K) LY294002, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή του FAK/PI3K σηματοδοτικού μηχανισμού στη διαδικασία της μετανάστευσης. Σε συμφωνία με αυτό, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της υπομονάδας p85-PI3K αυξήθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση της KDM2B, ενώ το αντίθετο έγινε εμφανές στα κύτταρα με αποσιωπημένο το εν λόγω γονίδιο. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση και η ενεργοποίηση των μορίων καθοδικά των FAK/PI3K, AKT και SGK1 δεν παρουσίασαν κάποια μεταβολή. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων DU-145 παρέμεινε ανεπηρέαστος από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση της KDM2B, μια παρατήρηση που συνάδει με τα παρατηρούμενα αμετάβλητα επίπεδα έκφρασης και

ενεργοποίησης των κινασών AKT και SGK1. Από τα αποτελέσματα αυτά, προκύπτουν νέοι μοριακοί στόχοι (FAK και PI3K) και αποκαλύπτεται ένας νέος λειτουργικός ρόλος της KDM2B στη ρύθμιση της ενεργοποίησης και της σηματοδότησης μέσω FAK/PI3K. Τέλος, εξετάσαμε και την επίδραση της KDM2B στην ομοιόσταση του Ca^{2+} . Υπερέκφραση της KDM2B στα κύτταρα DU-145 οδήγησε σε αύξηση των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων *Orai1* και *Stim1*, ενώ αντίθετα μειώθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση του γονιδίου. Επιπλέον σημαντική ήταν και η αλλαγή στην απελευθέρωση του ασβεστίου από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο της KDM2B σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της μελέτης μας, καθιερώνουν για πρώτη φορά μια σαφή λειτουργική σχέση μεταξύ του επιγενετικού παράγοντα KDM2B και της ρύθμισης της διακυτταρικής προσκόλλησης των κυττάρων, της σηματοδότησης μέσω Rho-GTPασών, της σηματοδότησης μέσω των κινασών FAK/PI3K και της ομοιοστασίας του Ca^{2+} , που με τη σειρά τους ελέγχουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τη μετανάστευση των κυττάρων. Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι στα καρκινικά κύτταρα, οι ρυθμιστές της χρωματίνης μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της ογκογένεσης με τον έλεγχο της έκφρασης και της λειτουργίας γονιδίων που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό, τη διακυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων. Διασαφηνίζοντας έτσι τον ρόλο της KDM2B στην επιγενετική ρύθμιση του κυτταροσκελετού, καθιερώσαμε μία σαφή μηχανιστική σύνδεση του πώς η επιγενετική ρύθμιση ελέγχει την δομή και λειτουργία του κυτταροσκελετού και πώς οι μεταβολές στους επιγενετικούς παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε απορυθμισμένες κυτταροσκελετικές λειτουργίες και να επηρεάσουν βασικές πτυχές της κυτταρικής φυσιολογίας.

Από όλα τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη μελέτη είναι ιδιαίτερα καινοτόμος, καθώς αποτελεί την πρώτη εστιασμένη προσπάθεια για την αποσαφήνιση της ρύθμισης μεταξύ χρωματίνης και κυτταροσκελετού. Χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το μηχανισμό ρύθμισης του κυτταροσκελετού από την KDM2B, η μελέτη αυτή απαντά σε θεμελιώδη ερωτήματα και προσθέτει σημαντικά εργαλεία και τεχνογνωσία στον τομέα αυτό. Μελλοντικές μελέτες σχετικά με τη ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών στη νόσο αυτή θα επαναπροσδιορίσουν την κατανόησή μας για το καρκινικό κύτταρο και θα αποκαλύψουν νέους πιθανούς φαρμακολογικούς στόχους.

ABSTRACT

To fit within the confines of the cell nucleus, DNA wraps around histones and folds to assume a higher order condensed structure termed chromatin. However, this condensation hinders important processes, such as transcription, replication, repair or recombination. Various covalent modifications on the histone proteins or the DNA itself, together with the active re-positioning of nucleosomes, regulate accessibility to the DNA. These modifications are functionally linked and cross-regulated, and their combination forms a code for the interpretation of the genetic information. Some of these modifications are transferred from mother to daughter cells or even from one generation of a multicellular organism to the next. These heritable alterations in chromatin that are not accompanied by changes in the DNA sequence are termed epigenetic, and are necessary for the temporal and spatial interpretation of the genome. Alterations in chromatin structure impact fundamental cellular processes and play a central role in human disease, and, in particular, cancer.

In cancer, many physiological cellular activities are altered, resulting in uncontrolled cell proliferation, unrestricted survival, and pronounced defects in cellular morphogenesis. The latter plays a central role in conferring cancer cells with the inappropriate migratory and invasive characteristics that are important for the progression of the disease. In the metastatic process, cancer cells leave the primary tumor, and are disseminated throughout the body to seed secondary tumors at distant sites. In this process, epithelial cells lose their polarity and cell-cell adhesion, and gain migratory and invasive properties, in a process termed epithelial-mesenchymal transition (EMT), which involves a dramatic reorganization of the cytoskeleton accompanied by the formation of membrane protrusions required for invasive growth.

Several lines of evidence suggest that the cytoskeleton is regulated by epigenetic mechanisms and alterations in chromatin regulators have now been linked to deregulated cytoskeletal functions. However, the detailed mechanisms behind these processes are only now beginning to emerge. The long term goal of this proposal will be the understanding of how chromatin regulation and epigenetic mechanisms influence the onset and progression of cancer. For this we will focus on the epigenetic regulation of one of the main cellular machineries involved in the metastatic process, the cytoskeleton. Our central hypothesis is that, in cancer, epigenetic alterations frequently result in the deregulation of the mechanisms maintaining normal cytoskeleton organization and function, which in turn promotes motility and invasiveness. To address this hypothesis, it is important to elucidate the chromatin factors that are involved in the regulation of the cytoskeleton, to decipher the epigenetic mechanisms by which these critical cellular factors regulate the expression of cytoskeleton genes, and to establish how these mechanisms contribute to tumor survival, invasiveness and migration.

Actin cytoskeleton reorganization and signaling play an essential role in promoting cell movement, changing cell shape and establishing intracellular adhesion, and are thus implicated in malignant cell growth, transformation and invasion. Actin remodelling is accomplished by assembling multi-molecular complexes of structural and regulatory proteins at specific cell contact sites. Subsequently, actin filaments undergo elongation, branching, bundling, and depolymerization, leading to assembled superstructures. Actin-binding proteins are the mediators for these processes. The regulation of actin assembly and disassembly is under the control of complex signaling systems that link external signals to remodelling events, which result in altered cellular activities that adapt cell shape and/or behavior to suit new environmental conditions. During cancer progression key actin regulators, such as the members of the Rho GTPase family, become deregulated.

To elucidate our hypothesis, we examined the effect of the chromatin regulator NDY1/KDM2B. The histone demethylase NDY1/KDM2B was isolated in a screen for novel oncogenes using retroviral insertion mutagenesis in rodents in 2008. KDM2B is downregulated during

senescence in mouse embryonic fibroblasts (MEFs), while ectopic expression of KDM2B enables MEFs to bypass replicative senescence by co-operating with PRC complexes in the repression the *Ink4a-Arf-Ink4b* locus. KDM2B represses the *Ink4a-Arf-Ink4b* locus by an elaborate mechanism. On the one hand, KDM2B expression counteracts the senescence-associated downregulation of EZH2, resulting in elevated global H3K27me3 levels. Increased trimethylation of H3K27 is also observed specifically in the *Ink4a-Arf-Ink4b* locus and results in the recruitment of PRC1 to the locus. In addition, KDM2B is specifically recruited to the *Ink4a-Arf-Ink4b* locus via a PRC1-type complex and it removes local H3K36me2 and H3K4me3 marks, marks that lead to transcriptional repression. KDM2B accelerates cell cycle progression and suppresses cell senescence during vitamin C-induced reprogramming by repressing the *Ink4a-Arf-Ink4b* locus and has also the capacity to promote iPSC generation in a vitamin C-independent manner, by co-operating with reprogramming factors Oct4, Sox2, and Klf4. This capacity depends on its demethylase and DNA-binding activities, but is largely independent of its role in antagonizing senescence. The function of KDM2B depends on its CxxC-ZF domain, which mediates its genome-wide binding to CpG islands. The histone demethylase KDM2B is an epigenetic factor with oncogenic properties that is regulated by the basic fibroblasts growth factor (FGF-2 or bFGF). FGF-2 is one of the 23 members of the FGF growth factor family. FGF-2 is produced by a variety of cell types and binds to the FGF receptors (primarily FGFR-1 and -2). In human cancer, FGF-2 is produced by the tumor cells or by the surrounding stroma and promotes tumor cell proliferation, migration, and invasiveness, as well as angiogenesis and the cycling of cancer stem cells. It has recently been shown that KDM2B co-operates with Polycomb Group proteins to promote cell migration and angiogenesis in tumors. The Polycomb group (PcG) proteins mediate epigenetic inheritance of silent and active chromatin states, are essential for normal development, and are implicated in cell proliferation, stem cell identity and cancer, genomic imprinting and X-inactivation. Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) contains the PcG proteins EZH2, which catalyzes the tri- and di- methylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27). The H3K27me3 mark is specifically recognized by Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1). The core of PRC1, of which many variants are thought to exist, contains BMI1 and KDM2B, polyhomeotic (Ph) and RING/RNF-type proteins. The RING/RNF proteins have ubiquitin E3 ligase activity that targets K119 of histone H2A. Ubiquitination of H2A appears to be a critical event in gene silencing.

In our study, focusing on the role of KDM2B, we addressed its role in the epigenetic regulation of actin cytoskeleton signaling, cell-cell adhesion, cell growth, motility and migration of prostate and colon tumor cells and we elucidated the underlying mechanism. We have found that this histone demethylase play an important role in cell migration and result in major alterations of several proteins involved in cytoskeleton regulation, cell-cell adhesion and Ca²⁺ homeostasis. We report here that KDM2B is functionally expressed in DU-145 prostate and HCT-116 colon cancer cells and it is activated by FGF-2. KDM2B regulates the PRC proteins EZH2 and BMI1, resulting in the up-regulation or down-regulation of gene transcription and protein expression of the protein upon overexpression or knockdown of KDM2B, respectively. Also, KDM2B knockdown induced potent up-regulation of gene transcription and protein expression of the epithelial markers E-Cadherin and ZO-1, while KDM2B overexpression down-regulated the levels of both markers, suggesting control of cell adhesion by KDM2B. The opposite was obvious for the mesenchymal marker N-Cadherin in colon cancer cells. Knockdown of this epigenetic factor induced potent down-regulation of the protein levels of N-Cadherin and on the other hand, KDM2B overexpression upregulated the mesenchymal marker, suggesting control of EMT by KDM2B. These results establish a clear functional role of the epigenetic factor KDM2B in the regulation of EMT in colon tumor cells and further support the recently postulated oncogenic role of this histone demethylase in various tumors. In addition, RhoA, RhoB and RhoC protein levels diminished upon KDM2B-

knockdown, while all three small GTPases became upregulated in KDM2B-overexpressing DU-145 and HCT-116 cell clones. While the transcription levels of the three small GTPases remained unchanged, RhoA and RhoB activity were diminished upon KDM2B-knockdown and upregulated in KDM2B-overexpressing cell clones. Interestingly, Rac1 GTPase levels increased upon KDM2B-knockdown and diminished in KDM2B-overexpressing HCT-116 colon tumor- and DU-145 prostate cancer cells. In accordance, actin reorganization with formation of stress fibers became evident in KDM2B-overexpressing cells and abolished in the presence of the Rho inhibitor C3 transferase. Furthermore, DU-145 cell migration was significantly enhanced in KDM2B overexpressing cells and abolished in C3-pretreated cells. Conversely, the retardation of cell migration observed in KDM2B knockdown cells was enhanced in C3-pretreated cells. Besides Rho-GTPases signaling, we have further analyzed whether KDM2B may as well control additional signaling effectors that regulate actin reorganization, cell growth and motility. For this reason, we have focused on the FAK/PI3K metabolic pathway and we analyzed the underlying mechanism upon silencing and/or overexpression of KDM2B. KDM2B overexpression or silencing controls the activity of FAK in DU-145 prostate- and HCT-116 colon-tumor cells without affecting gene transcription and protein expression of this kinase. Upon KDM2B overexpression in DU-145 cells, significantly enhanced migration was observed, which was abolished in cells pretreated by the specific phosphoinositide-3 kinase (PI3K) inhibitor LY294002, implying involvement of FAK/PI3K signaling in the migration process. In line with this, the p85-PI3K-subunit was downregulated upon knockdown of KDM2B in DU-145 cells, while the opposite effect became evident in KDM2B-overexpressing cells. On the other hand, expression and activation of the FAK/PI3K-downstream acting pro-survival kinases AKT and SGK1 were not changed. Short-term proliferation of DU-145 cells remained unaffected upon overexpression or knockdown of KDM2B, an observation being in line with the observed, unaltered expression and activation profiles of the pro-survival kinases AKT and SGK1. These results uncover novel molecular targets namely FAK and PI3K and revealed a novel functional role of KDM2B in regulating the activation of the FAK/PI3K signaling in prostate and colon cancer cells that participates in the control of cell motility without affecting cell proliferation. Last, we examined the effect of KDM2B in Ca²⁺ homeostasis. KDM2B overexpression in DU-145 cells, induced potent up-regulation of gene transcription of Orai1 and Stim1 and regulated Store Operated Calcium Entry (SOCE). These results revealed a novel functional role of KDM2B in regulating FAK/PI3K signaling and Ca²⁺ homeostasis in prostate cancer cells.

The results of this study, establish for the first time a clear functional link between the epigenetic factor KDM2B and the regulation of cell-cell adhesion, Rho-GTPases signaling, FAK/PI3K signaling and Ca²⁺ homeostasis that in turn controls actin cytoskeleton reorganization and cell migration. The chromatin factor KDM2B regulates cell motility via four at least different metabolic pathways; though actin cytoskeleton organization and RhoGTPases signaling, FAK/PI3K pathway and Ca²⁺ entry. Our findings imply that in tumor cells, chromatin regulators may contribute to tumor growth by controlling expression and function of cytoskeletal and cell-cell adhesion genes, invasiveness and migration and establish a clear mechanistic link, how alterations in epigenetic factors may lead to deregulated cytoskeletal functions.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο καρκίνος δεν οφείλεται μόνο σε γενετικά αίτια. Μη-γενετικές κληρονομικές αλλαγές που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης και την έκφραση των γονιδίων μπορούν επίσης να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. Μέχρι τώρα, έρευνες δείχνουν ότι αλλαγές στους ρυθμιστές της χρωματίνης, όπως είναι μεθυλοτρανσφεράσες και οι απομεθυλάσες των ιστονών, μπορούν να απορρυθμίσουν τις λειτουργίες του κυτταροσκελετού και της διακυτταρικής προσκόλλησης, καθώς και να συμμετάσχουν στην διαδικασία της μετάστασης.

Ο μακροπρόθεσμος στόχος αυτής της ερευνητικής εργασίας είναι η κατανόηση του τρόπου και η διασαφήνιση του μηχανισμού με τον οποίο η ρύθμιση της χρωματίνης και οι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν την εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου. Για το σκοπό αυτό επικεντρωθήκαμε στην επιγενετική ρύθμιση του κυτταροσκελετού, ενός από τα κυριότερα κυτταρικά συστήματα που εμπλέκονται στη μεταστατική διαδικασία. Προκειμένου να υποστηρίξουμε την υπόθεσή μας, είναι σημαντικό να αναγνωριστούν οι παράγοντες της χρωματίνης που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και να δειχθεί πώς οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων του κυτταροσκελετού, την επιβίωση, την εισβολή και τη μετανάστευση των κυττάρων.

Προκειμένου να επιτύχουμε το σκοπό της μελέτης μας, επικεντρωθήκαμε στο ρόλο του επιγενετικού παράγοντα KDM2B σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (κυτταρική σειρά του προστάτη DU145, κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου HCT116) και βασιζόμενοι στην υπόθεσή μας, ότι στον καρκίνο οι επιγενετικές διαφοροποιήσεις συχνά οδηγούν στην απορρύθμιση των μηχανισμών που διατηρούν τη φυσιολογική οργάνωση και λειτουργία του κυτταροσκελετού,

- i) αναγνωρίσαμε τα βασικά γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό και τα οποία ρυθμίζονται από την απομεθυλάση των ιστονών KDM2B,
- ii) διασαφήνισαμε το μηχανισμό με τον οποίο λαμβάνει χώρα η συγκεκριμένη ρύθμιση, και
- iii) διερευνήσαμε πώς αυτοί οι μηχανισμοί συμμετέχουν στην πορεία εξέλιξης του καρκίνου.

Αναλύοντας το ρόλο της KDM2B στην επιγενετική ρύθμιση του κυτταροσκελετού στοχεύουμε στο πώς οι ρυθμιστές της απορρυθμισμένης χρωματίνης μπορούν να επηρεάσουν βασικές πτυχές της κυτταρικής φυσιολογίας. Η προσπάθειά μας να εστιάσουμε στη ρύθμιση μεταξύ χρωματίνης και κυτταροσκελετού, παρέχει τη δυνατότητα κατανόησης της συμβολής των επιγενετικών μηχανισμών στον καρκίνο και παρέχει πιθανούς νέους στόχους για αντικαρκινική θεραπεία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Χρωματίνη - Ιστόνες - Επιγενετική

Οι δραματικές φαινοτυπικές αλλαγές που επέρχονται με την καθιέρωση της διαφοροποίησης των κυττάρων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης καθώς και ο επαναπρογραμματισμός που απαιτείται για τη δημιουργία των γεννητικών κυττάρων, αν και πραγματοποιούνται απουσία αλλαγών στην ακολουθία του DNA, είναι κληρονομικές. Τέτοιες αλλαγές αναφέρονται ως επιγενετικές και είναι υπεύθυνες για μεγάλες μεταβολές στην έκφραση γονιδίων και συνεπώς για σημαντικές φαινοτυπικές μεταβολές κατά την ανάπτυξη [1]. Η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι η βασική δύναμη που οδηγεί τη λειτουργία και την ανάπτυξη των βλαστικών κυττάρων. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί συμβάλλουν επίσης στη γήρανση [2] και την ανάπτυξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου [3], της φλεγμονής [4] και των εκφυλιστικών ασθενειών [5]. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης περιλαμβάνουν την αναδιαμόρφωση και επανατοποθέτηση των νουκλεοσωμάτων, την τροποποίηση αμινοξικών καταλοίπων των ιστονών καθώς και τη μεθυλίωση του DNA [6]. Οι διεργασίες αυτές είναι λειτουργικά συνδεδεμένες και αλληλορυθμίζονται.

Το πυρηνικό DNA πακετάρεται σφιχτά σε ίνες χρωματίνης [7]. Η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα το οποίο αποτελείται από 147bp ζεύγη βάσεων DNA, τυλιγμένα γύρω από το οκταμερές των ιστονών, που αποτελείται από δύο αντίγραφα από κάθε μία από τις “ιστόνες του πυρήνα” H2A, H2B, H3 και H4 [8-10]. Οι ιστονές του πυρήνα διακρίνονται για τη “histone fold” περιοχή τους, μία περιοχή η οποία είναι υπεύθυνη για αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ των ιστονών με το DNA όσο και μεταξύ του αμινοτελικού (N-terminal) και καρβοξυτελικού (C-terminal) άκρου των ουρών των διαφόρων ιστονών μεταξύ τους. Οι ουρές των ιστονών περιέχουν θέσεις που είναι στόχοι διαφόρων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, συμπεριλαμβανομένων της φωσφορυλίωσης, ακετυλίωσης, μεθυλίωσης, ουβικουτινυλίωσης, σουμυλίωσης και ADP ριβοζυλίωσης. Οι μετα-μεταφραστικές αυτές τροποποιήσεις των ουρών των ιστονών ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση των νουκλεοσωμάτων τόσο μεταξύ τους όσο και με το συνδετικό DNA και κατευθύνουν την αναδίπλωση της χρωματίνης σε δομές υψηλότερης τάξης πολυπλοκότητας [9, 10]. Οι ίδιες τροποποιήσεις ρυθμίζουν τη σύνδεση με τη χρωματίνη διαφόρων άλλων πρωτεϊνών που δε σχετίζονται άμεσα με τις ιστονές. Ως αποτέλεσμα, ένζυμα που εμπλέκονται στη μετα-μεταφραστική τροποποίηση των ουρών των ιστονών, σε συνδυασμό με τα εξαρτώμενα από την τριφωσφορική αδενοσίνη ένζυμα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, ρυθμίζουν τόσο τη μεταγραφή όσο και άλλες εξαρτώμενες από χρωματίνη λειτουργίες. Η δέσμευση αυτών των πρωτεϊνών στη χρωματίνη διαμεσολαβείται από ειδικές περιοχές που υπάρχουν σε αυτές τις πρωτεΐνες και αναγνωρίζουν τροποποιημένα κατάλοιπα ιστονών, όπως οι chromodomains, bromodomains, plant homeodomains (PHD), WD, and Tudor περιοχές [11-13]. Η τροποποίηση των ουρών των ιστονών διαδραματίζει ένα δυναμικά λειτουργικό ρόλο, καθώς όλες οι τροποποιήσεις είναι παροδικές και αναστρέψιμες. Η πλέον πρόσφατα ανακαλυφθείσα ομάδα ενζύμων που είναι υπεύθυνη για την αναστροφή μιας τροποποίησης στις ουρές των ιστονών είναι αυτή των απομεθυλασών [14, 15].

Οι τροποποιήσεις των ιστονών ρυθμίζουν αλλά και ρυθμίζονται από άλλες τροποποιήσεις της χρωματίνης που υπάρχουν σε κοντινή ή μακρινή απόσταση [16-18] και επιπλέον, ρυθμίζουν και ρυθμίζονται και από διάφορες άλλες πυρηνικές διαδικασίες, όπως το μάτισμα του RNA [19], ο μηχανισμός RNAi [20] ή η μεταφορά του νουκλεο-κυτταροπλασματικού (nucleocytoplasmic) RNA [21]. Διαδραματίζουν επομένως, σημαντικό ρόλο στην έκφραση των γονιδίων και στη ρύθμιση άλλων εξαρτώμενων από τη χρωματίνη διεργασιών, όπως ο διπλασιασμός του DNA, ο ανασυνδιασμός και η επιδιόρθωσή του. Οι τροποποιήσεις των ιστονών επίσης αλληλεπιδρούν και με το μηχανισμό μεθυλίωσης του DNA. Ως αποτέλεσμα, οι τροποποιήσεις των ιστονών και η μεθυλίωση του DNA είναι αλληλοεξαρτώμενες [22].

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι άλλες τροποποιήσεις ιστονών συνδέονται με ενεργή και άλλες με λιγότερο ενεργή ή μη-ενεργή χρωματίνη. Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες αμφισβήτησαν την προηγούμενη άποψη δείχνοντας πως οι μέχρι προηγουμένως γνωστές κατασταλτικές τροποποιήσεις όπως η τριμεθυλιωμένη λυσίνη 9 στην ιστόνη H3 (H3K9me3) και το μεθυλιωμένο CpG DNA, σχετίζονται με ενεργή μεταγραφή όταν οι τροποποιήσεις αυτές εντοπίζονται στο σώμα ενός γονιδίου [23-27]. Προτάθηκε στη συνέχεια, ότι τα σημάδια αυτά δημιουργούνται κατά την πορεία της μεταγραφής προκειμένου να αποτραπεί η ανεπιθύμητη έναρξη της μεταγραφής από κρυφές θέσεις έναρξης εντός του σώματος του γονιδίου. Συνεπώς, η μεταγραφή φαίνεται να περιλαμβάνει μια σειρά από αλληλεπιδραστικά γεγονότα τροποποίησης της χρωματίνης που σχετίζονται με την έναρξη της μεταγραφής ή τη μεταγραφική επιμήκυνση και διαχωρίζονται τόσο χωρικά όσο και χρονικά. Αυτά τα ευρήματα κατέστησαν σαφές ότι η ερμηνεία του επιγενετικού κώδικα είναι πολυδιάστατη διαδικασία και περιλαμβάνει χωρικές και χρονικές διαστάσεις οι οποίες επιπλέον διαφέρουν και μεταξύ των διάφορων κυτταρικών τύπων.

Ο κύκλος ζωής των βλαστοκυττάρων και η διαφοροποίησή τους εξαρτώνται από την ισορροπία μεταξύ των αντίθετων δραστηριοτήτων των πρωτεϊνών της ομάδας Polycomb (PcG) και Trithorax (TrxG). Τα σύμπλοκα PcG και TrxG ανακαλύφθηκαν αρχικά στη *Drosophila* ως καταστολείς (PcG) και ενεργοποιητές (TrxG) των γονιδίων Hox. Πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι αυτά τα σύμπλοκα είναι εξελικτικά συντηρημένα μεταξύ των ειδών και διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ταυτότητα των βλαστικών κυττάρων και τη δέσμευση της γενεαλογίας τους κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Απορρύθμιση αυτών των συμπλόκων έχει συνδεθεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [28-31]. Υπάρχουν αρκετά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα καταστολής γονιδίων (PcG) εκ των οποίων δύο [το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1 - Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) και το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 2 - Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)] ήταν τα πρώτα που ανακαλύφθηκαν και έλαβαν τη μεγαλύτερη προσοχή. Η προσέλευση αμφοτέρων στα γονίδια που ανταποκρίνονται στα πολυπρωτεϊνικά αυτά σύμπλοκα μεσολαβείται από το Pleiohomeotic (PHO ή YY1), μια πρωτεΐνη δέσμευσης του DNA. Ωστόσο, η προσέλευση του PRC1 συμπλόκου ενισχύεται από τη δέσμευση ενός από τα συστατικά του (Pc) στην τριμεθυλιωμένη λυσίνη 27 της ιστόνης 3 (H3K27me3), κάτι που επιτυγχάνεται έμμεσα με τη βοήθεια του συμπλόκου PRC2 [32-34]. Τα σύμπλοκα ενεργοποίησης γονιδίων TrxG είναι αρκετά πιο ετερογενή. Οι καλύτερα μελετημένες κατασταλτικές τροποποιήσεις που επάγονται από τα σύμπλοκα PcG περιλαμβάνουν την τριμεθυλίωση της λυσίνης 27 στην ιστόνη H3 (H3K27me3) και την ουβικουτινυλίωση της λυσίνης 119 της ιστόνης H2A (H2AK119ub). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πολλά από τα γονίδια που καταστέλλονται από τα σύμπλοκα PcG στα βλαστοκύτταρα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη περιοχών στη χρωματίνη που περιέχουν τόσο κατασταλτικές (H3K27me3) όσο και ενεργοποιητικές (H3K4me3) τροποποιήσεις της μεταγραφής [35-37]. Η διαφοροποίηση σχετίζεται με την επίλυση της ισορροπίας και την ανάλυση της δυσαναλογίας μέσω της απώλειας ενός από αυτά τα σημάδια (κατασταλτικές ή ενεργοποιητικές τροποποιήσεις) [38]. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ισορροπία των συμπλόκων PcG και TrxG στα βλαστοκύτταρα δημιουργεί μια κατάσταση στην οποία τα κύτταρα είναι ικανά και έτοιμα να επιλέξουν ανάμεσα σε δύο μοίρες. Η απόφαση αφορά την απώλεια ενός από τα δύο σήματα [31].

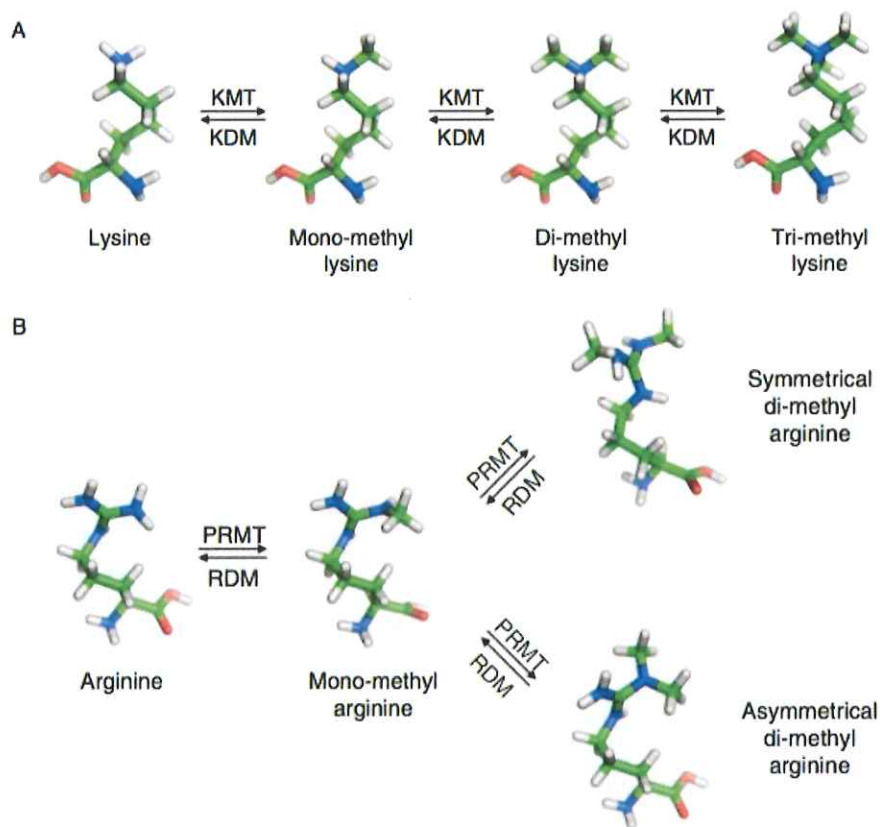
Ο μηχανισμός με τον οποίο οι επιγενετικές πληροφορίες μεταφέρονται από τη μία γενιά στην επόμενη ποικίλει ανάλογα με την πληροφορία. Στην περίπτωση της μεθυλίωσης του DNA για παράδειγμα, ο μηχανισμός έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό [39]. Ενώ ο μηχανισμός μεθυλίωσης του DNA είναι γενικά γνωστός, ο μηχανισμός με τον οποίο κληρονομούνται οι τροποποιήσεις των ιστονών δεν έχει καθοριστεί πλήρως και με την ίδια σαφήνεια και κατά καιρούς έχουν προταθεί διάφορες υποθέσεις [40, 41].

A. Μεθυλίωση Ιστονών και Δομή Χρωματίνης

Μεθυλίωση Ιστονών

Μεθυλίωση στις ιστόνες εντοπίζεται στις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξικών καταλοίπων της αργινίνης και λυσίνης. Οι πληροφορίες που κωδικοποιούνται μέσω μεθυλίωσης αναγνωρίζονται έπειτα από ειδική δέσμευση συμπλεγμάτων πρωτεϊνών στις τροποποιημένες ουρές των ιστονών. Η συσχέτιση ή μη αυτών των πρωτεϊνών με τις τροποποιημένες ουρές των ιστονών ρυθμίζει τόσο τη μορφή με την οποία συναντάται η χρωματίνη, αν δηλαδή βρίσκεται στην κατάσταση της ευχρωματίνης ή της ετεροχρωματίνης, όσο και άλλων λειτουργιών που βασίζονται στο DNA, όπως η μεταγραφή των γονιδίων, η επιδιόρθωση, η αντιγραφή και η συμπύκνωση του DNA [41, 42]. Η ιστόνη H3 μεθυλιώνεται κυρίως σε τέσσερα κατάλοιπα λυσίνης στο αμινοτελικό (N-) άκρο της ουράς (K4, K9, K27 και K36) και σε ένα εντός του πυρήνα της (K79). Επιπλέον, η ιστόνη H4 μεθυλιώνεται στην λυσίνη K20 και η ιστόνη H1 στο κατάλοιπο λυσίνης K26. Όλα αυτά τα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να είναι μονο-, δι- ή τριμεθυλιωμένα δημιουργώντας έτσι ατέλειωτους συνδυασμούς πολλαπλών εν δυνάμει σημείων μεθυλίωσης. Η μεθυλίωση στις ιστόνες δεν περιορίζεται μόνο σε κατάλοιπα λυσίνης. Οι πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης στις ουρές των ιστονών H3 (R2, R8, R17 και R26) και H4 (R3) μπορούν επίσης να υποβληθούν σε μεθυλίωση. Οι πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης μπορούν να μονομεθυλιωθούν ή να διμεθυλιωθούν με συμμετρικό ή ασύμμετρο τρόπο. Η μεθυλίωση στα κατάλοιπα λυσίνης καταλύεται από τις ειδικές για τη λυσίνη μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών (lysine methyl transferases, KMTs), οι περισσότερες από τις οποίες περιέχουν μία περιοχή SET και καταλύουν τη μεταφορά μίας ομάδας μεθυλίου από τον συμπαράγοντα S-αδενοσυλ-μεθειονίνη (S-adenosyl methionine) στην στοχευόμενη πλευρική αλυσίδα της ιστονικής λυσίνης. Η μεθυλίωση στα κατάλοιπα αργινίνης, από την άλλη πλευρά, καταλύεται από πρωτεϊνικές μεθυλοτρανσφεράσες αργινίνης (protein arginine methyltransferases, PRMTs) [41, 43-45].

Το αμινοξύ που μεθυλιώνεται και η στοιχειομετρία της μεθυλίωσης υπαγορεύουν τη συνολική δομή της χρωματίνης και το βιολογικό αποτέλεσμα. Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν να δρουν συνεργιστικά ή ανταγωνιστικά μεταξύ τους. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση και η ακετυλίωση ενός συγκεκριμένου αμινοξέος λυσίνης είναι αμοιβαία αποκλειόμενες διαδικασίες. Επιπλέον, η τροποποίηση της πλευρικής αλυσίδας μίας αργινίνης ή λυσίνης μπορεί να παρεμβάλλεται ή και να αλληλεπιδρά με την τροποποίηση ή την αναγνώριση της τροποποίησης ενός γειτονικού καταλοίπου [16, 46]. Παρομοίως, η φωσφορυλίωση καταλοίπου σερίνης ή θρεονίνης [47, 48] και ο ισομερισμός καταλοίπου προλίνης [49], μπορεί να ρυθμίζουν την αναγνώριση μιας γειτονικής τροποποίησης ιστονών από πρωτεΐνες που δεσμεύουν χρωματίνη.



Εικόνα 1: Οι διαφορετικές καταστάσεις μεθυλίωσης των καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης. (Α) Στις ιστόνες, η λυσίνη μπορεί να βρεθεί στη μονο-, δι- και τριμεθυλιωμένη μορφή. Το μεθύλιο προστίθεται από τις μεθυλτρανσφεράσες της λυσίνης (KMTs) και απομακρύνεται με τις απομεθυλάσες της λυσίνης (KDMs). (Β) Τα κατάλοιπα αργινίνης μπορούν να είναι τριών διακριτών μορφών, μονομεθυλ-αργινίνη, συμμετρική διμεθυλο-αργινίνη και ασύμμετρη διμεθυλ-αργινίνη. Οι μεθυλομάδες στην πλευρική αλυσίδα της αργινίνης προστίθενται από την πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης (PRMTs) και απομακρύνονται από τις απομεθυλάσες αργινίνης (RDMs) [50].

B. Η αναστρέψιμη φύση της μεθυλίωσης των ιστονών

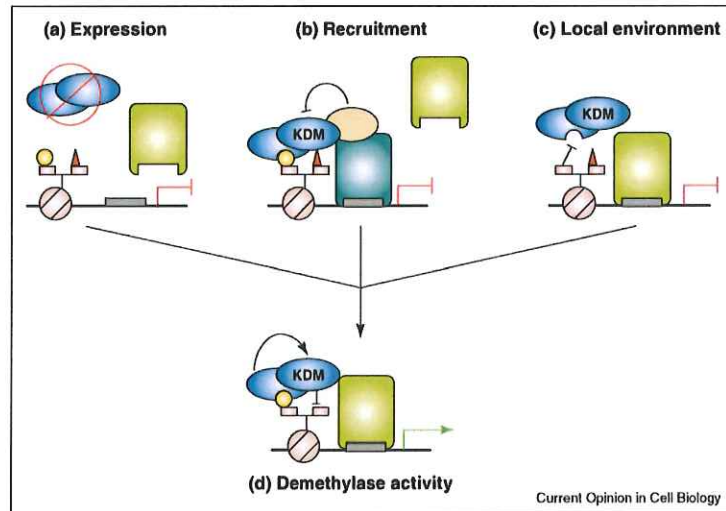
Για αρκετό καιρό υπήρχε αντιπαράθεση κατά πόσο υπάρχουν ένζυμα τα οποία είναι ικανά να καταλύσουν την απομάκρυνση των μεθυλομάδων από τις ιστόνες [51]. Σε καλλιέργειες κυττάρων θηλαστικών η αναστρεψιμότητα της μεθυλίωσης αποδείχθηκε ότι είναι μία πολύ αργή διαδικασία υποδηλώνοντας έτσι πως η μεθυλίωση των ιστονών μπορεί να είναι μη αναστρέψιμη [52-54]. Η άποψη αυτή υποστηρίχθηκε από μελέτες που έδειξαν ότι ο χρόνος ημίσειας ζωής της μεθυλίωσης ήταν περίπου ίσος με εκείνον των ιστονών και από την ιδέα ότι η σχετικά υψηλή θερμοδυναμική σταθερότητα του δεσμού N-CH₃ καθιστά ακόμα πιο δύσκολη την απομάκρυνση της μεθυλομάδας [55, 56]. Η σταθερότητα του δεσμού αυτού ταίριαζε απόλυτα και με τον προτεινόμενο ρόλο της μεθυλίωσης των καταλοίπων λυσίνης ως φορέων επιγενετικών πληροφοριών [55-57]. Ωστόσο στη συνέχεια, αποδείχθηκε ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης των ιστονών άλλαζαν ανάλογα με την έκφραση των γονιδίων με δυναμικό και αναστρέψιμο τρόπο, υποδηλώνοντας έτσι ότι θα μπορούσε να συμβαίνει ενεργή απομάκρυνση των μεθυλομάδων [58], γεγονός που θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα είτε αντικατάστασης των μεθυλιωμένων ιστονών με μη-μεθυλιωμένη ιστόνη ή ακόμα και αποτέλεσμα πρωτεολυτικής απομάκρυνσης και αποκοπής των τροποποιημένων ουρών των ιστονών [55, 56]. Ενώ από τη δεκαετία του '70, είχε αναφερθεί δραστηριότητα ικανή να απομεθυλιώνει ιστόνες, ποτέ δεν είχε εντοπιστεί το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για αυτή τη λειτουργία [56] και μόλις το 2004 ταυτοποιήθηκε η πρώτη απομεθυλάση

ιστονών. Σε μία πρωτοποριακή μελέτη αποδείχθηκε ότι η αμιδική οξειδάση LSD1/KDM1A μπορούσε να απομεθυλώσει τη λυσίνη 4 στην ιστόνη H3 σε μία εξαρτώμενη από το FAD αντίδραση, δρώντας σε μονο- και διμεθυλιωμένα υποστρώματα [59]. Δύο χρόνια αργότερα, το 2006, μία πρωτεΐνη που περιείχε JmjC περιοχή αναγνωρίστηκε επίσης ως απομεθυλάση ιστονών [60] και αργότερα το ίδιο έτος εντοπίστηκαν και άλλες απομεθυλάσες με JmjC περιοχή που στόχευαν τριμεθυλιωμένα κατάλοιπα [61-64]. Από τότε, το ρεπερτόριο της δραστηριότητας των απομεθυλασών έχει επεκταθεί σε μεγάλο βαθμό και είναι πλέον σαφές πως και οι τρεις βαθμοί μεθυλίωσης (μονο-, δι- τρι- μεθυλίωση) στα αμινοξικά κατάλοιπα των ουρών των ιστονών είναι αναστρέψιμοι και μπορούν να στοχευθούν από ένζυμα με δραστηριότητα απομεθυλάσης [40, 51]. Η πρόσφατη ανακάλυψη των απομεθυλασών λυσίνης έδειξε ότι η διατήρηση της ισορροπίας της μεθυλίωσης στις ιστόνες απαιτεί τη δράση τόσο των μεθυλοτρανσφερασών όσο και των απομεθυλασών. Η ανακάλυψη και ταυτοποίηση των απομεθυλασών ανέτρεψε την μέχρι πρότινος άποψη περί σταθερότητας και μη-αναστρέψιμης φύσης της μεθυλίωσης των ιστονών και πρότεινε ότι η τροποποίηση αυτή είναι πολύ πιο δυναμική από ό,τι είχε προηγουμένως προβλεφθεί. Αυτό, ωστόσο, δεν αποκλείει το ενδεχόμενο η μεθυλίωση των ιστονών σε συγκεκριμένα κυτταρικά περιβάλλοντα να χρησιμεύει ως “επιγενετικό σημάδι” συμβάλλοντας στην κυτταρική μνήμη. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι πολλές απομεθυλάσες έχουν λειτουργίες ανεξάρτητες από τη δραστηριότητα ως απομεθυλάση ιστονών, περιλαμβάνοντας την απομεθυλίωση υποστρωμάτων διαφορετικών από τις ιστόνες, κάτι που αποτελεί χώρο για περαιτέρω μελλοντική έρευνα [65-68].

Mark	Methylation	Demethylation	Catalytic specificity of the demethylase
H3K4	MLL1/KMT2A MLL2/KMT2B MLL3/KMT2C MLL4/KMT2D MLL5/KMT2E hSET1A/KMT2F hSET1B/KMT2G ASH1/KMT2H SET7-9/KMT7	LSD1/KDM1 JARID1A/RBP2/KDM5A JARID1B/PLU-1/KDM5B JARID1C/SMCX/KDM5C JARID1D/SMCY/KDM5D NDY1/JHDM1B/FBXL10 /KDM2B	me2/me1→me0 me3/me2/me1→me0 me3/me2/me1→me0 me3/me2→me1 me3/me2→me1 me3→me2
H3K9	SUV39H1/KMT1A SUV39H2/KMT1B G9a/KMT1C EuHMTase/GLP /KMT1D ESET/SETDB1 /KMT1E CLL8/KMT1F RIZ1/KMT8	LSD1/KDM1 JHDM2A/JMJD1A/KDM3A JHDM2B/5qNCA/KDM3B JHDM2C/TRIP8/KDM3C JMJD2A/JHDM3/KDM4A	me2/me1→me0 me2/me1→me0 me2 me3/me2→me1
H3K27	KMT6/EZH2	UTX/KDM6A JMJD3/KDM6B UTY	me3/me2→me1 me3/me2→me1
H3K36	SET2/KMT3A NSD1/KMT3B SMYD2/KMT3C	NDY2/JHDM1A/FBXL11 /KDM2A NDY1/JHDM1B/FBXL10 /KDM2B JMJD2A/JHDM3/KDM4A JMJD2B/KDM4B JMJD2C/GASC1/KDM4C	me2/me1→me0 me2/me1→me0 me3/me2→me1 me3
H3K79	DOT1L/KMT4		
H4K20	PR-SET7-8/KMT5A SUV4-20H1/KMT5B SUV4-20H2/KMT5C		

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας που περιλαμβάνει τις μεθυλοτρανσφεράσες και τις απομεθυλάσες της λυσίνης των ιστονών [50].

Η διαμόρφωση της δραστηριότητας των απομεθυλασών περιλαμβάνει ρύθμιση σε πολλαπλά επίπεδα [69] συμπεριλαμβανομένων της γονιδιακής έκφρασης [70-76], της στρατολόγησης [61-64, 77-95], του συντονισμού με άλλα επιγενετικά σημάδια και των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTM) [91, 96-105] (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Μοντέλο ρύθμισης της δράσης των απομεθυλασών. Τα πολλαπλά επίπεδα ρύθμισης πρέπει να συντονίζονται για να επιτρέπουν την κατάλληλη δράση της απομεθυλάσης - αρχικά πρέπει να εκφράζεται η απομεθυλάση της λυσίνης (KDM, μπλε οβάλ σχήμα), πρέπει να υπάρχει και να συσχετίζεται ο κατάλληλος παράγοντας πρόσδεσης του DNA και οι συμπαραγοντες και το τοπικό περιβάλλον χρωματίνης πρέπει να επιτρέπει (ή να προάγει με ενεργό τρόπο) τη σταθερότητα. (α) Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της απομεθυλάσης παρέχει το πρώτο και γενικότερο επίπεδο ρύθμισης. (β) Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης επιτρέπουν την κατασκευή συμπλεγμάτων με διάφορες συνθέσεις, όπως άλλωστε καταδεικνύεται από τις διαφορετικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν DNA (τα μπλε και πράσινα ορθογώνια υποδεικνύουν διαφορετικούς παράγοντες δέσμευσης DNA. Σε αυτό το παράδειγμα, η σύνδεση της KDM μέσω του δεσμευμένου παράγοντα μεταγραφής (μπλε ορθογώνιο) δεν οδηγεί σε ενζυματική δραστηριότητα λόγω της καταστολής από έναν συσχετισμένο συμπάραγοντα παρά το επιτρεπτικό τοπικό περιβάλλον. (γ) Το τοπικό περιβάλλον της χρωματίνης επηρεάζει τη δράση της απομεθυλάσης μέσω της στρατολόγησης και/ή σταθεροποίησης του κατάλληλου συμπλόκου. Εδώ, παρά το σωστό σχηματισμό του συμπλόκου, η απουσία συγκεκριμένης τροποποίησης (κίτρινος κύκλος) οδηγεί σε διάσπαση του συμπλέγματος. (δ) Όλες αυτές οι συνθήκες, που σηματοδοτούνται από τη διαφοροποίηση ή από εξωτερικά ερεθίσματα, ρυθμίζουν συντονιστικά τη δραστηριότητα των απομεθυλασών (απώλεια του κόκκινου τριγώνου, αντιπροσωπεύεται ένα σήμα κατασταλτικής μεθυλίωσης) οδηγώντας σε μεταβολή της μεταγραφικής κατάστασης (το γονίδιο στο συγκεκριμένο παράδειγμα τώρα μεταγράφεται ενεργά). Παρόλο που απεικονίζεται μία κατάσταση ενεργοποίησης γονιδίου, αυτό το μοντέλο ισχύει και για τις απομεθυλάσες που δρουν και για την καταστολή της μεταγραφής των γονιδίων [69].

Η οικογένεια των απομεθυλασών που περιέχουν την περιοχή Jumonji (Jumonji-domain-containing demethylases)

Ως εναλλακτική λύση σε σχέση με εκείνη των απομεθυλασών της οικογένειας της αμιδικής οξειδάσης (amine oxidase), οι οποίες αδυνατούν να απομεθυλώσουν την τριμεθυλιωμένη λυσίνη λόγω της απουσίας ενός πρωτονιωμένου αζώτου στο υπόστρωμα [56], οι Kubicek και Jenuwein πρότειναν ότι οι -κετογλουταρισμένες -Fe(II)-διοξυγενάσες (-ketoglutarate-Fe(II)-dioxygenases) μπορούν να έχουν δραστηριότητα συμβατή με αυτή της απομεθυλίωσης των ιστονών [106]. Λίγο μετά την ανακάλυψη της απομεθυλάσης LSD1/KDM1, ο Trewick και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι οι εξαρτώμενες από το σίδηρο Fe(II)-διοξυγενάσες που περιέχουν την περιοχή Jumonji (JmjC) διαθέτουν δραστηριότητα απομεθυλάσης [107] και έτσι, ένα χρόνο αργότερα ταυτοποιήθηκε η πρώτη απομεθυλάση ιστόνης της οικογένειας αυτής (JmjC-domain-containing histone

demethylase) [60]. Η πρωτεΐνη αυτή, γνωστή ως JHDM1A/FBXL11/KDM2A, ήταν σε θέση να επαναφέρει τη μονο- και τη δι- μεθυλιωμένη λυσίνη K36 της ιστόνης H3 (H3K36me/me2) πίσω στη μη μεθυλιωμένη μορφή της, σε μία αντίδραση που μεσολαβείται μέσω της καταλυτικής δραστηριότητας της περιοχής JmjC. Λίγο μετά την ανακάλυψη της KDM2A, η ίδια ομάδα απομόνωσε μια ακόμα απομεθυλάση με κοινά χαρακτηριστικά με την KDM2A, που περιέχει επίσης την καταλυτική περιοχή JmjC και προάγει την απομεθυλίωση της διμεθυλιωμένης λυσίνης K9 της ιστόνης H3 (H3K9me2), την JHDM2A/JMJD1A/KDM3A [83]. Έκτοτε, έχουν αναφερθεί αρκετές απομεθυλάσες ιστονών που περιέχουν την περιοχή JmjC, όπως για παράδειγμα οι JHDM3A/JMJD2A/KDM4A [64], η JMJD2B/KDM4B [62], JMJD2C/KDM4C/GASC1 [61, 108, 109], JARID1A/RBP2/KDM5A [110], JARID1B/PLU-1/KDM5B [95]. Ένας πλήρης κατάλογος των απομεθυλασών των ιστονών της οικογένειας των JmjC απομεθυλασών, των οποίων η δραστηριότητα και η ειδικότητα έχει προσδιοριστεί, παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2). Συνολικά στον άνθρωπο υπάρχουν 27 διαφορετικές πρωτεΐνες που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια [14, 61, 111].

Phylogenetic tree	Protein domains	Name	Synonyms	Specificity	
		KDM1A KDM1B	AOF2/BHC110/LSD1 AOF1/LSD2	H3K4me2/me1 H3K9me2/me1 H3K4me2/me1	
		JMJD7 HIF1AN HSPBAP1 JMJD5 JMJD4			
		JMJD6 JMJD8	PSR/PTDSR	H3R2 H4R3	
		KDM2B KDM2A JHDM1D PHF8 PHF2 HR	JHDM1B/FBXL10 JHDM1A/FBXL11 KIAA1718 JHDM1F JHDM1E	H3K36me2/me1 H3K4me3 H3K36me2/me1 H3K9me2/me1 H3K27me2/me1 H3K9me2/me1	
		KDM3B KDM3A JMJD1C	JHDM2A/JMJD1A/TSGA	H3K9me2/me1	
		KDM6B KDM6A UTY	JMJD3 UTX	H3K27me3/me2	
		KDM4A KDM4C KDM4B KDM4D	JHDM3A/JMJD2A JHDM3C/JMJD2C/GASC1 JHDM3B/JMJD2B JHDM3D/JMJD2D	H3K9me3/me2 H3K36me3/me2	
		KDM5B KDM5C KDM5D KDM5A	JARID1B/PLU1 JARID1C/SMCX JARID1D/SMCY JARID1A/RBP2	H3K4me3/me2	
		JARID2 MINA NO66		H3K4me3/me2 H3K36me3/me2	

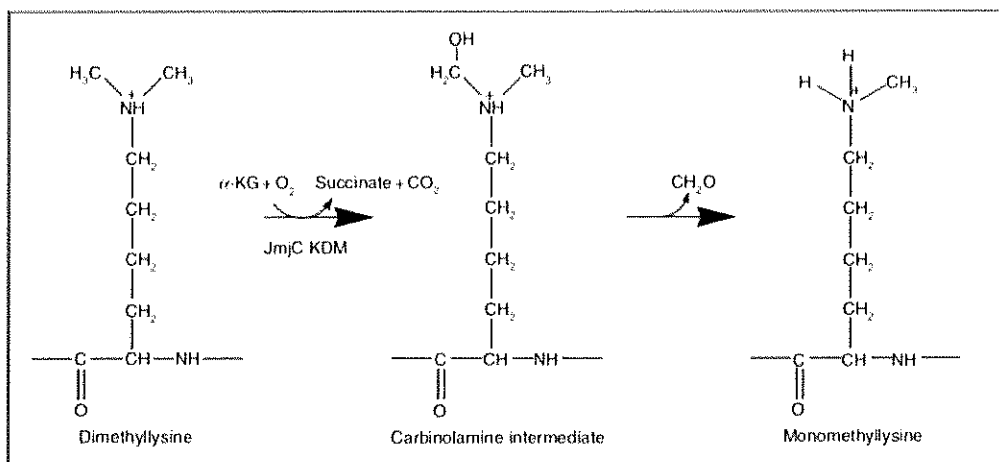
Key:

Πίνακας 2: Οι οικογένειες των απομεθυλασών. Σχηματική απεικόνιση των ανθρώπινων μελών των δύο οικογενειών των απομεθυλασών. Στην οικογένεια των JmjC απομεθυλασών εμφανίζεται και το φυλογενετικό δένδρο για τις ανθρώπινες JmjC απομεθυλάσες. Οι πρωτεΐνες για τις οποίες έχει αναφερθεί δραστηριότητα απομεθυλάσης *in vitro* παρουσιάζονται με γκρι. Για αυτές τις πρωτεΐνες, υποδεικνύονται τα συνώνυμα και οι ιδιότητες υποστρώματος ιστόνης. Συντομογραφίες: Amino oxidase: περιοχή αμινο οξειδάσης, JmjC: Jumonji C περιοχή, SWIRM, περιοχή SWIRM, CW: περιοχή παρόμοια με περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου, CXXC: CXXC περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου, PHD: plant homeodomain, FBOX: περιοχή F-box, LRR: περιοχή πλούσια σε αμινοξέα λευκίνης, TPR: περιοχή τετρατρικοπεπτιδίου (tetraatricopeptide), JmjN: Jumonji N περιοχή, TUDOR: περιοχή Tudor, ARID, περιοχή αλληλεπίδρασης πλούσια σε δινουκλεοτίδια AT, C5CH2: περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου [51].

Καταλυτικός Μηχανισμός και Υποστρώματα δράσης για τις απομεθυλάσες της οικογένειας JmjC

Οι απομεθυλάσες ιστονών της οικογένειας JmjC καταλύουν την απομεθυλίωση της λυσίνης μέσω μιας οξειδωτικής αντίδρασης που απαιτεί δισθενή σίδηρο Fe(II) και κετογλουταρικό (ketoglutarate) ως συμπαραγόντες. Η καταλυτική αντίδραση αρχίζει με το συντονισμό του μοριακού οξυγόνου (O₂) με το Fe(II) και τη μετατροπή του κετογλουταρικού σε succinate και CO₂, με την ταυτόχρονη υδροξυλίωση της μεθυλικής ομάδας του πεπτιδικού υποστρώματος. Η προκύπτουσα καρβινολαμίνη (carbinolamine) είναι ασταθές ενδιάμεσο προϊόν και αποικοδομείται αυθόρμητα σε μη μεθυλιωμένο πεπτίδιο και φορμαλδεΰδη [15, 112]. Σε αντίθεση με την LSD1/KDM1 απομεθυλάση, οι απομεθυλάσες της οικογένειας JmjC δεν απαιτούν την παρουσία πρωτονιωμένου αζώτου ως υπόστρωμα και συνεπώς απομεθυλιώνουν όχι μόνο μονο- και δι-μεθυλιωμένα αλλά και τρι- μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης.

Με τη συσσώρευση πληροφοριών για τις απομεθυλάσες της οικογένειας JmjC ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι αρκετές απομεθυλάσες ιστονών έχουν πολλαπλές εξειδικεύσεις σχετικά με το υπόστρωμά τους, απομεθυλιώνοντας διαφορετικά κατάλοιπα αμινοξέων στις ιστόνες [14, 64, 102, 113, 114]. Επιπλέον, δύο συγγενικά ένζυμα μπορούν να στοχεύσουν το ίδιο μεθυλιωμένο κατάλοιπο αλλά να παράγουν διαφορετικό προϊόν και τέλος, η *in vitro* εξειδίκευση των απομεθυλασών της οικογένειας JmjC εξαρτάται από το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα και μπορεί να διαφέρει από την ειδικότητά τους *in vivo* [63, 87, 94, 95, 101, 103, 115]. Έτσι, τα *in vitro* πειράματα μπορεί να μην είναι καθοριστικά για τον προσδιορισμό της εξειδίκευσης της *in vivo* αντίδρασης.



Εικόνα 3. Ο μηχανισμός αντίδρασης της οικογένειας των JmjC απομεθυλασών ιστονών. Ο καταλυτικός μηχανισμός των απομεθυλασών JmjC περιλαμβάνει το μοριακό οξυγόνο στη μετατροπή του -κετογλουταρικού σε CO₂ με την ταυτόχρονη υδροξυλίωση της μεθυλικής ομάδας του πεπτιδικού υποστρώματος. Η προκύπτουσα καρβινολαμίνη είναι ασταθής και διασπάται προς το μη μεθυλιωμένο πεπτίδιο με ταυτόχρονη απελευθέρωση φορμαλδεΰδης [50].

Μεθυλίωση και Απομεθυλίωση των Ιστονών και Καρκίνος

Τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA και οι τροποποιήσεις των ιστονών έχει βρεθεί ότι διαφοροποιούνται ανάμεσα σε φυσιολογικούς ιστούς και στους προερχόμενους από αυτούς καρκινικούς ιστούς. Η γονιδιακή έκφραση ελέγχεται από την επιγενετική κατάσταση και δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι επιγενετικές αλλαγές μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση [116]. Μια λίστα με μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες που εμπλέκονται στην ογκογένεση, με μια σύντομη περιγραφή των μηχανισμών δράσης τους

παρουσιάζεται στον πίνακα παρακάτω. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των ογκογονικών ιδιοτήτων των μελών αυτής της ομάδας που έχουν μελετηθεί καλύτερα είναι τα εξής: Η μεθυλοτρανσφεράση EZH2 της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27) έχει βρεθεί ότι υπερεκφράζεται μέσω ενίσχυσης του γονιδίου [117], μέσω μείωσης των επιπέδων του microRNA-101 που στοχεύει την EZH2 [118] ή από άλλους παράγοντες [119] σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Η υπερέκφραση της EZH2 ενισχύει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των primary κυττάρων [117] και προάγει την ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση ανάπτυξη και επιθετικότητα των αθανατοποιημένων κυττάρων σε μία κυτταροκαλλιέργεια [120]. Τέλος, η EZH2 έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο σε *in vivo* NIH 3T3-based xenograft μοντέλο ποντικού. Ο σχηματισμός του όγκου σε αυτό το μοντέλο εξαρτάται από την ακεραιότητα της καταλυτικής περιοχής της μεθυλοτρανσφεράσης [121]. Οι ειδικές για τη λυσίνη απομεθυλάσες (KDMs) λειτουργούν σε συντονισμό με τις μεθυλοτρανσφεράσες της λυσίνης για τη διατήρηση των γενικών προτύπων μεθυλίωσης των ιστονών. Αν και μέχρι σήμερα οι απομεθυλάσες ιστονών έχουν μελετηθεί σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τις μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών, είναι σαφές πως η απορρύθμιση των KDMs εμπλέκεται σε μεγάλο βαθμό στην πρόοδο του καρκίνου [122]. Η ογκογονική ικανότητα των περισσοτέρων από τις KDMs έχει αποκαλυφθεί με γονιδιωματικές αλλοιώσεις, όπως η προ-ϊική ένθεση σε επαγόμενους από ρετροϊούς όγκους (proviral insertion in retrovirus-induced tumors), με ενίσχυση ή αποσιώπηση των γονιδίων τους, ενώ άλλων KDMs έχει αποκαλυφθεί μέσω υπερέκφρασης σε διάφορους όγκους ή μέσω της λειτουργικής τους αλληλεπίδρασης με άλλα γνωστά ογκογονίδια ή γονίδια καταστολής όγκων. Η απορρύθμιση των μεθυλοτρανσφερασών (HMTs) και των απομεθυλασών των ιστονών (HDMs) έχει συσχετιστεί με μια ποικιλία τύπων καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων του μαστού, του προστάτη, του πνεύμονα και του εγκεφάλου [119, 120, 123-125]. Συγκεκριμένα, οι HMT και οι HDM παίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλαπλούς ιστούς ρυθμίζοντας την κατάσταση μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης τεσσάρων καταλοίπων λυσίνης K4, K9, K27 και K36 στην ιστόνη H3 [116].

Μεθυλοτρανσφεράση	Ρόλος
MLL1/KMT2A	Συχνά μεταβάλλεται από χρωμοσωμικές μετατοπίσεις σε οξείες λευχαιμίες, ιδιαίτερα σε λευχαιμίες βρεφών
MLL2/KMT2B	Ενισχύεται στο γλοιοβλάστωμα και στον καρκίνο του παγκρέατος
MLL3/KMT2C	Μεταλλάσσεται στο γλοιοβλάστωμα, σε μελάνομα και σε καρκίνο του παγκρέατος
RIZ1/KMT8	Είναι ανενεργή σε ποικίλους καρκίνους στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των λεμφωμάτων των B κυττάρων, του καρκίνου του ήπατος, στομάχου, των ωθηκών, του προστάτη και του θυρεοειδούς. Τα ποντίκια που δεν έχουν RIZ1 αναπτύζουν διάχυτα μεγάλα Β-λεμφοκύτταρα και ένα ευρύ φάσμα όγκων
EZH2/KMT6	Υπερεκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα καρκίνων στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων του επιθετικού καρκίνου του προστάτη και των μαστών, της ουροδόχου κύστης και των δερματικών μελανωμάτων. Η υπερέκφραση της EZH2 προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργεια, επάγει το σχηματισμό αποικιών αθανατοποιημένων κυττάρων και έχει χαρακτηριστεί ως ογκογονίδιο σε xenograft μοντέλα ποντικού
NSD1/KMT3B	Μεταλλάσσεται στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), στο πολλαπλό μύελωμα, στον καρκίνο του πνεύμονα και σε σύνδρομο υπερανάπτυξης. Μια συχνή μετατόπιση στην AML, ενώνει την NSD1 με τη νουκλεοπορίνη-98. Η πρωτεΐνη σύντηξης επάγει AML <i>in vivo</i> και διατηρεί την αυτο-ανανέωση των μυελοειδών βλαστικών κυττάρων <i>in vitro</i>
G9a/KMT1C	Η μείωση των επιπέδων της G9a προκαλεί διάσπαση του κεντροσώματος και χρωμοσωμική αστάθεια στα καρκινικά κύτταρα και προάγει τον ογκογονικό μετασχηματισμό των αθανατοποιημένων ανθρώπινων κυττάρων
DOT1L/KMT4	Η σύντηξη την DOT1L με την MLL έχει ως αποτέλεσμα το λευχαιμικό μετασχηματισμό που εξαρτάται από τη δραστηριότητα της μεθυλοτρανσφεράσης DOT1L

Μεθυλοτρανσφεράση	Ρόλος
ASH1/KMT2H	Είναι απαραίτητη για τη νευροενδοκρινική διαφοροποίηση στους πνεύμονες. Υπερεκφράζεται σε αρκετούς τύπους καρκίνου των πνευμόνων με νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του small cell lung cancer. Η έκφρασή της στον ποντικό προωθεί τη δυσπλασία των αεραγωγών και πνευμονικούς νευροενδοκρινικούς όγκους
SMYD2/KMT3C	Μεθυλιώνει την p53 και καταστέλλει τη δραστηριότητά της
SET7-9/KMT7	Μεθυλιώνει την p53 και τον A υποδοχέα οιστρογόνου και ρυθμίζει τη δραστηριότητα τους <i>in vivo</i> . Η μετάλλαξη που παρατηρείται στον υποδοχέα των οιστρογόνων στον καρκίνο του μαστού καταργεί τη μεθυλίωσή του από την SET7-9
CARM1/PRMT4	Προάγει τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού που διεγείρεται από οιστρογόνα. Είναι υπερεκφρασμένη στους όγκους του μαστού βαθμού 3
PRMT1	Μεθυλιώνει το H4R3 και συνεργάζεται με τη MLL για την ενίσχυση του μεσολαβούμενου από την MLL μετασηματισμού των αιματοποιητικών κυττάρων
PRMT5	Μεθυλιώνει τα H3R8 και H4R3 και αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα SWI/SNF καταστέλλοντας τη μετάφραση των μελών της οικογένειας RB. Είναι υπερεκφρασμένο σε αρκετές ανθρώπινες λευχαιμίες και λεμφώματα

[117-121, 126-165]

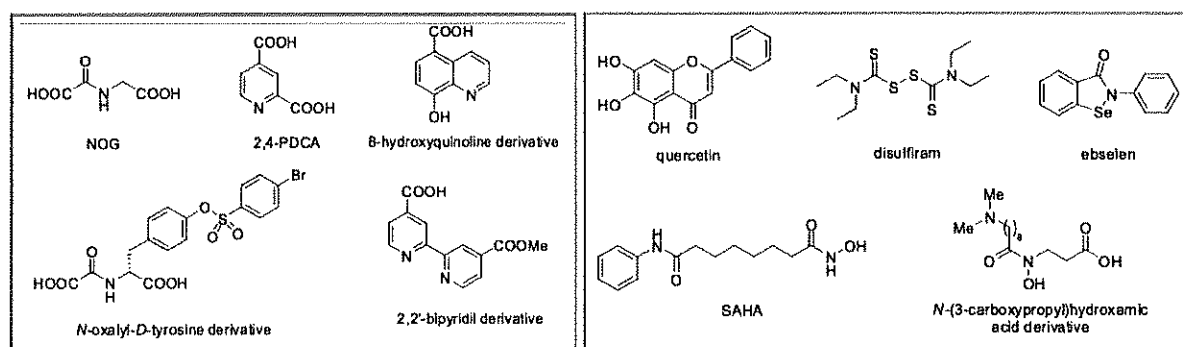
Απομεθυλάση	Νέο Όνομα	Διαφοροποίηση έκφρασης στον Καρκίνο	Συσχετιζόμενος Καρκίνος
LSD1	KDM1	Υπερέκφραση	Προστάτης, Μαστού, Νευροβλάστωμα
FBXL10	KDM2B	Μειωμένη Έκφραση, Μεταλλάξεις, Υπερέκφραση	Εγκεφάλου, Προστάτη, Μαστού, Ήπατος, Λέμφωμα
JMJD2C	KDM4C	Υπερέκφραση	Προστάτη, Οισοφάγου, desmoplastic medulloblastoma, MALT λέμφωμα
RBP2	KDM5A	Υπερέκφραση	Στομάχου
PLU-1	KDM5B	Υπερέκφραση	Προστάτη, Μαστού, Ωοθηκών, Γεννητικών οργάνων
UTX	KDM6A	Μεταλλάξεις	Πολλαπλό μυέλωμα, ποικιλία τύπων καρκίνου,
JMJD3	KDM6B	Υπερέκφραση	Προστάτη

[61, 94, 102, 108, 166-179]

Οι απομεθυλάσες των ιστονών (KDMs) ως θεραπευτικοί στόχοι - Αναστολείς των απομεθυλασών της οικογένειας JmjC

Το γεγονός ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι τόσο διαδεδομένες στους καρκίνους και παίζουν έναν αιτιολογικό ρόλο, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μιας εντελώς νέας θεραπευτικής προσέγγισης στην οποία στόχος είναι να αντιστραφεί το αποτέλεσμα της επιγενετικής αυτής τροποποίησης [3]. Με τις κλινικές υποσχέσεις που έχουν προκύψει από τους αναστολείς για άλλα κύρια συστατικά του επιγενετικού μηχανισμού [180-183], οι επόμενοι παράγοντες που αναδύονται ως πιθανοί νέοι στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων είναι οι απομεθυλάσες των ιστονών [184]. Αρκετές ενδείξεις υποδεικνύουν ότι οι απομεθυλάσες των ιστονών μπορούν όντως να είναι καλοί υποψήφιοι στόχοι για την ανάπτυξη επιγενετικών θεραπειών για τον καρκίνο, αντιπροσωπεύοντας ένα νέο διαγνωστικό εργαλείο [60, 61, 95, 114, 185-190]. Μέχρι σήμερα, τα δεδομένα δομής - δραστηριότητας (SAR) για τις απομεθυλάσες ιστονών της οικογένειας JmjC είναι περιορισμένα με αποτέλεσμα να είναι ελάχιστοι σε αριθμό οι αναστολείς που έχουν αναφερθεί για τα μόρια αυτά που να εμφανίζουν ισχυρό και εξειδικευμένο τρόπο δράσης έναντι των απομεθυλασών [191-193].

Ωστόσο, σημαντικές προσπάθειες έχουν γίνει στο να στοχευθούν οι συμπαράγοντες που απαιτούνται για τη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών [122, 191-194]. Το ανάλογο του 2-οξογλουταρικού (2-oxoglutarate), N-οξαλυλ-γλυκίνη (*N*-oxalyl-glycine) (NOG), μπορεί να αναστείλει ασθενώς τη δράση της JMJD2C και της JMJD2A [195]. Η απομεθυλάση JMJD2A βρέθηκε ότι αναστέλλεται παρουσία Zn-ενώσεων όπως οι disulfiram και ebselen καθώς αποδιοργανώνεται η θέση δέσμευσης του Zn²⁺ που έχει κοντά στην καταλυτική της περιοχή [196]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μόνο οι απομεθυλάσες της υποοικογένειας των JMJD2 επηρεάζονται από αυτές τις ενώσεις και όχι άλλες KDMs καθώς μόνο αυτές διαθέτουν μία θέση δέσμευσης του ψευδαργύρου κοντά στην καταλυτική τους περιοχή [196]. Άλλες ενώσεις με ανασταλτική δράση έναντι της JMJD2 είναι το 2,4-πυριδινοδικαρβοξυλικό οξύ (PDCA) (2,4-pyridindicarboxylic acid) [191, 193] και το 2,2-διπυριδυλικό (2,2'-bipyridyl) παράγωγο του [191]. Διάφορα φλαβονοειδή και μόρια κατεχολικής μορφής έχουν επίσης περιγραφεί ως ενώσεις που μπορούν να αναστείλουν τη δράση των JmjC KDMs. Ωστόσο, δεν αποτελούν τους ιδανικούς υποψήφιους καθώς επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα ενζυμικών στόχων [197]. Πρόσφατα, με high-throughput screening 236,000 περίπου ενώσεων ταυτοποιήθηκε το μόριο της 8-υδροξυ-5-καρβοξυκινολίνης (8-hydroxy-5-carboxyquinoline) ως ένα μόριο με ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι των απομεθυλασών της υποοικογένειας JMJD2 και συγκεκριμένα της JMJD2A [198]. Το 2010, αναφέρθηκαν ως εξειδικευμένοι αναστολείς των JMJD2A και JMJD2C, ορισμένα υδροξαμικά οξέα (hydroxamic acids) τα οποία φέρουν ως μοναδικό χαρακτηριστικό ένα κατάλοιπο N-προπιονικού οξέος [199]. Δύο μέλη της ομάδας αυτής, όταν προστέθηκαν σε διάφορες καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων (LNCaP, PC3, και HCT116) σε συνδυασμό με τον αναστολέα της LSD1 που βασίζεται στην τρανυλκυπρομίνη (tranylcypromine-based LSD1 inhibitor), οδήγησαν σε συνεργιστική αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης, κάτι που υποδεικνύει ότι ο συνδυασμός αυτός των δύο αναστολέων μπορεί να έχει θετικά κλινικά αποτελέσματα ως αντικαρκινική χημειοθεραπεία [199]. Συμπερασματικά, οι αναστολείς των απομεθυλασών των ιστονών, είτε μόνοι είτε σε συνδυασμό με αναστολείς αποακετυλάσης ιστονών ή μεθυλοτρανσφεράσης του DNA, μπορούν να αποδειχθούν αποτελεσματικοί επιγενετικοί θεραπευτικοί παράγοντες.



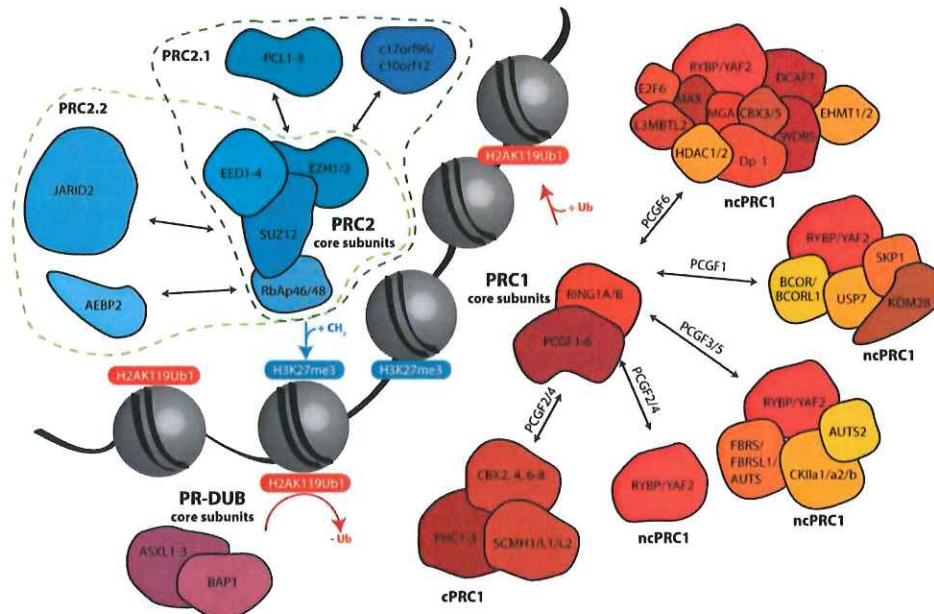
Εικόνα 4. Δομή των διάφορων αναστολέων της οικογένειας των JmjC απομεθυλασών της ιστόνης [184].

2. Ο κώδικας των ιστονών και η επιγενετική ρύθμιση από τις πρωτεΐνες Polycomb

Η ανάπτυξη ενός πολυκυτταρικού ευκαρυωτικού οργανισμού είναι μια πολύ περίπλοκη διαδικασία που απαιτεί τον ακριβή έλεγχο συγκεκριμένων μεταγραφικών προγραμμάτων με ρυθμιζόμενο χωρικά και χρονικά τρόπο. Για να διευκολυνθεί αυτός ο έλεγχος, το ευκαρυωτικό γονιδίωμα πακετάρεται στον πυρήνα με τη μορφή της χρωματίνης η οποία αναδιαμορφώνεται φυσικά σε απόκριση επιγενετικών τροποποιήσεων του DNA ή των ιστονών, είτε περιορίζοντας είτε επιτρέποντας την πρόσβαση διάφορων παραγόντων στο DNA που δρα ως καλούπι - εκμαγείο [1]. Η δομή και οι τροποποιήσεις της χρωματίνης και συνεπώς οι ρυθμιστικοί παράγοντές της εμπλέκονται στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, επηρεάζοντας διεργασίες όπως η αυτο-ανανέωση και η διαφοροποίηση των κυττάρων, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και κατά συνέπεια η ογκογένεση. Μεταξύ αυτών των παραγόντων, οι ομάδες πρωτεϊνών Polycomb (PcG) και Trithorax (trxG), μαζί με τις μεθυλοτρανσφεράσες, απομεθυλάσες, ακετυλάσες και αποακετυλάσες των ιστονών, μεταξύ άλλων, αποτελούν σημαντικά σύνολα πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη γονιδιακή δραστηριότητα και τη μεταγραφική έκφραση στο επίπεδο της χρωματίνης [2].

Η ομάδα πρωτεϊνών PcG είναι μια μεγάλη, ποικίλη και συντηρημένη εξελικτικά ομάδα πρωτεϊνών που λειτουργούν ως επιγενετικοί τροποποιητές και ρυθμιστές της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων, καταστέλλοντας επιγενετικά τη μεταγραφή βασικών αναπτυξιακών γονιδίων [3-6]. Αρχικά, αναγνωρίστηκαν ως μεταγραφικοί καταστολείς των homeotic (HOX) γονιδίων στη Δροσόφιλα [3-6]. Πλέον είναι γνωστό πως είναι απαραίτητες για την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων και την ομοιοστασία των ιστών [7, 8]. Η απορρύθμιση των PcG πρωτεϊνών στον άνθρωπο οδηγεί σε ένα ευρύ φάσμα κακοηθειών [8]. Ο μηχανισμός μέσω του Polycomb συστήματος οδηγεί στη σίγηση γονιδίων - στόχων σημαντικών για τη διατήρηση της ταυτότητας των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μετάβασης μεταξύ των διάφορων κυτταρικών σταδίων κατά την ανάπτυξή τους [9]. Η έκταση της τροποποίησης της χρωματίνης από τις Polycomb πρωτεΐνες ποικίλει ανάλογα με το κυτταρικό στάδιο στο οποίο βρίσκονται τα κύτταρα και είναι μεγαλύτερη σε διαφοροποιημένα κύτταρα από ό,τι σε κύτταρα με αναπτυξιακή δυναμική [10].

Η λειτουργική ποικιλομορφία των PcG συμπλόκων προέρχεται από τη δομική τους ποικιλομορφία, με αποτέλεσμα να σχηματίζουν τρεις ξεχωριστές ομάδες ενζυματικών συμπλοκών (PRC1, PRC2, PRDUB), το καθένα με την ικανότητα να αναδιαμορφώνει τη χρωματίνη με συγκεκριμένο και ξεχωριστό μηχανισμό επιτυγχάνοντας έτσι μια ειδική επιγενετική τροποποίηση [11, 12]. Ειδικότερα, το PRC1 παρουσιάζει δραστηριότητα E3 λυγής της ουβικουΐτινης, μονο-ουβικουτινυλιώνοντας την λυσίνη K119 της ιστόνης H2A (H2AK119ub1). Επιπλέον, συμβάλλει στη συμπύκνωση της χρωματίνης, δράση ανεξάρτητη από την ουβικουτινυλίωση και αλληλεπιδρά με το μηχανισμό μεταγραφής των γονιδίων απομεθυλιώνοντας τις λυσίνες K4 και K36 της ιστόνης H3. Το PRC2 παρουσιάζει δραστηριότητα μονο-, δι- και τρι- μεθυλοτρανσφεράσης στοχεύοντας τη λυσίνη K27 της ιστόνης H3 (H3K27me1, 2, 3) και το PR-DUB αντιτίθεται στη δράση του PRC1 απο-ουβικουτινυλιώνοντας τη λυσίνη K119 της ιστόνης H2A (H2AK119) (Εικόνα 5). Ενώ οι γνώσεις μας τα τελευταία χρόνια για τη βιολογική σπουδαιότητα των πρωτεϊνών των PcG συμπλόκων καθώς και για τις τροποποιήσεις που επιτελούν αυτά τα σύμπλοκα διευρύνθηκαν, η απόκτηση λεπτομερών δομικών πληροφοριών για τα σύμπλοκα αυτά, για τον τρόπο με τον οποίο επιτυγχάνουν μεταγραφική καταστολή των γονιδίων και για το πώς αυτά τα σύμπλοκα αλληλεπιδρούν λειτουργικά μεταξύ τους αποδείχθηκε μεγάλη πρόκληση, περιορίζοντας έτσι σοβαρά την κατανόησή μας για τη γενικότερη ρύθμιση της χρωματίνης και τη στόχευση των συμπλόκων στο υπόστρωμά τους. Πρόσφατα, ωστόσο, αρκετές νέες δομές των συμπλόκων και των υπομονάδων τους [13-17] ή ομόλογων συμπλόκων [18, 19], έριξαν φως στον τρόπο λειτουργίας των πρωτεϊνών αυτής της οικογένειας.



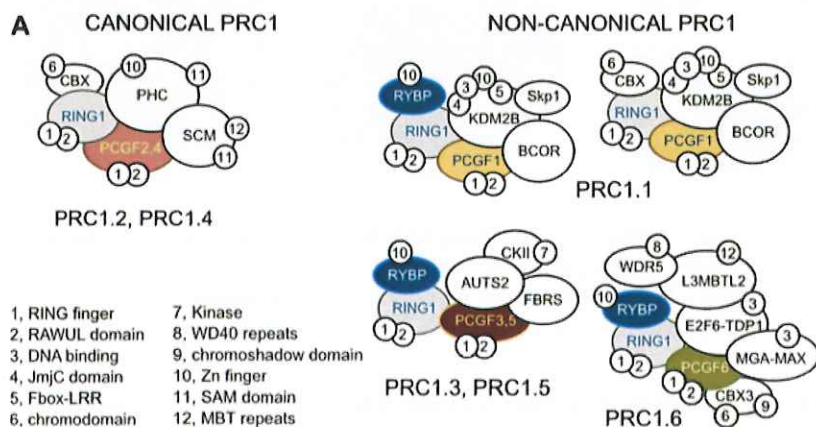
Εικόνα 5. Τα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα καταστολής γονιδίων στον άνθρωπο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τη ρύθμιση της μεθυλίωσης της H3K27, την απομεθυλίωση των H3K4 και H3K36 και της ουβικουτινίωσης της H2AK119. Οι Polycomb πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται από μία πυρηνική ενζυματική περιοχή που αλληλεπιδρά με παρόμοιες τέτοιες περιοχές ή με βοηθητικούς παράγοντες για να ρυθμίσουν την ενζυμική δραστηριότητα ή τη γονιδιακή στόχευση, ρυθμίζοντας έτσι το βιολογικό αποτέλεσμα των συγκεκριμένων συμπλόκων. Τα σύμπλοκα PRC1 απομεθυλιώνουν τις λυσίνες K4 και K36 της ιστόνης H3 και ουβικουτινιώνουν τη λυσίνη K119 της ιστόνης H2A (H2AK119) ενεργεία η οποία διεγείρει τη δραστηριότητα του PRC2-JARID2-AEBP2, ενώ το PRC2 σύμπλοκο μεθυλιώνει τη λυσίνη K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3) η οποία διεγείρει και τα δύο σύμπλοκα PRC2 και PRC1. Με τον τρόπο αυτό, δημιουργείται μία θετική ανατροφοδότηση (feedforward loop) η οποία προτείνεται ότι ενισχύει τα polycomb σήματα σε μεγάλες περιοχές του γονιδιώματος οδηγώντας στη μεταγραφική καταστολή των γονιδίων. Αντίθετα, το PR-DUB σύμπλοκο απομακρύνει την ομάδα της ουβικουτίνης από τη λυσίνη K119 της ιστόνης H2A (H2AK119) που έχει προηγουμένως τοποθετηθεί από το PRC1 και μεσολαβεί στην καταστολή των polycomb - στόχων μέσω ενός ξεχωριστού, μέχρι τώρα άγνωστου μηχανισμού [12, 20-22].

ι) Πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1 (Polycomb Repressive Complex 1, PRC1).

Κανονικά και Μη-κανονικά PRC1 σύμπλοκα

Το πρώτο σύμπλοκο Polycomb απομονώθηκε από έμβρυα Δροσόφιλας και ονομάστηκε PRC1 [23, 24]. Τα κύτταρα των θηλαστικών περιέχουν παρόμοια σύμπλοκα [25] με τη διαφορά ότι τα σύμπλοκα των θηλαστικών διαθέτουν επιπρόσθετες υπομονάδες, αντιπροσωπεύοντας την πολυπλοκότητα και πολλαπλότητα των ομόλογων πρωτεϊνών. Τα σύμπλοκα PRC1 αποτελούν μία ποικίλη οικογένεια πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που συμβάλλουν στην καταστολή της μεταγραφικής έκφρασης με μονο-ουβικουτινίωση της λυσίνης K119 της ιστόνης H2A (H2AK119), απομεθυλίωση των λυσινών K4 και K36 της ιστόνης H3, μη ενζυματική συμπύκνωση της χρωματίνης και πιθανώς με άμεση αλληλεπίδραση με τον μηχανισμό μεταγραφής [23, 26-29]. Αποτελούνται από έναν πυρήνα που αποτελείται από την πρωτεΐνη RING1 (RING1A ή RING1B) και μία PcG πρωτεΐνη δακτύλων PCGF(1-6) (polycomb group ring finger protein) [30]. Το ετεροδιμερές RING1/PCGF σχηματίζει ένα ικρίωμα για τη συναρμολόγηση του PRC1 συμπλόκου, με αμφότερες τις πρωτεΐνες να αλληλεπιδρούν με τις επιπρόσθετες υπομονάδες του PRC1 συμπλόκου μέσω της (C-) καρβοξυτελικής περιοχής της RAWUL (Ring finger And WD40 Ubiquitin-Like) περιοχής τους [31, 32]. Οι RING1 και RAWUL αλληλεπιδρούν με μια πρωτεΐνη Chromobox (CBX 2, 4, 6-8) ή την πρωτεΐνη RYBP (ή το ομόλογό της YAF2) με αμοιβαία αποκλειόμενο τρόπο [20, 32-34], ενώ κάθε PCGF πρωτεΐνη φαίνεται να αλληλεπιδρά επιλεκτικά με

συγκεκριμένους παράγοντες δέσμευσης (binding partners), καθορίζοντας έτσι την τελική δομή του PRC1 συμπλόκου και συνεπώς τη δραστηριότητα ουβικουτινυλίωσης και τον εντοπισμό του συμπλόκου κατά μήκος του γονιδιώματος [20, 22]. Ιστορικά, τα PRC1 σύμπλοκα των θηλαστικών ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: τα κανονικά PRC1 (cPRC1), τα οποία αποκαλούνται έτσι επειδή η σύνθεση των υπομονάδων τους είναι παρόμοια και ομόλογη με αυτή της σύνθεσης των PRC1 συμπλόκων στη Δροσόφιλα, και τα μη-κανονικά PRC1 σύμπλοκα (ncPRC), τα οποία περιγράφουν όλα τα υπόλοιπα PRC1 σύμπλοκα [20]. Πρόσφατα προτάθηκε, ως μια πιο χρήσιμη εναλλακτική λύση, η ταξινόμηση των PRC1 συμπλόκων να γίνεται με βάση την ταυτότητα της πρωτεΐνης PCGF [12] (Εικόνα 6).

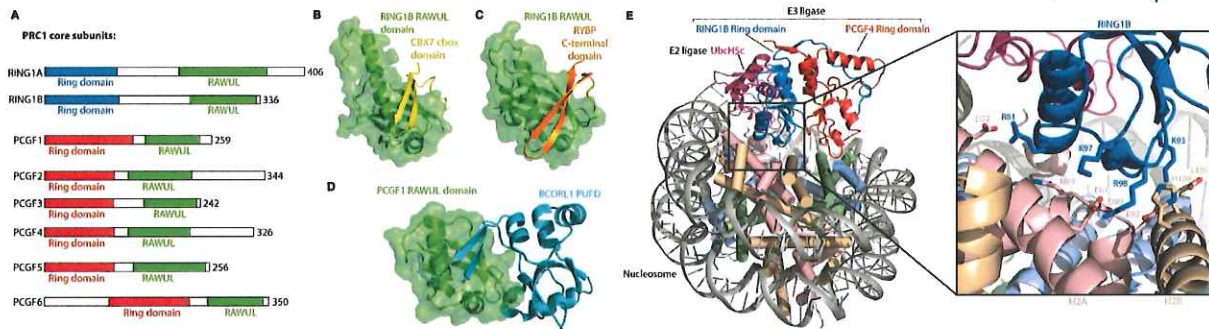


Εικόνα 6. Κανονικά και μη-κανονικά σύμπλοκα PRC1. (A) Εκτός από τις PCGF, οι υπομονάδες αντιπροσωπεύονται με έναν απλοποιημένο τρόπο. Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης δεν είναι ακριβείς σε όλες τις περιπτώσεις επειδή, σε αρκετές περιπτώσεις, δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές [21].

Υπάρχουν αρκετές διαθέσιμες κρυσταλλικές δομές για διάφορες αλληλεπιδράσεις των υπομονάδων του συμπλόκου με τους παράγοντες δέσμευσής τους [34-36]. Τα δομικά δεδομένα από τις κρυσταλλικές αυτές δομές ταιριάζουν απόλυτα με αποτελέσματα πρωτεϊνωματικών μελετών (proteomic studies) που έχουν κατά καιρούς γίνει [20], δείχνοντας ότι η ταυτότητα της PCGF υπομονάδας του PRC1 συμπλόκου καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη συνολική σύνθεση των υπομονάδων του συμπλόκου. Η δραστηριότητα ουβικουτινυλίωσης των συμπλοκών PRC1 επιτελείται από την περιοχή δακτυλίου της πρωτεΐνης RING1, η οποία λειτουργεί ως E3 λιγάση, μεταφέροντας την ομάδα της ουβικουτίνης από μια E2 λιγάση προς το στόχο H2AK119 [27, 37, 38]. Πληροφορίες για το μηχανισμό και τη στόχευση της δραστηριότητας E3 λιγάσης του PRC1 έναντι της H2AK119 έχουν δοθεί από μια πρόσφατη κρυσταλλική δομή των περιοχών δακτυλίου του ετεροδιμερούς RING1B/PCGF4 συζευγμένο με τη E2 λιγάση UbcH5c (σύμπλεγμα E2-E3) δεσμευμένο σε ένα νουκλεόσωμα [14]. Η στόχευση των PRC1 συμπλόκων στα νουκλεοσώματα λαμβάνει χώρα μέσω διάφορων διαφορετικών μηχανισμών [39-44].

Από δομική άποψη, η δραστηριότητα E3 λιγάσης του PRC1 συμπλόκου είναι επί του παρόντος καλύτερα κατανοητή σε σχέση με τη δραστηριότητα του συμπλόκου στη συμπύκνωση της χρωματίνης και την αλληλεπίδρασή του με το μηχανισμό μεταγραφής. Ωστόσο, η σχετική σημασία των διαφόρων μηχανισμών και ο τρόπος με τον οποίο επιφέρουν μεταγραφική καταστολή εξακολουθεί να μην είναι πλήρως σαφής. Δεδομένα όμως μέχρι τώρα έχουν καταλήξει στο ενδιαφέρον συμπέρασμα ότι οι δύο αυτοί μηχανισμοί είναι μεταξύ τους διακριτοί. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι παρά την δομική ομοιότητα μεταξύ των διαφορετικών δομών E2-E3 των PRC1 συμπλόκων (π.χ. PCGF5 E2-E3) [41, 45], και παρά τα έξι συμπλέγματα PCGF/RING1B που δείχνουν εγγενή καταλυτική δραστηριότητα που εξαρτάται από τη δέσμευση στο H2A acidic patch με παρόμοιο τρόπο [45], δεν είναι όλα τα PRC1 σύμπλοκα σημαντικά για την ουβικουτινυλίωση *in vivo* [46]. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στη διαφορετική ικανότητα των PCGF πρωτεϊνών να διεγείρουν και να ενεργοποιήσουν τη δραστηριότητα της E3 λιγάσης της

RING1 [27], είτε στην ανικανότητα της πρωτεΐνης να τοποθετήσει στη σωστή θέση το E2-E3 σύμπλοκο για την ουβικουτινύωση της H2AK119 [45]. Εναλλακτικά, η παρουσία ορισμένων επιπρόσθετων PRC1 υπομονάδων, ή η μη ενζυματική συμπύκνωση της χρωματίνης, μπορεί να παρεμποδίσει στερεοχημικά την αλληλεπίδραση του PRC1 με την H2AK119 ή τη E2 λιγάση, αποκλείοντας έτσι την ουβικουτινύωση της χρωματίνης.



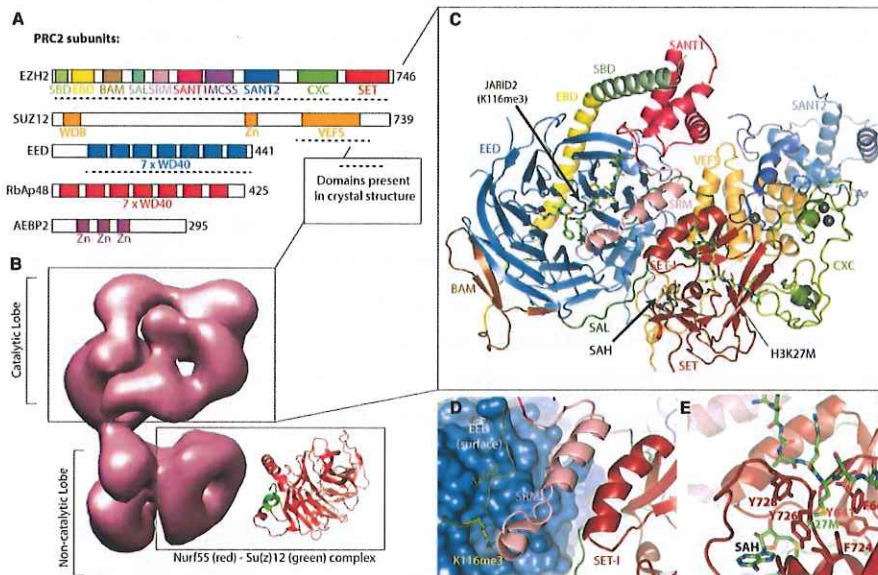
Εικόνα 7. Το σύμπλοκο PRC1. (A) Δομή των πρωτεϊνών του πυρήνα του PRC1 συμπλόκου: οι πρωτεΐνες RING1 και PCGF. (B) Δομή της RING1B RAWUL περιοχής/CBX7 chox περιοχής [34]. (C) Δομή της RING1B RAWUL περιοχής/RYPB C-terminal περιοχής [34]. (D) Δομή της PCGF1 RAWUL περιοχής/BCORL1 PFUD περιοχής [35]. (E) Δομή της RING1B ring περιοχής-UBch5c fusion/PCGF4/nucleosome complex [14].

ii) Πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 2 (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2)

Η δράση των πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων καταστολής γονιδίων 2, εξαρτάται από την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη (SAM) (S-adenosyl-L-methionine (SAM)-dependent) και παρουσιάζουν δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης ιστονών (HMTases). Καταλύουν τη μονο-, δι- και τρι-μεθυλίωση της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27). Αρχικά αναγνωρίστηκε και ταυτοποιήθηκε ως καταστολέας των γονιδίων HOX στη Δροσόφιλα [3, 47]. Το PRC2 των θηλαστικών έχει πρόσφατα ταξινομηθεί ως δύο ξεχωριστά σύμπλοκα, τα PRC2.1 και PRC2.2 [21], τα οποία μαζί εμπλέκονται σε μια σειρά βιολογικών διεργασιών που περιλαμβάνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την πλαστικότητα των βλαστικών κυττάρων, την καρκινογένεση και την απενεργοποίηση του X-χρωμοσώματος [48-50]. Και τα δύο αυτά σύμπλοκα (PRC2.1 και PRC2.2) χαρακτηρίζονται από μια καταλυτική υπομονάδα, την EZ homolog 2 (EZH2), που περιέχει μία ενζυμική περιοχή SET [Su(var)3-9, Enhancer of zeste (EZ) and Trithorax] που ανήκει στην οικογένεια των EZ μεθυλοτρανσφερασών των ιστονών (EZ family of HMTases) [51, 52]. Απαλοιφή του γονιδίου EZH2 οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα στα ποντίκια [53], επισημαίνοντας το θεμελιώδη ρόλο της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 κατά την ανάπτυξη. Η EZH2 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε εμβρυϊκά κύτταρα και σε κύτταρα με μεγάλη πολλαπλασιαστική ικανότητα και παρουσιάζει την ισχυρότερη καταλυτική της δράση έναντι της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3) [54]. Το αλληλο-αποκλειόμενο ομόλογό της, η EZH1 παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης (HMTase) και ο ρόλος της ακόμη αμφισβητείται.

Οι δομές του ελάχιστου συμπλόκου PRC2 (minimal PRC2 complex) αποκάλυψαν πώς μία ογκογονικού χαρακτήρα σημειακή μετάλλαξη (H3K27M) σε ένα μόνο αλληλόμορφο της ιστόνης H3, μπορεί να αναστείλει τη δράση του συμπλόκου, οδηγώντας σε μείωση των τριμεθυλιωμένων επιπέδων της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 κατά μήκος όλου του γονιδιώματος, κάτι που ευθύνεται για την ανάπτυξη γλοιοβλαστωμάτων σε παιδιά [55, 56]. Η δι- και τρι-μεθυλιωμένη λυσίνη K36 της ιστόνης H3 (H3K36me2/3) που εντοπίζεται στην ενεργά μεταγραφόμενη χρωματίνη, μειώνουν τη δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης του συμπλόκου PRC2 [57]. Αυτό φαίνεται να εξαρτάται ωστόσο από το ποιος υπότυπος του PRC2 συμπλόκου (PRC2.1 και PRC2.2) θα συναντήσει το

σήμα αυτό. Η ανασταλτική επίδραση της H3K36me3 στο PRC2 καταργείται παρουσία της PHF1 (χαρακτηριστικό του PRC2.1), η οποία μπορεί να συνδέεται με την H3K36me3 μέσω της συντηρημένης εξελικτικά Tudor περιοχή της [58]. Αυτό υποδηλώνει ότι τα σύμπλοκα PRC2-PHF1 μπορεί να είναι σημαντικά για την εξάπλωση της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K27 (H3K27me3) σε πλούσιες σε H3K36me3 περιοχές [58]. Αν και έχουν γίνει σημαντικά βήματα στη κατανόηση του τρόπου δράσης του ελάχιστου συμπλόκου PRC2, οι ακριβείς μηχανισμοί στρατολόγησης και πρόσδεσης του PRC2 σε περιοχές - στόχους στα θηλαστικά παραμένουν γενικά αμφοιβητούμενοι.



Εικόνα 8. Το σύμπλοκο PRC2. (A) Δομή των υπομονάδων του συμπλόκου PRC2 (B): EZ homolog 2 (EZH2), EED, SUZ12, retinoblastoma-binding protein p48 (RbAp48), adipocyte enhancer-binding protein 2 (AEBP2). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν περιοχές που βρέθηκαν να υπάρχουν στην πρόσφατα μελετημένη ανθρώπινη κρυσταλλική δομή με τη χρήση ακτίνων X στον πυρήνα του συμπλόκου PRC2. Η δομή του ανθρώπινου συμπλόκου PRC2 επιλύθηκε χρησιμοποιώντας negative stain EM σε ανάλυση 21Å [13]. Η κρυσταλλική δομή με τη χρήση ακτίνων X της Nurf55 (κόκκινο) και Su(z)12 (πράσινο) της Δροσόφιλας [57]. (C) Δομή τη πυρηνικής περιοχής του ανθρώπινου συμπλόκου PRC2 που περιλαμβάνει τις EZH2, EED και την περιοχή VEFS της SUZ12 σε αλληλεπίδραση με το διεγερτικό πεπτίδιο JARID2, τον συμπαράγοντα SAH και ανασταλτικό πεπτίδιο H3K27M [17]. (D) Το πεπτίδιο ενεργοποίησης, JARID2 K116me3, δεσμεύεται με την EED (μπλε, αναπαράσταση επιφάνειας) προκαλώντας την κοντινή SRM (ροζ) να υιοθετήσει μια α-ελικοειδή διαμόρφωση, η οποία με τη σειρά της καταλήγει στην SET-I, σταθεροποιώντας περαιτέρω την ενεργό θέση και διεγείροντας τη δραστηριότητά της. (E) Το H3K27M ανασταλτικό πεπτίδιο (πράσινο) δεσμευμένο στην περιοχή αναγνώρισης της SET (κόκκινο). Ο συμπαράγοντας SAH εμφανίζεται επίσης με πράσινο χρώμα κάτω από την περιοχή αναγνώρισης [14].

Πρωτεΐνες PcG: επιγενετικά ογκογονίδια - μεταλλάξεις και απαλοιφές του PRC2 συμπλόκου στον καρκίνο

Στον καρκίνο, οι υπομονάδες των PRC1 και PRC2 συμπλόκων μπορούν να μεταλλαχθούν, να υπερεκφραστούν ή να μειωθεί η έκφρασή τους. Οι παρεκκλίσεις που εμφανίζονται είναι ειδικές για τον κάθε τύπο καρκίνου, μπορεί ωστόσο να υπάρξουν και διαφορετικές αλλοιώσεις ακόμη και στον ίδιο τύπο καρκίνου [59]. Η ακριβής αιτιολογία της υπερέκφρασης των PcG πρωτεϊνών φαίνεται να σχετίζεται από το κυτταρικό περιβάλλον μέσα στο οποίο η υπερέκφραση των γονιδίων επιτελείται όπως επίσης και από τον τύπο του κυτταρικού ιστού (context and tissue type-dependent). Στον καρκίνο έχει παρατηρηθεί μία ποικιλία μηχανισμών που οδηγούν στην απορρόθμιση και τη μη σωστή έκφραση των PcG πρωτεϊνών, όπως η διακύμανση του αριθμού των αντιγράφων των PcG γονιδίων, μη σωστές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, μη σωστή τροποποίηση μέσω των micro-RNAs, απώλεια του πυρηνικού εντοπισμού των πρωτεϊνών

και διάφορες σωματικές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δραστηριότητά τους. Η κακοήθης ανάπτυξη επομένως, φαίνεται ότι στηρίζεται στην απενεργοποίηση κρίσιμων ογκοκατασταλτικών γονιδίων και ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου λόγω της ανισορροπίας της λειτουργίας που προκαλείται από την απορρύθμιση των PcG πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί που προκαλούν υπερέκφραση των υπομονάδων των PcG συμπλόκων και οι επιδράσεις τους στον κυτταρικό κύκλο, την επιδιόρθωση του DNA, την απόπτωση, τη γήρανση και άλλες κυτταρικές διεργασίες αναθεωρήθηκαν πρόσφατα λεπτομερώς [60]. Μεταλλάξεις και διαγραφές των υπομονάδων των PRC2 συμπλόκων έχουν αναφερθεί σε αρκετούς καρκίνους. Οι μεταλλάξεις αυτές, μπορεί να έχουν ενεργοποιητική ή κατασταλτική δράση και να οδηγούν σε ογκογονικό ή ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα. Επιπροσθέτως, οι πρωτεΐνες PcG διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση των κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των πολυδύναμων progenitor κυττάρων σε ποικίλους ιστούς υπό φυσιολογικές συνθήκες [61-63]. Η υπερέκφραση αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να προάγει την ογκογένεση ενισχύοντας την αυτο-ανανέωση ενός πληθυσμού κυττάρων, με πρότυπο μεθυλίωσης της χρωματίνης χαρακτηριστικό των βλαστοκυττάρων (stem cell-like chromatin patterns), ικανών για ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό, δίνοντας έτσι πίστη στους υποστηρικτές της υπόθεσης των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Με βάση το σενάριο αυτό, η κατασταλτική δράση έναντι της διαφοροποίησης και των ογκοκατασταλτικών γονιδίων που διατηρούν την πλαστικότητα αφήνει τις περιοχές του γονιδιώματος ευάλωτες στην υπερ-μεθυλίωση οδηγώντας έτσι στη μόνιμη σταθεροποίηση της ακατάλληλης γονιδιακής σίγησης [64].

Η πρωτεΐνη Polycomb BMI1

Η πρωτεΐνη BMI1 ήταν η πρώτη PcG πρωτεΐνη που συνδέθηκε με νεοπλασματική ανάπτυξη και παραμένει η καλύτερα μέχρι τώρα χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη. Με την ανακάλυψη και το χαρακτηρισμό της ως πρωτο-ογκογονίδιο διαπιστώθηκε ότι συνεργάζεται με τη Myc επιταχύνοντας σημαντικά την βιογένεση των B και T κυττάρων στα λεμφώματα (B- and T- cell lymphomagenesis) [65]. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω καταστολής της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης CDKN2A ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταρικό κύκλο, τον πολλαπλασιασμό και τη γήρανση των κυττάρων [66]. Η υπερέκφραση της BMI1 έχει γίνει ένας σημαντικός προγνωστικός δείκτης σε μια ευρεία ποικιλία καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου των ωοθηκών [67], της ουροδόχου κύστης [68] και του καρκίνου του μαστού [68].

Η πρωτεΐνη Polycomb EZH2

Η EZH2 είναι μία μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, αποτελεί την καταλυτική υπομονάδα του PRC2 συμπλόκου [69] και καταλύει την μονο-, δι- και τρι- μεθυλίωση της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me, H3K27me2, H3K27me3). Η δράση της ως απομεθυλάση επιτελείται από την καταλυτική περιοχή SET της αμινοξικής αλληλουχίας της. Η EZH2 εκτός του ότι προάγει την πρόσδεση του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου καταστολής γονιδίων 1 (PRC1) κατά μήκος του γονιδιώματος [69], πρόσφατα αποδείχθηκε ότι στρατολογεί μεθυλοτρανσφεράσες σε γονίδια - στόχους, παρέχοντας έτσι μία άμεση σύνδεση μεταξύ της μεθυλίωσης των ιστονών και της μεθυλίωσης του DNA [70].

Η EZH2 συνδέεται στενά με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [54] ενώ η αποσιώπηση της οδηγεί σε καθολική μείωση των επιπέδων της δι- και τρι- μεθυλίωσης της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me2/me3). Ενεργοποιητικές ή κατασταλτικές μεταλλάξεις λειτουργίας της έχουν βρεθεί σε μία πληθώρα καρκίνων [71]. Οι μεταλλάξεις υπερ-ενεργοποίησης συνήθως περιλαμβάνουν αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην καταλυτική περιοχή της πρωτεΐνης SET [72-74], ενώ οι αδρανοποιητικές μεταλλάξεις μπορεί να οφείλονται σε παρανοηματικές (μη-συνώνυμες) μεταλλάξεις, μεταλλάξεις μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης, ή μεταλλάξεις που οδηγούν σε λανθασμένο μάτισμα [75-79]. Η EZH2 υπερεκφράζεται σε πολλούς διαφορετικούς

τύπους καρκίνου και η έκφρασή της είναι ανάλογη της επιθετικότητας στον καρκίνο του προστάτη [80, 81], τον καρκίνο του μαστού [81-83], τον καρκίνο του παγκρέατος [84], τον καρκίνο του ενδομητρίου [81] και το μελάνωμα [81, 85]. Στις περισσότερες από αυτές τις μορφές καρκίνου, η υπερέκφραση της EZH2 σχετίζεται με την μεγάλη πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων, την επιθετικότητα έναντι των ιστών και τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό [59, 81]. Επιπλέον, τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της EZH2 σχετίζονται με τη σοβαρότητα της κακοήθειας και αποτελούν έναν αρνητικό προγνωστικό δείκτη για τον καρκίνο του μαστού και του προστάτη [80, 82]. Πειραματικά έχειδειχθεί πως η υπερέκφραση της EZH2 προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [86-90], τη μετανάστευση των κυττάρων [91-93], την αγγειογένεση [94] και την επιβίωση [95, 96]. Η EZH2 ανταγωνίζεται τις HDAC1 και τους καταστολείς της ανάπτυξης pRb2/p130 στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης A, οδηγώντας σε διακοπή της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου και προάγοντας τη γονιδιωματική αστάθεια και το μετασχηματισμό των κυττάρων [97, 98]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της EZH2 οδηγεί στην καταστολή της E-καδερίνης, μία πρωτεΐνη που συμβάλλει στη διατήρηση της μορφολογίας των επιθηλιακών κυττάρων και εμπλέκεται άμεσα στην κυτταρική προσκόλληση, τη μετανάστευση των κυττάρων και τη μετάσταση [92]. Από την υπερέκφραση των PcG πρωτεϊνών διαταράσσονται πολλαπλές καθοδικές λειτουργίες του κυττάρου, γεγονός που υποδεικνύει τη σπουδαιότητα της σωστής ρύθμισης των πρωτεϊνών αυτών. Πρόσφατα μάλιστα προτάθηκε ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ του PRC2 συμπλόκου και της ανοσολογικής σηματοδότησης. Η EZH2 φαίνεται να καταστέλλει γονίδια που σχετίζονται με τη σηματοδότηση μέσω των ιντερφερονών και των κυττοκινών, καθιστώντας έτσι τα καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά απέναντι στην “ανοσολογική παρακολούθηση” (immune surveillance). Παραδείγματα περιλαμβάνουν τον υποκινητή του IFNGR1 γονιδίου, ο οποίος ρυθμίζει την IFN-g σηματοδότηση στον καρκίνο του προστάτη [99]. Μεταλλάξεις υπερενεργοποίησης της EZH2 συνήθως εντοπίζονται στην καταλυτική περιοχή SET του ενζύμου και έχουν αναφερθεί στο θυλακοειδές λέμφωμα (follicular lymphoma) και στο διάχυτο λέμφωμα B-κυττάρων (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL). Η πιο κοινή τέτοια μετάλλαξη είναι η αντικατάσταση της τυροσίνης 641 (Y641) [72]. Το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο βρίσκεται πάντοτε σε συνδυασμό με ένα αλληλόμορφο άγριου τύπου (WT). Παλιότερα, είχε θεωρηθεί ότι αυτή η μετάλλαξη συνδεόταν με μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα του συμπλόκου *in vitro*, ωστόσο, τώρα έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός μεταλλαγμένων και άγριου τύπου αλληλομόρφων λειτουργεί κυρίως για να αυξηθεί η τριμεθυλίωση της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27) [100]. Πέρα από αυτή την αντικατάσταση της τυροσίνης 641 έχουν κατά καιρούς αναφερθεί και άλλες μεταλλάξεις ενεργοποίησης της EZH2 στο λέμφωμα. Η αντικατάσταση, για παράδειγμα, της A687V λειτουργεί με παρόμοιο τρόπο με αυτή της Y641 [73]. Μεταλλάξεις που οδηγούν σε καταστολή της καταλυτικής δράσης της EZH2 έχουν ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη EZH2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και οι καρκίνοι που εμφανίζουν μεταλλάξεις ή διαγραφές τμημάτων γονιδίων του χρωμοσώματος 7 και πιο συγκεκριμένα στο τμήμα 7q του χρωμοσώματος, έχει παρατηρηθεί πως έχουν αδρανοποιημένες ή διαγραμμένες μορφές της EZH2. Ομόζυγες ή ετερόζυγες μικροαπαλοιφές (microdeletions) στην αλληλουχία της EZH2 έχουν εντοπιστεί σε μυελοδυσπλαστικά (myelodysplastic) [76] και μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα (myeloproliferative neoplasms) (MDS/MPN) [75] και στη χρόνια μυελομονοκυτταρική λευχαιμία (chronic myelomonocytic leukemia) (CMML) [77], σε κυτταρικές σειρές που δείχνουν σχεδόν πλήρη απώλεια της H3K27me3. Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας εντοπίζονται επίσης κυρίως στην myelofibrosis, όπου οι μεταλλάξεις αυτές σχετίζονται με μικρότερο ποσοστό επιβίωσης και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης λευχαιμίας [78]. Σε αυτούς τους καρκίνους, η πρόοδος της νόσου προκαλείται κυρίως από μεταλλάξεις στις υπομονάδες του PRC2 συμπλόκου. Ωστόσο, στους περισσότερους άλλους τύπους καρκίνου, η υπερέκφραση της EZH2 σχετίζεται με την επιθετικότητα του καρκίνου.

Υπερέκφραση της EZH2 στον καρκίνο του προστάτη - miRNAs [101]

Η υπερέκφραση της EZH2 στον καρκίνο του προστάτη [80] προέρχεται κυρίως από τη συντονισμένη δράση αρκετών παραγόντων μεταγραφής, όπως οι πρωτεΐνες E2F [86] και MYC [102], οι οποίες δεσμεύονται στα E-boxes ανοδικά της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου EZH2 [103]. Επιπλέον, micro-RNAs χάνονται [104, 105] ή αναστέλλονται από την MYC στον καρκίνο του προστάτη [102]. Η υπερέκφραση της EZH2 οδηγεί αναπόφευκτα στην απόκτηση νέων στόχων, οι οποίοι είναι κυρίως ογκοκατασταλτικά γονίδια ή γονίδια που ελέγχουν την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Ο παρακάτω πίνακας παραθέτει διάφορα γονίδια που η έκφρασή τους καταστέλλεται από το PRC2 στον καρκίνο του προστάτη [106].

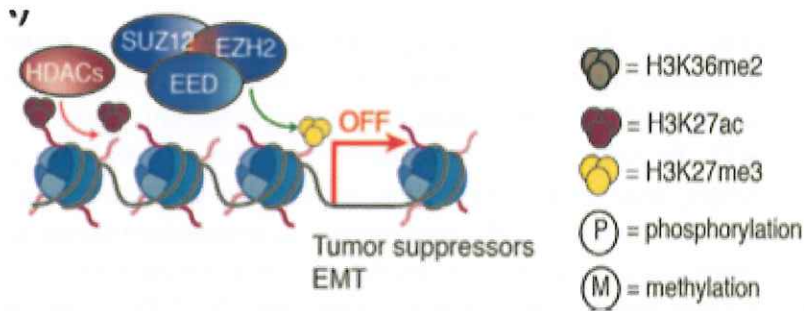
Gene	DNA methylation	Role in cancer	Function
DAB2IP	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits activation of Ras and NF-κB
ADRB2	n.a.	Tumor suppressive	Repress invasion and transformation
CDH1	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits EMT
KLF2	n.a.	Tumor suppressive	Growth inhibition, pro-apoptotic, and anti-angiogenic
RKIP	n.a.	Tumor suppressive	Metastasis suppressor
CBP	n.a.	Tumor suppressive	Histone acetyltransferase prevents H3K27me3
TIMP2	n.a.	Tumor suppressive	Inhibitor of matrix metalloproteinase
TIMP3	+	Tumor suppressive	Inhibitor of matrix metalloproteinase
IFNGR1	n.a.	Tumor suppressive	Activates IFN-γ-signaling
RUNX1	n.a.	Tumor suppressive/Oncogenic	Promotes and inhibit proliferation depending on AR
NOV	n.a.	Tumor suppressive	Cell differentiation
SAFB1	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits growth, interacts with MST1
MSMB	+	Tumor suppressive	Inhibits growth
GAS2	n.a.	Tumor suppressive	Promote apoptosis and inhibits growth
PIK3C4	n.a.	Tumor suppressive	Promote apoptosis and inhibits growth
SLIT2	+	Tumor suppressive	Inhibition of migration
RARβ	+	Tumor suppressive	Differentiation
MST1	+	Tumor suppressive	Inhibit proliferation
ID4	+	Tumor suppressive	Regulates prostate morphogenesis
VCL	n.a.	Tumor suppressive	Required for E-cadherin function, inhibits EMT
miR-181a,b	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits growth, invasiveness, and self-renewal
miR-203	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits growth, invasiveness and self-renewal, inhibits MMSET
miR-200b,c	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits growth, invasiveness, and self-renewal
PCAT-1	n.a.	Oncogenic	Promotes proliferation in LNCaP cells
miR-205	n.a.	Tumor suppressive	Promotes apoptosis and inhibits chemoresistance
miR-31	n.a.	Tumor suppressive	Promotes apoptosis and inhibits chemoresistance
miR-26A	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits MMSET
miR-31	n.a.	Tumor suppressive	Inhibits MMSET

n.a., not applicable.

Gene	Mutation	Cancer
SUZ12, EED	Frameshift/point	MPNSTs
SUZ12, EZH2	Frameshit/nonsense/point	T-ALL
EZH2	Y641, A687V, A677G	DCLBCL
EZH2	Microdeletions	MDS/MPN, Myelofibrosis, CMML

Πίνακας 5, 6: Γονίδια και miRNAs που η έκφρασή τους καταστέλλεται από τη δράση του PRC2 συμπλόκου στον καρκίνο του προστάτη. Μεταλλάξεις στον καρκίνο στο PRC2 συμπλόκο [106].

Συνδυασμοί αναστολέων που στοχεύουν τα HDACs και PRC2 έχουν χρησιμοποιηθεί για να αποδειχθεί ότι και τα δύο συστήματα απαιτούνται για την αποτελεσματική σίγηση αυτών των στόχων. Εκτός από την κλασική λειτουργία του PRC2 που μεσολαβείται μέσω της H3K27me3, μερικές μελέτες έχουν αναφέρει ένα ξεχωριστό μηχανισμό δράσης, ειδικά σε καρκίνους του προστάτη που προκαλούνται από το MYC. Μία μελέτη μάλιστα, έδειξε απώλεια των συστατικών του PRC2 συμπλόκου έπειτα από την απο-καταστολή των γονιδίων στόχων χωρίς ταυτόχρονη απώλεια της H3K27me3, όπως συνήθως περιγράφεται σε άλλα συστήματα [99].



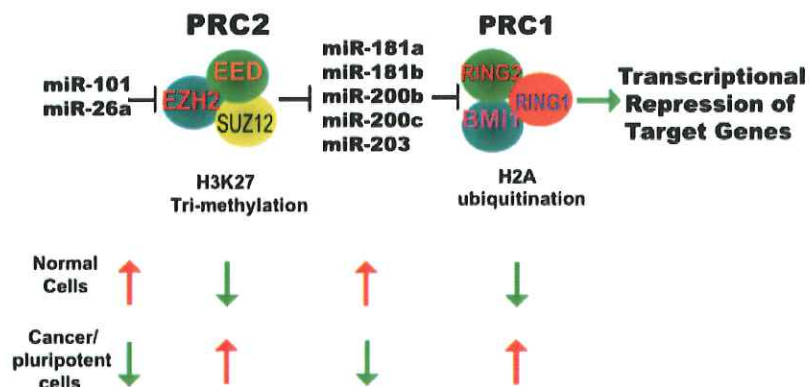
Εικόνα 10. Μηχανισμός δράσης των PRC2 και EZH2 στον καρκίνο του προστάτη. Α: Μεταγραφική σίγηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων και των γονιδίων που εμπλέκονται στην επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) στον καρκίνο του προστάτη, που προκαλείται από την αποακετυλίωση της H3K27ac ακολουθούμενη από την τριμεθυλίωση της H3K27 από το PRC2 [92, 107-109].

Σε μία άλλη μελέτη, παρατηρήθηκε αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της MYC και της H3K27me3 σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη [110]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η H3K27me3 επάγεται (self-propagating) κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και τα επίπεδά της αυξάνονται κατά το στάδιο G0 [111]. Διαγραφή της EZH2 σε καρκινικά κύτταρα προστάτη οδηγεί συνήθως σε αναστολή του κυτταρικού κύκλου. Συνεπώς, ακόμη και απουσία των ενζύμων που καταλύουν την μεθυλίωση της ιστόνης K27 στην ιστόνη H3 η απώλεια της H3K27me3 μπορεί να μην ακολουθεί την ίδια δυναμική με εκείνη των συστατικών του Polycomb λόγω της φύσης αυτής της αυτο-επαγωγής (nature of its propagation). Εκτός από τα γονίδια - στόχους, η EZH2 μπορεί επίσης να καταστέλλει την έκφραση διάφορων miRNAs. Τα miRNAs αυτά, συνήθως εμπλέκονται σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως είναι η απόπτωση και συχνά θεωρούνται ότι αποτελούν ένα μηχανισμό που παρέχει ανθεκτικότητα έναντι της αυτο-ανανέωσης [112], της χημειοθεραπείας [112] και της clonogenicity σε καρκινικά κύτταρα προστάτη. Η καταστολή της έκφρασης των miRNAs από την EZH2 επηρεάζει επίσης τους καθοδικούς στόχους των miRNAs αυτών, μερικοί από τους οποίους είναι τροποποιητές της χρωματίνης. Για παράδειγμα, η απώλεια του microRNA-101 (miRNA101) έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας μηχανισμός που οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα της EZH2 και του PRC2 συμπλόκου σε όγκους [104, 105, 113, 114]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι το miR-26a στοχεύει την EZH2 στον καρκίνο και τη μυογένεση.

Συσσωρευμένα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η αυξημένη δραστηριότητα του PRC2 έχει ογκογονικό χαρακτήρα, όπως καταδεικνύεται από τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [80, 86], την αυξημένη διηθητική ικανότητα [82, 92], την ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση ανάπτυξη (anchorage-independent growth) [82, 86], την ανάπτυξη όγκων σε xenograft μοντέλα και τη μετάσταση *in vivo* στον καρκίνο του προστάτη [101]. Η αυξημένη δραστηριότητα του PRC2 καταλήγει στην καταστολή πολλών miRNAs που είναι γνωστό ότι είναι σημαντικά για τη διατήρηση του stem cell-like φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, το PRC2 οδηγεί στην επιγενετική καταστολή της έκφρασης των miR-181a, miR-181b, miR-200b, miR-200c και miR-203 έπειτα από την τριμεθυλίωση της λυσίνης K27 στην ιστόνη H3 (H3K27me3) σε αυτούς τους γονιδιακούς τύπους. Η εξωγενής υπερέκφραση των miR-181a, miR-181b, miR-200b, miR-200c, και miR-203 αναστέλλει τον καρκινικό φαινότυπο *in vitro*. Επιπλέον, υπερέκφραση των miR-181b, miR-200b και miR-203 καταστέλλει το σχηματισμό και την ανάπτυξη όγκων στον προστάτη σε xenografts μοντέλα ποντικών. Πρόσφατα, αρκετές ομάδες μάλιστα ανέφεραν ότι τα miR-200b, miR-200c και miR-203 διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στον έλεγχο της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) και της προόδου του καρκίνου.

Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι οι πρωτεΐνες BMI1 και RING2 του PRC1 συμπλόκου είναι άμεσοι στόχοι των miR-181a, miR-181b, miR-200b, miR-200c και miR-203 στον καρκίνο του

μαστού και του προστάτη [101]. Συνοψίζοντας, έχει δειχθεί ότι υπάρχει μια σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του PRC2 και των miR-181a, miR-181b, miR-200b, miR-200c και miR-203, καθώς και μια ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των πρωτεϊνών EZH2, BMI1 και RING2. Τα microRNAs, η έκφραση των οποίων ρυθμίζεται από την EZH2, συμβάλλουν στη διατήρηση μιας διαφοροποιημένης κυτταρικής κατάστασης και τα miR-181a, miR-181b, miR-200b, miR-200c και miR-203 λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά κατά την πρόοδο του καρκίνου του προστάτη. Όλα τα παραπάνω ευρήματα έχουν συνοψιστεί σε ένα μοντέλο που απεικονίζει τη συντονισμένη δράση των ογκοπρωτεϊνών των PRC2-PRC1 συμπλόκων και την επιγενετική σύνδεση μεταξύ της H3K27me3 και της ουβικουτινυλιωμένης ιστόνης H2A, με τη μεσολάβηση των ρυθμισμένων από PRC2 miRNAs [101].

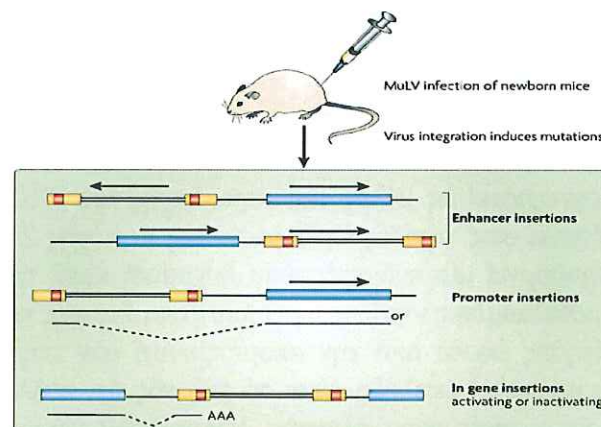


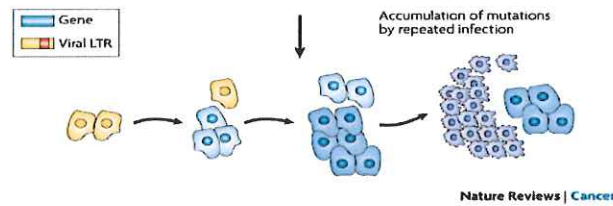
Εικόνα 12. Προτεινόμενο μοντέλο για τη δράση των *micro-RNAs* στη ρύθμιση των *PRCs* συμπλόκων. Ειδικά, το *PRC2* σύμπλοκο συνδέεται μοριακά με το *PRC1* μέσω ενός συνόλου ρυθμιστικών *miRs* [101].

3. Διαφορετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για απομεθυλάσες ιστονών κατά την ογκογένεση

Οι απομεθυλάσες ιστονών κωδικοποιούνται από γονίδια που είναι στόχοι ενσωμάτωσης προϊών. Οι όγκοι που προκαλούνται είναι αποτέλεσμα της ένθεσης του ρετροϊού στην αλληλουχία των γονιδίων-στόχων

Η μεταλλαξογένεση μέσω εισαγωγής ρετροϊών στην αλληλουχία των γονιδίων-στόχων είναι ένα ισχυρό γενετικό εργαλείο για την ταυτοποίηση νέων ογκογονιδίων [1]. Η ενσωμάτωση ενός προϊού στο γονιδίωμα προκαλεί αλλοιώσεις που ως αποτέλεσμα έχουν την προαγωγή και εξέλιξη των επαγόμενων από το ρετροϊό όγκων. Δεδομένου ότι οι περιοχές της ενσωμάτωσης του προϊού είναι σχεδόν τυχαίες, η ενσωμάτωση ενός προϊού σε κοινές θέσεις (CIS) σε πολλαπλούς όγκους υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη που προκαλείται από την ενσωμάτωση σε αυτές τις θέσεις παρέχει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στα προσβεβλημένα κύτταρα έναντι των υπολοίπων όσο αφορά τον ογκογονικό τους χαρακτήρα. Με πειράματα ένθεσης ρετροϊών κατά μήκος όλου του γονιδιώματος, σε λεμφώματα T κυττάρων ποντικών που προκλήθηκαν από την ενσωμάτωση του MoMuLV, ταυτοποιήθηκαν τέσσερις πρωτεΐνες που στην αλληλουχία του γονιδίου τους περιείχαν την αμινοξική αλληλουχία που κωδικοποιεί για την περιοχή JmjC [2]. Οι περισσότερες από αυτές τις ενθέσεις πραγματοποιήθηκαν στην 5' περιοχή ενός γονιδίου, το οποίο λόγω του χαρακτηριστικού φαινοτύπου που εμφάνιζαν τα ποντίκια ονομάστηκε Not-dead-yet-1 (NDY1). Είναι επίσης γνωστό και ως FBXL10, JHDM1B ή KDM2B. Στα ίδια πειράματα ανιχνεύθηκαν επίσης ενσωματώσεις προϊού στην 5' περιοχή του γονιδίου NDY2/KDM2A (επίσης γνωστό ως FBXL11 ή JHDM1A), ομόλογου του NDY1, όπως επίσης και στην 5' περιοχή δύο άλλων JmjC- πρωτεϊνών, των PHF2 και PHF8 [2]. Το γονίδιο NDY1/KDM2B αναγνωρίστηκε ως κοινή θέση ενσωμάτωσης προϊού σε πολλαπλούς όγκους (CIS) σε τρεις επιπρόσθετες μελέτες [3, 4], ενώ το PHF2 αναγνωρίστηκε επίσης ως CIS σε μία μεγάλης κλίμακας ανάλυση μεταλλαξογένεσης, σχετική με τη διαμεσολαβούμενη από ρετροϊούς ογκογένεση σε p19^{ARF}- και p53- deficient ποντίκια [4]. Τέλος, εντοπίστηκαν πολλαπλές ενσωματώσεις προϊού στο γονίδιο NDY2/KDM2A σε ανθρώπινα κύτταρα καλλιέργειας έπειτα από τη μόλυνσή τους με τον ιό HIV [5]. Δύο επιπλέον πρωτεΐνες που περιείχαν την περιοχή JmjC, οι JMJD5 και JMJD1A/KDM3A, ταυτοποιήθηκαν σε μία διαφορετική ανάλυση σχετική με την προκαλούμενη ογκογένεση από ενσωμάτωση ρετροϊών σε ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης Blm (Blm-deficient) [3]. Το επιχείρημα για τη χρήση ποντικών χωρίς Blm ήταν ότι στις προηγούμενες αναλύσεις με ποντίκια αγρίου τύπου, οι ρετροϊοί στόχευαν κατά προτίμηση ογκογονίδια, ενώ στα Blm-deficient ποντίκια μπορεί οι ρετροϊοί να στοχεύουν ογκοκατασταλτικά γονίδια.





Εικόνα 13. Ενσωμάτωση προ-ϊών (*Provirus integration*): εργαλείο για τον εντοπισμό νέων ογκογονιδίων. Δεδομένου ότι η ενσωμάτωση του προϊού είναι τυχαία, η ανίχνευση ενός ενσωματωμένου προϊού εντός μιας δεδομένης περιοχής DNA σε πολλαπλούς όγκους, υποδηλώνει ότι η μετάλλαξη που προκαλείται από την ενσωμάτωση αυτή του προϊού, προσδίδει στο προσβεβλημένο κύτταρο ένα πλεονέκτημα έναντι των γειτονικών του. Έτσι, η ταυτοποίηση κοινών θέσεων ενσωμάτωσης σε όγκους που προκαλούνται από ρετροϊούς χρησιμοποιείται ως αποτελεσματικό εργαλείο για τον εντοπισμό νέων ογκογονιδίων.

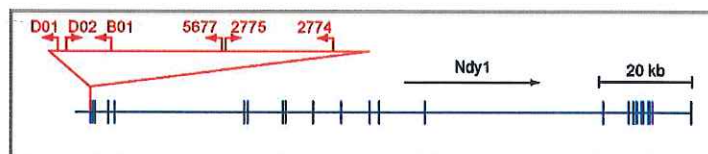
KDM2B και PRC1: Δύο αντίθετοι “παίχτες” της επιγενετικής ρύθμισης [6]

Οι νησίδες CpG αντιπροσωπεύουν θέσεις “ανοιχτής και χαλαρής” δομής της χρωματίνης. Για το λόγο αυτό αποτελούν επιτρεπτές “πλατφόρμες” για διάφορα σύμπλοκα να προσδεθούν στις θέσεις αυτές και να επιτελέσουν τον εκάστοτε ρόλο τους, όπως για παράδειγμα της προαγωγής της μεταγραφής. Γενικά οι νησίδες των διουκλεοτιδίων CpG χαρακτηρίζονται από την παρουσία της μεθυλιωμένης λυσίνης K4 της ιστόνης H3 (H3K4me3), σημάδι της “ενεργής” χρωματίνης, το οποίο εναποτίθεται από το σύμπλοκο SET1 και τις συγγενικές πρωτεΐνες της ομάδας Trithorax. Η κατάσταση αυτή είναι ανταγωνιστική στις *de novo* DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs) (this state is antagonistic to *de novo* DNA methyltransferases). Οι νησίδες CpG βρίσκονται κάτω από τη συνεχή παρακολούθηση κατασταλτικών παραγόντων, τα λεγόμενα σύμπλοκα Polycomb [7, 8]. Αυτή η ισορροπία μεταξύ των ενεργοποιητικών και των κατασταλτικών ενεργειών είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τη διάρκεια των μεταβατικών αλλαγών της ανάπτυξης, κατά την οποία συγκεκριμένα σύνολα γονιδίων ενεργοποιούνται μεταγραφικά ή καταστέλλεται η έκφρασή τους. Απορρύθμιση της ισορροπίας αυτής μπορεί να προκαλέσει τη ξαφνική, ακατάλληλη και μόνιμη διακοπή της έκφρασης ή υπερέκφρασης γονιδίων, όπως συμβαίνει και στον καρκίνο. Λεπτομέρειες σχετικά με τη μετάβαση από την κατασταλτική-Polycomb κατάσταση στις DNA-μεθυλιωμένες CpG νησίδες παραμένουν ασαφείς (details of the progression from Polycomb-repressed to DNA-methylated CpG islands remain unclear), ιδιαίτερος επειδή η τριμεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη K27 (H3K27me3), τροποποίηση ιστόνης όπου εξαρτάται από το Polycomb σύμπλοκο και η μεθυλίωση του DNA εμφανίζονται γενικά να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες διαδικασίες. Από τις πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε νησίδες CpG, πολλές κατέχουν μια περιοχή δακτύλου ψευδαργύρου (ZF)-CXXC, η οποία δεσμεύεται ειδικά με μη μεθυλιωμένα CpGs διουκλεοτίδια. Μία τέτοια πρωτεΐνη είναι η FBXL10, επίσης γνωστή ως KDM2B ή JHDM1B [9]. Αναλύσεις δέσμευσης πρωτεϊνών κατά μήκος όλου του γονιδιώματος παρουσίασαν την KDM2B στις περισσότερες νησίδες CpG [10, 11], θέσεις που τις μοιράζεται με την συγγενική της πρωτεΐνη FBXL11 ή KDM2A, με τη διαφορά όμως ότι η KDM2B εντοπίζεται στις νησίδες CpG οι οποίες καταλαμβάνονται κατά κύριο λόγο από το κατασταλτικό σύμπλοκο των γονιδίων Polycomb 1 (PRC1). Η KDM2B έχει αναγνωριστεί ως μέλος της παραλλαγής του PRC1 συμπλόκου [10], το οποίο είναι ικανό να προσδένεται στις νησίδες CpG μέσω της περιοχής ZF-CXXC της KDM2B [10-12]. Το γεγονός αυτό δημιουργεί μία ενδιαφέρουσα δυναμική κατά την οποία τα σύμπλοκα Polycomb στοχεύουν σε μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG που είναι έτοιμες να “κλειδωθούν” σε μία κατάσταση μεταγραφικής σίγησης έπειτα από την απομάκρυνση των ενεργοποιητών [7, 8, 13]. Κάτι που δεν πρέπει να μας προκαλεί έκπληξη είναι το γεγονός ότι πολλές από αυτές τις CpG νησίδες που βρίσκονται σε υποκινητές αναπτυξιακών ρυθμιστικών γονιδίων παρουσιάζουν μια κατάσταση “δισθενούς” χρωματίνης (bivalent chromatin status) που χαρακτηρίζεται από αμφοτερές την παρουσία της ενεργοποιητικής H3K4me3 και της κατασταλτικής H3K27me3 τροποποίησης της ιστόνης.

NDY1/KDM2B and NDY2/KDM2A

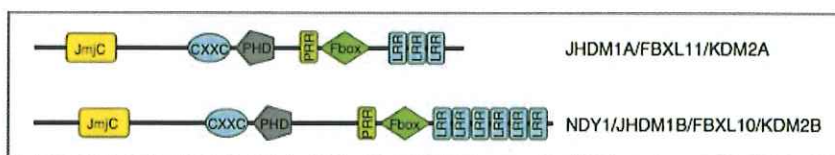
Οικογένεια KDM2 - Μοριακός Χαρακτηρισμός των NDY1 και NDY2

Το γονίδιο NDY1/KDM2B κωδικοποιεί για μία απομεθυλάση ιστονών και ανήκει στην ομάδα των απομεθυλασών ιστόνης KDM2. Η ομάδα αυτή αποτελείται από δύο μέλη, τα ομόλογα γονίδια NDY1/KDM2B και NDY2/KDM2A. Η πρώτη πρωτεΐνη που αποδείχτηκε ότι περιέχει την περιοχή JmjC ήταν η απομεθυλάση KDM2A/JHDM1A/FBXL11 (JmjC domain-containing histone demethylation protein 1A)/FBXL11 (F-box and leucine-rich repeat protein 11) [14]. Και οι δύο πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί ότι είναι στόχοι προ-ϊών [2-5, 15].



Εικόνα 14. *Ndy1* is a Common Target of Provirus Integration in *MoMuLV*-induced Rat T Cell Lymphomas [2].

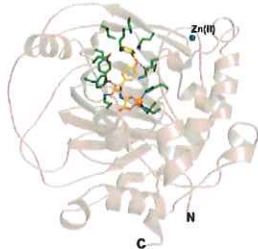
Είναι πρωτεΐνες του πυρήνα και περιέχουν μια αμινοτερματική περιοχή JmjC (N-terminal JmjC domain), μία περιοχή δαχτύλων - ψευδαργύρου CXXC (CXXC zinc-finger domain), μία δεύτερη περιοχή δαχτύλων - ψευδαργύρου PHD (PHD zinc-finger), ένα κουτί F-box και μία περιοχή πλούσια σε λευκίνες LRR (leucine-rich repeat). Επιπλέον, και οι δύο περιέχουν μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης PRR (region rich in proline residues), η οποία βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του F-box. Το μοτίβο CXXC συνδέεται με μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG κατά μήκος του DNA και συμβάλλει στη σύνδεση αυτών των πρωτεϊνών με τα γονίδια-στόχους τους [16, 17]. Η περιοχή PHD αποτελεί μία περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών. Κατ' αναλογία με τις περιοχές PHD άλλων απομεθυλασών ιστονών, είναι πιθανό να μεσολαβεί στη σύνδεση των NDY1 και NDY2 με τις μεθυλιωμένες συρές των ιστονών [18-22] ή με άλλους ρυθμιστές της δομής της χρωματίνης, όπως είναι οι αποακετυλάσες των ιστονών [23]. Η περιοχή F-box συμβάλλει στην αναγνώριση των NDY1 και NDY2 ως συστατικά των συμπλεγμάτων της λιάσης της ουβικουτίνης (ubiquitin ligase complexes.). Το F-box συχνά συσχετίζεται με την καρβοξυτελική πλούσια σε λευκίνη περιοχή (C-terminal LRRs) και αμφότερες οι περιοχές αυτές λειτουργούν συντονισμένα στη συναρμολόγηση του μηχανισμού ουβικουτυνίωσης και την αναγνώριση της πρωτεΐνης στόχου [24].



Εικόνα 14. Μοριακή δομή των KDM2/JHDM1 απομεθυλασών [25].

Η έναρξη της μεταγραφής από διαφορετικά σημεία καθώς και το εναλλακτικό μάτισμα και ωρίμανση του RNA δημιουργούν αρκετές ισομορφές της KDM2B/NDY1 πρωτεΐνης [2]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία συγκεκριμένη ισομορφή, που ονομάζεται “βραχεία” ή “μικρή” ισομορφή, από την οποία απουσιάζει η καταλυτική περιοχή απομεθυλάσης JmjC [2]. Με πειράματα gene-trap insertion [26], μία τεχνική που καταργεί την έκφραση και των δύο ισομορφών της πρωτεΐνης αποκαλύφθηκε πως η μικρότερη ισομορφή έχει κυρίαρχη λειτουργία κατά την εμβρυογένεση. Ανάλυση της DNA μεθυλίωσης εμβρυϊκών κυττάρων (ES) βλαστοκύστεων από KDM2B-null έμβρυα ποντικών φανέρωσε ότι η απουσία της KDM2B οδηγεί σε αύξηση της μεθυλίωσης στις νησίδες CpG, συνοδευόμενη από μεταγραφική καταστολή [26]. Τα μέχρι τώρα

πειράματα επικεντρώνονται και έχουν βασιστεί κυρίως στην ισομορφή NDY1v1 του ποντικού, η οποία αναφέρεται ως η “μακρά” ισομορφή και περιέχει όλες τις προαναφερθείσες λειτουργικές περιοχές [2]. Οι σχετικοί ρόλοι αυτών των ισομορφών στη βιολογία των κυττάρων και στη γενικότερη φυσιολογία των οργανισμών, μόλις τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αναλύονται.

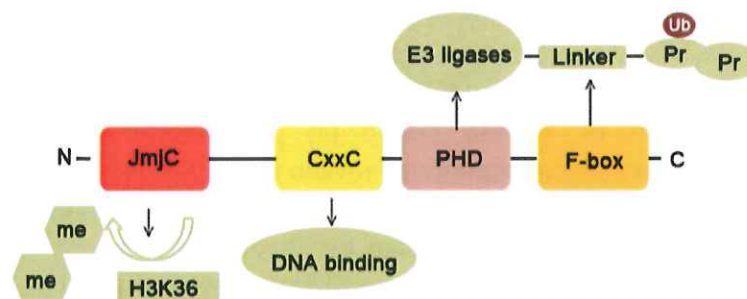


Εικόνα 15. Δομή της πρωτεΐνης KDM2B [27].

Οι πρωτεΐνες KDM2A και KDM2B των θηλαστικών καθώς και οι ομόλογές του στη Δροσόφιλα και το *S. cerevisiae*, έχουν καταδείξει ότι καταλύουν την απομεθυλίωση της μονο- και διμεθυλιωμένης λυσίνης K36 της ιστόνης H3 (H3K36me2/me1) [14, 28, 29] αλλά όχι και της τριμεθυλιωμένης μορφής (H3K36me3) [14, 28, 30]. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, η KDM2B προτάθηκε ότι δρα και ως απομεθυλάση για την τριμεθυλιωμένη λυσίνη K4 της ιστόνης H3 (H3K4me3) [30, 31], αλλά υπάρχει ακόμα ασυμφωνία σχετικά με το εάν η ανασυνδυασμένη KDM2B μπορεί ή όχι να στοχεύσει αυτό το σήμα [28, 30]. Αν και η εξειδίκευση της KDM2A/NDY2 όσο αφορά το υπόστρωμα δράσης της φαίνεται να περιορίζεται στη διμεθυλιωμένη λυσίνη K36 της ιστόνης H3 (H3K36me2), η ακριβής εξειδίκευση του υποστρώματος δράσης της KDM2B/NDY1 ακόμα αμφισβητείται. Έτσι, ενώ μία ερευνητική ομάδα έχει αναφέρει ότι η KDM2B/NDY1 στοχεύει στην ιστόνη κατάλοιπα της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K4 (H3K4me3) [31], άλλοι παρέχουν αποδείξεις ότι τόσο η KDM2B/NDY1 των θηλαστικών όσο και η ομόλογή του dKDM2 στη δροσόφιλα στοχεύουν ειδικά την διμεθυλιωμένη μορφή της λυσίνης K36 (H3K36me2) [28, 29]. Στη συνέχεια, μία τρίτη ομάδα ερευνητών έδειξε ότι η KDM2B/NDY1 στοχεύει κυρίως τα διμεθυλιωμένα κατάλοιπα της λυσίνης K36 της ιστόνης H3, παρουσιάζει όμως και μια ασθενή δραστηριότητα απομεθυλάσης έναντι της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K4 (H3K4me3) [30], γεγονός που υποστηρίζει τη διπλή δραστηριότητα του ενζύμου αυτού. Ένα ισχυρό επιχείρημα υπέρ της διττής αυτής δράσης της KDM2B/NDY1 δίνεται από γενετικά πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στη δροσόφιλα. Στη δροσόφιλα, το γονίδιο που κωδικοποιεί για το μοναδικό ομόλογο των γονιδίων της ομάδας KDM2, το CG11033 ή dKDM2, είναι απαραίτητο για την επιβίωσή της [29]. Συγκεκριμένα, έχει δείχθει ότι μετάλλαξη απώλειας της λειτουργίας στο ένα αλληλόμορφο του γονιδίου dKDM2 μειώνει τη συχνότητα του μετασχηματισμού (homeotic transformation) από τις μεταλλάξεις ετεροζυγωτικής απώλειας της λειτουργίας της ομάδας των γονιδίων Trithorax που κωδικοποιούν για τις ASH1 (μεθυλοτρανσφεράση της H3K36) ή TRX1 (μεθυλοτρανσφεράση της H3K4) (heterozygous loss of function mutations of dKDM2 reduce the frequency of homeotic transformation of heterozygous loss of function mutations of Trithorax group genes encoding ASH1 and TRX1 ???) [29]. Η γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ των dKDM2 και ASH1 υποδηλώνει ότι μείωση της δραστηριότητας της απομεθυλάσης της dKDM2 για την H3K36me2 βελτιώνει τις επιπτώσεις που προκαλούνται από τη μείωση της δράσης της ASH1 από μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας. Μια παρόμοια εξήγηση θα μπορούσε να δοθεί και για τη γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ των dKDM2 και TRX1, κάτι που όμως δεν έγινε καθώς το αποτέλεσμα αποδόθηκε στο γεγονός ότι η δέσμευση του TRX1 στη χρωματίνη εξαρτάται από την ASH1 [29, 32]. Το γεγονός ότι η δέσμευση της TRX1 στη χρωματίνη εξαρτάται από την ASH1 καθιστά δύσκολη την εξήγηση της γενετικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των dKDM2 και TRX1. Η εξάρτηση αυτή μπορεί να υποδηλώνει ότι η δέσμευση διαμεσολαβείται μέσω της ASH1 ή μέσω της αναγνώρισης της

μεθυλιωμένης H3K36 από την TRX1, περιπτώσεις που δεν θα επηρεαστούν αν η dKDM2 υποστεί κάποια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας. Επιπλέον, η dKDM2 (CG11033) εντοπίζεται σε πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων μαζί με άλλες πρωτεΐνες PcG (polycomb group proteins) παίζοντας έτσι κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη και την καρκινογένεση. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η dKDM2 διαμεσολαβεί στην μονο-ουβικουτυνιλώση της ιστόνης H2A που προκαλείται από το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1, PRC1 (polycomb repressive complex 1), μία ενέργεια ανεξάρτητη της δράσης της ως απομεθυλάση της λυσίνης K36 της ιστόνης H3 (H3K36) [29]. Σε αναλογία με την dKDM2, και η KDM2B των θηλαστικών έχει εντοπιστεί στο αντίστοιχο πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1, PRC1, μαζί με τον συν-καταστολέα BCOR (BCL-6 corepressor) [33-35]. Η BCOR μεταλλάσσεται στο σύνδρομο OFCD (oculo-facio-cardio-dental) και μείωση είτε της BCOR ή της KDM2B ενισχύει την osteo-dentinogenic διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων [36]. Οι πρωτεΐνες της ομάδας KDM2 των θηλαστικών έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρούν και με άλλες πρωτεΐνες που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη και την ογκογένεση. Για παράδειγμα, η KDM2A απομεθυλώνει την υπομονάδα RELA [*v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)*] του NF- κ B, αναστέλλοντας έτσι τη δέσμευσή του στο DNA και την προκαλούμενη από τον NF- κ B μεταγραφική δραστηριότητα [37], ενώ η KDM2B μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφική δραστηριότητα του c-Jun χωρίς να επηρεάσει όμως την καταλυτική του δράση [16, 31, 35]. Οι πρωτεΐνες της ομάδας KDM2 στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς περιέχουν, όπως αναφέραμε και νωρίτερα, μια περιοχή δακτύλων ψευδαργύρου CXXC, η οποία δεσμεύει μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG *in vitro* και είναι σημαντική για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών αυτών σε συγκεκριμένους στόχους [2, 16, 31, 35, 38-40]. Πρόσφατα, σε ES κύτταρα ποντικού, αποδείχθηκε ότι η KDM2A δεσμεύεται στην πλειοψηφία των CpG νησίδων, οι οποίες συνήθως καλύπτουν γονιδιακά ρυθμιστικά στοιχεία [40]. Αν και ο ρόλος της KDM2A και της δραστηριότητας της ως απομεθυλάση των H3K36me2/me1 στη μεταγραφική ρύθμιση απαιτεί περαιτέρω μελέτη, τα μέχρι τώρα ευρήματα υποστηρίζουν την υπόθεση ότι οι πρωτεΐνες KDM2 μπορούν να στρατολογηθούν απευθείας στο DNA, ανεξάρτητα από την ύπαρξη, ειδικών για την αλληλουχία, παραγόντων μεταγραφής. Οι ρόλοι των KDM2 απομεθυλασών των θηλαστικών στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση είναι σε μεγάλο βαθμό μη μελετημένοι. Μελέτες ωστόσο εισαγωγής μεταλλάξεων στα τρωκτικά, χαρακτήρισαν το γονίδιο *Kdm2b* τόσο ως δυνητικό ογκοκατασταλτικό γονίδιο [3] όσο και ως -μαζί με την *Kdm2a*- εν δυνάμει πρωτο-ογκογονίδιο [2]. Η υπερέκφραση και η αποσιώπηση της KDM2B έχουν διαμετρικά αντίθετους φαινοτύπους σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Σε φυσιολογικά κύτταρα, όπως οι ινοβλάστες ποντικού (MEFs), η KDM2B προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και λειτουργεί ως φυσιολογικός αναστολέας της κυτταρικής γήρανσης (inhibitor of senescence) [2]. Σε κύτταρα HeLa, από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση της KDM2B αναστέλλει, και η αποσιώπηση της προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [16, 31]. Ορισμένες μάλιστα, από τις ανασταλτικές επιδράσεις στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων φαίνεται να είναι ανεξάρτητες από τη δράση της JmjC περιοχής [16]. Οι διαφορές στο φαινότυπο σχετίζονται με διαφορές στην υποκυτταρική κατανομή της πρωτεΐνης στους δύο παραπάνω κυτταρικούς τύπους. Και στους δύο τύπους κυττάρων η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα. Ωστόσο, στα MEFs εξαιρείται από τα nucleoli [2], ενώ στα HeLa κύτταρα είναι κυρίως nucleolar [31]. Η υποκυτταρική κατανομή της KDM2B μπορεί να εξηγήσει τις φαινοτυπικές διαφορές που παρατηρούνται σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές κατά την υπερέκφραση του γονιδίου. Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η πρωτεΐνη μπορεί κανονικά να μεταφέρεται μεταξύ του πυρήνα και της πυρηνικής μεμβράνης ενώ στα καρκινικά κύτταρα παραμένει απομονωμένη και εγκλωβισμένη σε ένα σημείο στον πυρήνα χωρίς τη δυνατότητα μετακίνησης, λόγω ελαττωματικής μεταφοράς ή πυρηνικής κατακράτησης του μορίου. Δεδομένα γονιδιακής έκφρασης από διάφορους τύπους καρκίνου του ανθρώπου δείχνουν αυξημένα επίπεδα

της KDM2B σε λεμφώματα και αδενοκαρκινώματα [2], ενώ αντίθετα παρατηρείται μείωση της έκφρασης της KDM2A και KDM2B σε καρκίνους του προστάτη και σε γλοιοβλαστώματα, αντίστοιχα [31, 35, 38]. Μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες υποστηρίζουν την άποψη ότι οι προ- ή οι αντι-ογκογονικές λειτουργίες των πρωτεϊνών της ομάδας KDM2 μπορεί να είναι εξαρτώμενες από το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η KDM2A μπορεί για παράδειγμα, να καταστείλει την εξαρτώμενη από το NF-κΒ ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων που παχέος εντέρου [35, 37], ενώ η KDM2B έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των όγκων που σχετίζεται με την αποσιώπηση των γονιδίων rRNA [31]. Αντίθετα, η KDM2B προλαμβάνει την πρόωρη γήρανση των MEFs (εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού) μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος πιθανότατα περιλαμβάνει την καταστολή του γονιδίου Ink4b [2, 28, 30, 35]. Τα MEFs που εκφράζουν εκτοπικά την KDM2A ή την KDM2B παρακάμπτουν την επαγόμενη από το στρες γήρανση (stress-induced senescence) σε μία διαδικασία που απαιτεί ακέραια την JmjC περιοχή του μορίου. Η KDM2B επίσης, συνεργάζεται με το Ras στον ογκογονικό μετασχηματισμό [2, 28, 35]. Εκτός από το ρόλο τους στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, οι πρωτεΐνες KDM2 διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους σημαντικούς για τη γονιδιωματική σταθερότητα. Η KDM2B έχει αποδειχθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από την υπερϊώδη ακτινοβολία, το οξειδωτικό στρες και την αυθόρμητη μεταλλαξογένεση [3, 16, 31, 35, 39], ενώ αφαίρεση της KDM2A επηρεάζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων μέσω επιδράσεων που ασκούνται στις ετεροχρωματικές περιοχές του γονιδιώματος [35, 38]. Συμπερασματικά, λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα προηγούμενα, οι KDM2 απομεθυλάσες των θηλαστικών παρουσιάζουν ογκοκατασταλτικές ή ογκογονικές ιδιότητες που εξαρτώνται από το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Η εξωγενής έκφραση της KDM2B μπορεί να παρακάμψει το φραγμό της κυτταρικής γήρανσης παρέχοντας έτσι μία ισχυρή απόδειξη για το ρόλο της στην ογκογένεση. Ωστόσο, απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες με ζωικά μοντέλα, ώστε να αποσαφηνιστεί πλήρως η φυσιολογική σημασία των αναφερόμενων κυτταρικών λειτουργιών.



Εικόνα 16. Δομή και βιοχημικά χαρακτηριστικά της KDM2B. Η KDM2B αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές περιοχές: την JmjC περιοχή, τη CxxC περιοχή, την περιοχή PHD και ένα F-box. Η περιοχή JmjC δεσμεύεται στις προς απομεθυλίωση μεθυλιωμένες λυσίνες K4 και K36 της ιστόνης H3. Η περιοχή CxxC είναι περιοχή δέσμευσης του DNA και αναγνωρίζει ειδικά μη μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG στις νησίδες. Η περιοχή PHD έχει δραστηριότητα E3 λιγάσης ουβικουϊτίνης και δρα ως αναγνώστης των τροποποιήσεων των ιστονών. Η περιοχή F-box δρα ως συνδετική πρωτεΐνη μεταξύ της πρωτεΐνης στόχου και της λιγάσης της ουβικουϊτίνης [41].

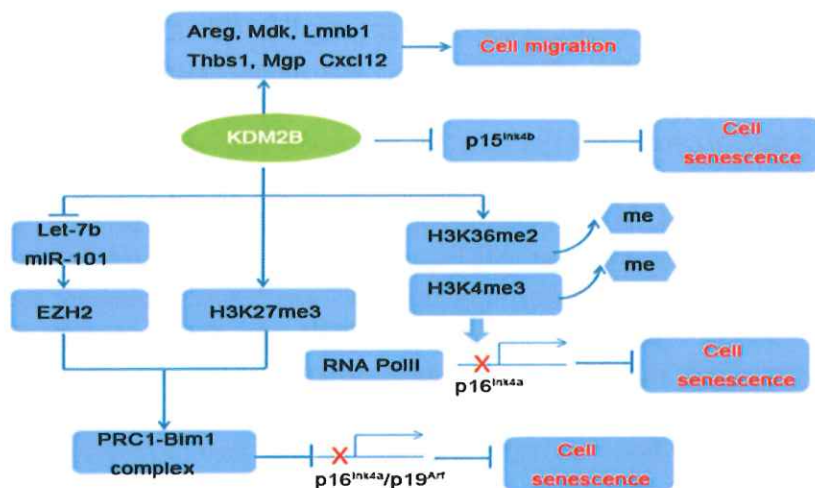
Βιολογικές λειτουργίες της KDM2B [41]

Η KDM2B καταστέλλει την κυτταρική γήρανση (cell senescence) και προάγει τον πολλαπλασιασμό, την αθανατοποίηση και τη μετανάστευση των κυττάρων

Η KDM2B αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένας νέος ρυθμιστής της διάρκειας ζωής των εμβρυϊκών ινοβλαστών (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) στα ποντίκια [28], αφού με την πάροδο των κυτταρικών γενεών και την επακόλουθη επαγωγή της γήρανσης τα επίπεδα έκφρασης της KDM2B μειώνονται [30]. Επιπλέον, κύτταρα τα οποία εκφράζουν εξωγενώς την KDM2B,

παρουσιάζουν μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα και υφίστανται αθανατοποίηση παρακάμπτοντας τη γήρανση (replicative senescence). Η αποσιώπηση της KDM2B ή η δημιουργία μεταλλάξεων απώλειας λειτουργίας της JmjC-περιοχής της πρωτεΐνης καθυστερεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και οδηγούν σε κυτταρική γήρανση [2]. Βάσει αυτών των δεδομένων, γίνεται σαφές πως σε φυσιολογικά κύτταρα όπως οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικών (MEFs), η KDM2B προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και λειτουργεί ως ένας φυσιολογικός αναστολέας της γήρανσης [2]. Η έκφραση διαφορετικών κάθε φορά μοναδιαίων μεταλλάξεων στις KDM2B ή KDM2A σε κύτταρα MEFs, αποκάλυψε ότι ο επακόλουθος αθανατοποιημένος φαινότυπος που παρατηρείται εξαρτάται από τις JmjC- και CXXC- περιοχές των πρωτεϊνών αυτών και ότι είναι ανεξάρτητος από την περιοχή PHD, το F-box ή την C-καρβοξυτελική περιοχή LRR. Οι σημειακές μεταλλάξεις στην καταλυτική περιοχή απομεθυλάσης των ιστονών JmjC, αποτυγχάνουν να αθανατοποιήσουν τους ινοβλάστες ποντικών, υποστηρίζοντας έτσι περαιτέρω ότι η δραστηριότητα απομεθυλάσης των ιστονών που κωδικοποιείται από την περιοχή JmjC της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο της αθανατοποίησης. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτών διαγράφηκε επίσης και η πλούσια σε αμινοξικά κατάλοιπα προλίνης περιοχή, PRR. Η εξάλειψη της περιοχής αυτής από την πρωτεΐνη, αναμφισβήτητα προήγαγε τον φαινότυπο αθανατοποίησης. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί υποστηρίζοντας την άποψη ότι η περιοχή αυτή μπορεί να αποτελεί θέση πρόσδεσης για διάφορες πρωτεΐνες που δεσμεύονται στην KDM2B και αναστέλλουν την αθανατοποίηση των κυττάρων ή ακόμα ότι μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της πρωτεΐνης [2]. Τόσο οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στην περιοχή JmjC όσο και στην περιοχή CXXC αδυνατούν να οδηγήσουν στην αθανατοποίηση των κυττάρων. Ωστόσο, διαφέρουν μεταξύ τους στο ότι οι μεταλλάξεις στην περιοχή JmjC προάγουν την κυτταρική γήρανση ενώ το μεταλλαγμένο μοτίβο CXXC δεν το κάνει. Αυτό υποδηλώνει ότι μόνο οι μεταλλάξεις της περιοχής JmjC επεμβαίνουν στη λειτουργία της ενδογενούς πρωτεΐνης. Βάσει αυτών των ευρημάτων, συμπεραίνεται ότι η καταλυτική περιοχή JmjC είναι υπεύθυνη για την αθανατοποίηση και ότι το μοτίβο CXXC που δεσμεύει το DNA εμπλέκεται στη σύνδεση της πρωτεΐνης με τις περιοχές της ιστόνης-στόχους. Οι μεταλλάξεις στο μοτίβο CXXC δεν προκαλούν αθανατοποίηση επειδή η μεταλλαγμένη αυτή πρωτεΐνη δεν έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στο DNA. Ωστόσο τα μεταλλάγματα αυτά δεν εμφανίζουν κυρίαρχο αρνητικό (dominant-negative) φαινότυπο όπως στην περίπτωση των JmjC-μεταλλαγμάτων επειδή η ανικανότητα της μεταλλαγμένης CXXC-πρωτεΐνης να προσδεθεί στο DNA δεν παρεμβαίνει στη λειτουργία της ενδογενούς πρωτεΐνης.

Αφαίρεση της περιοχής JmjC της KDM2B σε κύτταρα βλαστικής προέλευσης, οδηγεί σε μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων αυτών [42]. Ανάλυση των συσχετίσεων της γονιδιακής έκφρασης από την βάση δεδομένων TCGA αποκάλυψε ότι η KDM2B παρουσιάζει συσχετίσεις με πολλά γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο [43]. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι η KDM2B προάγει τη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων στοχεύοντας απευθείας γονίδια που σχετίζονται με τη μετάσταση, όπως τα Areg, Mdk, Lmnbl, Thbs1, Mgp και Cxcl12 [44]. Συννοσίζοντας, τα παραπάνω ευρήματα παρέχουν ένα νέο επιγενετικό μηχανισμό της KDM2B στην κυτταρική γήρανση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Όπως είναι γνωστό, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να παρακάμψουν τη γήρανση και να ενεργοποιήσουν σηματοδοτικά μονοπάτια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η υπερέκφραση της KDM2B, είναι ικανή και συμβάλλει στη συνεχή ενεργοποίηση των μονοπατιών αυτών στα καρκινικά κύτταρα.

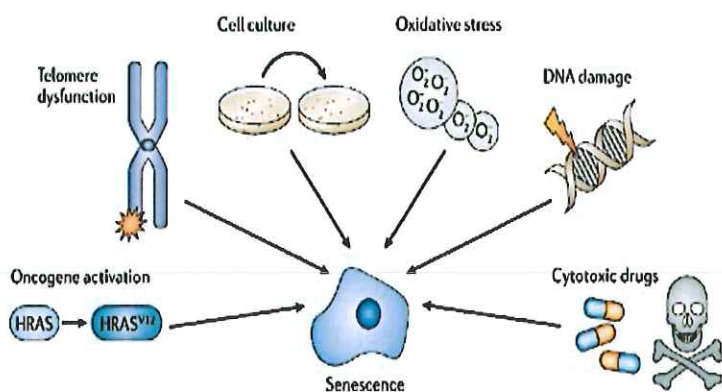


Εικόνα 17. Μηχανισμοί της KDM2B στη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης και γήρανσης. Η KDM2B συνδέεται άμεσα στον υποκινητή γονιδίων που σχετίζονται με τη μετανάστευση προωθώντας έτσι την αυξημένη κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η KDM2B προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αναστέλλει τη γήρανση των κυττάρων καταστέλλοντας τον σχετιζόμενο με τον γηρασμό γονιδιακό τόπο *Ink4a/Arf/Ink4b*. Η λειτουργία αυτή, επιτελείται μέσω i) της αυξημένης έκφρασης της

μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 και κατ' επέκταση των αυξημένων επιπέδων της μεθυλιωμένης λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (EZH2/H3K27me3) και ii) της απομεθυλίωσης των λυσινών K36 και K4 της ιστόνης H3 (H3K36me2/H3K4me3) [41].

Ο μοριακός μηχανισμός της κυτταρικής γήρανσης και ο ρόλος της KDM2B

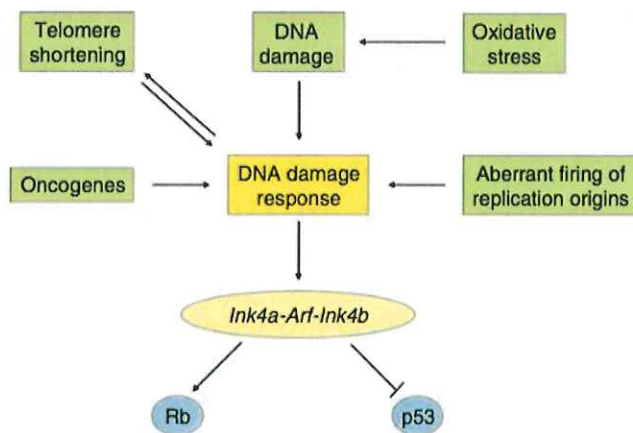
Η κυτταρική γήρανση οφείλεται στην προοδευτική μείωση του αριθμού των τελομερών, στην ενεργοποίηση του γονιδιακού τόπου *Ink4a-Arf-Ink4b* και στην ενεργοποίηση της απόκρισης των κυττάρων στις βλάβες του DNA. Η μείωση του αριθμού των τελομερών και η ενεργοποίηση του γονιδιακού τόπου *Ink4a-Arf-Ink4b* μπορεί να είναι διαδικασίες προγραμματισμένες κατά την ανάπτυξη στα διαιρούμενα κύτταρα. Εναλλακτικά, μπορεί να προκληθούν από παράγοντες που ενεργοποιούν την απόκριση στις βλάβες του DNA, όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η μείωση του μήκους των τελομερών, το οξειδωτικό στρες και η aberrant firing of DNA replication origins. Για την διελεύκανση του μηχανισμού με τον οποίο η KDM2B αναστέλλει την κυτταρική γήρανση έπρεπε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της δράσης της KDM2B σε κάθε έναν από τους παραπάνω παράγοντες που οδηγούν στη γήρανση των κυττάρων.



Εικόνα 18. Η κυτταρική γήρανση είναι μια μη αναστρέψιμη αναστολή της ανάπτυξης που είναι είτε αναπτυξιακά προγραμματισμένη είτε μπορεί να προκληθεί από παράγοντες που ενεργοποιούν την απόκριση στις βλάβες του DNA. Τα γηρασμένα κύτταρα εμφανίζουν χαρακτηριστικές αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και φυσιολογία.

Αρχικά εξετάστηκε κατά πόσο η επίδραση της KDM2B στην κυτταρική γήρανση προκαλείται από το ογκογονίδιο Ha-Ras το οποίο ενεργοποιεί τον γενετικό τόπο *Ink4a-Arf-Ink4b* απουσία βλάβης στο DNA. Δεδομένα από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν ότι η KDM2B αναστέλλει την ενεργοποίηση αυτού του γενετικού τόπου και κατ' επέκταση την πρόκληση της γήρανσης, κάτι που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η KDM2B δρα καθοδικά του μονοπατιού της απόκρισης του κυττάρου στις βλάβες του DNA [9, 30]. Στη συνέχεια εξετάστηκε

κατά πόσο η KDM2B ρυθμίζει την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και την απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες. Πράγματι, η KDM2B προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση που προκαλείται από το H₂O₂, από την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο G2/M και αναστέλλει την κυτταρική σηματοδότηση και την καταστροφή του DNA που προκαλούνται από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS). Η αποσιώπηση της KDM2B έχει ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η KDM2B προάγει την έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα συνθάση της αμινοαδιπικής ημιαλδεύδης (amino adipic semialdehyde synthase) (Aass), οξειδορεδοκτάση-1 (NAD(P)H quinone oxidoreductase-1) (Nqo1), υπεροξυρεδοξίνη-4 (peroxiredoxin-4) (Prdx-4) και αναστολέα της πεπτιδάσης της σερπίνης b1b (Serpín b1b) και αναστέλλει την έκφραση της IL-19. Η αποσιώπηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων Aass, Nqo1, Prdx4 και Serpinb1b σε κύτταρα που εκφράζουν KDM2B σε επίπεδα ανάλογα με εκείνα των κυττάρων ελέγχου, καταστέλλει πλήρως τον οξειδοαναγωγικό φαινότυπο της KDM2B. Η KDM2B δεσμεύεται σε συγκεκριμένες θέσεις σε τουλάχιστον δύο από τους υποκινητές των παραπάνω γονιδίων (Nqo1 και Prdx4), υποδηλώνοντας την άμεση μεταγραφική ρύθμισή τους από την KDM2B [39]. Η αναστολή της προκαλούμενης από τις ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS) βλάβης του DNA από την KDM2B είναι σύμφωνη και με άλλες μελέτες που έχουν προτείνει ότι η KDM2B προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες στο DNA [3, 45]. Για να προσδιοριστεί κατά πόσο η KDM2B ρυθμίζει τη μείωση του μήκους των τελομερών εξετάστηκε η ικανότητά της στην αθανатоποίηση ανθρώπινων ινοβλαστών IMR90. Οι εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (MEFs) και οι ανθρώπινοι ινοβλάστες διαφέρουν μεταξύ τους όσο αφορά τη σχετική σημασία της απομάκρυνσης των τελομερών κατά την πρόκληση της κυτταρικής γήρανσης, με τη μείωση του μήκους των τελομερών στους ανθρώπινους ινοβλάστες να είναι η κύρια αιτία γήρανσης σε σχέση με τα MEFs [46, 47]. Η έκφραση της KDM2B σε ανθρώπινους ινοβλάστες εμποδίζει την πρόωρη γήρανση αλλά αποτυγχάνει να αθανатоποιήσει τα κύτταρα αυτά, υποδηλώνοντας έτσι ότι ενώ μπορεί να εμποδίσει τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από τη μείωση του μήκους των τελομερών, δεν επηρεάζει το σπάσιμο των τελομερών per se [2].

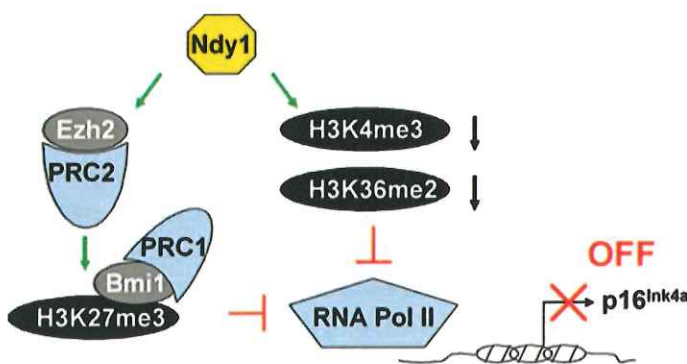


Εικόνα 19. Διάφοροι μηχανισμοί που προάγουν την κυτταρική γήρανση μέσω του γονιδιακού τόπου Ink4a-Arf-Ink4b [25].

Ο γενετικός τόπος Ink4a-Arf-Ink4b ενεργοποιείται από διαδικασίες που προάγουν την κυτταρική γήρανση. Η KDM2B μπορεί να αναστείλει την ενεργοποίηση αυτού του γενετικού τόπου σε ήδη γερασμένα MEFs (passaged MEFs) είτε μέσω στόχευσης μονοπατιών που ρυθμίζουν την απόκριση του κυττάρου σε βλάβες του DNA, όπως προτείνεται στις προηγούμενες παραγράφους, είτε με απευθείας άμεση δέσμευσή της στον γονιδιακό αυτό τόπο. Και στις δύο περιπτώσεις, η καταστολή είτε του p15INK4B είτε του p16INK4A, ή και των δύο, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της pRB φωσφορυλίωσης στις Ser807/811. Καταστολή της έκφρασης του p19ARF, από την άλλη πλευρά, οδηγεί σε μείωση της έκφρασης της p53 και των στόχων της. Ωστόσο, το

p53 και ο στόχος του p21^{CIP1} υπερεκφράζονται αντί να ρυθμίζεται αρνητικά η έκφρασή τους. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η KDM2B μπορεί να στοχεύει πρωτίστως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις p15^{INK4B} και p16^{INK4A} και όχι το overlapping γονίδιο p19^{ARF}. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση του p21^{CIP1} σε κύτταρα που εκφράζουν KDM2B δεν αντισταθμίζεται κατά το πέρασμα των γενεών (is not counterselected during passage). Αυτό το εύρημα υποδηλώνει ότι η έκφραση της KDM2B καθιστά τα MEFs ανθεκτικά έναντι των αντιπολλαπλασιαστικών δράσεων των p53 και p21^{CIP1}. Ο μοριακός μηχανισμός ωστόσο πίσω από αυτή την ανθεκτικότητα δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί.

Η KDM2B καταστέλλει την έκφραση του γονιδιακού τόπου Ink4a-Arf-Ink4b: Σύζευξη της απομεθυλίωσης της διμεθυλιωμένης λυσίνης K36 και της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K4 της ιστόνης H3 (H3K36me2 και H3K4me3) με την τριμεθυλίωση της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3) και την ουβικουτινίωση της λυσίνης K119 της ιστόνης H2A (H2AK119).



Εικόνα 20. Η απομεθυλάση KDM2B καταστέλλει τον γενετικό τόπο Ink4a/Arf. Η KDM2B καταστέλλει τον τόπο Ink4a/Arf μέσω 2 διαφορετικών μηχανισμών: ρυθμίζει θετικά την EZH2 και προάγει την τριμεθυλίωση της ιστόνης H3K27 και τη δέσμευση της BMI1 εντός του τόπου Ink4a/Arf και δεσμεύει και απομεθυλιώνει τις ιστόνες H3K36me2 και H3K4me3 εντός του τόπου Ink4a/Arf. Αυτές οι τροποποιήσεις των ιστονών, όταν συνδυάζονται, παρεμβάλλονται στη δέσμευση της RNA Pol II και συμβάλλουν στην αποσιώπηση του τόπου Ink4a/Arf [30].

Η ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδιακού τόπου Ink4a-Arf-Ink4b, η οποία πραγματοποιείται στα MEFs κατά το πέρασμα των γενεών ή κατά την απόκριση σε μια ποικιλία σημάτων, προωθεί την κυτταρική γήρανση. Με βάση αυτή την παρατήρηση, τα p19^{ARF}/MEFs είναι αθάνατα [48]. Ωστόσο, τα p16^{Ink4a}/MEFs και τα p15^{Ink4b}/MEFs δεν είναι [49-51]. Η αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούνται από το γονιδιακό τόπο Ink4a-Arf-Ink4b και η παράλληλη ταυτόχρονη μείωση της έκφρασης της KDM2B σε κύτταρα MEFs που υφίστανται γήρανση οδηγεί στο συμπέρασμα πως η KDM2B μπορεί να αποτελεί έναν άμεσο καταστολέα του γενετικού αυτού τόπου και ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης της KDM2B μπορεί να είναι άμεσα υπεύθυνη για την ενεργοποίησή του. Τα μέχρι τώρα δεδομένα που υπάρχουν υποστηρίζουν αυτή την υπόθεση. Ωστόσο, η καταστολή της μεταγραφικής έκφρασης των p16^{Ink4a} και p15^{Ink4b} από τη δράση της KDM2B είναι ισχυρότερη σε σχέση με αυτή έναντι του γονιδίου p19^{ARF} [9, 30].

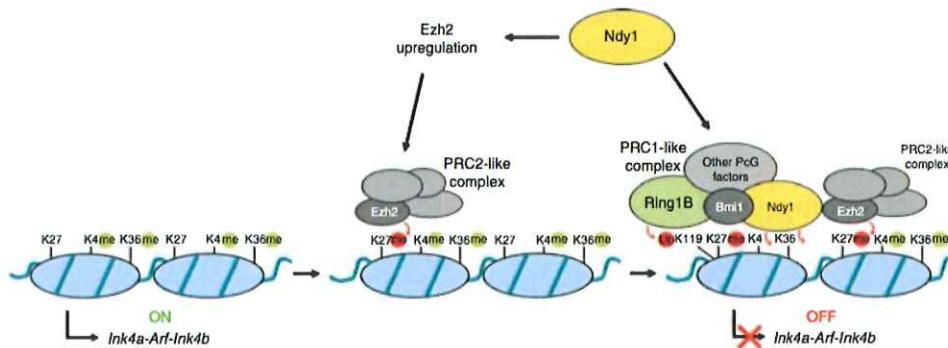
Για να πραγματοποιήσει η KDM2B αυτή την κατασταλτική μεταγραφική της ιδιότητα, προσεγγίζει τη χρωματίνη ως συστατικό των συμπλόκων που τροποποιούν τη χρωματίνη. Τα μέχρι τώρα στοιχεία υποδηλώνουν πως η KDM2B σχετίζεται με ένα πολυπρωτεϊνικό Polycomb σύμπλοκο καταστολής γονιδίων, το οποίο περιέχει κοινά μέλη με το κανονικό πολυπρωτεϊνικό Polycomb σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1, PRC1, διαφέρει όμως από αυτό. Σε εκχυλίσματα προερχόμενα από έμβρυα Δροσόφιλας, το αντίστοιχο αυτό σύμπλοκο (dRAF, dRING-associated factors) αποδείχθηκε ότι περιέχει την πρωτεΐνη dRING (ομόλογη της πρωτεΐνης RING των θηλαστικών), την PSC (ομόλογη της πρωτεΐνης BMI των θηλαστικών), την dKDM2 (ομόλογη των πρωτεϊνών KDM2B και KDM2A των θηλαστικών) καθώς και άλλες, μη επιβεβαιωμένες ακόμα πρωτεΐνες [29]. Αντίστοιχα σύμπλοκα που περιέχουν τις ομόλογες πρωτεΐνες των βασικών συστατικών του συμπλόκου dRAF της Δροσόφιλας, έχουν απομονωθεί από κύτταρα θηλαστικών. Το καθαρισμένο σύμπλοκο αυτό βρέθηκε να είναι συνδεδεμένο στην BCOR (BCL6 corepressor) σε

μετασηματισμένα με κατασκευή με επισημασμένο επιτόπο BCOR (epitope-tagged BCOR construct), HeLaS3 και HEK293 κύτταρα. Το σύμπλοκο περιέχει τις πρωτεΐνες RING1A και RING1B/RNF2, NSPC1, μία ομόλογη της BMI1, την KDM2B και αρκετές άλλες πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των RYBP/YAF2 και SKP1 [33]. Τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν από μία άλλη ομάδα από MEL erythroleukemia cells περιείχαν επίσης τις NSPC1 και τις BMI1, RING1A και RING1B, KDM2B, BCOR, RYBP/YAF2, SKP1 και αρκετές επιπλέον πρωτεΐνες [34]. Συνδυασμένα αυτά τα δεδομένα, υποδηλώνουν ότι διακριτά σύμπλοκα που περιέχουν την KDM2B και αρκετές ακόμα πρωτεΐνες των PRC1 συμπλόκων, μπορούν να ανιχνευθούν τόσο στη Δροσόφιλα όσο και σε κύτταρα θηλαστικών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η KDM2B αλληλεπιδρά επίσης με τη μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών EZH2, συστατικό του PRC2 συμπλόκου [30]. Ωστόσο, δεν γνωρίζουμε κατά πόσο η αλληλεπίδραση αυτή τοποθετεί την KDM2B στο σύμπλοκο PRC2 ή σε σύμπλοκα που σχετίζονται αλλά διαφέρουν από το PRC2. Σύμπλοκα που περιέχουν συστατικά όπως οι πρωτεΐνες EZH2 και PCL (Polycomb-like protein) (PHF1 σε θηλαστικά) που αποτελούν συστατικά των PRC2 συμπλόκων έχουν ανιχνευθεί τόσο στη Δροσόφιλα όσο και σε κύτταρα θηλαστικών [52-54].

Η KDM2B αναστέλλει την upregulation του p16^{Ink4a} σε μεγάλης γενιάς κύτταρα MEFs, μέσω ενός πολύπλοκου μηχανισμού που ενώνει και συνδέει την απομεθυλίωση της λυσίνης K36 και K4 της ιστόνης H3 (H3K36me2 και H3K4me3) με τη τριμεθυλίωση της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3) [30] και την ουβικουτινυλίωση της λυσίνης K119 στην ιστόνη H2A (H2AK119) [29]. Οι μετασηματισμένοι με KDM2B MEFs, ρυθμίζουν με ανοδικό τρόπο έκφρασης αντί με αρνητικό τρόπο την έκφραση της EZH2 κατά τη διάρκεια της μετάβασης των κυττάρων από τη μία γενεά στην επόμενη μέσω μιας διαδικασίας που εξαρτάται από την JmjC- περιοχή. Αποσιώπηση της KDM2B σε primary MEFs και ταυτόχρονη εξάλειψη της εξωγενούς KDM2B σε KDM2B-αθανατοποιημένα κύτταρα MEFs μειώνει την έκφραση της EZH2. Μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 μεταβάλλουν τα επίπεδα τριμεθυλίωσης της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3), τόσο σε τοπικό επίπεδο εντός του γενετικού τόπου Ink4a-Arf-Ink4b όσο και κατά μήκος όλου του γονιδιώματος.

Η KDM2B δεσμεύεται και καταστέλλει άμεσα το γενετικό τόπο Ink4a-Arf-Ink4b προάγοντας την απομεθυλίωση της διμεθυλιωμένης λυσίνης K36 και της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K4 της ιστόνης H3 (H3K36me2 και H3K4me3) [30]. Δεδομένου ότι αλληλεπιδρά επίσης και με την EZH2, η πρόσδεσή της στον γονιδιακό αυτό τόπο μπορεί να διευκολύνεται από την παρατηρούμενη αυξημένη έκφραση της EZH2 [30]. Λεπτομερής ανάλυση του μοριακού μηχανισμού φανέρωσε πως η υπερέκφραση της KDM2B αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 και κατ' επέκταση τα επίπεδα της τριμεθυλιωμένης ιστόνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3). Η μεθυλίωση αυτή της ιστόνης H3K27me3, προάγει τη σύνδεση του PRC1 ή ενός συμπλόκου τύπου dRAF στο γονιδιακό τόπο Ink4a-Arf-Ink4b [30], γεγονός που, κατ' αναλογία με τις παρατηρήσεις που έχουν γίνει στην Δροσόφιλα [29], μπορεί να προάγει την μονοουβικουτινυλίωση της ιστόνης H2A στη λυσίνη K119 και τη σίγηση της γονιδιακής έκφρασης των συσχετιζόμενων με αυτή την περιοχή γονιδίων p16^{Ink4a} και p19^{Arf}. Η αλληλεξάρτηση αυτών των συμβάντων υποδεικνύεται από την παρόμοια κατανομή της τριμεθυλιωμένης ιστόνης H3K27 εντός του τόπου και από τη δέσμευση των KDM2B και BMI1. Μια άλλη παρατήρηση που υποστηρίζει αυτή την αλληλεξάρτηση είναι η σταδιακή αύξηση των επιπέδων της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K27 στην ιστόνη H3 (H3K27me3) και η δέσμευση των KDM2B και BMI1 στον τόπο με το πέρασμα των κυτταρικών γενεών (with each passage), γεγονός που υποδηλώνει έναν μηχανισμό επανατροφοδότησης και προώθησης (feed forward mechanism) της τροποποίησης της ιστόνης και της πολύπλοκης δέσμευσης των πρωτεϊνών. Φαίνεται ότι η KDM2B συντονίζει αρκετές τροποποιήσεις ιστονών και συμβάλλει στη λεπτομερή ρύθμιση της μεταγραφικής διαδικασίας [30]. Πέρα από αυτά, η KDM2B απομεθυλιώνει τις μεθυλιωμένες λυσίνης K36 και K4 της ιστόνης H3

(H3K36 και H3K4) της περιοχής, γεγονός που δεν επιτρέπει την πρόσδεση της RNA-Pol II στην περιοχή του τόπου *Ink4a*, καταστέλλοντας έτσι την μεταγραφική έκφραση. Επιπλέον, η KDM2B καταστέλλει την έκφραση των μικρών miRNA *let-7b* και *miR-101* που σχετίζονται με την EZH2, αναστέλλοντας ακόμα περισσότερο την κυτταρική γήρανση και προάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [55]. Τέλος, μία ακόμα από τις τροποποιήσεις των ιστονών που φαίνεται να ρυθμίζονται από την KDM2B είναι η μονο-ουβικουτίνωση της λυσίνης K119 της ιστόνης H2A. Με βάση δεδομένα από τη Δροσόφιλα, η KDM2B μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή σε κύτταρα θηλαστικών. Ωστόσο, η σημασία αυτής της τροποποίησης για τη ρύθμιση του γονδιακού τόπου *Ink4a-Arf-Ink4b* και την αθανатоποίηση των MEFs δεν έχει ακόμα διελευκανθεί πλήρως. Υποθέτοντας ότι η περιοχή F-box της KDM2B είναι απαραίτητη για αυτή τη διαδικασία, η μονο-ουβικουτίνωση της λυσίνης K119 της ιστόνης H2A θα πρέπει να είναι dispensable για τη ρύθμιση του τόπου *Ink4a-Arf-Ink4b* και για το φαινότυπο αθανатоποίησης, καθώς η περιοχή F-box is dispensable for both [2].



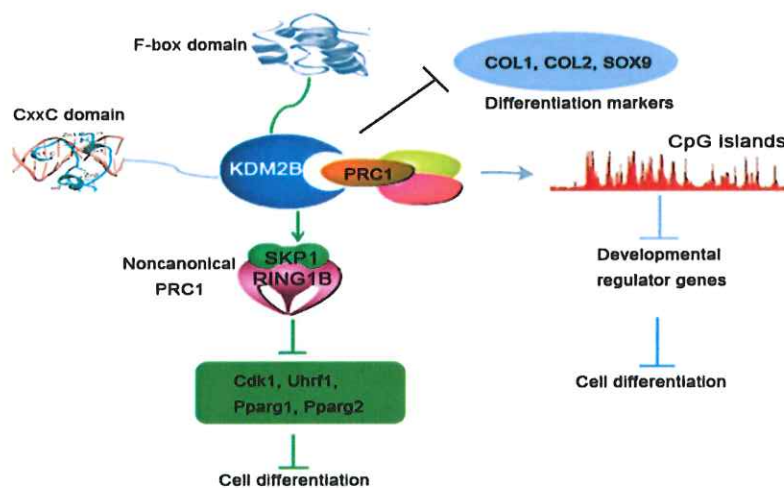
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της συντονισμένης δράσης της KDM2B που οδηγεί στην καταστολή του γονδιακού τόπου *Ink4a-Arf-Ink4b* [25]. Η KDM2B καταστέλλει τον τόπο *Ink4a-Arf* μέσω ενός περίπλοκου μηχανισμού. Από τη μία πλευρά, η έκφραση της KDM2B αντισταθμίζει την επαγόμενη από τη γήρανση μείωση των επιπέδων της EZH2, με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27me3) κατά μήκος όλου του γονιδιώματος. Η αυξημένη τριμεθυλίωση της H3K27 παρατηρείται επίσης ειδικά και εντός του τόπου *Ink4a-Arf* και έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης BMI1, πρωτεΐνη που ανήκει στην ομάδα των Polycomb πρωτεϊνών, στην περιοχή του *Ink4a-Arf-Ink4b* γονδιακού τόπου [30]. Η πρόσδεση της BMI1 από μόνη της δεν μπορεί να προάγει τον φαινότυπο της αθανатоποίησης, καθώς η αποσιώπησή της σε επαγόμενα από την KDM2B-αθανатоποιημένα κύτταρα προκαλεί μόνο μερική αναστροφή της καταστολής που επάγεται από την KDM2B, μεταγραφικής έκφρασης του γονδιακού τόπου *Ink4a-Arf*. Η KDM2B βρίσκεται στο επίκεντρο μίας επιπρόσθετης διαδικασίας που είναι απαραίτητη για την αθανатоποίηση των κυττάρων. Στρατολογείται ειδικά στον γονδιακό τόπο *Ink4a-Arf-Ink4b*, όπου αφαιρεί τοπικά τις μεθυλομάδες από τις λυσίνες K36 και K4 της ιστόνης H3 (H3K36me2 και H3K4me3). Αυτή η στρατολόγηση της KDM2B πιθανώς μεσολαβείται από τη σχέση της με το σύμπλοκο τύπου-PRC (PRC-type complexes). Στη Δροσόφιλα, το ομόλογο γονίδιο της KDM2A, το *dKDM2*, είναι μέλος του πολυπρωτεϊνικού συμπλόκου *dRAF* της ομάδας των Polycomb συμπλόκων (Polycomb group complex). Εκτός από το *dKDM2*, το σύμπλοκο *dRAF* περιλαμβάνει επίσης τη λιγάση της ουβικουτίνης της ιστόνης H2A, *dRING*, και το ομόλογο γονίδιο της BMI1, το *PSC*. Σε κύτταρα θηλαστικών, η KDM2B αλληλεπιδρά με την λιγάση της ουβικουτίνης RING1B/RNF2, που αποτελεί το ανθρώπινο ομόλογο της *dRING* και τα μέλη της ομάδας των Polycomb πρωτεϊνών RING1A/RNF1, RYBP και NSPC1/PCGF1 [33, 34]. Έτσι, η επαγόμενη από την KDM2B αύξηση των επιπέδων έκφρασης της EZH2 και της επακόλουθης αύξησης των επιπέδων της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27) προάγουν τη στρατολόγηση και τη σύνδεση της BMI1 στον γονδιακό τόπο *Ink4a-Arf-Ink4b*, ο οποίος με τη σειρά του στρατολογεί την KDM2B όντας τμήμα ενός συμπλέγματος παρόμοιο με το PRC1 (PRC1-like complex), το οποίο περιέχει επίσης BMI1. Το ομόλογο γονίδιο της KDM2A στη Δροσόφιλα, *dKDM2*, εμπλέκεται σε έναν συντονισμένο μηχανισμό γονδιακής σίγασης, στον οποίο η απομάκρυνση της διμεθυλίωσης από την λυσίνη K36 της ιστόνης H3, (H3K36) συζεύγνται με τη μονο-ουβικουτίνωση της λυσίνης K119 της ιστόνης H2A [29]. Είναι πιθανό η κατασταλτική λειτουργία της KDM2B να περιλαμβάνει επίσης την ουβικουτίνωση της ιστόνης H2A.

Η KDM2B αναστέλλει την ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HeLa κυττάρων μέσω JmjC-εξαρτώμενου και μη-JmjC-εξαρτώμενου μηχανισμού

Στις προηγούμενες παραγράφους υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η υποκυτταρική κατανομή της KDM2B μπορεί να διαφέρει ανάμεσα στους διάφορους κυτταρικούς τύπους και ότι ο επαγόμενος από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση της KDM2B φαινότυπος μπορεί να εξαρτάται από την υποκυτταρική κατανομή της σε δεδομένο κυτταρικό τύπο και κυτταρικό περιβάλλον. Μελέτες σε κύτταρα HeLa έχουν δείξει ότι η KDM2B εντοπίζεται στους πυρήνες και δεσμεύεται στις μεταγραφόμενες περιοχές του ριβοσωμικού DNA για να καταστείλει τη μεταγραφή των ριβοσωμικών RNA γονιδίων μέσω μιας διαδικασίας εξαρτώμενης από την JmjC. Δεδομένου ότι η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εξαρτώνται από τη βιογένεση των ριβοσωμάτων, η καταστολή της μεταγραφής των ριβοσωμικών RNA γονιδίων αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό [31]. Σε μία άλλη μελέτη, επίσης σε κύτταρα HeLa, αποδείχθηκε ότι η KDM2B στρατολογείται στον υποκινητή του γονιδίου c-jun. Όπως προέκυψε από την αποσιώπηση της KDM2B μέσω παρεμβολής με RNA (RNA interference), το σύμπλεγμα c-Jun/KDM2B καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου c-jun και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Το ίδιο παρατηρήθηκε και έπειτα από την ακτινοβολία των κυττάρων HeLa με υπεριώδη ακτινοβολία, η οποία μειώνει τα επίπεδα έκφρασης της KDM2B. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι η καταστολή του c-jun από την KDM2B είναι ανεξάρτητη της περιοχής JmjC [16].

Η KDM2B εμποδίζει τη διαφοροποίηση των κυττάρων

Η KDM2B στρατολογεί το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων (PRC) στις νησίδες CpG (CGIs) στους υποκινητές των γονιδίων- στόχων [10, 11, 40]. Οι νησίδες αυτές δινοκλεοτιδίων εντοπίζονται με μεγάλη συχνότητα στους υποκινητές γονιδίων ανάπτυξης και διαφοροποίησης [13, 56, 57]. Η KDM2B εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (mESCs) [58]. Απαλοιφή της KDM2B στα κύτταρα αυτά οδηγεί σε πρόωρη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ο μοριακός μηχανισμός πίσω από αυτό είναι ότι η KDM2B στρατολογεί το πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων 1 (PRC1) στις CpG νησίδες (CGIs) των early lineage-specific γονιδίων [58]. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι ο ρόλος της KDM2B στη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των mESC εξαρτάται από την CxxC περιοχή του. Επιπλέον, η KDM2B έχει δειχθεί πως καταστέλλει τα μονοπάτια σηματοδότησης που οδηγούν στη διαφοροποίηση των κυττάρων, διατηρώντας έτσι την αυτοανανέωση των αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSCs) [59]. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση της KDM2B έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της έκφρασης των chondrogenic παραγόντων διαφοροποίησης COL1, COL2 και SOX9 [60]. Στα βασικά adipogenic γονίδια, όπως τα Cdk1, Uhrf1, Pparg1, Pparg2, η KDM2B στρατολογεί ένα μη- κανονικό PRC1 σύμπλοκο (PRC1.1) το οποίο περιέχει επιπλέον τις πρωτεΐνες RING1B και SKP1 σε σχέση με το κανονικό σύμπλοκο καταστολής γονιδίων PRC1, εμποδίζοντας τη διαφοροποίηση των 3T3-L1 προς λιπώδη κύτταρα [61]. Ο ρόλος της KDM2B στην αδιπογένεση (adipogenesis) διαμεσολαβείται από την περιοχή F-box της πρωτεΐνης. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία της KDM2B στην επιγενετική ρύθμιση της διαφοροποίησης των κυττάρων. Όπως είναι γνωστό, τα καρκινικά βλαστοκύτταρα είναι μία από τις βασικές αιτίες της ογκογένεσης, της μετάστασης και της αντίστασης έναντι της χημειοθεραπείας [62, 63]. Άλλες μελέτες έχουν ανακαλύψει ότι η KDM2B στα καρκινικά κύτταρα σχηματίζει ακόμα ένα διαφορετικό PRC1 σύμπλοκο που περιέχει τις πρωτεΐνες BCoR (Bcl-6-interacting co-repressor), SKP1, PCGF1 (polycomb group RING finger1) και RING1B [33, 34, 64, 65]. Η KDM2B επομένως αποτελεί έναν σημαντικό μοριακό ρυθμιστή της διατήρησης της αυτοανανέωσης των στελεχειαίων καρκινικών κυττάρων.



Εικόνα 22. Διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί καταστολής της κυτταρικής διαφοροποίησης που επάγονται από τη δράση της KDM2B. Η KDM2B στρατολογεί το σύμπλοκο PRC1 στις νησίδες CpG των αναπτυξιακών γονιδίων μέσω του τομέα CxxC-ZF. Επιπλέον, προσελκύει ένα μη-κανονικό PRC1 σύμπλοκο στους υποκινητές των βασικών γονιδίων που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση μέσω της περιοχής F-box. Τέλος, η KDM2B μπορεί να καταστείλει άμεσα την έκφραση παραγόντων διαφοροποίησης [41].

Η KDM2B αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή του επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων

Εκτός από τη ρύθμιση της αυτοανανέωσης των βλαστοκυττάρων, η KDM2B προάγει επίσης και τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs). Τα σωματικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν σε πολυδύναμα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESC) [pluripotent embryonic stem cell (ESC)-like] έπειτα από τη χρήση των βασικών μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Sox2, Klf4 και c-Myc [66, 67]. Οι βασικοί μηχανισμοί επαναπρογραμματισμού ωστόσο των σωματικών κυττάρων παραμένουν ελάχιστα κατανοητοί. Το 2011 αναφέρθηκε ότι η KDM2B οδηγεί στην αποδοτική παραγωγή iPSCs και ενισχύει τον επαγόμενο από τον μεταγραφικό παράγοντα Oct4 επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων ξεπερνώντας την κυτταρική γήρανση που προκαλείται από την έκφραση της γονιδιακής περιοχής Ink4/Arf [68]. Κατά τη διάρκεια του επαναπρογραμματισμού, η KDM2B μπορεί να συνεργαστεί με το μεταγραφικό παράγοντα Oct4 προκειμένου να αυξήσει την έκφραση των σχετιζόμενων με την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, μικρών miRNA 302/367. Η ενίσχυση του επαναπρογραμματισμού των σωματικών κυττάρων που προκλήθηκε από τη δράση του παράγοντα Oct4, επιτυγχάνεται κυρίως μέσω της στρατολόγησης ενός παραλλαγμένου συμπλόκου PRC1 από την KDM2B, στις νησίδες CGIs των υποκινητών αναπτυξιακών γονιδίων [69]. Η υπερέκφραση της KDM2B ενισχύει επίσης την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων Oct4 και Sox2. Το δίδυμο γονιδίων Oct4/Sox2 συχνά υπερεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στον καρκίνο του πνεύμονα, στον καρκίνο του μαστού, σε καρκινώματα του οισοφάγου και στο λέμφωμα [70-73]. Η KDM2B, επομένως, θα μπορούσε να συμμετάσχει σε Oct4/Sox2-associated καρκίνους.

Η KDM2B/NDY1 δρα είτε ως ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο

Η KDM2B όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μπορεί να δρα είτε ως πρωτο-ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στις διάφορες κυτταρικές σειρές. Επίσης, μελέτες σε κυτταροκαλλιέργειες υποστηρίζουν την άποψη ότι οι πρωτεΐνες KDM2 εμφανίζουν ογκογονικές ή ογκοκατασταλτικές ιδιότητες ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται [74]. Προωθώντας την πρωτο-ογκογονική της ιδιότητα, αναστέλλεται η κυτταρική γήρανση, διαδικασία προστατευτικού χαρακτήρα έναντι της ογκογένεσης [2, 30, 39]. Προωθώντας την ογκοκατασταλτική της ιδιότητα προστατεύει το γονιδίωμα από μεταλλάξεις [3, 39, 45] και καταστέλλει την αύξηση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων σε κυτταροκαλλιέργειες [16, 31]. Με βάση τον πρωτο-ογκογονικό της χαρακτήρα, η KDM2B είναι γενετικά τροποποιημένη έπειτα από την ενσωμάτωση προ-ιού στην αλληλουχία του γονιδίου της

και υπερεκφράζεται σε λεμφώματα που έχουν προκληθεί από την ένθεση ρετροϊού στο γονιδίωμα τρωκτικών [2, 30, 39]. Επιπλέον, υπερεκφράζεται σε οξεία Β και Τ λεμφοβλαστική λευχαιμία στον άνθρωπο (B and T acute lymphoblastic leukemias, T και B ALL), στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), και σε καρκίνο του μαστού και seminomas [30]. Με βάση τον ογκοκατασταλτικό της χαρακτήρα εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε επιθετικού τύπου γλοιοβλαστώματα [31].

Ο πολύπλευρος ρόλος της KDM2B σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο

Απορρύθμιση της έκφρασης της KDM2B έχει βρεθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως στη λευχαιμία (ALL και AML), στον καρκίνο του μαστού, στον παγκρεατικό καρκίνο, στο γαστρικό καρκίνο, στον καρκίνο του πνεύμονα και στο καρκίνο της ουροδόχου κύστης [43, 75-78]. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί της KDM2B σε αυτούς τους όγκους ποικίλουν και είναι περισσότερο περίπλοκοι από ό,τι αρχικά πιστευόταν.

Ρόλος της KDM2B σε διάφορους καρκινικούς τύπους στον άνθρωπο

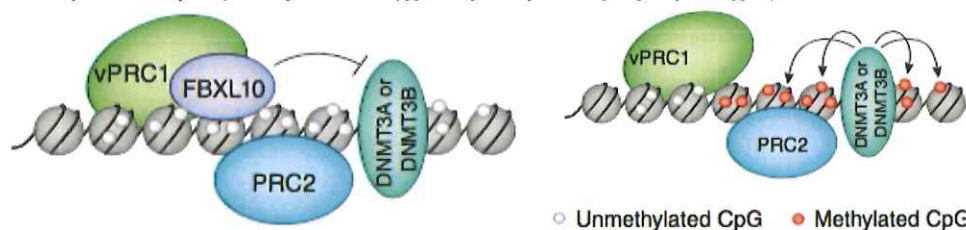
Καρκίνος	Λειτουργική Δράση της KDM2B	Γονίδια που επηρεάζονται από την απορρύθμιση της KDM2B
Οξεία Λεμφοβλαστική και Οξεία Μυελοκυτταρική Λευχαιμία (ALL, AML)	Ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων	p15 ^{Ink4b} , Nsg2, PRC
Καρκίνος του Μαστού	Ογκογονική Δράση (πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, ανανέωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων, ανθεκτικότητα έναντι των οιστρογόνων) Ογκοκατασταλτική Δράση (μείωση της βιογένεσης των ριβοσωμάτων)	Ογκογονική Δράση (miR-101, PRC1, PRC2, CD44, ALDH) Ογκοκατασταλτική Δράση (45S pre-rRNA)
Καρκίνος του Τραχήλου της Μήτρας	Ογκογονική Δράση (αύξηση της γλυκόλυσης) Ογκοκατασταλτική Δράση (μείωση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων)	Ογκογονική Δράση (RIP3 and Crabp2) Ογκοκατασταλτική Δράση (Ribosomal RNA, c-Fos)
Καρκίνος Ωοθηκών	Ογκογονική Δράση (ανάπτυξη του όγκου, πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, μετάσταση)	EZH2
Καρκίνος του Παγκρέατος	Ογκογονική Δράση (ανάπτυξη του όγκου, πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, μετάσταση, διαφοροποίηση)	PRC, EZH2, MYC
Καρκίνος του Στομάχου	Ογκογονική Δράση (Αρνητικός προγνωστικός δείκτης) Ογκοκατασταλτική Δράση (μείωση της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων)	Ογκογονική Δράση (mTOR and p70S6K) Ογκοκατασταλτική Δράση (miR-448, MYC)
Καρκίνος του Πνεύμονα και της Ουροδόχου Κύστης	Ογκογονική Δράση (ανάπτυξη του όγκου, πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων, μετάσταση)	miR-101, EZH2
Ρινοφαρυγγικό Καρκίνωμα	Ογκογονική Δράση	Ογκογονική Δράση (mTOR and P70s6k)
Καρκίνος του Προστάτη, πολλαπλά Γλοιοβλαστώματα	Ογκογονική Δράση (ανθεκτικότητα έναντι του TRAIL)	Ογκογονική Δράση (c-Fos/c-FLIP)

[2, 31, 75-77, 79-93]

KDM2B και αιματολογικοί καρκίνοι

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η υπερέκφραση της KDM2B προάγει την εξέλιξη και ανάπτυξη των MoMuLV-induced T-λεμφομάτων στα ποντίκια στην οξεία λεμφοβλαστική (ALL) και την οξεία μυελοκυτταρική λευχαιμία [2, 79, 87]. Η αποσιώπηση της KDM2B σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ALL, CML και AML στα ποντίκια οδηγεί σε μείωση τόσο της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων αλλά και σε μειωμένο αριθμό μεταστάσεων στον πνεύμονα. Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων Oncomine, ασθενείς με OMA, T-κυτταρική οξεία λεμφοειδή λευχαιμία και οξεία λεμφοειδή λευχαιμία κυττάρων Β, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα έκφρασης της KDM2B. Μία άλλη μελέτη ανέφερε ότι η KDM2B υπερεκφράζεται σε επαγόμενα από Hoxa9/Meis1 λευχαιμικά βλαστοκύτταρα (Hoxa9/Meis1-induced leukemic stem cells, LSCs) και απαιτείται για το μετασχηματισμό των κυττάρων αυτών και την εξέλιξη του καρκίνου [82].

Η ογκογονική δράση της KDM2B στη λευχαιμία επιτελείται μέσω της σύγκρισης του p15Ink4b. Επιπλέον, η KDM2B συνεργάζεται και συνδέεται με πρωτεΐνες προς το σχηματισμό ενός μη κανονικού πολυπρωτεϊνικού συμπλέγματος καταστολής γονιδίων τύπου 1 (non-canonical Polycomb complex), το PRC1.1. Η δράση του συμπλέγματος αυτού φαίνεται να είναι πολύ σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων LSCs [89]. Σε συμφωνία με όλα τα προηγούμενα ευρήματα, μία άλλη έρευνα έδειξε ότι οι KDM2B-διαγονιδιακοί ποντικοί αναπτύζουν μυελογενείς και Β-λεμφοκυτταρικές λευχαιμίες [85]. Ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου η KDM2B δρα σε αυτού του είδους τον καρκίνο αποκάλυψε ότι η KDM2B προκαλεί την έκφραση του Nsg2, κάτι που οδηγεί σε μη επιτυχημένη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ταυτόχρονα, η KDM2B αυξάνει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την οξειδωτική φωσφορυλίωση προωθώντας με τον τρόπο αυτό την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Λαμβάνοντας επομένως υπόψη ότι η KDM2B συχνά υπερεκφράζεται στις ανθρώπινες κακοήθειες του αίματος, μπορούμε να υποθέσουμε πως αποτελεί έναν κύριο επιγενετικό ρυθμιστή που ελέγχει την πορεία προς τη λευχαιμία.



Εικόνα 23. Η KDM2B προσδένεται σε νησίδες CpG δινουκλεοτιδίων όντας μέλος του συμπλόκου PRC1. Το ότι το DNA μεθυλιώνεται στις θέσεις αυτές ακόμα και απουσία της KDM2B, χωρίς να μεταβάλλεται το σύμπλοκο PRC1, υποδηλώνει έναν ανταγωνιστικό ρόλο της KDM2B ως προς τις DNMT3A και DNMT3B που μπορούν να στρατολογήσουν το σύμπλοκο PRC2 [6].

KDM2B και γυναικολογικοί καρκίνοι

Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η KDM2B υπερεκφράζεται σε καρκίνους γυναικολογικής φύσης [76, 91]. Αποσιώπηση της KDM2B σε κυτταρικές σειρές αδενοκαρκινώματος οδηγεί στην υπερέκφραση των miR-101, miR-200a/b/c, miR-181a/b/b και miR-203. Τα miRNA αυτά είναι ρυθμιστές της έκφρασης των ρυθμιστικών υπομονάδων των PRC1 και PRC2 συμπλόκων. Αύξηση της ποσότητάς τους οδηγεί σε αρνητική ρύθμιση και αναστολή της έκφρασης των υπομονάδων αυτών με άμεσα επακόλουθα το μειωμένο κυτταρικό μέγεθος και την αναστολή της προαγωγής του κυτταρικού κύκλου στο στάδιο G1 [76]. Η KDM2B εκφράζεται επίσης σε μεγάλο βαθμό στον basal-like τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (ER-, PR- και Her2-) αποτελώντας αρνητικό προγνωστικό δείκτη [76]. Προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι στη θεραπεία με οιστρογόνα και για το λόγο αυτό έχει χαρακτηριστεί και ως γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα έναντι των οιστρογόνων (BCAR, breast cancer anti-estrogen resistance gene) [80].

Υπάρχει όμως και η αντίθετη άποψη που υποστηρίζει ότι η KDM2B στον καρκίνο του μαστού, πέρα από την ογκογονική της δράση, μπορεί να έχει και ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα ελέγχοντας και ρυθμίζοντας αρνητικά τη βιογένεση των ριβοσωμάτων [90]. Αποσιώπηση της KDM2B σε καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-231 προκαλεί μεγαλύτερη επιθετικότητα των κυττάρων και αυξημένη πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική ικανότητα υποδεικνύοντας έτσι τον διπλό ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει στον καρκίνο του μαστού. Ένα άλλο παράδειγμα που φανερώνει τον ογκοκατασταλτικό χαρακτήρα της KDM2B στους γυναικολογικούς καρκίνους προκύπτει από τον τρόπο δράσης της στα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας HeLa. Σε αυτά, αύξηση των επιπέδων της έκφρασής της καταστέλλει την έκφραση των ριβοσωμικών RNA γονιδίων, μειώνει το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων και την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα [31]. Η ογκοκατασταλτική αυτή ιδιότητα διαμεσολαβείται μέσω της απομεθυλίωσης της τριμεθυλιωμένης λυσίνης K4 της ιστόνης H3, H3K4me3 και την ουβικουτινύλιωση του c-Fos [68]. Η αντίθετη τώρα

ογκογονική δράση, στηρίζεται στο γεγονός ότι η KDM2B προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη γλυκόλυση των κυττάρων HeLa ενεργοποιώντας τα μεταβολικά ένζυμα RIP3 και Crabp2 [86]. Το παράδοξο αυτό φαινόμενο υποδηλώνει ότι η λειτουργία της KDM2B στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μπορεί να έχει διαφορετικούς μοριακούς μηχανισμούς στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Υψηλά επίπεδα KDM2B έχουν καταγραφεί επίσης στον καρκίνο των ωοθηκών και μάλιστα τα επίπεδα συσχετίζονται θετικά με το βαθμό επιθετικότητας και αποδιαφοροποίησης των κυττάρων και κατ' επέκταση της παθολογικής κατάστασης. Αποσιώπηση της KDM2B στα κύτταρα αυτά αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και τη μετανάστευση [91].

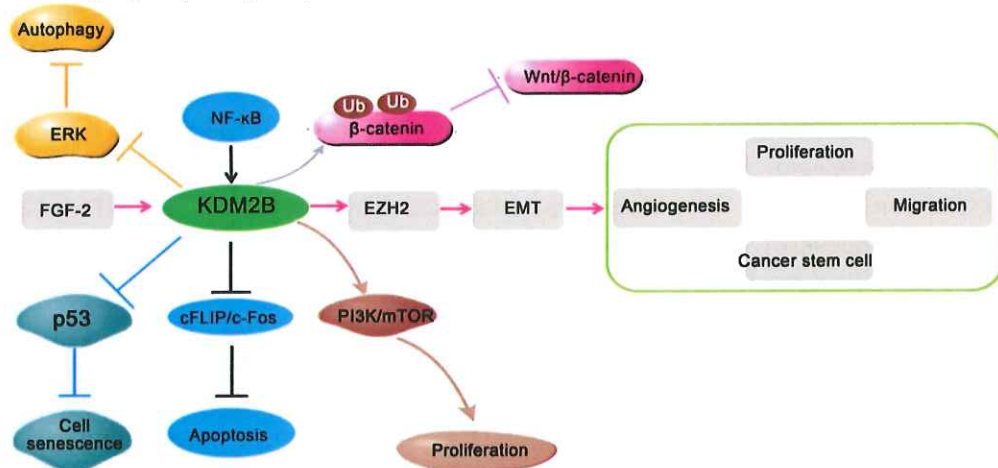
KDM2B στον καρκίνο του παγκρέατος και του στομάχου

Έχει αναφερθεί ότι η KDM2B είναι σημαντικά αυξημένη στον καρκίνο του παγκρέατος (PDAC) και συσχετίζεται θετικά με την εξέλιξη του όγκου [75]. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης της KDM2B αυξάνονται όσο αυξάνεται το επίπεδο της αποδιαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος και η διηθητική τους ικανότητα, ενώ αποσιώπησή της καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εμποδίζει τον σχηματισμό όγκων σε xenograft μοντέλα. Μοριακά, η KDM2B αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του συμπλόκου καταστολής γονιδίων (Polycomb group proteins) οδηγώντας στη σίγηση προγραμμάτων κυτταρικής διαφοροποίησης μέσω της απομεθυλίωσης της λυσίνης K36 (H3K36) και της μεθυλίωσης της λυσίνης K27 της ιστόνης H3 (H3K27). Επιπλέον, ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων MYC και KDM5A προωθώντας με αυτό τον τρόπο την εξέλιξη του παγκρεατικού καρκίνου [75]. Όπως και στον παγκρεατικό καρκίνο PDAC, η KDM2B εκφράζεται με τον ίδιο τρόπο στον καρκίνο του γαστρικού ιστού στον άνθρωπο. Η έκφρασή της αποτελεί αρνητικό προγνωστικό δείκτη για δύο τύπους καρκίνου του στομάχου, τους τύπους intestinal και disuse Lauren [93]. ChIP ανάλυση έδειξε ότι η KDM2B προσδέεται άμεσα στον υποκινητή του MYC, αναστέλλοντας τη γλυκόλυση στον καρκίνο του στομάχου [77].

Ρύθμιση των κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον καρκίνο από την KDM2B

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η KDM2B ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διηθητική ικανότητα, τη μετάσταση και την αυτοανάνεωση των βλαστικών καρκινικών κυττάρων σε διάφορους τύπους καρκίνου και συμμετέχει ενεργά στις οδούς σηματοδότησης που σχετίζονται με την ογκογένεση. Ένα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια που θεωρείται ότι κατέχει σημαντική θέση στη ρύθμιση της ανάπτυξης των όγκων και τη μετάσταση είναι το μονοπάτι της AP-1 [94-97]. Το μονοπάτι AP-1 αποτελείται από δύο βασικές πρωτεΐνες: τις c-Jun και c-Fos. Το c-Fos είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της απόπτωσης που προκαλείται από ligand (TRAIL)-induced apoptosis των καρκινικών κυττάρων [98]. Έχει παρατηρηθεί πως η έκφραση της KDM2B μειώνεται έπειτα από την προσθήκη TRAIL σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ευαίσθητες στο TRAIL και η αποσιώπηση της KDM2B μπορεί να μεταβάλλει τα ανθεκτικά κύτταρα στην αγωγή με TRAIL σε κύτταρα που παρουσιάζουν ευαισθησία στην αγωγή αυτή [81]. Η KDM2B συγκεκριμένα, μειώνει την απόκριση των κυττάρων στο TRAIL στο πολυμορφικό γλοιοβλάστωμα (GBM) [92]. Περαιτέρω μελέτη επιβεβαίωσε ότι η KDM2B παρεμποδίζει την προκαλούμενη από την TRAIL απόπτωση μέσω καταστολής της σηματοδοτικής οδού c-Fos/c-FLIP. Η αντι-αποπτωτική δράση της KDM2B εξαρτάται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB. Η σίγαση της KDM2B ενισχύει σημαντικά την ευαισθησία των GBM κυττάρων στο TRAIL και προάγει την ενεργοποίηση της κασπάσης-8, -3, και -7 και τη διάσπαση της PARP. Επιπροσθέτως, το προφίλ της γονιδιακής έκφρασης των κυτταρικών σειρών στη T-ALL λευχαιμία αποκάλυψε ότι η αποσιώπηση της KDM2B μειώνει τη δράση των εξαρτώμενων από τις πρωτεΐνες MYC- και EZH2- σηματοδοτικών μονοπατιών ενώ αντίθετα αυξάνει την ενεργότητα των ογκοκατασταλτικών μονοπατιών p53, TGFB1 και

SMARCA4 [87]. Προηγούμενες μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι το μεταβολικό μονοπάτι KDM2B-miR-101-EZH2 είναι ενεργό σε τουλάχιστον 25 ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως για παράδειγμα στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης και τον καρκίνο του πνεύμονα [83]. Και αυτή η σηματοδοτική οδός συμβάλλει στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την αγγειογένεση και την αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης αυξάνοντας την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται και προάγουν την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) των κυττάρων [43]. Επιπλέον, η KDM2B προωθεί την εξέλιξη του ρινοφαρυγγικού καρκίνου μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδοτικής οδού PI3K/mTOR [84]. Αντίθετα, σε καρκινικά κύτταρα στομάχου, η αποσιώπηση της KDM2B προάγει την αυτοφαγία μέσω της αναστολής της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR και την ενεργοποίησης του ERK1/2 [93]. Πολλά στοιχεία επίσης έχουν δείξει πως η δράση του μονοπατιού της Wnt/ β -κατενίνης συμβάλλει με κάποιο τρόπο στην καρκινογένεση [99]. Η KDM2B είναι ικανή να καταστείλει τη δράση του μονοπατιού αυτού αποικοδομώντας τη μη φωσφορυλιωμένη β -κατενίνη του πυρήνα [100]. Σε τι ποσοστό το μονοπάτι KDM2B-Wnt/ β -κατενίνης συντελεί στην εξέλιξη του καρκίνου παραμένει ακόμα σε μεγάλο βαθμό αδιευκρίνιστο. Συμπεραίνεται επομένως, πως η KDM2B στα διάφορα ογκογονικά σηματοδοτικά μονοπάτια έχει τόσο θετική όσο και αρνητική επίδραση.



Εικόνα 24. Ρόθμιση των κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στον καρκίνο από την KDM2B. Πρώτον, η ενεργοποίηση της οδού FGF-2-KDM2B-EZH2 συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, την αγγειογένεση και την αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστοκυττάρων. Δεύτερον, η KDM2B αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση με καταστολή της οδού c-Fos/c-FLIP. Τέλος, η KDM2B ενεργοποιεί την οδό PI3K/AKT/mTOR και αναστέλλει την οδό P53 στον καρκίνο. Η KDM2B αναστέλλει επίσης την οδό σηματοδότησης Wnt/ β -κατενίνης προκαλώντας την αποικοδόμηση της β -κατενίνης [41].

Η KDM2B ως πιθανός θεραπευτικός αντι-καρκινικός στόχος [41]

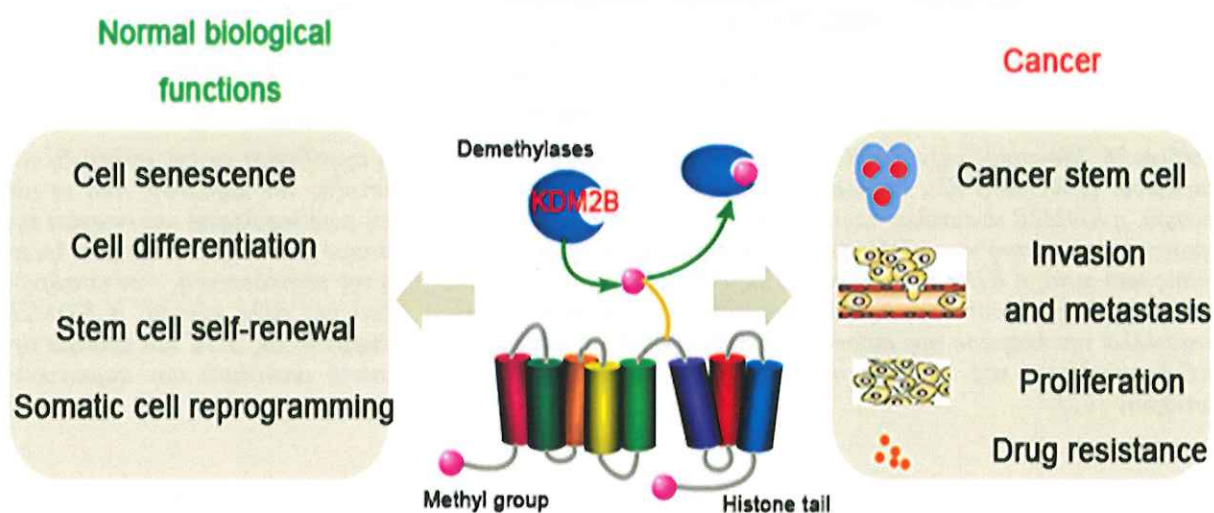
Λόγω της αντιστρέψιμης φύσης της μεθυλίωσης, πολλοί αναστολείς των απομεθυλασών ιστόνης έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς ως αντικαρκινική θεραπεία [101-103]. Ενώ για την LSD1 ήδη τέσσερις ενώσεις βρίσκονται στο στάδιο των κλινικών δοκιμών, η ανάπτυξη υποψηφίων μορίων-αναστολέων έναντι των απομεθυλασών της οικογένειας JMJC δεν είναι τόσο προηγμένη. Η ανάπτυξη εξειδικευμένων αναστολέων για την οικογένεια των απομεθυλασών που περιέχουν την περιοχή JMJC είναι αρκετά πιο πολύπλοκη. Η δυσκολία αυτή οφείλεται σε δύο λόγους. Πρώτον, τα μέλη της οικογένειας αυτής παρουσιάζουν υψηλή δομική ομοιότητα μεταξύ τους και δεύτερον, όσοι αναστολείς μέχρι τώρα έχουν παραχθεί εμφανίζουν πολύ μικρή κυτταρική διαπερατότητα (πολλοί από αυτούς είναι χηλικά μεταλλικά ανάλογα της 2-OG).

Η υποοικογένεια KDM5, επίσης γνωστή ως JARID1, απομεθυλιώνει τα H3K4me2/3 και οι δραστηριότητες των ενζύμων αυτών σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων,

τη μείωση της έκφρασης διάφορων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την αντίσταση σε αντικαρκινικά φάρμακα και την υποτροπή [104]. Η εταιρεία EpiTherapeutics, ανέφερε ότι ένα μικρό μόριο, το EPT-103182, στοχεύει την KDM5B (with subnanomolar potency) *in vitro*, με IC50 ίσο με 1.8nM σε κύτταρα U2OS, και με 20–50-fold selectivity έναντι της KDM4 and 3000-fold έναντι της KDM6 [105]. Το EPT-103182, του οποίου η δομή δεν έχει ακόμα πλήρως διελευκανθεί, αποτελεί τον πλέον προηγμένο αναστολέα των KDM σε προκλινική ανάπτυξη. Προκαλεί αναστολή της πολλαπλασιαστικής ικανότητας σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε αιματολογικές καρκινικές σειρές και η αναστολή της ανάπτυξης του όγκου σε xenograft μοντέλα εξαρτάται από τη δοσολογία [106]. Η 2 N-οξαλυλγλυκίνη (NOG) (N-oxalylglycine 2) και τα παράγωγά της αναστέλλουν τις KDM4A, KDM2A, KDM2C και KDM2D [107]. Το 2,4-πυριδινοδικαρβοξυλικό οξύ (2,4-PDCA) (2,4-pyridinedicarboxylic acid) καταστέλλει την KDM5B [108]. Επιπλέον, τα CPI-455 και GSK-J1/GSK-J4 είναι επιλεκτικοί αναστολείς των υποοικογενειών KDM5 και KDM6 [109, 110]. Το 2016, η Quanticel Pharmaceuticals κατοχύρωσε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας μια σειρά παραγώγων πυριδίνης (pyridine) ως αναστολείς των KDM5A/JARID1A, KDM5B/JARID1B, KDM4C/JMJD2C και KDM2B/FXBL10 [111]. Οι 1,7-ναφθυριδόνες (1,7-naphthyridones) (WO 2014100463 A1 και WO 2014151945 A1) παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα έναντι των ισομορφών KDM4C και KDM2B [112] και οι πρώτες κλινικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του 2017 [111]. Οι αναστολείς της KDM2B θα μπορούσαν ενδεχομένως στο μέλλον να είναι πολλά υποσχόμενες ουσίες για αντικαρκινική θεραπεία.

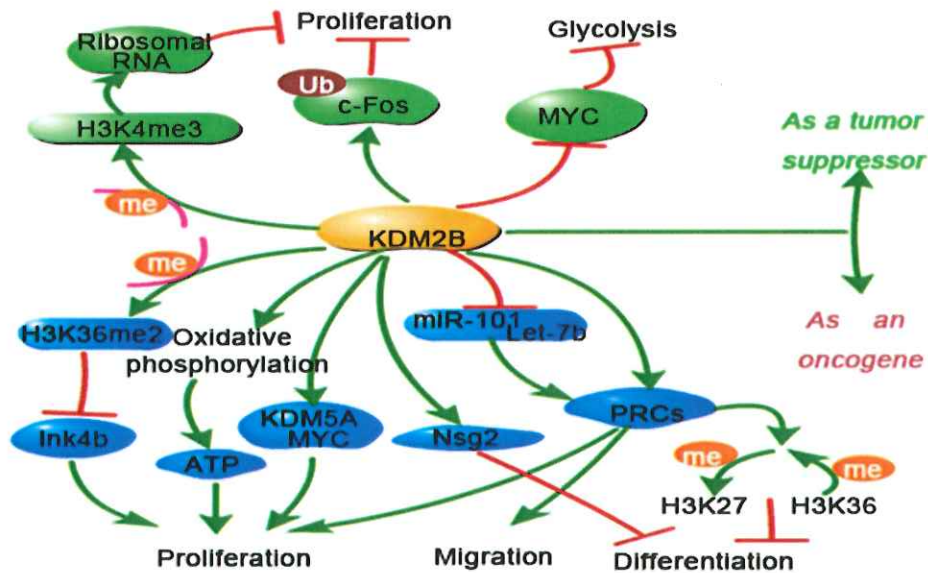
Συμπεράσματα

Μια πληθώρα αποδείξεων έχει καταδείξει τον σημαντικό ρόλο της KDM2B στη ρύθμιση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διαφοροποίησης, της αυτοανανέωσης των βλαστοκυττάρων και της απόπτωσης. Είναι επίσης σαφές ότι η αυξημένη έκφραση της KDM2B προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, τη μετάσταση, την αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και την αντίσταση σε αντικαρκινικά φάρμακα (Εικόνα 25). Ωστόσο, η KDM2B θα μπορούσε επίσης να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων αναστέλλοντας την έκφραση διάφορων ογκογονιδίων.



Εικόνα 25. Ρόλος της KDM2B σε φυσιολογικές βιολογικές λειτουργίες και στον καρκίνο. Η KDM2B είναι σημαντική για τη ρύθμιση της γήρανσης των κυττάρων (cell senescence), τη διαφοροποίηση των κυττάρων, την αυτοανανέωση των βλαστοκυττάρων και τον επαναπρογραμματισμό των σωματικών κυττάρων. Η απορρύθμιση της KDM2B μπορεί να συμβάλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου, στη δυσλειτουργία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετάστασης και της ανοχής έναντι των φαρμάκων [41].

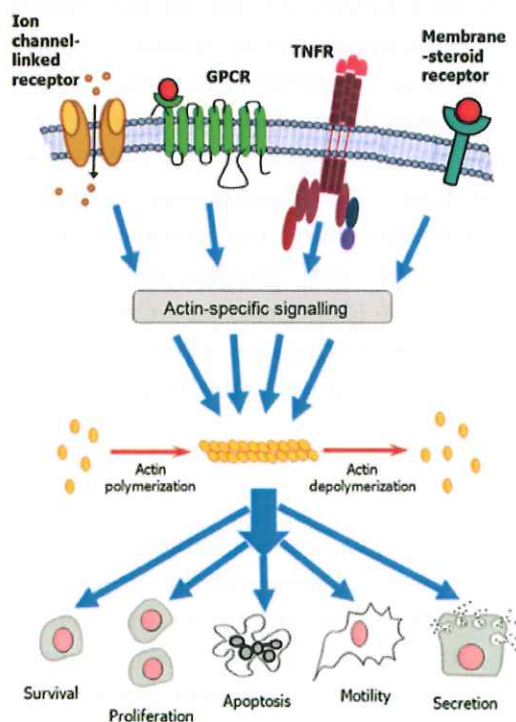
Η KDM2B επομένως, λειτουργεί με διπλό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του καρκίνου (Εικόνα 26), ρόλος που φαίνεται να είναι πιο περίπλοκος από ό,τι αρχικά πιστευόταν. Στις μέρες μας, οι περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στις φαινοτυπικές αλλαγές που παρατηρούνται έπειτα από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση της KDM2B. Πολλά ερωτήματα ωστόσο παραμένουν αναπάντητα μέχρι σήμερα. Οι μελλοντικές μελέτες πρέπει να διευκρινίσουν τη μακροπρόθεσμη επίδραση των διαφοροποιημένων επιπέδων της KDM2B *in vivo*. Επιπλέον, πρέπει να επιβεβαιωθούν ποια είναι τα ανοδικά σήματα που ενεργοποιούν την έκφραση της KDM2B, να αποσαφηνιστεί γιατί η KDM2B έχει διαφορετική λειτουργία σε διάφορους τύπους καρκίνου και ποιες είναι οι συνθήκες εκείνες που οδηγούν στην απομεθυλίωση της H3K36me2 και/ή της H3K4me3. Πέρα των παραπάνω, πρέπει επίσης να γίνει σαφές γιατί η KDM2B εμφανίζει πολύπλευρους ρόλους στον ίδιο καρκίνο. Αυτό το παράδοξο φαινόμενο υποδηλώνει την πιθανότητα ότι η ρύθμιση της KDM2B μπορεί να αλλάξει κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης ενός όγκου. Επιπλέον, θα ήταν πρόκληση να εντοπιστούν δυνητικοί εξειδικευμένοι αναστολείς έναντι της KDM2B. Προφανώς, απαιτείται περισσότερη έρευνα και χρόνος για την αποσαφήνιση αυτών των ερωτημάτων [41] και μην ξεχνάμε ότι το γονίδιο αυτό ανακαλύφθηκε μόλις πριν από 10 μόνο χρόνια.



Εικόνα 26. Μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους εμπλέκεται η KDM2B και σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρκίνου. Η KDM2B δρα λειτουργεί με διπλό ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του καρκίνου. Από τη μία πλευρά, η KDM2B αναστέλλει το μονοπάτι p15Ink4b, αυξάνει την οξειδωτική φωσφορλίωση και ενισχύει την πρωτεϊνική έκφραση της KDM5A/MYC, η οποία προάγει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Εκτός από αυτά, η KDM2B στρατολογεί τις PRC και Nsg2 για την ενίσχυση της μετανάστευσης των κυττάρων και ελέγχει την αυτοανανέωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η KDM2B αναστέλλει την έκφραση των ριβοσωμικών RNA γονιδίων, την πρωτεϊνική έκφραση της MYC και προάγει την ουβικωτινυλίωση της c-Fos, η οποία οδηγεί σε μειωμένη πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων [41].

4. ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΣ

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διακρίνονται για το σχήμα, την εσωτερική τους οργάνωση και την κίνησή τους, ιδιότητες που εξαρτώνται από ένα πολύπλοκο και καλά οργανωμένο δίκτυο πρωτεϊνών που σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πλέγμα και ονομάστηκε το 1936 “κυτταροσκελετός” [1]. Ο κυτταροσκελετός απαρτίζεται από τρεις τύπους κυτταροσκελετικών πολυμερών: από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, τα μικροϊνίδια ή αλλιώς τα ινίδια ακτίνης, το δίκτυο των μικροσωληνίσκων και τα ενδιάμεσα ινίδια - νημάτια. Όλες αυτές οι δομές δημιουργούνται όταν τα μονομερή πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούν τα συστατικά τους πολυμερίζονται ταχύτατα σε ινιδιακές δομές μέσα στο κύτταρο. Τα τρία αυτά πολυμερή μαζί, ελέγχουν το σχήμα και τη μηχανική των ευκαρυωτικών κυττάρων, οργανώνονται σε δίκτυα τα οποία αντιστέκονται στις μηχανικές πιέσεις αλλά μπορούν και να επανα-διοργανώνονται σε απόκριση εξωκυτταρικών σιγνάλων κατέχοντας έτσι σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και τη διατήρηση της ακεραιότητας των ενδοκυτταρικών δομών.



Εικόνα 27. Η μετάδοση σημάτων στον κυτταροσκελετό της ακτίνης προκαλεί μια ποικιλία κυτταρικών αποκρίσεων. Το σήμα δημιουργείται έπειτα από την ενεργοποίηση των υποδοχέων της μεμβράνης, όπως των υποδοχέων που συνδέονται με κανάλια ιόντων, GPCRs, υποδοχέας του TNF και υποδοχείς των ανδρογόνων. Τα μόρια μεταγωγής σήματος μεταδίδουν το σήμα από τους υποδοχείς στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Μεταβολές της κατάστασης πολυμερισμού/αποπολυμερισμού της ακτίνης έχουν εμπλακεί σε διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις, όπως της κυτταρικής επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της κινητικότητας και της εκκριτικής διαδικασίας [2].

Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων

Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων είναι το ινιδιακό σύστημα του κυτταροσκελετού με τη μεγαλύτερη διάμετρο (περίπου 24nm), αποτελεί την πολυμερή μορφή τουμπουλίνης και έχουν δομή κενού κυλίνδρου [3]. Η τουμπουλίνη, όπως και η ακτίνη, είναι εξελικτικά συντηρημένο μόριο και απαντάται με τρεις μορφές, την α και β- τουμπουλίνη που σχηματίζουν τη δομή του μικροσωληνίσκου και τη γ-τουμπουλίνη [4] η οποία εντοπίζεται στα κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων (MTOC). Κάθε μικροσωληνίσκος αποτελείται από 13 πρωτοϊνίδια διμερών α- και β-τουμπουλίνης και διαθέτει θέσεις σύνδεσης τόσο για δισθενή ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου όσο και για νουκλεοτίδια GTP. Κάθε φορά που προστίθεται μία καινούρια υπομονάδα στο “+” άκρο του μικροσωληνίσκου, υδρολύεται το GTP απελευθερώνοντας πυροφωσφορικό [5-7]. Στο “+” άκρο του μικροσωληνίσκου συμβαίνει διαρκής προσθήκη ετεροδιμερών τουμπουλίνης τα οποία στη συνέχεια μετακινούνται κατά μήκος του μικροσωληνίσκου και απομακρύνονται από το “-” άκρο [8]. Το “+” άκρο παρουσιάζει μεγαλύτερη ταχύτητα πολυμερισμού/αποπολυμερισμού, ενώ το “-” άκρο πολυμερίζεται και αποπολυμερίζεται βραδύτερα. Οι μικροσωληνίσκοι, είναι πολωμένα πολυμερή, πράγμα που σημαίνει ότι οι υπομονάδες τους είναι δομικά ασύμμετρες σε μοριακό

επίπεδο. Ως αποτέλεσμα αυτής της δομικής ασυμμετρίας, τα πολυμερή δρουν σαν σιδηροδρομικές ράγες για τις κινητήριες πρωτεΐνες οι οποίες κινούνται επιλεκτικά προς μία κατεύθυνση [9, 10]. Για τους μικροσωληνίσκους, κινητήριες πρωτεΐνες είναι οι κινεσίνες και οι δυνείνες [11, 12]. Η αρχιτεκτονική των μικροσωληνίσκων καθορίζεται από ένα ή δύο συνήθως οργανωτικά κέντρα σε αντίθεση με αυτή του κυτταροσκελετού της ακτίνης που συνεχώς συναρμολογείται και αποσυναρμολογείται σε απόκριση σηματοδοτικών ερεθισμάτων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι μικροσωληνίσκοι εμφανίζουν ομοιόμορφη κατανομή στο κυτταρόπλασμα [13]. Επιπλέον, ορισμένοι ρυθμιστές του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT και οι Rho GTPάσες, αποτελούν αναγνωρισμένους ρυθμιστές της σταθερότητας των μικροσωληνίσκων [14, 15].

Τα ενδιάμεσα ινίδια- νημάτια

Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν μια ομάδα ινιδίων με διάμετρο 10nm και βρίσκονται στα σημεία του κυττάρου που ασκείται έντονη μηχανική πίεση, αποτελώντας ένα από τα πιο σταθερά στοιχεία του κυτταροσκελετού [16]. Αποτελούνται από διαφορετικές, αλλά δομικά συγγενείς πρωτεΐνες μεταξύ τους, με αξιοσημείωτη κυτταρική εξειδίκευση, με χαρακτηριστικές εκπροσώπους τους τις κυτοκερατίνες, τη βιμεντίνη και τη δεσμίνη [17]. Αν και οι διαφορετικές ισομορφές έχουν διαφορετικές δομές, οργανώνονται με παρόμοιο δομικό τρόπο, λειτουργώντας στη στήριξη της πλασματικής μεμβράνης και τη διατήρηση του κυτταρικού σχήματος [18]. Εμπλέκονται επίσης στη διατήρηση των δυνάμεων έλξης μεταξύ των κυττάρων και στην προστασία των κυττάρων από τη διάσπαση. Σε αντίθεση με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και τους μικροσωληνίσκους, τα ενδιάμεσα νημάτια παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα έκφρασης ιστού [19]. Έτσι, για παράδειγμα σε ένα ενδιάμεσο ινίδιο τύπου I, η κερατίνη, εκφράζεται ειδικά σε επιθηλιακά κύτταρα, ενώ τα ενδιάμεσα ινίδια τύπου III εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά, μεσεγγυματικά και αιματοποιητικά κύτταρα [20-22].

Ινίδια Ακτίνης- Μικροϊνίδια

Τα μικροϊνίδια είναι τα μικρότερα ινίδια του κυτταροσκελετού, έχοντας διάμετρο μόλις 5-7nm. Το δομικό συστατικό των μικροϊνιδίων είναι η ακτίνη η οποία απομονώθηκε αρχικά από μυϊκά κύτταρα τη δεκαετία του '40 και από μη μυϊκά τη δεκαετία του '60 και αποτελεί μία από τις πέντε πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η ακτίνη, μια εξελικτικά συντηρημένη πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 42kDa, είναι ένα από τα κύρια κυτταροσκελετικά συστατικά σε ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα θηλαστικά υπάρχουν τουλάχιστον έξι διαφορετικές ισομορφές της ακτίνης [23] οι οποίες κωδικοποιούνται από έξι διαφορετικά γονίδια [24] και εκφράζονται με πολύπλοκο αναπτυξιακό και ιστοειδικό τρόπο. Η ποικιλομορφία της αυξάνεται ακόμη περισσότερο με μετα-μεταγραφικές (RNA splicing) και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, κυρίως στο αμινοτελικό της άκρο. Με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο οι ισομορφές της ακτίνης διακρίνονται σε τρεις μορφές: την α-, β- και τη γ- ακτίνη [25] και με βάση τον ιστό στον οποίο εκφράζονται κατατάσσονται σε μυϊκές και κυτταροπλασματικές. Οι μυϊκές ισομορφές περιλαμβάνουν τις δύο ισομορφές των λείων μυών, α-λεία ή α-αγγειακή μυϊκή (smooth muscle ή vascular) και γ-λεία μυϊκή ή γ-εντερική και τις δύο ισομορφές που εκφράζονται στους γραμμωτούς μύες της καρδιάς και του μυοσκελετικού, την α-καρδιακή και την α-σκελετική, αντίστοιχα. Οι κυτταροπλασματικές ισομορφές περιλαμβάνουν δύο ισομορφές, τη β- και τη γ-κυτταροπλασματική που εντοπίζονται σε όλα τα κύτταρα σε διαφορετικά όμως επίπεδα ανάλογα το κύτταρο και φαίνεται να έχουν διαφορετικές κατανομές και ρόλους [23, 25, 26]. Όλες οι ισομορφές παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (93-99%) σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ τους [23, 25] και μάλιστα η ακτίνη παρουσιάζει τόσο μεγάλη φυλογενετική συντήρηση, ώστε πρωτεΐνες από είδη που απέχουν πολύ εξελικτικά να παρουσιάζουν την ίδια ή ορισμένες φορές και μεγαλύτερη

ομολογία από αυτή που εμφανίζουν μεταξύ τους διαφορετικές ισόμορφες από το ίδιο είδος [27]. Πρέπει επίσης, να σημειωθεί πως μια ισομορφή της ακτίνης δεν μπορεί να αντικατασταθεί από άλλη [28]. Η β-ακτίνη, είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση, την προσκόλληση των κυττάρων και την κυτταρική συστολή. Διανέμεται κυρίως σε κυκλικές δέσμες, σε ίνες τάσης, σε διακυτταρικές συνδέσεις και στους συστολικούς μιτωτικούς δακτυλίους. Αντίθετα, η γ-ακτίνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο σε ίνες ραχιαίας τάσης στα ακίνητα κύτταρα, ενώ στα μεταναστευτικά κύτταρα συμμετέχει στο σχηματισμό δομών όπως τα λαμελλιπόδια. Στα κύτταρα που στερούνται β-ακτίνη, ο αριθμός των ινών τάσης μειώνεται και σχηματίζονται ευρείες προεξοχές, ενώ τα κύτταρα που στερούνται γ-ακτίνη τείνουν να σχηματίζουν παχιές δέσμες ακτίνης ελασματοειδούς μορφής και χαρακτηρίζονται από μειωμένες δομές λαμελλιποδίων. Σε νεοπλασματικά μετασχηματισμένα κύτταρα, η β-ακτίνη υποεκφράζεται, απαντάται διάχυτα εντοπισμένη στο κυτταρόπλασμα και διανέμεται στις περιοχές με ελασματοειδή μορφή, κατά μήκος ολόκληρης της περιμέτρου του κυττάρου [26]. Δεν υπάρχει διαφορά στην κατανομή της γ-ακτίνης μεταξύ νεοπλασματικών κυττάρων και φυσιολογικών κερατινοκυττάρων, ωστόσο η ποσότητά της αυξάνεται. Ο λόγος β/γ-ακτίνη είναι μοναδικός για κάθε είδος κυττάρων [29, 30].

Κάθε μόριο ακτίνης διαθέτει έξι με δέκα θέσεις πρόσδεσης κατιόντων [31, 32] από τις οποίες μία είναι θέση υψηλής συγγένειας για Mg^{2+} ή για Ca^{2+} [32]. Το μόριο του ασβεστίου έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το μόριο της ακτίνης, ωστόσο λόγω της μεγαλύτερης ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του μαγνησίου, η θέση αυτή καταλαμβάνεται σχεδόν αποκλειστικά από μόρια μαγνησίου [33]. Το μόριο της ακτίνης επίσης διαθέτει μεγάλη συγγένεια σύνδεσης με τα νουκλεοτίδια ATP και ADP [34]. Υπο φυσιολογικές συνθήκες στις θέσεις αυτές είναι προσδεδεμένο το νουκλεοτίδιο ATP. Έχει δειχθεί πως η δέσμευση του Mg^{2+} και του νουκλεοτιδίου ATP/ADP στην πρωτεΐνη σταθεροποιεί το μόριο [35], καθώς η απομάκρυνσή τους οδηγεί στην πλήρη μετουσίωση της ακτίνης [36].

Το ινίδιο της ακτίνης έχει περιγραφεί είτε ως δυο δεξιόστροφες έλικες μικρού βήματος, είτε ως μία αριστερόστροφη έλικα μεγάλου βήματος [37]. Η δημιουργία των μικροϊνιδίων της ακτίνης οφείλεται στη θεμελιώση ιδιότητα της μονομερούς - σφαιρικής G-ακτίνης (Globular) να πολυμερίζεται σε νηματοειδή - ινίδια F-ακτίνης (filamentous). Η μονομερής G-ακτίνη τείνει συνήθως να πολυμερίζεται σε νημάτια ακτίνης υπό φυσιολογικές συνθήκες άλατος και τα μονομερή τοποθετούνται στα μικροϊνίδια καταλαμβάνοντας συγκεκριμένη θέση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πολικότητα στα ινίδια της ακτίνης. Η πραγματική ισορροπία μεταξύ G-ακτίνης και F-ακτίνης εξαρτάται από την κρίσιμη συγκέντρωση της ακτίνης. Όταν η συγκέντρωση της ακτίνης είναι πάνω από το καθορισμένο σημείο, αρχίζει η διαδικασία πολυμερισμού της [38]. Με βάση το κλασικό μοντέλο *in vitro* πολυμερισμού της ακτίνης, αναγνωρίζονται τρεις φάσεις: i) η ενεργοποίηση (activation) των μονομερών G-ακτίνης και η δημιουργία τριμερών "πυρήνων" (nucleation), ii) η επιμήκυνση (elongation) του ινιδίου κατά την οποία ένα γραμμομόριο ATP υδρολύεται σε ADP και P_i , για κάθε γραμμομόριο G-ακτίνης που μετατρέπεται σε νηματοειδή F μορφή και iii) η δυναμική σταθεροποίησή του (steady state). Ο αρχικός "πυρήνας" δημιουργείται με αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των μονομερών ακτίνης έπειτα από αύξηση της ιονικής ισχύς και σύνδεση των μονομερών με ιόντα Mg^{2+} [39]. Ο σχηματισμός των πυρήνων δεν ευνοείται θερμοδυναμικά και είναι το πιο αργό στάδιο του πολυμερισμού [36, 40]. Έπειτα από τον σχηματισμό ικανού αριθμού πυρήνων ακολουθεί η ταχεία προσθήκη μονομερών και η επιμήκυνση των σχηματιζόμενων ινιδίων. Η επιμήκυνση ή ο αποπολυμερισμός των ινιδίων είναι αποτέλεσμα όλων των αντιδράσεων προσθήκης και απομάκρυνσης μονομερών και στα δύο άκρα του ινιδίου και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της μονομερούς ακτίνης. Στα κύτταρα η ακτίνη βρίσκεται σε μονομερή και πολυμερή μορφή σε δυναμική μεταξύ τους ισορροπία. Κατά την επιμήκυνση, πραγματοποιείται προσθήκη ATP-ακτίνης η οποία μετατρέπεται αρχικά σε ADP- P_i -ακτίνη και τελικά σε ADP-ακτίνη [41]. Η λειτουργική σημασία της υδρόλυσης του ATP μετά την ενσωμάτωση

μορίων ακτίνης στο ολιγομερές είναι ότι διευκολύνεται αργότερα ο αποπολυμερισμός τους αφού τα ινίδια ADP-ακτίνης αποπολυμερίζονται ευκολότερα από την ATP-ακτίνη λόγω διαφορετικής κρίσιμης συγκέντρωσης [42]. Τα ινίδια της ακτίνης παρουσιάζουν έτσι πολικότητα η οποία σχετίζεται με την κινητική πολυμερισμού/αποπολυμερισμού σε κάθε άκρο τους. Το ένα άκρο ονομάζεται “ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο” (barbed-end) ή “αμβλύ άκρο” του ινιδίου και παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για την ATP-ακτίνη, ενώ το άλλο άκρο ονομάζεται “βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο” (pointed-end) ή “αιχμηρό άκρο”. Η προσθήκη μονομερών κατά την επιμήκυνση του ινιδίου, είναι μεγαλύτερη στο ταχέως αναπτυσσόμενο σε σχέση με το βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο. Η συγκέντρωση της μονομερούς ακτίνης στην κατάσταση ισορροπίας λέγεται κρίσιμη συγκέντρωση και τα δύο άκρα του ινιδίου της ακτίνης έχουν διαφορετική κρίσιμη συγκέντρωση. Το “ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο” έχει χαμηλή κρίσιμη συγκέντρωση, ενώ το “βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο” έχει υψηλή κρίσιμη συγκέντρωση, για το λόγο αυτό ο πολυμερισμός συμβαίνει κυρίως στο ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο. Αν η τιμή συγκέντρωσης της G-ακτίνης είναι μεταξύ της κρίσιμης συγκέντρωσης του ταχέως αναπτυσσόμενου και του βραδέως αναπτυσσόμενου άκρου, ο πολυμερισμός συμβαίνει μόνο στο αμβλύ άκρο, ενώ αν η συγκέντρωση των μονομερών της ακτίνης είναι μικρότερη από αυτή του ταχέως αυξανόμενου άκρου, τότε δεν παρατηρείται επιμήκυνση του ινιδίου. Στην κατάσταση εκείνη όπου το μήκος του ινιδίου παραμένει σταθερό (treadmill) για κάθε μόριο ακτίνης που προστίθεται στο “ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο”, ένα μόριο ακτίνης απομακρύνεται από το “βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο” [43, 44]. Στην περίπτωση της ATP-ακτίνης, η οποία αντιπροσωπεύει και τη φυσιολογική κατάσταση στο κύτταρο, η προσθήκη ATP-μονομερών στο ινίδιο συνοδεύεται από τη μη αντιστρεπτή υδρόλυση του ATP. Κατά την απομάκρυνση δε των ADP-υπομονάδων, η αναγέννηση της μονομερούς ATP-ακτίνης δεν επιτυγχάνεται με την εκ νέου σύνθεση ATP, αλλά με ανταλλαγή του ADP με ATP από το διάλυμα. Συνεπώς κατά τον πολυμερισμό συμβαίνει συνεχής υδρόλυση ATP, η οποία προσδίδει στην ακτίνη δράση ATPάσης [36]. Ο μηχανισμός πολυμερισμού της ακτίνης δεν είναι ενεργειακά εξαρτώμενος από την υδρόλυση του ATP, δεδομένου ότι η G-ακτίνη μπορεί να πολυμερίζεται ακόμα και όταν είναι συνδεδεμένη μόνο με μόρια ADP ή με μη υδρολυόμενα ανάλογα του ATP [45]. Αντίθετα, η υδρόλυση του ATP λειτουργεί σαν ένα εσωτερικό ρολόι που υποδεικνύει την ηλικία του ινιδίου και σηματοδοτεί διαδικασίες για την αποδόμηση του ινιδίου της ακτίνης [46]. Ο πολυμερισμός της ακτίνης είναι μια δαπανηρή διαδικασία λόγω της κατανάλωσης ATP, για το λόγο αυτό όταν δεν είναι απαραίτητος, το κύτταρο κρατά το ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο ενωμένο με πρωτεΐνες κάλυψης (capping proteins). Τα μικροϊνίδια της ακτίνης συνδέονται επίσης με πρωτεΐνες συνδεδεμένες στην ακτίνη (actin binding proteins). Οι δύο αυτές ομάδες πρωτεϊνών ρυθμίζουν και την κατάσταση πολυμερισμού των μικροϊνιδίων της ακτίνης [47]. Επιπλέον, η διαφορά στην κρίσιμη συγκέντρωση των δύο άκρων σε συνδυασμό με την ύπαρξη πληθώρας πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη (actin binding proteins) επιτρέπει στο κύτταρο να δημιουργήσει έναν ευέλικτο και γρήγορο μηχανισμό ρύθμισης της συγκέντρωσης των μικροϊνιδίων. Η μεταβολή είτε της κρίσιμης συγκέντρωσης μέσω της αποκάλυψης/απόκρυψης των άκρων χαμηλής κρίσιμης συγκέντρωσης, ή της συγκέντρωσης των μονομερών μέσω της απελευθέρωσης/δέσμευσής τους από πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τη μονομερή ακτίνη ή του αριθμού των άκρων μέσω κατάτμησης ινιδίων, οδηγεί σε μεταβολή της υπάρχουσας σταθερής κατάστασης και αποκατάσταση μιας νέας δυναμικής ισορροπίας, ενώ ταυτόχρονα διατηρείται η συνολική συγκέντρωση της ακτίνης. Ο μηχανισμός αυτός ρύθμισης του πολυμερισμού της ακτίνης εξασφαλίζει την άμεση απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις που απαιτούν την ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Τα μικροϊνίδια στο κύτταρο οργανώνονται σε χαρακτηριστικές δομές στις διάφορες κυτταροπλασματικές περιοχές [48]. Ο λειτουργικός ρόλος των δύο αυτών δομών είναι ίδιος, δηλαδή να στηρίζουν την πλασματική μεμβράνη και να καθορίζουν το σχήμα του κυττάρου. Έτσι,

η ακτίνη απαντάται στην περιφέρεια του κυττάρου και πιο συγκεκριμένα στην λάμελλα (lamella) είτε ως ένα πυκνό πλέγμα-δίκτυο ινιδίων κάτω από την κυτταρική μεμβράνη (cortical actin) [49] το οποίο προσδίδει πλαστικότητα και μηχανική αντοχή στην μεμβράνη και αποτελεί φραγμό για την μετακίνηση μεμβρανικών δομών, όπως τα εκκριτικά κυστίδια, είτε ως παχειές παράλληλες δέσμες ινιδίων [50]. Η πυκνότητα και η γεωμετρία του πλέγματος εμφανίζουν διαβάθμιση. Έτσι, παρατηρείται προοδευτική μείωση της πυκνότητας κατά την απομάκρυνση από την περιφέρεια προς το εσωτερικό του κυττάρου [51-53]. Τα ινίδια κάτω από την πλασματική μεμβράνη εμφανίζουν ταυτόσημο προσανατολισμό και συνδέονται στην κυτταρική μεμβράνη με το αμβλύ - ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο τους ενώ το βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο κατευθύνεται προς το εσωτερικό του κυττάρου [54, 55]. Τα κύτταρα που μετακινούνται, στο προπορευόμενο άκρο τους (leading edge) δημιουργούν προεξοχές (protrusions) με διαφορετικό σχήμα και μέγεθος, στις οποίες όμως όλα τα ινίδια εμφανίζουν ταυτόσημο προσανατολισμό, με το "αμβλύ" άκρο τους προς την πλευρά της μεμβράνης [51, 55]. Στην δημιουργία των σχηματισμών αυτών μετέχουν πρωτεΐνες διασύνδεσης και δεσματοποίησης (crosslinking proteins), όπως η φιμπρίνη και η φιλαμίνη [52, 53, 55, 56]. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων δομών αποτελούν τα παρακάτω. i) Τα λαμελλιπόδια (lamellipodia) είναι χαρακτηριστικές δομές της κυτταρικής μεμβράνης που περιέχουν πυκνό πλέγμα μικροϊνιδίων ακτίνης. Συχνά, οι σχηματισμοί αυτοί ανασηκώνονται από το υπόστρωμα δημιουργώντας μεμβρανικές αναδιπλώσεις (membrane ruffles) [57]. ii) Τα φιλοπόδια (filopodia) αποτελούν την πιο εκτεταμένη μορφή αυτών των δομών, εμφανίζονται σαν επιφανειακές μεμβρανικές προεξοχές μεγαλύτερου μήκους και κυλινδρικού σχήματος και προκύπτουν από τη συνένωση ινιδίων του πλέγματος σε δέσμες από παράλληλα ινίδια ακτίνης τα οποία έχουν μήκος σχεδόν ίσο με το μήκος του φιλοποδίου. Στα λιγότερο κινούμενα άκρα η έκταση της λάμελλας είναι πολύ μικρότερη και συχνά περιγράφεται από περιφερειακές δέσμες ινιδίων (peripheral bundles). iii) Το σώμα του κυττάρου, τόσο την κάτω πλευρά (ventral) που εφάπτεται στο υπόστρωμα όσο και την πάνω πλευρά (dorsal), διατρέχουν παράλληλες δέσμες ινιδίων, τα ινίδια του στρες (stress fibers). Τα ινίδια του στρες ή ίνες τάσης αποτελούν την άλλη χαρακτηριστική δομή που δημιουργούν τα μικροϊνίδια της ακτίνης. Είναι παράλληλες δέσμες μικροϊνιδίων ακτίνης, αποτελούνται από ινίδια διαφορετικού μήκους και τυχαίου προσανατολισμού, το συνολικό μήκος τους ποικίλει [58] και "αγκυροβολούν" στις εστίες πρόσφυσης (focal adhesions), τις περιοχές επαφής της μεμβράνης με την εξωκυττάρια ουσία (extracellular matrix) [58]. Η συσχέτιση των μικροϊνιδίων με την κυτταρική μεμβράνη διαδραματίζει θεμελιώδη ρόλο στην αγκύρωση των μεμβρανικών πρωτεϊνών ενώ οι ίνες του στρες διατηρούν τις συνδέσεις μεταξύ του κυττάρου και της εξωκυττάριας ουσίας [2]. Το δίκτυο ακτίνης είναι μια δυναμική δομή με συνεχή κατευθυντικό πολυμερισμό και αποσυναρμολόγηση [59]. Η κατάσταση πολυμερισμού της ακτίνης, το μήκος των μικροϊνιδίων καθώς και οι ιδιότητές τους στα κύτταρα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες και κυρίως από τις πρωτεΐνες που δεσμεύονται με τη μονομερή ή πολυμερή ακτίνη, τις "σχετιζόμενες με την ακτίνη" πρωτεΐνες, όπως αλλιώς ονομάζονται. Έχουν αναγνωριστεί πολυάριθμες τέτοιες λειτουργικά σημαντικές πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ακτίνη [46]. Ο όρος κυτταροσκελετός της ακτίνης δεν αναφέρεται μόνο στην ακτίνη, αλλά και σε αυτή την μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, οι οποίες συνδέονται με την ακτίνη και ρυθμίζουν τον πολυμερισμό ή αποπολυμερισμό των μικροϊνιδίων, καθώς και την οργάνωσή τους. Η ενεργοποίηση των συνδεδεμένων με την ακτίνη πρωτεϊνών, προς την μια ή την άλλη κατεύθυνση, εξαρτάται από τις ενδοκυττάρια συνθήκες που διαμορφώνονται μετά από κάθε εξωκυττάρια ερέθισμα. Η πρόσδεσή τους στην G- ή F- ακτίνη έχει διάφορες λειτουργίες: ορισμένες, όπως οι βιλλίνη, κοφιλίνη, γκελσολίνη, φραγκμίνη και σεβερίνη, χρησιμεύουν για τον έλεγχο του μήκους των νηματίων καθώς και για τη διατήρησή τους σε συγκεκριμένο μήκος. Άλλες όπως οι βιλλίνη, φιμπρονεκτίνη και φιλαμίνη, είναι υπεύθυνες για την παραγωγή δεσμίδων ακτίνης, ενώ μία άλλη κατηγορία ελέγχει τη συγκέντρωση της G-ακτίνης

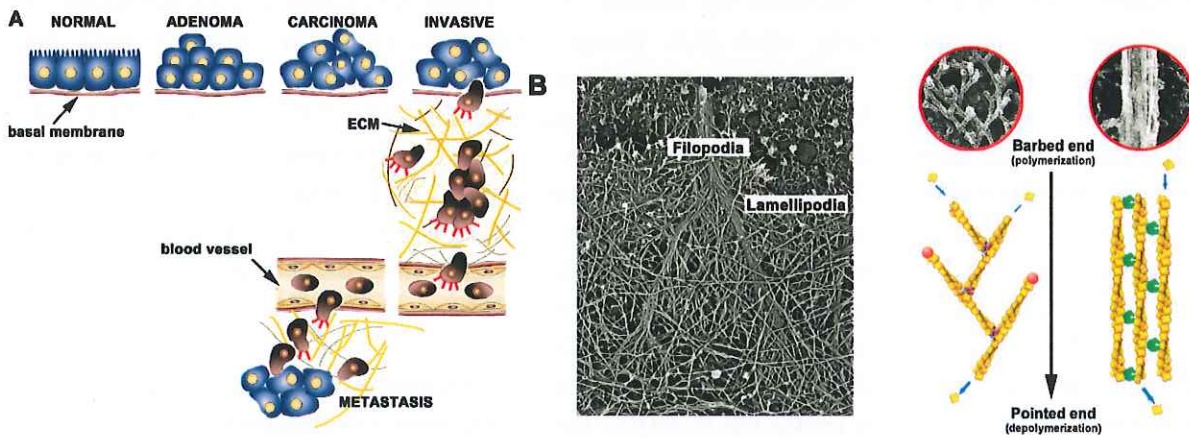
παρεμποδίζοντας τον πολυμερισμό της ακτίνης (π.χ. προφιλίνη) [2]. Το κύτταρο μπορεί να ελέγξει τις φυσικές ιδιότητες του κυτταροπλάσματος και να ανταποκριθεί σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα μέσω της αναδιαμόρφωσης του δικτύου των μικροϊνιδίων. Ο πολυμερισμός/αποπολυμερισμός των νηματίων της ακτίνης είναι μια δυναμική διαδικασία η οποία εμπλέκεται σε διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις [2].

Κυτταροσκελετός και EMT

Όλο και περισσότερες ενδείξεις υποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο του κυτταροσκελετού κατά τη διαδικασία της EMT. Κατά τη διάρκεια αυτής της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μεταβολής, εκτός από την τροποποίηση του προσκολλητικού τους χαρακτήρα με τα διπλανά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα περιλαμβάνουν και μορφολογικές μεταβολές, από επιθηλιακό με κορυφαία πολικότητα σε μεσεγγυματικό φαινότυπο με διάφορες μεταναστευτικές προεξοχές που απαιτούνται για την εισβολή και τη μετανάστευση των κυττάρων στους παρακείμενους ιστούς [60]. Διάφοροι τύποι μεταναστευτικών δομών έχουν αναφερθεί, όπως τα ποδοσώματα (podosomes), τα ινβαδοπόδια (invadopodia), τα φιλοπόδια (filopodia) και τα λαμελλιπόδια (lamellipodia). Παρόλο που το σχήμα των συγκεκριμένων προεκβολών-δομών είναι διαφορετικό, αυτά εξελίσσονται και ρυθμίζονται από τον δυναμικό μετασχηματισμό του κυτταροσκελετού της ακτίνης [61-63].

Ο δομικός σχεδιασμός και η μηχανική αντοχή που παρέχουν στα κύτταρα τα τρία πολυμερή που απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό των ευκαρυωτικών κυττάρων, είναι απαραίτητα για την EMT. Η δυναμική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αποτελεί προϋπόθεση για τη μορφολογία, τη μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων [64]. Το δίκτυο των μικροσωληνίσκων είναι ο τύπος του κυτταροσκελετού που παρέχει την κινητήρια δύναμη κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των κυττάρων [65]. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι μικροσωληνίσκοι εμφανίζουν ομοιόμορφη κατανομή στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα, κατά την EMT, σε τρισδιάστατη καλλιέργεια κυττάρων, οι μικροσωληνίσκοι εντοπίζονται κυρίως στις προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης. Η μορφολογία των προεκβολών αυτών διαφέρει σημαντικά από αυτή που παρατηρείται σε μεταναστευτικά κύτταρα σε καλλιέργεια δύο διαστάσεων, υποδεικνύοντας ότι το περιβάλλον διαβίωσης των κυττάρων επηρεάζει το σχηματισμό των προεξοχών [13]. Η βασικότερη πρωτεΐνη που κατέχει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της συναρμολόγησης της τουμπουλίνης για το σχηματισμό των προεξοχών της μεμβράνης είναι η πρωτεΐνη tau [66]. Επιπλέον, ορισμένοι ρυθμιστές του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K-AKT και οι Rho GTPάσες, αποτελούν αναγνωρισμένους ρυθμιστές της σταθερότητας των μικροσωληνίσκων [14, 15]. Κατά τη διαδικασία της EMT, τα ενδιάμεσα ινίδια αναδιατάσσονται σε σημαντικό βαθμό και μεταβαίνουν συνήθως από πλούσια σε κυτοκερατίνη σε πλούσια σε βιμεντίνη μορφή δίκτυα, συνοδευόμενα από αυξημένη ικανότητα κινητικότητας [67-70]. Η βιμεντίνη, ένα ενδιάμεσο ινίδιο τύπου III, αποτελεί ένα τυπικό βιοδείκτη για την EMT, καθώς εμπλέκεται στην εξαιρετικά δυναμική αναδιάταξη του κυτταροσκελετού κατά τη μετάσταση των κυττάρων προσδίδοντάς τους μεσεγγυματικό φαινότυπο και αυξημένη κινητικότητα [71]. Τέλος, ο μηχανισμός ρύθμισης του πολυμερισμού της ακτίνης εξασφαλίζει την άμεση απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις που απαιτούν την ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Στα καρκινικά κύτταρα που υποβάλλονται σε EMT, η G-ακτίνη πολυμερίζεται για να σχηματίσει νημάτια ακτίνης για να ξεκινήσει ο σχηματισμός μίας προπορευόμενης ακμής. Τα πρόσφατα αυτά σχηματισθέντα νημάτια ακτίνης αλληλεπιδρούν στη συνέχεια με δεσμευτικές πρωτεΐνες και συσταλτικές πρωτεΐνες, όπως η μυοσίνη II, οδηγώντας στην κίνηση των ινών της ακτίνης στο υπόστρωμα προς την προπορευόμενη ακμή [72]. Έτσι, η δυναμική αναδιοργάνωση της ακτίνης είναι προϋπόθεση για τη μορφολογία, τη μετανάστευση και την εισβολή καρκινικών κυττάρων [73]. Τα τρία αυτά κυτταροσκελετικά συστατικά δρουν συνεργατικά ώστε να παραχθεί η απαιτούμενη κινητήρια δύναμη για την κυτταρική μετανάστευση [74].

Οικογένειες πρωτεϊνών που συνδέονται και ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης κατά την EMT [70]



Εικόνα 28. Τα δίκτυα της ακτίνης στη μεταστατική διαδικασία. Α) Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες της παίζουν διαφορετικό ρόλο στα διάφορα στάδια της διαδικασίας εισβολής/μετάστασης: αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, μετανάστευση μεμονωμένων ή συσσωματωμένων κυττάρων και ενδοαγγείωση/εξαγγείωση. Β) Δομή φιλοποδίου και λαμελλιποδίου σε κύτταρα B16P1 που φαίνονται με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Οι εικόνες στους κύκλους εμφανίζουν διακλαδισμένο και παράλληλο δίκτυο ινιδίων της ακτίνης. Τα λαμελλιπόδια αποτελούνται από διακλαδισμένα νημάτια ακτίνης, ενώ τα φιλοπόδια περιέχουν μια μη διακλαδισμένη δέσμη ινών ακτίνης, οι οποίες ευθυγραμμίζονται αξονικά και συσσευάζονται σφιχτά μεταξύ τους [75].

Με βάση το λειτουργικό τους ρόλο οι συνδεδεμένες με την ακτίνη πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: (α) τις πρωτεΐνες που μεταβάλλουν τις κινητικές παραμέτρους και/ή τη σταθερή κατάσταση του *in vitro* πολυμερισμού και συνεπώς επιτρέπουν στα κύτταρα την ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού τους και (β) τις πρωτεΐνες που οργανώνουν τα ινίδια σε δομές υψηλότερου επιπέδου. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες με ενεργότητες δέσμευσης μονομερών (sequestration), σχηματισμού πυρήνων (nucleation), ανακύκλωσης μονομερών (treadmilling), κάλυψης άκρων (capping) και κατάτμησης ινιδίων (severing). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συνδέονται με μικροϊνίδια με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση (stabilization) ή τη διασύνδεση (crosslinking) και δεσματοποίηση (bundling) ή σύνδεση με μεμβρανικές πρωτεΐνες.

Η οικογένεια πρωτεϊνών του παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης cofilin (ADF cofilin, actin-depolymerizing factor family) περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες cofilin-1, cofilin-2 και ADF. Οι πρωτεΐνες αυτές θεωρούνται ως οι σημαντικότεροι ρυθμιστές της δυναμικής αναδιοργάνωσης της ακτίνης [76]. Η κοφιλίνη (cofilin) και ο ADF (actin depolymerizing factor) συνδέουν με μεγάλη συγγένεια την ADP-ακτίνη, είτε με τη μορφή μονομερούς (ένα μόριο G-ακτίνης) είτε με τη μορφή υπομονάδων του ινιδίου. Η κατεξοχήν δράση τους είναι η επιτάχυνση της ανακύκλωσης (treadmilling) των ινιδίων λόγω της αύξησης της ταχύτητας απομάκρυνσης των υπομονάδων από το “αιχμηρό” άκρο [77, 78]. Οι ADF/κοφιλίνη προσδέονται στο πλάι των ινιδίων ενώνοντας δύο διαδοχικές κατά μήκος της ίδιας έλικας υπομονάδες αλλά χωρίς να διαθέτουν ενεργότητα κατάτμησης. Το αμινοτελικό τμήμα της ακτίνης συνδέεται χημικά με τον ADF [79]. Η πρόσδεση της ADF/κοφιλίνης κατά μήκος των δύο τελευταίων υπομονάδων του “αιχμηρού” άκρου διευκολύνει τη ρήξη των δεσμών της τελικής υπομονάδας με το ινίδιο με αποτέλεσμα την απομάκρυνσή του με τη μορφή συμπλόκου ADF/κοφιλίνης-ακτίνης και την αύξηση της ταχύτητας αποπολυμερισμού. Η εξισορρόπηση του αποπολυμερισμού από το “αιχμηρό” άκρο με πολυμερισμό στο “αμβλύ” άλλο οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης των ινιδίων. Η δράση των ADF/

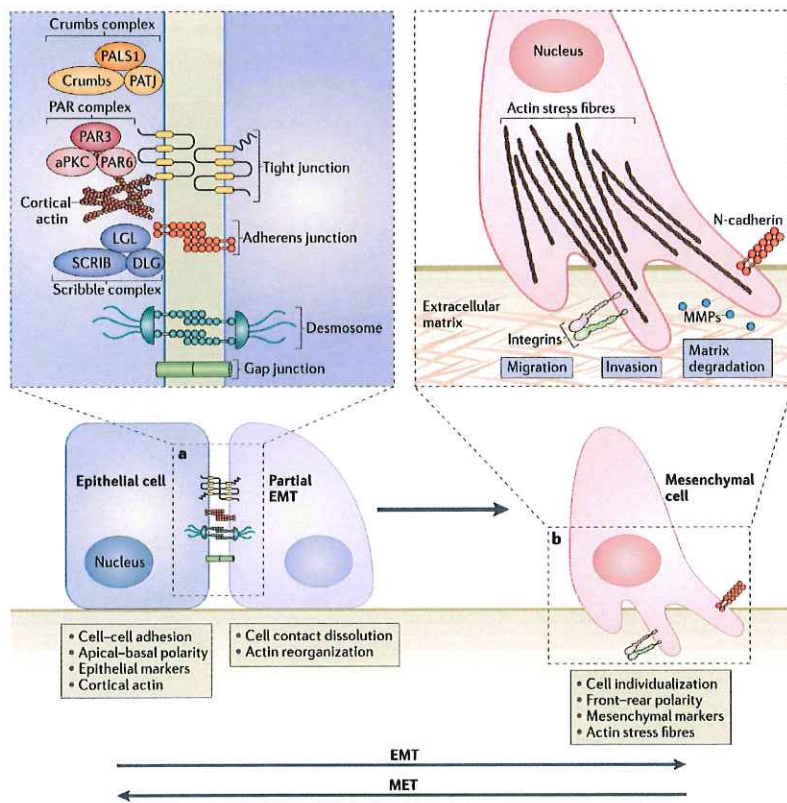
κοφιλίνης παρεμποδίζεται από τα φωσφοϊνοσιτίδια και τη φωσφορυλίωση τους, ενώ αντιθέτως η αποφωσφορυλίωση οδηγεί στην ενεργοποίησή τους. Οι LIMK κινάσες (LIM domain kinase) απενεργοποιούν τη δράση των πρωτεϊνών της οικογένειας ADF/cofilin επηρεάζοντας έτσι την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης [80]. Το μονοπάτι LIMK/cofilin βρίσκεται υπό τον έλεγχο της σηματοδοτικής οδού ILK (integrin-linked kinase)/b-parvin/bPIX/Cdc42 (cell division control protein 42)/PAK (p21-activated kinase) που συμμετέχει στη δημιουργία των μεμβρανικών τύπου-φιλοπόδια προεκβολών. Η σηματοδοτική οδός ILK/b-parvin/bPIX/Cdc42/PAK/LIMK/cofilin καταστέλλει τη διάσπαση των ινιδίων της ακτίνης με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των προεξοχών που μοιάζουν με φιλοπόδια κατά τη διάρκεια της διαδικασίας EMT. Αυτή η οδός διαδραματίζει επίσης ζωτικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την ογκογένεση και τη μετάσταση [61]. Η P120-catenin, ένας σημαντικός ρυθμιστής της ανεξάρτητης από την αγκυροβόληση ανάπτυξη, καταστέλλει την οδό σηματοδότησης του gas homolog (Rho)/Rho-associated protein kinase/LIMK/cofilin που δρα συνεργιστικά με τη σηματοδότηση μέσω p190RhoGAP για τη ρύθμιση της αναδιοργάνωσης της ακτίνης [81]. Η ερευνητική ομάδα του Shibue έδειξε ότι οι mDia2 και Rif επάγουν την πυρήνωση της ακτίνης και την επακόλουθη επέκταση των ινιδίων της [82]. Η σηματοδότηση μέσω Rif/mDia2 και η σηματοδότηση ILK/b-parvin/bPIX/Cdc42/PAK/LIMK/cofilin συνεργάζονται ώστε να διατηρηθούν τα φιλοπόδια που εμπλέκονται στο πρόγραμμα EMT [83]. Ως άμεσος πρώτος τελεστής καθοδικά των TGF- β -Smads, το JunB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην EMT [84] διεγείροντας την οργάνωση των ινών του στρες και των εστιακών συμφύσεων μέσω της ρύθμισης της τροπομυοσίνης α -1 [85].

Ορισμένοι ρυθμιστές της τοπικής αναδιοργάνωσης της ακτίνης αναγνωρίστηκαν επίσης ότι έχουν σημαντικούς ρόλους στη μετανάστευση και τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, όπως το σύμπλοκο Arp2/3 (actin-related protein2/3), η cortactin, η fascin, ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα kinase substrate 8, η α -actinin, η φιλαμίνη και οι πρωτεΐνες της οικογένειας WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein). Το σύμπλοκο Arp2/3 εμπλέκεται στην έναρξη του πολυμερισμού των νημάτων της ακτίνης. Συχνά υπερεκφράζεται σε κακοήθεις όγκους, όπως τα καρκινώματα του μαστού και του ήπατος, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της εξέλιξης του καρκίνου και της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης [86-88]. Το σύμπλοκο των Arp2/3 αποτελεί παράγοντα που διαθέτει ενεργότητα σχηματισμού πυρήνων (nucleation) αλλά και κάλυψης των ινιδίων της ακτίνης στο αιχμηρό τους άκρο. Σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες κάλυψης/κατάτμησης οδηγεί σε πυρήνες με ελεύθερο το “αμβλύ” άκρο τους και επομένως στην αύξηση όχι μόνο της αρχικής ταχύτητας πολυμερισμού αλλά και της ταχύτητας επιμήκυνσης των ινιδίων αφού ο πολυμερισμός συμβαίνει στα ταχέως αυξανόμενα άκρα. Επιπλέον, το σύμπλοκο Arp2/3 έχει την ικανότητα να προσδένεται στο πλάι των ινιδίων επάγοντας από το σημείο πρόσδεσης τον πολυμερισμό ενός νέου ινιδίου, δημιουργώντας έτσι διακλαδιζόμενα ινίδια και συμβάλλοντας στο σχηματισμό πλέγματος της ακτίνης. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου επιτυγχάνεται με την πρόσδεση σε αυτό της ενεργοποιημένης WASP [89]. Η κορτακτίνη (cortactin) είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει ακτίνη και πιστεύεται ότι ενεργοποιεί το σύμπλοκο Arp2/3 το οποίο με τη σειρά του προάγει τον πολυμερισμό των νηματίων της ακτίνης στην πρόσθια άκρη των κυττάρων. Η υπερέκφραση και η φωσφορυλίωση της κορτακτίνης συσχετίζονται στενά με την κινητικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων [90, 91]. Η έκφραση της fascin συνδέεται με την γενικότερη πορεία πρόγνωσης και επανεμφάνισης του καρκίνου και τη μεταστατική εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων [92]. Πρόκειται και αυτή για μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται στην ακτίνη που εντοπίζεται κυρίως στα φιλοπόδια και ινβαδοπόδια. Η υπερέκφρασή της προάγει τη μετανάστευση των κυττάρων διεγείροντας τον σχηματισμό των προεξοχών της μεμβράνης [93]. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες της ρεφιλίνης (refilin), και συγκεκριμένα οι RefilinA και RefilinB, είναι και αυτές ρυθμιστές της ακτίνης [94]. Οι πρωτεΐνες refilin δρουν καθοδικά μέσω του τελεστή τους

FLNA για να ρυθμίσουν την δυναμική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Το διμερές RefilinA προάγει την FLNA (filamin A) να σχηματίζει ένα πολυμοριακό σύμπλοκο στη νηματοειδή ακτίνη (F-ακτίνη) και στη συνέχεια να μετατραπεί ώστε να δεσμεύει F-actin, ενώ η RefilinB σε συνδυασμό με τη FLNA οργανώνει ένα μοναδικό περιπυρηνικό δίκτυο ακτίνης στην κορυφαία επιφάνεια του κυττάρου κατά τη διάρκεια της EMT [95]. Οι β-θυμοσίνες είναι μικρές πρωτεΐνες που αποτελούνται από 43 αμινοξέα, δεσμεύονται με την ATP-ακτίνη με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι με την ADP-ακτίνη και παρεμποδίζουν την προσθήκη υπομονάδων στα άκρα των ινιδίων. Ταυτόχρονα παρεμποδίζουν και την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου [96, 97]. Επίσης, οι προφιλίνες δεσμεύονται και αυτές σε μονομερή ακτίνης και επιταχύνουν την επιμήκυνση των μικροϊνιδίων μειώνοντας την κρίσιμη συγκέντρωση στο αμβλύ άκρο. Αυτό συμβαίνει γιατί το σύμπλοκο ακτίνης-προφιλίνης συνδέεται με το αμβλύ άκρο με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι το μονομερές της ακτίνης. Στη συνέχεια, η προφιλίνη απομακρύνεται από το άκρο του ινιδίου με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται η περαιτέρω προσθήκη μονομερών. Η προφιλίνη αυξάνει την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου ADP στην G-ακτίνη με αποτέλεσμα, στις περιπτώσεις που υπάρχει αυξημένη παραγωγή ADP-ακτίνης λόγω αυξημένου αποπολυμερισμού των μικροϊνιδίων, να επάγει την ταχεία μετατροπή της σε ATP-ακτίνη [97, 98]. Μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην ακτίνη και περιλαμβάνει πάνω από 40 ισομορφές είναι αυτή των τροπομοουσινών [99]. Οι αλλοιωμένες ισομορφές της τρομομοουσίνης σταθεροποιούν σε διαφορετικό καθεμία βαθμό τις δέσμες των ινιδίων της ακτίνης και παρουσιάζουν συσχέτιση με τη μορφολογία των εστιακών προσφύσεων ανάλογη με την ικανότητά τους να επηρεάζουν το μέγεθος και τη σηματοδότηση της εστιακής προσκόλλησης [100]. Οι ταυτόχρονες επιδράσεις των διαφόρων τρομομοουσινών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης και στη σύνδεση της μορφολογίας της προσκόλλησης με τον κυτταροσκελετό, είναι κρίσιμες για τον ακριβή έλεγχο του χρόνου εκκίνησης και αναστολής της κυτταρικής μετανάστευσης [101]. Η ερευνητική ομάδα του Bach ταυτοποίησε ότι η ισομορφή Tm5NM1 σταθεροποιεί τις εστιακές προσκολλήσεις και τα νημάτια της ακτίνης επηρεάζοντας την κυτταρική μετανάστευση σε 2D και 3D κυτταροκαλλιέργειες [102]. Η διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τις τρομομοουσίνες πιστεύεται επίσης ότι έχει μεγάλη επίδραση στην ανεξάρτητη από την αγκυροβόληση ανάπτυξη των κυττάρων [103]. Η βιλλίνη είναι μια από τις πρωτεΐνες με δράση κατάτμησης, ευνοεί όμως και το σχηματισμό δέσμης ινιδίων ακτίνης λειτουργώντας και σαν πρωτεΐνη δεσματοποίησης ανάλογα με τα επίπεδα του ενδοκυττάρου ασβεστίου [44, 104]. Μία άλλη πρωτεΐνη που διαθέτει ενεργότητα πυρηνοποίησης, κάλυψης άκρων και κατάτμησης ινιδίων είναι η πολυλειτουργική πρωτεΐνη γκελσολίνη (gelsolin). Η *in vitro* δράση της γκελσολίνης στην ακτίνη είναι διττή αλλά το αποτέλεσμα και στις δυο περιπτώσεις είναι το ίδιο, η δημιουργία δηλαδή πολλών και μικρών ινιδίων που έχουν καλυμμένο το “αμβλύ” άκρο τους. Κατά την προσθήκη της σε διάλυμα F-ακτίνης η γκελσολίνη συνδέεται με τα υπάρχοντα ελεύθερα άκρα εμποδίζοντας την περαιτέρω προσθήκη μονομερών (ενεργότητα κάλυψης) ενώ ταυτόχρονα προσδένεται στο πλάι των ινιδίων τεμαχίζοντας κάθε ινίδιο σε δύο μικρότερου μήκους (ενεργότητα κατάτμησης) ινίδια παραμένοντας προσδεσμένη στο προκύπτον “αμβλύ” άκρο τους. Κατά την προσθήκη της σε διάλυμα G-ακτίνης σχηματίζει σύμπλοκο με δύο μόρια ακτίνης σταθεροποιώντας τα, επιταχύνοντας έτσι τον σχηματισμό των πυρήνων πολυμερισμού. Τέλος, προσθήκη γκελσολίνης σε πλέγμα ινιδίων οδηγεί στην αποδιοργάνωση και ρευστοποίησή του [105]. Η οικογένεια πρωτεϊνών WAVE (WASP/WASP family verprolin-homologous protein) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών δέσμευσης της ακτίνης που αποτελείται από πέντε μέλη, τα WASP, NWASP, WAVE1, 2 και 3 [106]. Έχει δειχθεί ότι η WAVE3 απαιτείται για την έναρξη της EMT μέσω της εμπλοκής της στη σύνθεση του DNA, στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, τη μετανάστευση και του σχηματισμού μεμβρανικών προεξοχών σε κύτταρα τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού [63]. Σε απόκριση στις Rho GTPάσες, οι πρωτεΐνες WASP/WAVE αυξάνουν τη δραστηριότητα του συμπλόκου Arp2/3, το οποίο είναι ικανό να προάγει τη συναρμολόγηση των ινιδίων της ακτίνης και

την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, εξαρτώμενο από την εμπλοκή των παραγόντων προαγωγής πυρήνωσης της ακτίνης, NPFs (nucleation-promoting factors). Συγκεκριμένα, οι υποοικογένειες WASP και WAVE αποτελούν μέρος των NPF, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού θετικής ανατροφοδότησης και προώθησης της διαδικασίας αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης [107, 108]. Η δραστηριότητα των NPFs ρυθμίζεται επίσης από τη Cdc42 και τη Rac (ras-related C3 botulinum toxin substrate) που απαιτείται για τις δραστηριότητες της οικογένειας πρωτεϊνών WASP/WAVE [109, 110]. Οι Rac1 και Cdc42 εντοπίζονται στο πρόσθιο μέρος της κατεύθυνσης των κυττάρων που μεταναστεύουν [111]. Η Cdc42 διεγείρει μεγάλες μη διακλαδισμένες δεσμίδες ακτίνης για το σχηματισμό φιλοποδίων [112], ενώ η Rac1 ρυθμίζει τον πολυμερισμό της διακλαδισμένης ακτίνης για τον σχηματισμό προεξοχών, οδηγώντας το κύτταρο προς τα εμπρός [113]. Η πρωτεΐνη δέσμευσης του ρυθμιστικού παράγοντα 4 της ιντερφερόνης, IBP (Interferon regulatory factor 4 binding protein), μεσολαβεί στις δραστηριότητες των πρωτεϊνών Cdc42, Rac1 και RhoA στον καρκίνο του μαστού. Μπορεί να προκαλέσει την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, διεγείροντας το σχηματισμό φιλοποδίων και λαμελλιποδίων επιδρώντας έτσι στη μορφολογία των κυττάρων. Η ερευνητική ομάδα του Zhang ταυτοποίησε τη συμμετοχή της IBP στην EMT που προκαλείται από τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα [114]. Οι φορμίνες (formins) είναι συντηρημένες εξελικτικά πρωτεΐνες που ενισχύουν την πυρήνωση της ακτίνης στο άκρο της F-ακτίνης [115]. Θεωρούνται σημαντικοί ρυθμιστές της κυτταρικής κίνησης, της ανάπτυξης και της οργάνωσης της μορφολογίας του κυττάρου. Η δραστηριότητά τους ρυθμίζεται από τις RhoGTPάσες, οι οποίες ελέγχουν τη συναρμολόγηση των ινιδίων του στρες, το σχηματισμό των μεμβρανικών προεξοχών και τον τρόπο κινητικότητας των κυττάρων [116, 117]. Οι φορμίνες (formins) λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες στην αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της μορφολογίας του σχήματος του κυττάρου κατέχοντας έτσι κεντρικό ρόλο στην EMT. Η FHOD1 (formin homology domain protein) εντοπίζεται κυρίως σε μεσεγγυματικά κύτταρα στους ανθρώπινους ιστούς και διεγείρει άμεσα τον σχηματισμό νηματίων της ακτίνης [118]. Η ερευνητική ομάδα του Gardberg ανέφερε ότι η έκφραση της FHOD1 είναι αυξημένη στην πρόσθια άκρη μετασχηματισμένων μεσεγγυματικών κυττάρων κατά την EMT [115]. Αυτή η ανεπαρκώς μελετημένη πρωτεΐνη προάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και το σχηματισμό ινών του στρες, διαδικασίες απαραίτητες για την εισβολή και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Αποσιώπηση της FHOD1 αναστέλλει το σχηματισμό προεξοχών στη μεμβράνη μειώνοντας τη μετανάστευση των κυττάρων. Η FHOD1 μπορεί επίσης να αυξήσει την έκφραση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 2 (MLC2, myosin light chain 2) και να επηρεάσει τη φωσφορυλίωσή της στα αμινοξικά κατάλοιπα Thr18 και Ser19. Η φωσφορυλιωμένη MLC2 απαιτείται για το σχηματισμό των ινιδίων του στρες και νηματίων της μυοσίνης, τα οποία παρέχουν συσταλτική δύναμη ενισχύοντας τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων [119]. Αρκετές πρωτεΐνες που έχουν περιγραφεί με άλλες λειτουργίες, τώρα έχειδειχθεί ότι έχουν στενή σχέση με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Το σύμπλοκο metaderin (MTDH) για παράδειγμα, το οποίο αναγνωρίστηκε αρχικά ως ένα συστατικό των στεγανών - στενών συνδέσεων, θεωρείται πλέον ως ρυθμιστής του κυτταροσκελετού της ακτίνης [120]. Η πρωτεΐνη MTDH συν-εντοπίζεται με τις occludins και την zonula occludens-1 (ZO-1) στο κυτταρόπλασμα των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων. Υπερέκφρασή της μειώνει τον αριθμό των φιλοποδίων που είναι πλούσια σε F-ακτίνη, αυξάνει το μέγεθος των κυττάρων και εξασθενεί γενικά τα μεσεγγυματικά χαρακτηριστικά των κυττάρων. Επιπλέον, αναστέλλει την αυξημένη ικανότητα της κυτταρικής μετανάστευσης και της διήθησης, ενώ η αποσιώπησή της επάγει την EMT. Οι κυτοκίνες μπορούν να ρυθμίζουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην πολωμένη ακμή των κυττάρων, μέσω ειδικών ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης για να σχηματίσουν προεξοχές στη μεμβράνη [121, 122]. Η κυκλίνη A2 έχει έναν νέο και κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης καθώς μεσολαβεί στη μετάβαση στη φάση S και στη G2/M

μετάβαση του κυτταρικού κύκλου. Ενεργοποιεί τη σύνθεση του DNA σε συνδυασμό με την εξαρτώμενη από κυκλίνη κινάση 2 (cyclin-dependent kinase 2) κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και ενεργοποιεί την κυκλίνη B1-CDK1 κατά τη μετάβαση G2/M. Επιπλέον βρέθηκε ότι η κυκλίνη A2 είναι ένας νέος ρυθμιστής του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Σε κύτταρα με ανεπαρκή ποσότητα κυκλίνης A2, τόσο ο κυτταροσκελετός όσο ο εντοπισμός των εστιακών συμφύσεων μεταβάλλονται σημαντικά [123]. Από όλα τα παραπάνω, είναι προφανές ότι η μεταβολή της κατάστασης πολυμερισμού του κυττάρου απαιτεί την ενορχηστρωμένη δράση πολλών πρωτεϊνών και συχνά την συνεργασία παράλληλων μηχανισμών.



Εικόνα 29. Κυτταρικά γεγονότα κατά την EMT και συσχετίσή τους με τον κυτταροσκελετό [124]. a) Τα πρώτα βήματα της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) είναι η αποσυναρμολόγηση των διακυτταρικών επαφών των επιθηλιακών κυττάρων (στεγανοί σύνδεσμοι, σύνδεσμοι προσκόλλησης, δεσμοσώματα και χασμοσύνδεσμοι) και η απώλεια της πολικότητας μέσω της αποδιοργάνωσης των συμπλόκων πολικότητας Crumbs, PAR και SCRIB. Η έκφραση των επιθηλιακών γονιδίων-δεικτών καταστέλλεται ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η έκφραση των μεσεγχυματικών-δεικτών. b) Στη συνέχεια, παρατηρείται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τα κύτταρα αποκτούν κινητικότητα και διηθητικότητα έναντι των παρακείμενων ιστών, σχηματίζοντας λαμελλιπόδια, φιλοπόδια και ινβαδοπόδια, και εκφράζοντας

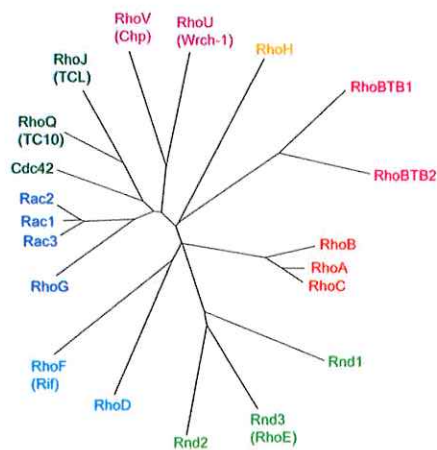
μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) που μπορούν να αποικοδομούν πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM). Η διαδικασία μεσεγχυματικής-επιθηλιακής μετάβασης (MET) επιτρέπει στα κύτταρα που έχουν υποβληθεί EMT να επανέλθουν στην επιθηλιακή κατάσταση. Τρεις τύποι EMT μπορούν να διακριθούν ανάλογα με το περιβάλλον του φυσιολογικού ιστού [125]. Το EMT τύπου 1 συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση και την ανάπτυξη των οργάνων [126], ο τύπος 2 EMT είναι σημαντικός για την αναγέννηση των ιστών και την fibrosis των οργάνων [125, 127], και η EMT τύπου 3 συνδέεται με την πρόοδο εξέλιξης του καρκίνου [125] και τις ιδιότητες των καρκινικών στελεχιαίων κυττάρων [128]. Η MET συμβάλλει επίσης στην ανάπτυξη (για παράδειγμα, στην ανάπτυξη των νεφρών [129] και στην παραγωγή μεταστατικών καρκινωμάτων [130, 131]). Οι διαδοχικοί γύροι EMT και MET λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης [126, 129]. Σε πρωτογενή EMT, τα εκτοδερματικά ή επιθηλιακά κύτταρα χωρίς προηγούμενο ιστορικό EMT διαφοροποιούνται σε μεσεγχυματικά κύτταρα. Στο δευτερογενές EMT, κύτταρα που έχουν ήδη υποβληθεί σε EMT και έχουν επανέλθει στην επιθηλιακή τους κατάσταση ξεκινούν μια νέα διαδικασία EMT [126, 132]. Παρομοίως, έπειτα από τη διασπορά των κυττάρων, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να επανέλθουν μέσω της MET σε μια επιθηλιακή κατάσταση, οδηγώντας στο σχηματισμό δευτερογενών εστιών καρκίνου, με φαινότυπους παρόμοιους με τον πρωτογενή όγκο [131]. aPKC: atypical protein kinase C, DLG: discs large, LGL: lethal giant larvae. N-cadherin: neural cadherin. PALS1: protein associated with Lin-7 1, PATJ: PALS1-associated tight-junction protein [124].

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B

Ο ρόλος των ινιδίων ακτίνης στη μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στους ιστούς έχει μελετηθεί εκτενώς. Από την ανακάλυψη της οικογένειας των Rho GTPασών και μετά [1, 2] έχουν συγκεντρωθεί πολλά δεδομένα που δείχνουν πώς αυτές οι πρωτεΐνες ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης κατά τη διάρκεια της κυτταρικής κίνησης. Ο πολυμερισμός ή ο αποπολυμερισμός της ακτίνης προκαλείται από εξωκυτταρικά ή ενδοκυτταρικά σήματα που ενεργοποιούν μέλη της οικογένειας των Rho πρωτεϊνών. Οι μηχανισμοί με τους οποίους οι πρωτεΐνες της οικογένειας Rho επηρεάζουν τη δυναμική των νηματίων ακτίνης και τη μετανάστευση είναι αρκετά πολύπλοκοι και θα αναλυθούν με λεπτομέρειες παρακάτω [3-8].

ι) Οι πρωτεΐνες Rho

Οι πρωτεΐνες Rho (Ras-homologue) αναγνωρίστηκαν και κλωνοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1985 [9], και αντιπροσωπεύουν μία υπο-οικογένεια μικρών GTPασών της υπερ-οικογένειας Ras. Είναι μικρές πρωτεΐνες μοριακού βάρους 21kDa, απαντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα και λειτουργούν ως διαδοικοί διακόπτες σε ένα εύρος ποικίλων σηματοδοτικών μονοπατιών [10, 11]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 20 κινάσες Rho οι οποίες χωρίζονται με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία, τα δομικά τους μοτίβα και τη βιολογική τους δράση σε έξι υπο-ομάδες: τις πρωτεΐνες Rho (RhoA, RhoB, RhoC), τις πρωτεΐνες Rac (Rac1, Rac2, Rac3, RhoG), τις πρωτεΐνες Cdc42-like (Cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Chp), τις πρωτεΐνες Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE), τις πρωτεΐνες RhoBTB (RhoBTB1, RhoBTB2, RhoBTB3) και τις πρωτεΐνες Miro (Miro1, Miro2) [12, 13]. Οι Rho GTPάσες RhoD, Rif και TTF/RhoH δεν εμπίπτουν σε καμία από τις παραπάνω υπο-ομάδες [14].

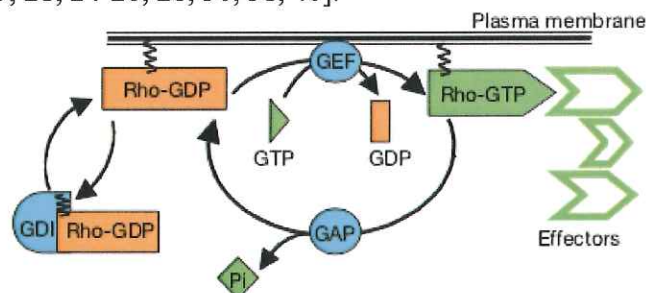


Εικόνα 50. Η οικογένεια των RHO πρωτεϊνών στον άνθρωπο όπως παρουσιάζεται σε ένα φυλογενετικό δέντρο χωρίς ρίζα. Η οικογένεια Rho διαιρείται σε υποοικογένειες με βάση την ομολογία της αλληλουχίας και με βάση τα λειτουργικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά της κάθε πρωτεΐνης. Κάθε υποοικογένεια εμφανίζεται με διαφορετικό χρώμα. Οι αλληλουχίες των αμινοξέων των RhoGTPασών ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας ClustalW [15].

Οι περισσότερες πληροφορίες που διατίθεται για τη λειτουργία των πρωτεϊνών Rho, πηγάζουν από μελέτες πάνω στις RhoA, Rac1 και Cdc42 οι οποίες έχει διαπιστωθεί πως ελέγχουν ένα μεγάλο εύρος κυτταρικών διεργασιών, ρυθμίζοντας την ακτίνη και τους μικροσωληνίσκους του κυτταροσκελετού επάγοντας συγκεκριμένες δομές στα ινίδια της ακτίνης σε ινοβλάστες, ινίδια του στρες (stress fibers), λαμελλιπόδια (lamellipodia/membrane ruffles) [1, 2, 4, 16-19] και φιλοπόδια (filopodia) [1, 2, 16, 20], αντίστοιχα [4, 17-19, 21]. Όλες οι Rho GTPάσες διαθέτουν ένα μοτίβο αλληλουχίας το οποίο μεσολαβεί στη πρόσδεση του GTP ή/και του GDP, κάνοντας τις Rho GTPάσες να λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες έχοντας ενεργή, GTP-προσδεσμένη (GTP-bound) και ανενεργή, GDP-προσδεσμένη (GDP-bound) μορφή [5, 14, 22].

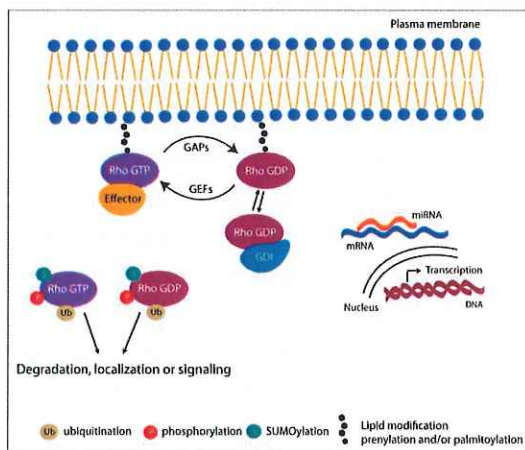
Η δραστηριότητα των κινασών σε απόκριση της διέγερσης του υποδοχέα, ελέγχεται αυστηρά

τόσο σε τοπικό όσο και σε χρονικό επίπεδο ώστε να διεγείρονται κάθε φορά συγκεκριμένα μόνο καθοδικά κυτταρικά μονοπάτια. Η ενεργοποίηση των Rho GTPασών λαμβάνει χώρα κατά τρόπο που εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Οι ρυθμιστές της δραστηριότητας των κινασών κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες και ο αριθμός τους είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των κινασών Rho, γεγονός που καταδεικνύει τη σημαντικότητα της ρύθμισης της ενεργότητας των κινασών [23]: i) τους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (guanine nucleotide-exchange factors, GEFs) οι οποίοι καταλύουν αρχικά την απελευθέρωση του GDT και στη συνέχεια την πρόσδεση του GTP, τροποποιώντας έτσι τη στερεοδιαμόρφωση της κινάσης ενεργοποιώντας την, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγγένεια πρόσδεσης των πρωτεϊνών - τελεστών και να ενεργοποιούνται καθοδικά μονοπάτια [23-28] ii) τις πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις GTPάσες (GTPase-activating proteins, GAPs) οι οποίες ενισχύουν τη χαμηλή ενδογενή δυνατότητα των μικρών GTPασών να υδρολύουν το προσδεμένο GTP σε GDT απενεργοποιώντας τις GTPάσες, προάγοντας την απενεργοποίηση και αναστροφή της πρόσδεσης του τελεστή με αποτέλεσμα να μπλοκάρουν το σηματοδοτικό μονοπάτι [14, 22, 27, 29-31] iii) και τους αναστολείς αποδέσμευσης των νουκλεοτιδίων γουανίνης (guanine nucleotide-dissociation inhibitors, GDIs) οι οποίοι προσδένονται στο καρβοξυτερματικό πρενυλιωμένο άκρο των GTPασών εμποδίζοντας τη δέσμευσή τους στην πλασματική μεμβράνη με αποτέλεσμα οι Rho πρωτεΐνες να οδηγούνται στο κυτταρόπλασμα, να εμποδίζεται η ενεργοποίησή τους και να μη μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις άλλες πρωτεΐνες [14, 32-36]. Οι RhoGDIs μπορούν να προσδεθούν στις Rho GTPάσες είτε αυτές βρίσκονται στην ενεργή προσδεμένες με GTP ή ανενεργή προσδεμένες με GDP μορφή τους [23, 30, 37-39]. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 70 Rho GEFs, 80 ρυθμιστικές πρωτεΐνες Rho GAP [26] και 3 Rho GDI, αντανάκλωντας έτσι την πολυπλοκότητα της ρύθμισης των Rho πρωτεϊνών [5, 21, 24-26, 28, 30, 31, 40].



Εικόνα 51. Πρότυπο ρύθμισης των RHO-πρωτεϊνών, Ο κύκλος των RhoGTPασών [5]. Έχουν περιγραφεί περίπου είκοσι RhoGTPάσες στα θηλασικά: Rho (τρεις ισομορφές: A, B, C), Rac (1, 2, 3), Cdc42, TC10, TCL, Chr (1, 2), RhoG, Rnd (1, 2, 3), RhoBTB (1, 2), RhoD, Rif, και TTF. Αυτές βρίσκονται μεταξύ μιας ενεργής (δεσμευμένης με GTP) και μιας αδρανούς (δεσμευμένης στο GDP) διαμόρφωσης. Ο κύκλος ρυθμίζεται σε μεγάλο βαθμό από τρεις κατηγορίες πρωτεϊνών: σε κύτταρα θηλασικών, περίπου 60 παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs) καταλύουν την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων και μεσολαβούν στην ενεργοποίηση, περισσότερες από 70 πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη GTPase (GAPs) διεγείρουν την GTP υδρόλυση, οδηγώντας σε αδρανοποίηση και τέσσερις αναστολείς ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GDIs) εκχωλίζουν την αδρανή GTPase από μεμβράνες. Όλες οι GTPases Rho είναι προνυλιωμένες στο άκρο τους C και αυτό απαιτείται για τη λειτουργία. Όταν συνδέονται με το GDP, μπορούν να απομονωθούν στο κυτταρόπλασμα από τους αναστολείς αποδέσμευσης RHO-GDIs. Η ανταλλαγή του GDP με GTP προωθείται από τους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων της γουανίνης RHO-GEFs και συχνά συνδέεται με τη μετατόπιση των πρωτεϊνών RHO στις κυτταρικές μεμβράνες. Στην ενεργή κατάσταση αλληλεπιδρούν με μία από τις περισσότερες από 60 πρωτεΐνες- στόχους (effectors). Οι περισσότερες RHO πρωτεΐνες έχουν μια εγγενή ικανότητα να υδρολύουν το GTP σε GDP και ανόργανο φωσφορικό (P), το οποίο μπορεί να προωθηθεί από πρωτεΐνες ενεργοποίησης RHO-GAPs. Οι RND1, RND2, RND3/RHOE και RHOH δεν είναι σε θέση να υδρολύσουν το GTP και η ρύθμισή τους είναι πιθανό να γίνεται μέσω αλλαγών στο επίπεδο της πρωτεΐνης ή στον εντοπισμό, και όχι μέσω δέσμευσης GDP/GTP [34].

Η κατάσταση ενεργοποίησης των κινασών Rho εξαρτάται από την ισορροπία των ενεργητικών των ρυθμιστών τους (GEFs, GAPs και GDIs). Μετά την ενεργοποίησή τους, οι Rho GTPάσες προσδένονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες στόχους - τελεστές (effectors) ξεκινώντας έτσι σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών [5, 41], όπως η αναδιοργάνωση της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, η κυτταρική διαίρεση, η κυτταρική προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων αλλά και με την εξωκυττάρια ουσία, η μετακίνηση των κυττάρων, η απόπτωση, η μεταφορά κυστιδίων, η φαγοκυττάρωση, η κυτταρική πολικότητα, η προαγωγή του κυτταρικού κύκλου και η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων [5, 21-23, 40]. Πέρα όμως από τη συμμετοχή τους σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, οι Rho GTPάσες έχουν επίσης βρεθεί να εμπλέκονται και σε παθολογικές διεργασίες συμβάλλοντας στη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, τη μετάσταση και τη φλεγμονή [5, 21, 40]. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί πάνω από 70 διαφορετικές πρωτεΐνες - τελεστές. Η κάθε Rho κινάση έχει συγγένεια πρόσδεσης για πολλές πρωτεΐνες - τελεστές, ενώ μερικές πρωτεΐνες - τελεστές αναγνωρίζονται από πολλαπλές κινάσες Rho. Οι περισσότερο μελετημένες πρωτεΐνες - τελεστές είναι οι ROCK, WAVE και WASP. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης ROCK (Rho-Associated Coiled Coil Containing Protein Kinase) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RhoA με αποτέλεσμα τη δημιουργία ινιδίων ακτο-μυοσίνης [22] ενώ οι πρωτεΐνες- τελεστές WAVE και WASP αλληλεπιδρούν με την Rac και τη Cdc42 αντίστοιχα, ενεργοποιώντας καθοδικά το σύμπλοκο Arp2/3 το οποίο οδηγεί σε προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης μέσω πολυμερισμού της περιφερειακής ακτίνης, τα λεγόμενα λαμελλιπόδια [1, 2, 16] ή φιλοπόδια [1, 2, 16, 20] αντίστοιχα [21, 42, 43].

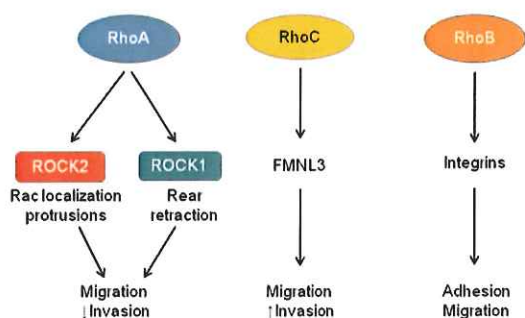


Εικόνα 51: Ρύθμιση των Rho GTPασών. Οι περισσότερες Rho GTPάσες ρυθμίζονται από τα GEFs, GAPs και GDIs. Οι RhoGDIs μπορούν επίσης να ρυθμίσουν τον εντοπισμό και την αποικοδόμηση των Rho GTPασών. Η έκφραση των Rho ρυθμίζεται τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μετα-μεταγραφικό (miRNA) επίπεδο. Οι Rho GTPάσες ρυθμίζονται επίσης με μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (τροποποίηση λιπιδίων, φωσφορύλιωση, ουβικιτινίωση και sumoylation), οι οποίες μεταβάλλουν τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους, τη σταθερότητά τους και/ή την ικανότητά τους να ενεργοποιούν τους τελεστές τους καθοδικά στο μονοπάτι σηματοδότησης [44].

Η υπο-ομάδα των RhoA, RhoB, RhoC [45]

Η υποοικογένεια της RhoA (RhoA-related proteins) περιλαμβάνει τις RhoA, RhoB και RhoC, οι οποίες εμφανίζουν μεταξύ τους 87% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία [46], με την RhoB να εμφανίζει τη μεγαλύτερη απόκλιση στη ρύθμιση και λειτουργία [47]. Σε αντίθεση με το γονίδιο της RhoB, τα RhoA και RhoC υπάρχουν σε όλα τα σπονδυλωτά [48, 49]. Εκφράζονται σε όλους τους ιστούς με επίπεδα έκφρασης τους ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του ιστού [45]. Παρόλη τη μεταξύ τους ομοιότητα έχουν διακριτούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διεργασίες πιθανόν λόγω διαφορών στο καρβοξυτερματικό τους άκρο οι οποίες και καθορίζουν τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους [50]. Οι RhoA και RhoC γεραφυλιώνονται και εντοπίζονται είτε στην πλασματική μεμβράνη, είτε στο κυτταρόπλασμα, ενώ η RhoB πρενυλιώνεται είτε με τη γεραφυλο-γεραφυλο- (GG), είτε με τη φαρνεσυλο- (F) ισοπρενυλο-ομάδα καθώς επίσης τροποποιείται με παλμιτυλίωση και βρίσκεται κυρίως στα ώριμα ενδοσώματα και λυσοσώματα [14, 45, 46, 50-56]. Η RhoA είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση του σχηματισμού των ινών στρες της ακτίνης και των συμπλοκών εστιακής προσκόλλησης στους ινοβλάστες [1] και έχει δειχθεί ότι

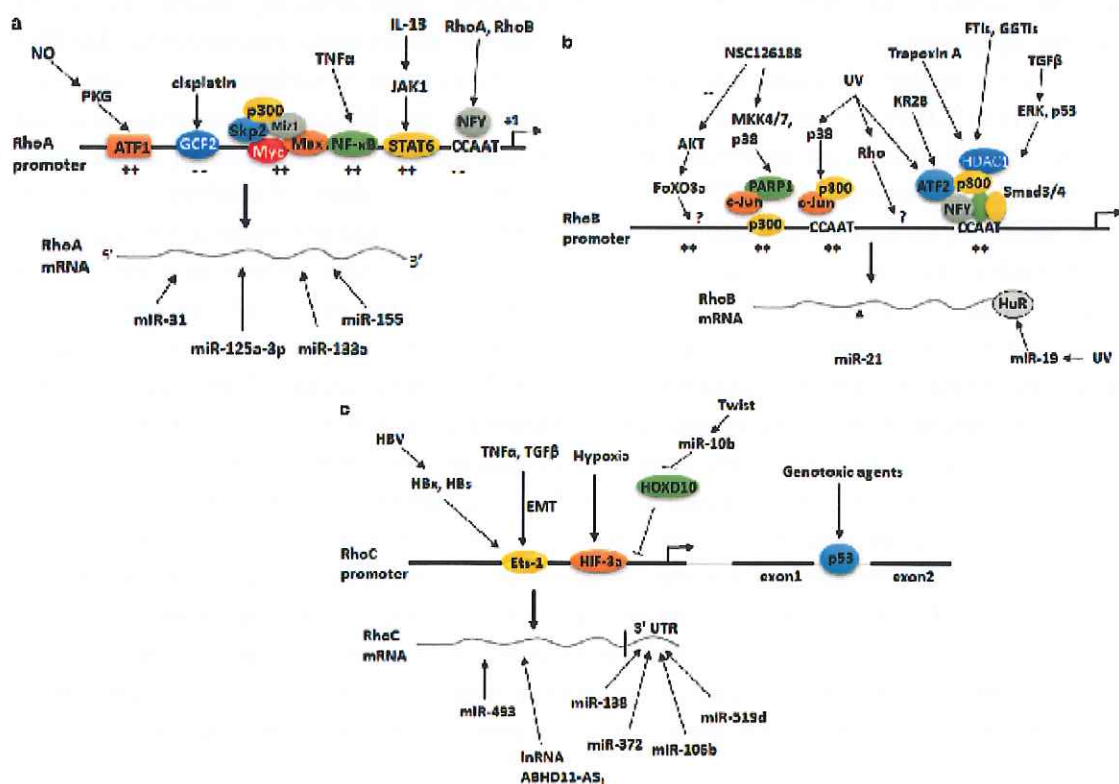
εμπλέκεται στις περισσότερες από τις θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες, όπως η μεταγραφή [57], ο κυτταρικός μετασχηματισμός [21, 58, 59], η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων [60, 61], η μεταφορά κυστιδίων [39], η χημειοταξία [62], η πολικότητα των κυττάρων [63, 64], η κυτταρική μετανάστευση [6] και η διακυτταρική προσκόλληση [64-66]. Οι RhoA και RhoC έχουν κατά κανόνα συσχετισθεί με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων μέσω ενεργοποίησης της ROCK κινάσης και των formin και mDia1, ενώ η RhoB, κυρίως λόγω της αλληλεπίδρασης της με την PRK1, φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενδοκυττάρωση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων [46]. Σε κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια η έκφραση του γονιδίου της RhoB αλλά όχι της RhoA ή της RhoC, επάγεται από ένα πλήθος παραγόντων όπως η UV ακτινοβολία, κυτταροκίνες ή αυξητικοί παράγοντες, μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου [67]. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και τα μετάγραφα της έχουν μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής από αυτό των RhoA και RhoC [51]. Οι διαφορές στη γονιδιακή ρύθμιση των τριών ισομορφών της υποοικογένειας της RhoA υποδεικνύουν ενδεχομένως τόσο διαφορετικές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών όσο και τον υψηλό βαθμό ελέγχου που απαιτείται για την έκφρασή τους [46, 51]. Η έκφραση και η ενεργότητα των πρωτεϊνών RhoA και RhoC συχνά αυξάνεται σε ανθρώπινους όγκους και η έκφρασή τους συσχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου. Αντίθετα, τα επίπεδα και οι λειτουργίες της RhoB σε ανθρώπινους καρκίνους εξαρτώνται από το περιβάλλον. Η μεταγραφή του γονιδίου RhoB ρυθμίζεται τόσο ιστοειδικά όσο και με βάση την ηλικία του οργανισμού [68]. Έχει προταθεί πως η δομή της χρωματίνης στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB σταδιακά αλλάζει κατά τη διάρκεια της γήρανσης, με τρόπο τέτοιο που εξαρτάται από το είδος του ιστού [68]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της RhoB αυξάνεται μετά τη μείωση των επιπέδων έκφρασης των RhoA ή RhoC [69-71] κάτι που μπορεί να πραγματοποιείται είτε λόγω διαφορετικής πρωτεϊνικής σταθερότητας είτε μέσω ρύθμισης από miRNA. Σε μία πρόσφατη μελέτη προτάθηκε ότι η δραστηριότητα των υποκινητών των γονιδίων RhoA και RhoB υπόκειται σε αυτορρύθμιση [72]. Ειδικότερα, η υπερέκφραση της RhoA αναστέλλει τη δραστηριότητα των υποκινητών των γονιδίων RhoB και RhoA και το κουτί CCAAT του υποκινητή του γονιδίου RhoB είναι ουσιώδες για αυτή την αυτορρύθμιση. Επίσης, δείχθηκε πως ο αναστολέας ran-Rho C3 αύξησε τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της RhoB με τρόπο που εξαρτάται από το χρόνο, αλλά κάτι αντίστοιχο δεν έγινε και με το γονίδιο RhoA. Αυτά τα δεδομένα θα μπορούσαν να εξηγήσουν, τουλάχιστον εν μέρει, τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου RhoB που παρατηρούνται σε μερικά κύτταρα που εκφράζουν υψηλά επίπεδα RhoA, όπως οι κυτταρικές σειρές CGR8 και P-19 [72]. Παρόμοιος τύπος αυτορρυθμίσεως των Rho έχει παρατηρηθεί και σε ινοβλάστες ποντικού [73] και στις καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MDA-MB-231 και προστάτη PC3 [70]. Όπως αναφέραμε και παραπάνω, οι Rho GTPάσες δεν είναι λειτουργικά πανομοιότυπες και παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών. Οι λειτουργικές διαφορές μπορεί να δημιουργούνται από ένα συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών που σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής τους, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους και την επιλεκτική και αυστηρά ρυθμιζόμενη αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες ενεργοποιητές και τελεστές [46, 74].



Εικόνα 52. Μοντέλο σηματοδότησης των RhoA, RhoB και RhoC προς τους τελεστές τους. Οι τελεστές συνεισφέρουν στη διαμόρφωση των μορφολογικών χαρακτηριστικών που οδηγούν στην απόκτηση μεταναστευτικών και διηθητικών

ιθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, i) Οι πρωτεΐνες Rho

φαινοτύπων στα καρκινικά κύτταρα PC3 του προστάτη [15].



Εικόνα 53. Περιληπτική παρουσίαση των μηχανισμών που ελέγχουν την έκφραση των μικρών γονιδίων GTPases RhoA (a), RhoB (b) και RhoC (c) σε μεταγραφικό και μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Τα σύμβολα + και - υποδεικνύουν θετικά και αρνητικά αποτελέσματα στην έκφραση γονιδίων, αντίστοιχα [75].

Rho και κυτταροσκελετός

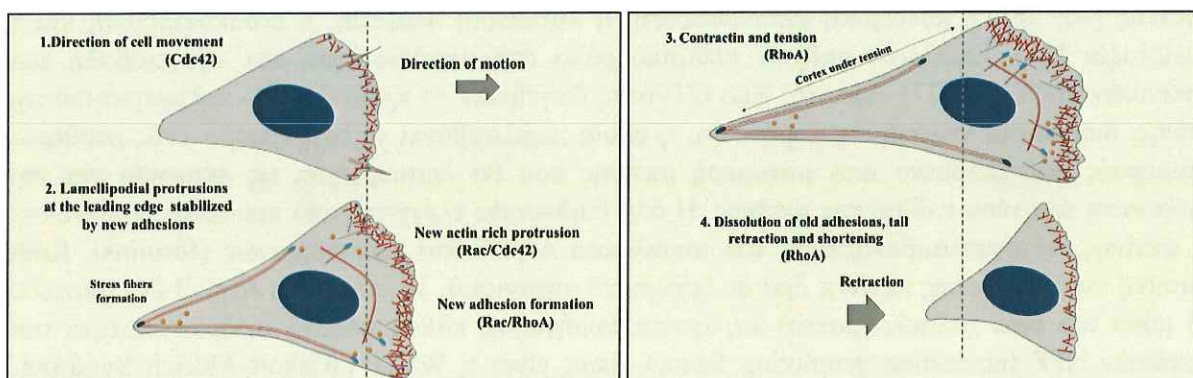
Η πιο λεπτομερώς μελετημένη δράση και εξαιρετικά συντηρημένη λειτουργία των κινασών Rho είναι η ρύθμιση και ο έλεγχος του κυτταροσκελετού της ακτίνης ως απόκριση στη διέγερση διαφόρων ερεθισμάτων [3-8]. Οι Rho GTPάσες διαμέσου της δράσης τους στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων κατέχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών και ιδιοτήτων όπως είναι η κίνηση, ο όγκος, το σχήμα και η πολικότητα των κυττάρων, η πρόσφυση στην εξωκυττάρια μάζα και η συσταλτικότητα του συμπλόκου της ακτομυοσίνης [46, 76], η κυτταρική μετανάστευση, η κυτταρική διαίρεση, η ενδοκυττάρωση και η χημειοταξία [21]. Επιπλέον, παίζουν κεντρικό ρόλο στη μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων [77]. Αρκετές Rho GTPάσες διεγείρουν το πρώτο στάδιο πολυμερισμού της ακτίνης, διαδικασία γνωστή ως πυρήνωση, η οποία περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός σταθερού πολυμερούς αποτελούμενο από μονομερή ακτίνης που θα λειτουργήσει ως εκμαγείο για την επιμήκυνση του νέου ινιδίου της ακτίνης. Η όλη διαδικασία ελέγχεται από πρωτεΐνες πυρήνωσης της ακτίνης, συμπεριλαμβανομένου του συμπλόκου Arp2/3 και των φορμινών (formins). Κάθε πρωτεΐνη πυρήνωσης της ακτίνης δρα σε ξεχωριστό μηχανισμό. Το σύμπλοκο Arp2/3 δεν αποτελεί από μόνο του έναν αποτελεσματικό παράγοντα πυρήνωσης καθώς απαιτεί τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών NPF (nucleation promoting factor), όπως είναι η WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein), η N-WASP (neuronal WASP) και η WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein) ή αλλιώς SCAR (suppressor of cyclic AMP repressor) [78, 79]. Οι πρωτεΐνες NPF έχουν κοινή την περιοχή WCA η οποία είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση της G-ακτίνης στο σύμπλοκο και για

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, i) Οι πρωτεΐνες Rho

την αλλαγή της διαμόρφωσης του συμπλέγματος Arp2/3, κάτι που οδηγεί στην έναρξη του πολυμερισμού της ακτίνης. Εκτός από τη διέγερση της πυρήνωσης της ακτίνης με μεσολάβηση του συμπλέγματος Arp2/3, οι Rho GTPάσες δεσμεύονται και ενεργοποιούν τις φορμίνες (formins), οι οποίες είναι μεγάλες πρωτεΐνες που διαθέτουν πολλούς διαφορετικούς τομείς. Οι φορμίνες λειτουργούν αμφότερα ως παράγοντες πυρήνωσης και ως παράγοντες επιμήκυνσης. Συνδέονται διαδοχικά με τα αγκαθωτά άκρα των ινιδίων, επιτρέποντας την προσθήκη της G-ακτίνης ενώ παράλληλα αναστέλλουν τη δράση των πρωτεϊνών κάλυψης, συμβάλλοντας έτσι στην επιμήκυνση του ινιδίου [80, 81]. Μια άλλη οικογένεια πρωτεϊνών που ελέγχει την επιμήκυνση των ινιδίων της ακτίνης είναι οι πρωτεΐνες Ena/VASP (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein proteins). Δρουν δεσμεύοντας τα αγκαθωτά άκρα των νηματίων της ακτίνης και αναστέλλουν την κάλυψή τους από τις πρωτεΐνες κάλυψης των άκρων. Τα ινίδια της ακτίνης είναι γνωστό πως επιμηκώνονται μέχρι να καλυφθούν τα άκρα τους. Η κάλυψη αυτή είναι σημαντική για τον έλεγχο του μήκους των αναπτυσσόμενων κλάδων και για τον εντοπισμό των ινιδίων, όπου παράγουν pro-pulsive δυνάμεις. Οι δύο κύριες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία είναι η CapZ και η γελσολίνη [82]. Ενώ δεν υπάρχουν γνωστές άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Rho GTPασών και των πρωτεϊνών κάλυψης, οι Rho GTPάσες εντούτοις ρυθμίζουν τον αποπολυμερισμό της ακτίνης, ο οποίος είναι σημαντικός για τη δυναμική των ινιδίων της ακτίνης. Η οικογένεια του παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης ADF(actin-depolymerizing factor)/cofilin εμπλέκεται σε αυτό το στάδιο. Τόσο ο ADF όσο και η κοφιλίνη δεσμεύονται με υπομονάδες της F-ακτίνης που είναι δεσμευμένες με ADP, προωθώντας την αποσυναρμολόγησή τους. Η Rho σηματοδότηση όχι μόνο αυξάνει τον πολυμερισμό της ακτίνης αλλά ταυτόχρονα μειώνει και τον αποπολυμερισμό της. Η έκταση του αποπολυμερισμού των ινιδίων της ακτίνης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν τη σχετική συγκέντρωση άλλων πρωτεϊνών που δεσμεύονται στην ακτίνη [83, 84].

Rho GTPάσες, κυτταρική μετακίνηση και μετανάστευση των κυττάρων

Οι Rho GTPάσες εμπλέκονται στην κυτταρική μετανάστευση μέσω της ικανότητάς τους να οργανώνουν και να ρυθμίζουν δομές που αποτελούνται από ακτίνη. Τα καρκινικά κύτταρα προκειμένου να μεταναστεύσουν σε μακρινούς ιστούς πρέπει να εισέλθουν στο αγγειακό σύστημα και κατόπιν να εξέλθουν και να αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται μέσα στο νέο ιστό. Η ικανότητα της οικογένειας των Rho GTPασών να ρυθμίζουν το κυτταροσκελετό της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, τη προσκόλληση αλλά και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω της διακοπής των κυτταρικών συνδέσμων, της αύξησης της κινητικότητας των κυττάρων και της επαγωγής της αποικοδόμησης της εξοκυττάριας μάζας υποδεικνύει ότι ενδεχόμενη τροποποίηση της δράσης των Rho πρωτεϊνών παίζει κεντρικό ρόλο στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων [40].



Εικόνα 54. Rho GTPάσες και ο κύκλος κυτταρικής κινητικότητας [85]. Ένα μεταναστευτικό κύτταρο εισέρχεται στον κύκλο της κυτταρικής κινητικότητας σε απόκριση ενός χημειοελκυστικού ερεθίσματος. Η Cdc42 καθορίζει την κατεύθυνση της κίνησης. Η Rac διεγείρει το σχηματισμό λαμελλιποδίων, πλούσιων σε

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, i) Οι πρωτεΐνες Rho

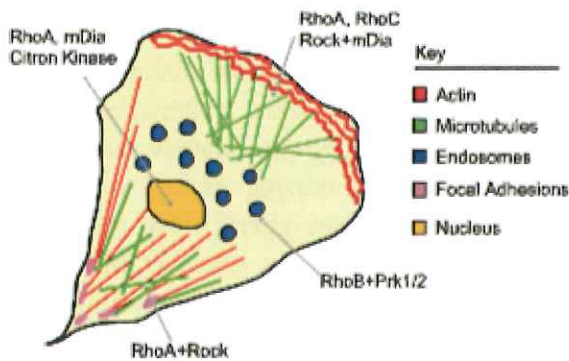
ακτίνη μεμβρανικών προεξοχών στην πρόσθια μεριά του κυττάρου. Η νέα προεξοχή σταθεροποιείται με το σχηματισμό νέων συγκολλήσεων στο υποκείμενο υπόστρωμα, μια διαδικασία που ελέγχεται κυρίως από τις Rac και RhoA. Οι Rho δρουν επίσης στο οπίσθιο άκρο του κυττάρου σχηματίζοντας ίνες του στρες και προκαλώντας τη συσταλτικότητα της ακτομυοσίνης, παρέχοντας δύναμη στο κύτταρο για να αποσύρει το οπίσθιο κομμάτι του προς τη μεριά της κατεύθυνσης και να προχωρήσει.

Οι RhoA, RhoB και RhoC αν και παρουσιάζουν μεγάλη αμινοξική ομοιότητα και ομολογία έχουν διαφορετικές λειτουργίες κατά τη μετανάστευση και την εισβολή των κυττάρων. Από τις τρεις, η RhoC προωθεί περισσότερο την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στους παρακείμενους ιστούς σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου. Το επίπεδο της έκφρασής της συσχετίζεται θετικά με την εξέλιξη του καρκίνου στον άνθρωπο και τη μετάσταση και επίσης έχει δείχθει ότι είναι υπεύθυνη για τη μετάσταση των κυττάρων *in vivo* σε μοντέλα ποντικών. Αν και η RhoB έχει κυρίως χαρακτηριστεί ως μία ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη [86], υπάρχουν και διάφορα άλλα δεδομένα που αντιτίθεται σε αυτό το εύρημα [15]. Έχει αποδειχθεί ότι η λειτουργία της στη μετανάστευση, έχει να κάνει με τη ρύθμιση των επιπέδων της β1- ιντεγκρίνης. Η σχετική συνεισφορά της στην πρόοδο του καρκίνου εξαρτάται από την ισορροπία των ρόλων της στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση έναντι της εισβολής και της μετάστασης. Όπως με τη RhoB, η RhoA φαίνεται να προωθεί την εισβολή των κυττάρων σε ορισμένους τύπους καρκίνου και να την εμποδίζει σε άλλους. Αυτό πιθανόν να αντικατοπτρίζει τη σχετική απαίτηση των διαφορετικών τύπων καρκίνων για επιμήκεις ή περισσότερο στρογγυλεμένους τύπους μεθόδων εισβολής (elongated versus rounded invasive methods) [87]. Ορισμένοι τύποι καρκίνου μπορεί να χρησιμοποιούν κατά κύριο λόγο την επιμηκυμένη μορφολογία και να επεκτείνουν λεπτές προεξοχές μεταξύ των ECM πρωτεϊνών και των ενδοθηλιακών κυττάρων για την ενδοαγγείωση και εξαγγείωση, ενώ άλλοι μπορεί να χρησιμοποιούν actomyosin-driven blebs ώστε να συμπιεστούν στην ECM και τη συσταλτικότητα της ακτομυοσίνης για να επιβιώσουν καλύτερα στο αγγειακό σύστημα [87]. Η μετανάστευση κυττάρων είναι μια πολυσταδιακή διαδικασία κατά την οποία τα κύτταρα πρέπει να επεκτείνουν κυτταρικές προεξοχές προς το μέτωπο κατεύθυνσης του κυττάρου (lamellipodia, filopodia and/or membrane blebs), να αλληλεπιδράσουν οι προεξοχές αυτές με τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας ή με τα γειτονικά κύτταρα, το σώμα του κυττάρου στη συνέχεια να συσταλθεί και να αποσυνδεθεί από την προηγούμενη θέση του με σκοπό να μετακινηθεί στο καινούριο μικροπεριβάλλον.

Έχει υποστηριχθεί η άποψη πως το κύτταρο διακρίνεται σε δύο ζώνες - περιοχές ανάλογα με την κατανομή των Rho πρωτεϊνών: Την μπροστινή (frond) ζώνη ή ζώνη Rac και την πίσω (rear) ζώνη ή ζώνη Rho. Ο πολυμερισμός της ακτίνης και η επιμήκυνση των ινιδίων στο μπροστινό μέρος καθώς και η συστολή των ινιδίων της ακτινομυοσίνης στο πίσω άκρο του κυττάρου συνιστούν τις βασικότερες δυνάμεις που εμπλέκονται στη μετανάστευση των κυττάρων. Η μετανάστευση ωστόσο, απαιτεί επιπρόσθετες κυτταρικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένων της πόλωσης του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων καθώς και τη δράση του εκκριτικού μονοπατιού [76].

Στην κυρίαρχη άκρη των μεμονωμένων κυττάρων ή των κυτταρικών ομάδων, προκειμένου να μετακινηθούν, τα κύτταρα συχνά εκτείνουν μεμβρανικές προεξοχές πλούσιες σε πολυμερισμένη ακτίνη, τα γνωστά λαμελλιπόδια και φιλοπόδια [88]. Εναλλακτικά, *in vivo*, τόσο τα μεμονωμένα κύτταρα όσο και τα κύτταρα στην άκρη των ιστών μπορούν να μεταναστεύσουν χρησιμοποιώντας bleb-based forward protrusion, κατά την οποία η μεμβράνη του πλάσματος παροδικά αποσπάται από το δίκτυο της φλοιώδους ακτίνης και η προεξοχή στη συνέχεια σταθεροποιείται με πολυμερισμό της ακτίνης [89]. Το Blebbing συσχετίζεται συνήθως με μεγάλη συσταλτικότητα της ακτομυοσίνης στα κύτταρα το οποίο και πάλι πρέπει να ρυθμίζεται δυναμικά ώστε να επιτρέπει αλλαγές στην κατεύθυνση των κυττάρων. Για να μεταναστεύσουν μέσω των ιστών *in vivo*, τα κύτταρα πρέπει να αποικοδομούν την ECM, κάτι που περιλαμβάνει εξειδικευμένες δομές πλούσιες σε ακτίνη, γνωστές ως ινβαδοπόδια (invadopodia) ή ποδοσώματα (podosomes) [90]. Σε 3D κυτταρικά περιβάλλοντα, η RhoA έχει εμπλακεί τόσο σε μετανάστευση που κατευθύνεται από τις

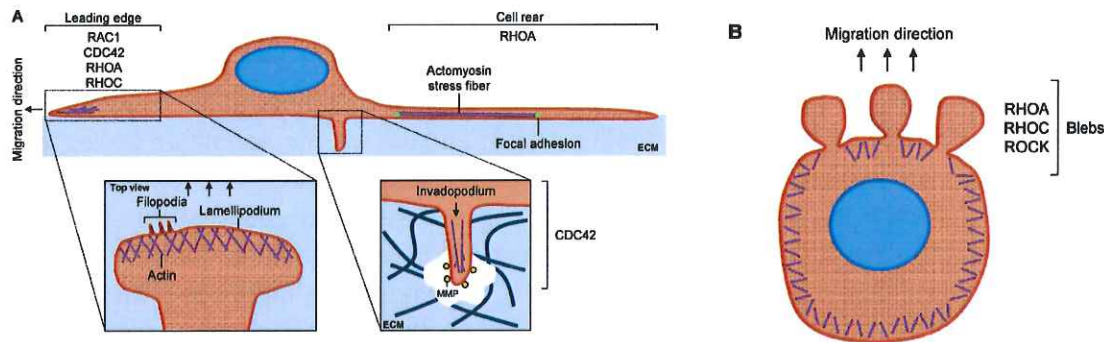
μεμβρανικές προεξοχές (lamellipodium-driven) όσο και σε bleb-driven μετανάστευση. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούν μετανάστευση που κατευθύνεται από τα λαμελλιπόδια έχουν επιμήκη μορφολογία που εξαρτάται από τη δυναμική προσκόλλησης των κυττάρων και τις δυνάμεις έλξης μεταξύ των δύο πόλων του κυττάρου. Οι προεξοχές αυτές είναι εμφανείς στο πρόσθιο τμήμα του κυττάρου. Ο σχηματισμός των συμφύσεων βασίζεται στην ιντεγκρίνη και η συσταλτικότητα που μεσολαβείται από την ακτομυοσίνη ελέγχεται μέσω Rho/ROCK σηματοδότηση [91, 92]. Τα λαμελλιπόδια είναι μεταβατικές δομές και ο σχηματισμός τους οδηγείται από τον πολυμερισμό της ακτίνης. Το σύμπλεγμα Arp2/3 συνδέεται με τα ινίδια της ακτίνης στο πρόσθιο μέρος των κυττάρων και μαζί με τις πρωτεΐνες WAVE διεγείρει το σχηματισμό ενός “δενδριτικού” δικτύου ακτίνης που είναι σημαντικό για την επέκταση της προεξοχής [93]. Η ενεργοποίηση της Rac είναι απαραίτητη για το σχηματισμό τους και δημιουργείται ένας θετικός κύκλος ανατροφοδότησης που οδηγεί στη συσσώρευση ενεργής Rac στο πρόσθιο τμήμα του κυττάρου [6, 88, 93]. Στην επέκταση των λαμελλιποδίων εμπλέκονται επίσης και οι φορμίνες [79].



Εικόνα 55. Μοντέλο κατανομής των RhoA, RhoB και RhoC και των τελεστών τους στο μεταναστευτικό κύτταρο. Οι πρωτεΐνες mDia και ROCK έχει δείχθει ότι σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους και συνεπώς βρίσκονται στο μπροστινό-οδηγό άκρο (leading edge) του κυττάρου υπό τον έλεγχο της RhoA. Η ROCK κινάση μέσω της RhoA είναι απαραίτητη για τη δημιουργία συσταλτικότητας, για το μάζεμα της ουράς (tail retraction) και την αποσυναρμολόγηση των προσκολλήσεων στο πίσω μέρος του κυττάρου. Η RhoB συνεντοπίζεται με την PRK1 στα ενδοσώματα και ρυθμίζει την κυκλοφορία των υποδοχέων των αυξητικών παραγόντων. Η RhoC παρουσιάζει μια πιο διάχυτη κατανομή στο κύτταρο.

Οι πρωτεΐνες RhoA, RhoB και RhoC αποικοδομούνται επιλεκτικά στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου [46, 94, 95] και ενεργοποιούνται στο πίσω μέρος του κυττάρου ενώ το αντίθετο συμβαίνει με την πρωτεΐνη Rac. Η RhoA είναι λειτουργικά ενεργή περισσότερο στο πρόσθιο από ότι στο οπίσθιο μέρος του κυττάρου. Κατά τη διάρκεια της μεμβρανικής προεξοχής, η RhoA είναι ενεργή στην πρόσθια άκρη, αλλά απενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της απόσυρσης της μεμβράνης [96]. Ορισμένα κύτταρα χρησιμοποιούν δυνάμεις έλξης για να τραβήξουν την εξωκυτταρική μήτρα, γεγονός που συμβάλλει στη μετακίνησή τους. Η ενεργή RhoA σχετίζεται με το σχηματισμό εστιών προσκόλλησης (focal adhesion), θέσεις δηλαδή επαφής του κυττάρου με την εξωκυτταρική μήτρα, και με τη συσταλτικότητα των κυττάρων κατά τη μετακίνηση. Η πολικότητα των κυττάρων είναι σημαντική για την κατευθυνόμενη μετανάστευση. Ο σχηματισμός των μεμβρανικών προεξοχών και η συστολή του οπίσθιου μέρους του κυττάρου μόνο δεν επαρκούν για να κατευθύνουν τα κύτταρα προς ένα συγκεκριμένο σημείο [44]. Όπως είπαμε, η RhoA ρυθμίζει το σχηματισμό συσταλτών ινιδίων ακτινομυοσίνης (stress fibers) και εστιών προσκόλλησης ενώ η Rac1 ρυθμίζει την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης σχηματίζοντας προεκβολές πλούσιων σε ακτίνη, τα λεγόμενα λαμελλιπόδια. Η ενεργοποίηση της Cdc42 τέλος, οδηγεί στο σχηματισμό φιλοποδίων [5, 97]. Οι αλλαγές αυτές πραγματοποιούνται έπειτα από τη συντονισμένη ενεργοποίηση πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά των Rho GTPασών. Συγκεκριμένα, η RhoA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη- τελεστή της ROCK, η οποία ενεργοποιεί την κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (myosin light chain phosphatase kinase) με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μυοσίνη, να προάγεται η ολίσθηση της μυοσίνης II στα ινίδια της ακτίνης, να αυξάνεται η συσταλτικότητα (contractile force) στο πίσω μέρος του μεταναστεύοντος κυττάρου και ο σχηματισμός ιών τάσης

(stress fibers) [98-100]. Η ROCK επίσης, αναστέλει τις πλευρικές αναδιπλώσεις της μεμβράνης μέσω περιορισμού της δημιουργίας νέων συμπλόκων προσκόλλησης από ιντεγκρίνες [6, 21, 101]. Πέρα από τα παραπάνω, η πρωτεΐνη RhoA διεγείρει τον πολυμερισμό της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης των πρωτεϊνών-τελεστών της mDia. Αυτές καταλύουν την προσθήκη μονομερούς F- ακτίνης στα άκρα των ινιδίων, στα φιλοπόδια και τα λαμελλιπόδια [46, 99, 100]. Η πρωτεΐνη Rac από την άλλη, συσσωρεύεται στο μπροστινό μέρος των μεταναστευόντων κυττάρων και διατηρείται ενεργή μέσω ενός θετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης που περιλαμβάνει την κινάση PI3K [6, 102, 103], συμβάλλοντας στον πολυμερισμό της ακτίνης και τη δημιουργία προεκβολών στην πλασματική μεμβράνη προς αυτή την κατεύθυνση. Η Rac1 ρυθμίζει την οργάνωση της ακτίνης δρώντας μέσω των WAVE και Arp2/3 [104]. Στο οπίσθιο άκρο ενός κυττάρου σε μετανάστευση δημιουργούνται δυνάμεις συστολής μέσω της φωσφορυλίωσης της MLC από τη ROCK ωθώντας με αυτό τον τρόπο το κύτταρο προς τα εμπρός [98]. Οι Rho συμμετέχουν παράλληλα και στη ρύθμιση των μικροσωληνίσκων οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της πολικότητας του κυττάρου και την ενδοκυτταρική μεταφορά κυστιδίων μέσω των πρωτεϊνών-τελεστών ROCK και mDia [46, 105, 106]. Η σταθερότητα τώρα των μικροσωληνίσκων μεσολαβείται από την Rac1 και τη Cdc42 μέσω σηματοδότησης της PAK προς σταθμίνη [107]. Η Cdc42 επίσης, πέρα από το ρυθμιστικό της ρόλο στο σχηματισμό φιλοποδίων [97], έχει την ικανότητα να οδηγεί σε επαναπροσαρμογή της συσκευής Golgi και του κέντρου οργάνωσης των μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα να αλλάζει την πολικότητα του προς μετανάστευση κυττάρου [108]. Η κίνηση των κυττάρων εκτός από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού προϋποθέτει και την αναδημιουργία προσφύσεων τόσο μεταξύ των κυττάρων μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια ουσία. Δομές προσκόλλησης όπως είναι οι σύνδεσμοι προσκόλλησης (Adherens Junctions, AJ), οι στενοσύνδεσμοι (Tight Junctions, TJ) και τα δεσμοσώματα (Desmosomes), συνδέονται με τον κυτταροσκελετό καθορίζοντας την αρχιτεκτονική του κυττάρου και έχει δειχθεί πως ο σχηματισμός, η ωρίμανση αλλά και η συντήρησή τους εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις κινάσες Rho [22, 46, 109]. Οι Rho GTPάσες είναι υπεύθυνες για την αύξηση στο μέγεθος και τον αριθμό των εστιακών προσφύσεων που βασίζονται σε ιντεγκρίνες [110, 111] και τον αριθμό των εστιακών προσφύσεων που βασίζονται σε ιντεγκρίνες [46, 76, 110, 111]. Η καθιέρωση της αρχικής ζώνης των AJs απαιτεί την τοπική ενεργοποίηση της Rac [112], η οποία προάγει τη δημιουργία νέων επαφών μεταξύ γειτονικών κυττάρων που μεσολαβούνται από την E-καδερίνη μέσω της δημιουργίας προεκβολών που στηρίζονται στην ακτίνη, οι οποίες μεταφέρουν την E-καδερίνη. Η ενεργός Rac-GTP είναι υπεύθυνη επίσης και για τη διεύρυνση της ζώνης της διακυτταρικής επαφής [113]. Η συνεργασία μεταξύ των Rho GTPασών και των συστατικών των AJs διατηρείται και κατά την ωρίμανση των AJs, καθώς δημιουργούνται οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions) και καθιερώνεται η κορυφαία-βασική (apical-basal) πολικότητα με τη βοήθεια των Rac και Cdc42 [74, 114]. Η σηματοδότηση των κινασών Rho συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στη σταθεροποίηση αλλά και την αποσυναρμολόγηση των διακυτταρικών συνδέσεων AJs, διεργασίες κεντρικές στο φαινόμενο της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT) [115, 116]. Έτσι, η αμοιβαία ισορροπία μεταξύ των δραστηριοτήτων των Rac και Rho καθορίζει τον επιθηλιακό ή μεσεγχυματικό φαινότυπο των επιθηλιακών κυττάρων [117]. Φυσικά, όλα τα παραπάνω αποτελούν ένα υπεραπλουστευμένο σενάριο καθώς πιο πρόσφατες μελέτες μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων σε μήτρες τριών διαστάσεων αποκάλυψαν μεγάλες διαφορές από αυτές σε πλάτα καλλιέργειας δύο διαστάσεων [21, 118].



Εικόνα 58. Μετακίνηση του κυττάρου με βάση τη δράση των Rho GTPασών. (Α) Μεμονωμένα κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν με τρόπο που εξαρτάται από τα λαμελλιπόδια. Πιο συγκεκριμένα, ο πολυμερισμός της ακτίνης (δείχνεται με μοβ χρώμα) οδηγεί στο σχηματισμό μεμβρανικών προεξοχών, των λαμελλιποδίων και των φιλοποδίων στο πρόσθιο μέρος του κυττάρου και στη δημιουργία συσταλτικότητας της ακτομυοσίνης στο οπίσθιο μέρος. Τα κύτταρα που μεταναστεύουν μπορούν επίσης να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας μήτρας, ECM, μέσω της δράσης των εκκρινόμενων μεταλλοπρωτεασών μήτρας (MMPs) που υπάρχουν στα ινβαδοπόδια. Υποδεικνύονται οι εκάστοτε Rho GTPάσες που εμπλέκονται σε καθεμία από αυτές τις περιοχές του κυττάρου. (Β) Εναλλακτικά, τα κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν με bleb-driven τρόπο που χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα δραστηριότητας των Rho/ROCK και συσταλτικότητα της ακτινομυοσίνης [119].

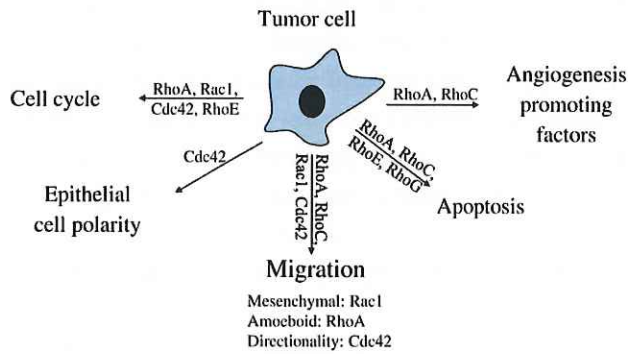
Rho GTPάσες πολλαπλασιασμός των κυττάρων και αγγειογένεση

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι Rho πρωτεΐνες των οποίων η ρύθμιση του κυτταροσκελετού αποτελεί τη βασική λειτουργία τους συνδέονται επίσης και με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι τα μη μετασχηματισμένα κύτταρα σε καλλιέργεια χρειάζονται τόσο χημικά ερεθίσματα όπως αυξητικούς παράγοντες όσο και φυσικά ερεθίσματα όπως προσκόλληση προκειμένου να πολλαπλασιαστούν. Σε *in vivo* συνθήκες, οι προϋποθέσεις αυτές διασφαλίζουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων μόνο παρουσία κατάλληλου φυσικού περιβάλλοντος και των απαιτούμενων αυξητικών παραγόντων [34]. Παρόλο που μόνο τα φυσικά ερεθίσματα δεν είναι επαρκή, υπάρχουν φυσικά σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (checkpoints) τα οποία εξασφαλίζουν το σωστό πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Ένα αντίστοιχο G2/M σημείο ελέγχου εξαρτώμενο από την ακτίνη και τις MAPK κινάσες ανακαλύφθηκε πρόσφατα στο σακχαρομύκητα [120]. Η ενεργότητα των Rho GTPασών ρυθμίζεται από ποικίλα φυσικά ερεθίσματα όπως το σύμπλεγμα των ιντεγκρινών και ο σχηματισμός των συνδέσμων των κυττάρων. Για το λόγο αυτό οι Rho πρωτεΐνες αποτελούν ιδανικούς αναμεταδότες των σημάτων του φυσικού περιβάλλοντος στον κυτταρικό κύκλο. Ασυνήθιστη δράση των Rho πρωτεϊνών μπορεί να μιμηθεί τα φυσικά ερεθίσματα τα οποία προαπαιτούνται για να αρχίσει ένα φυσιολογικό κύτταρο να πολλαπλασιάζεται με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [120]. Μια επιπρόσθετη ιδιότητα των Rho GTPασών είναι η δυνατότητα ρύθμισης της απελευθέρωσης παραγόντων οι οποίοι επάγουν την αγγείωση των όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν παράγοντες οι οποίοι προκαλούν την αγγειογένεση μέσω προ-υπαρχόντων αιμοφόρων αγγείων καθώς η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για την αύξηση των όγκων πέραν ενός ορισμένου μεγέθους [40].

Rho GTPάσες και Καρκίνος

Εικόνα 57. Ογκογονική λειτουργία των RhoGTPασών *in vitro*. Οι Rho GTPάσες έχει βρεθεί ότι ρυθμίζουν διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες σημαντικές για την ανάπτυξη του όγκου και εξέλιξή του *in vitro*. Στο σχήμα, αναφέρονται σημαντικές RhoGTPάσες που εμπλέκονται στις συγκεκριμένες λειτουργίες [121].

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B,
 - i) Οι πρωτεΐνες Rho



Εξαιτίας του μεγάλου εύρους διεργασιών που ρυθμίζονται από τις κινάσες Rho, η διαταραχή της ρύθμισης των ενεργοτήτων τους έχει σοβαρές επιπτώσεις σε πολλές κυτταρικές διεργασίες και για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια ο ρόλος των πρωτεϊνών Rho στον καρκίνο και τη μετάσταση έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών ερευνών [72, 122]. Οι πρωτεΐνες Rho

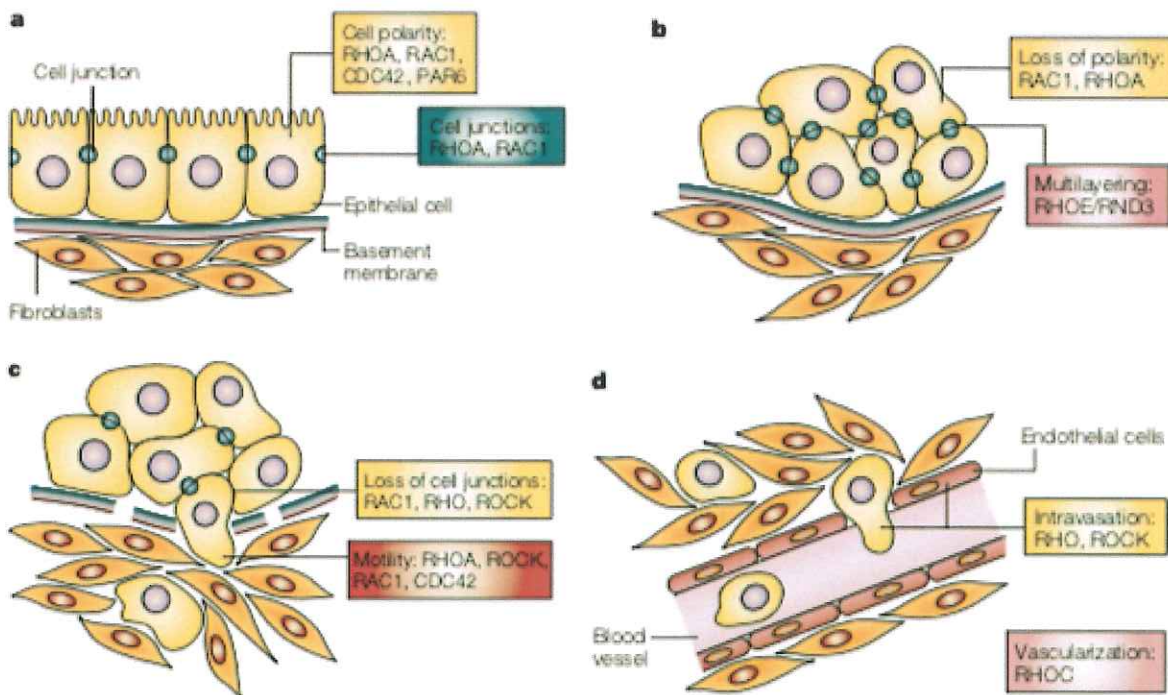
είναι ικανές να συντονίζουν διαφορετικές και μερικές φορές αντίθετες κυτταρικές λειτουργίες μεταξύ τους (για παράδειγμα πολλαπλασιασμό έναντι απόπτωσης, κινητικότητα έναντι προσκόλλησης), γεγονός που εμποδίζει την κατανόηση του ρόλου τους στην καρκινογένεση. Έτσι, διαφορετικοί ανθρώπινοι όγκοι εμφανίζουν διαφορετικούς τύπους ρύθμισης των Rho πρωτεϊνών. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η πιο συχνά παρατηρούμενη ανωμαλία σε σχέση με τις Rho GTPάσες σε ανθρώπινους όγκους δεν φαίνεται να είναι κάποια γενετική μετάλλαξη αλλά η υπερέκφραση των γονιδίων τους, οδηγώντας σε ποσοτική και ποιοτική αύξηση της σηματοδότησης μέσω των Rho GTPασών [34, 67]. Μια υπόθεση που μπορεί να εξηγήσει την παρατήρηση αυτή είναι ότι η υπερέκφραση των Rho GTPασών ρυθμίζεται από το περιβάλλον του καρκινικού όγκου και ως εκ τούτου είναι αναστρέψιμη. Επομένως, τα γονίδια των Rho GTPασών δεν μπορούν να θεωρηθούν ως ογκογονίδια με τον τρόπο που ο ορισμός αυτός έχει “κλασικά” γίνει αποδεκτός. Αυτή η ιδέα υποδηλώνει ότι η υπερέκφραση των Rho θα μπορούσε να ρυθμιστεί τόσο από πρωτο-ογκογονικού τύπου μεταλλάξεις όσο και από εξωκυτταρικούς παράγοντες, κάτι που καθιστά τη ρύθμιση [122] αναστρέψιμη και ευπροσάρμοστη στα εκάστοτε δεδομένα. Με αυτή την έννοια, το διαφορετικό περιβάλλον του κάθε όγκου (δηλ. έκθεση σε συγκεκριμένα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας, αυξητικούς παράγοντες, περιεκτικότητα οξυγόνου κλπ.) θα μπορούσε να προάγει αντίθετα αποτελέσματα ανάλογα με την τρισδιάστατη θέση του καρκινικού κυττάρου εντός του όγκου. Για παράδειγμα, κατά την αποσύνδεση από τον πρωτογενή όγκο τα καρκινικά κύτταρα εκτίθενται σε εξωκυτταρικούς παράγοντες που θα μπορούσαν να προκαλέσουν τέτοια έκφραση των Rho πρωτεϊνών ώστε να ευνοήσουν την κινητικότητα, ενώ αντίθετα άλλοι παράγοντες σε μια μακρινή θέση θα ευνοούσαν έναν επιθηλιακό φαινότυπο με μειωμένη κινητικότητα, υψηλότερη προσκόλληση και μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική ικανότητα [123]. Επιπλέον, ορισμένοι τύποι όγκων εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των Rho πρωτεϊνών που μπορεί να μην συσχετίζεται πάντα θετικά με ταυτόχρονα υψηλότερα επίπεδα του αντίστοιχου mRNA του γονιδίου [34, 123].

Οι Rho GTPάσες εμπλέκονται στα περισσότερα στάδια της καρκινογένεσης, από την έναρξη έως και την τελική εξέλιξη της νόσου [40]. Στα στάδια αυτά, συμβάλουν ώστε τα καρκινικά κύτταρα να αποκτήσουν απεριόριστο δυναμικό πολλαπλασιασμού, μέγιστη ικανότητα επιβίωσης και αποφυγή της απόπτωσης, ικανότητα εισβολής στους παρακείμενους ιστούς και καθιέρωση μεταστάσεων [40, 123]. Οι πρωτογενείς όγκοι γενικά προκύπτουν ως συνέπεια πολλαπλών μεταλλάξεων και επιγενετικών αλλαγών που επηρεάζουν βασικά γονίδια του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Μεταλλάξεις υπερ-ενεργοποίησης των τριών ισομορφών του γονιδίου Ras, Ki-Ras, N-Ras και Ha-Ras, βρίσκονται στο 15% όλων των ανθρώπινων όγκων. Μεταλλάξεις στα γονίδια των πρωτεϊνών Rho σπάνια έχουν εντοπιστεί, αντιθέτως μεταβάλλεται η έκφραση και/ή η δραστηριότητά τους. Για παράδειγμα, αρκετές Rho GTPάσες, όπως οι RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42, Wrch2/RhoV και RhoF, υπο-εκφράζονται σε μερικούς ανθρώπινους όγκους

[124-126]. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, σε συνδυασμό με τα αυξημένα σήματα επιβίωσης που επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να διαφύγουν την απόπτωση, οδηγούν στην ανάπτυξη του όγκου. Ορισμένες Rho GTPάσες διεγείρουν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων, κάτι που θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει τις προ-ογκογονικές ιδιότητές τους, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της προαγωγής του μετασχηματισμού που προκαλείται από Ras [123]. Η επαγωγή της αγγειογένεσης στον όγκο είναι απαραίτητη ώστε να αναπτυχθούν οι όγκοι πέρα από ένα ορισμένο μέγεθος. Πιστεύεται πως οι Rho GTPάσες είναι σε θέση να ρυθμίσουν την απελευθέρωση παραγόντων που επάγουν την αγγειογένεση από τα κακοήγη κύτταρα [127].

Ένας μεγάλος αριθμός *in vivo* και *in vitro* μελετών στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν καρκινικές κυτταρικές σειρές, πρωτογενείς όγκοι και ζωικά μοντέλα, υποδεικνύουν ότι η απορρύθμιση της σηματοδότησης των κινασών Rho παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην έναρξη όσο και στην εξέλιξη του καρκίνου στον άνθρωπο. Η πρωτεΐνη RhoA έχει εμπλακεί σε σχεδόν όλα τα στάδια της εξέλιξης του καρκίνου [21] και αυξημένη της έκφραση συσχετίζεται με πιο επιθετικούς φαινοτύπους, κακή πρόγνωση και υποτροπή [128, 129]. Η RhoA προκαλεί μετασχηματισμό ινοβλαστών σε καλλιέργεια, ενώ μπορεί να προάγει περαιτέρω το σχηματισμό όγκων σε ποντίκια από τα κύτταρα αυτά. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης και ενεργοποίησης της πρωτεΐνης RhoA έχουν βρεθεί σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές [121], πολλές από τις οποίες εμφανίζουν υψηλό βαθμό μεταστατικότητας ή απορρύθμιση του ελέγχου του πολλαπλασιασμού [130]. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης έχουν βρεθεί σε καρκίνο στο συκώτι [128, 129], το δέρμα [131], στο παχύ έντερο [132], στον καρκίνο της μήτρας [133], του στομάχου [134], του οισοφάγου [135], του μαστού [132] στην ουροδόχο κύστη [136] και στον καρκίνο των όρχεων [137]. Επιπλέον, αξίζει να σημειώσουμε πως παρόλο που δεν έχουν ανιχνευθεί αλλαγές στα επίπεδα mRNA των Rho GTPασών στον όγκο του παχέος εντέρου και του μαστού σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό αν και έχουν πολύ υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης, αυτό δεν ισχύει για τους όγκους των όρχεων, όπου παρατηρείται αύξηση στο επίπεδο του Rho mRNA [34]. Η πρωτεΐνη RhoB έχει δειχθεί πως μπορεί να δράσει είτε ως ογκογονίδιο είτε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το εκάστοτε περιβάλλον, πιθανώς επειδή επηρεάζει τόσο την ενδοκυτταρική διακίνηση πρωτεϊνών όσο και την οργάνωση της ακτίνης [138]. Μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη του όγκου ρυθμίζοντας τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, την εισβολή τους σε νέους ιστούς και την μετέπειτα προσκόλλησή τους στους ιστούς αυτούς. Τόσο η εξάλειψη όσο και η υπερέκφραση της RhoB φαίνεται να είναι ικανή να μειώσει τη μετανάστευση *in vitro*, υπογραμμίζοντας τη σημασία ενός αυστηρού ελέγχου της έκφρασης και της λειτουργίας της RhoB [139]. Η RhoB προκαλεί μετασχηματισμό των ινοβλαστών σε καλλιέργεια [130]. Η υπερέκφραση της RhoB αντιθέτως, αναστέλλει τη μετανάστευση, τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση σε κύτταρα μελανώματος [139] και σε αρκετούς καρκίνους τα επίπεδα έκφρασής της μειώνονται κατά την εξέλιξη του καρκίνου [130]. Μελέτες έδειξαν ότι η RhoB είναι σημαντική για την απόπτωση που επάγεται από στρες, υποδεικνύοντας ένα ρόλο αρνητικού ρυθμιστή της κυτταρικής επιβίωσης για τη RhoB [140]. Η πρωτεΐνη RhoC έχει χαρακτηριστεί ως δείκτης κακής πρόγνωσης σε καρκίνους διαφορετικής προέλευσης [141] και έχει προταθεί πως η αναστολή της δράσης της θα μπορούσε να είναι μια πολλά υποσχόμενη αντικαρκινική στρατηγική [15, 142, 143]. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης έχουν παρατηρηθεί σε καρκίνο του παγκρέατος [144], του μαστού [138, 145-148], της μήτρας [133], του δέρματος [149], του προστάτη [150], του ήπατος [151], της ουροδόχου κύστης [136], του στομάχου [152], του εγκεφάλου [141], του οισοφάγου [135], και του πνεύμονα [153]. Η RhoC δεν προκαλεί το μετασχηματισμό ινοβλαστών [130], παρόλα αυτά ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε ότι η έκφρασή της σταδιακά αυξάνεται καθώς οι όγκοι γίνονται πιο μεταστατικοί και ότι η RhoC μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση προάγει τη διαδικασία αυτή [154]. Επιπλέον, η RhoC εμπλέκεται ειδικά στη διαδικασία της διασποράς των

καρκινικών κυττάρων και της μετάστασης [147] καθώς υπερεκφράζεται κατά τη διάρκεια της επιθηλιο-μεσεγχειματικής μετάβασης (EMT) σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους [45, 155-157] και μειωμένα επίπεδα έκφρασης της οδηγούν και σε μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων [45, 156, 157]. Η υπερέκφραση της RhoC φαίνεται να επαρκεί για τη συνεισφορά της στη μετάσταση καθότι η RhoC δεν έχει βρεθεί μεταλλαγμένη σε καρκίνους [46]. Η Rac1 είναι ένα άλλο μέλος της οικογένειας των Rho GTPασών που η έκφρασή της διαφοροποιείται στα διάφορα στάδια της εξέλιξης της ογκογένεσης. Η απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της Rac μπορεί να προκληθεί από αλλαγές ανοδικά του μονοπατιού σηματοδότησής της που περιλαμβάνει υποδοχείς κίνησης τυροσίνης PI3Ks, GEFs and GAPs [44]. Ήδη δημοσιευμένες μελέτες υποστηρίζουν πως η Rac1- εξαρτώμενη κυτταρική σηματοδότηση είναι απαραίτητη για τον κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων [125]. Η Rac1 υπερεκφράζεται σε μερικούς καρκινικούς τύπους [158] και σχετίζεται περισσότερο με την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων [21, 123, 159-161] και όχι τόσο με τη διασπορά και τη μετανάστευσή τους [159, 161]. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για το ρόλο της Rac1 στην εξέλιξη του καρκίνου *in vivo*. Επιπλέον είναι πιθανό να καταστέλλει τη διάδοση και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω ενίσχυσης της διακυτταρικής προσκόλλησης [91]. Αξίζει να σημειωθεί επίσης, πως τα υψηλά επίπεδα της ενεργής Rac στο κύτταρο, συχνότερα συσχετίζονται με αντίστοιχα χαμηλά επίπεδα ενεργής Rho και αντίστροφα [6, 22, 162].



Εικόνα 58. Συμμετοχή των πρωτεϊνών RHO σε διαφορετικά στάδια της εξέλιξης του όγκου. α) Διατήρηση της φυσιολογικής επιθηλιακής πολικότητας. Οι RHOA, RAC1, CDC42 και PAR6 απαιτούνται για την πολικότητα των κυττάρων. Οι RHOA και RAC1 είναι σημαντικές για τον σχηματισμό των προσκολλήσεων των κυττάρων. β) Καλοήθεις όγκοι: απώλεια της πολικότητας των κυττάρων και επαγωγή πολλαπλών στρώσεων. Η καταστολή της RAC1 οδηγεί σε αποτυχία της σωστής εναπόθεσης της λαμινίνης και επακόλουθη απώλεια πολικότητας. Η ενεργοποίηση της RHOA οδηγεί επίσης σε απώλεια της πολικότητας, αλλά η ανταγωνιστική δράση της λειτουργίας της RHOA με την υπερεκφρασμένη RHOE/RND3 οδηγεί σε πολλαπλή επίστρωση των επιθηλιακών κυττάρων. γ) Τοπικοί μεταστατικοί όγκοι: απώλεια των ορίων στους ιστούς και αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων. Η διαμόρφωση της ενεργοποίησης των RAC1 και RHO/ROCK μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια των διακυτταρικών προσκολλήσεων. Η αυξημένη ενεργότητα των RHOA, ROCK, RAC1 και CDC42 επιφέρει αυξημένη κινητικότητα. Οι RHOA και RAC1 ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών η δράση των οποίων διευκολύνει την κινητικότητα των κυττάρων με την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης (Basement membrane) και άλλων ενώσεων της εξωκυτταρικής μήτρας. Η εισβολή των επιθηλιακών κυττάρων

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, ι) Οι πρωτεΐνες Rho

στους παρακείμενους ιστούς ξεκινά όταν διαταρράσσεται η ακεραιότητα του επιθηλίου και τα κακοήθη κύτταρα διασπούν τη βασική μεμβράνη και εισέρχονται στο υποκείμενο στρώμα. Αυτό συνήθως συνεπάγεται τη χαλάρωση των επαφών των επιθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους και την απόκτηση ενός περισσότερο κινητικού φαινοτύπου σε μια διαδικασία που συχνά αναφέρεται ως επιθηλιακή-μεσεγχοματική μετάβαση (EMT). Τα μεταστασικά επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα συχνά έχουν μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης προσκόλλησης E-καδερίνης και εκφράζουν δείκτες μεσεγχοματικής προέλευσης όπως η βιμεντίνη και η N-καδερίνη [163]. d) *Μεταστάσεις σε μια μακρινή τοποθεσία: ενδοαγγείωση και εξαγγείωση.* Για να καθιερωθούν οι μεταστάσεις σε απομακρυσμένους ιστούς, τα καρκινικά κύτταρα του όγκου πρέπει να εισέλθουν στο αγγειακό ή λεμφικό σύστημα και στη συνέχεια να βγουν και να πολλαπλασιαστούν στον νέο ιστό. Η ικανότητα των μελών της οικογένειας των Rho GTPασών να ρυθμίζουν την κυτταροσκελετική δυναμική, την κυτταρική προσκόλληση και τη μετανάστευση των κυττάρων τις καθιστά κεντρικούς ρυθμιστές των διαδικασιών αυτών [21]. Οι δράσεις των RHO και ROCK απαιτούνται ώστε τα μεταναστευτικά κύτταρα να διαπεράσουν τα στρώματα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η RHOC προάγει την έκφραση αγγειογόνων (angiogenic) παραγόντων οδηγώντας σε αύξηση της αγγειογένεσης στον όγκο [34].

ii) Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι FAK/PI3K/Rac1/AKT/SGK1

Η κινητικότητα είναι μια σημαντική λειτουργία των κυττάρων κάτω από φυσιολογικές ή παθολογικές καταστάσεις, όπως ο σχηματισμός ιστών, η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η ανοσολογική αντίδραση και ο καρκίνος. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της ακτίνης, σε πρωτεΐνες που δεσμεύουν ακτίνη ή σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της δυναμικής πολυμερισμού/ αποπολυμερισμού της ακτίνης έχουν θεωρηθεί ότι οδηγούν σε διάφορες διαταραχές [1]. Παρόλο που οι μεταλλάξεις στην β-ακτίνη που σχετίζονται με κακοήθεια έχουν βρεθεί σε περιορισμένο μόνο αριθμό όγκων [2, 3], τα ελαττώματα στη δυναμική της ακτίνης που έχουν συσχετιστεί με την ενισχυμένη κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων προκαλούνται από εσφαλμένη ρύθμιση των ανοδικών σηματοδοτικών μορίων όπως οι Rho-GTPάσες, LIMK και PAK ή τροποποιημένη έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών δεσμεύσεως ακτίνης περιλαμβανομένης της γελσολίνης, της κοφιλίνης, της προφιλίνης, και του συμπλόκου Arp2/3 όπως επίσης και σε απορρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού της FAK κινάσης [1, 4-13].

Κινάση Εστιακής Προσκόλλησης, FAK

Η Κινάση Εστιακής Προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1992 ως μέλος της πρωτεϊνικής οικογένειας των κινασών της τυροσίνης (Protein Tyrosine Kinases, PTKs) [14-16]. Είναι μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη [17] μοριακού βάρους 120 kDa [18]. Η πρωτεΐνη FAK εντοπίζεται στις υπομεμβρανικές θέσεις εστιακής προσκόλλησης (Focal Adhesions, FAs) [18]. Οι FAs αποτελούν μεγάλα πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα, βασιζόμενα μοριακά στις ιντεγκρίνες (integrins), που συμμετέχουν στη σύνδεση των κυττάρων με το κυτταρικό υπόστρωμα, καθώς και την αμφίδρομη μεταβίβαση πληροφοριών μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του εξωκυττάρου χώρου [14, 15, 19-23]. Το ένζυμο FAK εκφράζεται με συντηρημένο τρόπο σε διάφορα είδη οργανισμών [24, 25] και σε πληθώρα ιστών και κυττάρων στον άνθρωπο [18, 26].

Η ρύθμιση της ενεργότητας της πρωτεΐνης FAK πραγματοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης των καταλοίπων τυροσίνης στην καταλυτική περιοχή του μορίου που περιλαμβάνει τις θέσεις Tyr576 και Tyr577 [24]. Η φωσφορυλίωση αυτή των Tyr576 και Tyr577 που ενισχύει την καταλυτική δράση και ικανότητα του μορίου [24, 27], διαμεσολαβείται φυσιολογικά από τις ιντεγκρίνες [28-30]. Επιπλέον, η κινάση FAK έχει δείχθει πως ενεργοποιείται άμεσα ή έμμεσα και από διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα, σιινάλα από τον εξωκυττάριο χώρο (ECM) μέσω υποδοχέων G-πρωτεϊνών, από νευροδιαβιβαστές [31-33], κυττοκίνες [34-36], ορμόνες [37-39], αυξητικούς παράγοντες όπως ο επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας (epithelial growth factor, EGF) [40, 41], ο αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων/παράγοντας διασποράς (hepatocyte growth factor, HGF) [42], ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (vascular endothelial growth factor, VEGF) [43], ο παράγοντας ανάπτυξης αιμοπεταλίων (platelet derived growth factor, PDGF) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών-2 (Fibroblast growth factor-2) [44-46] ή μέσω άγνωστων ως τώρα μηχανισμών. Το 1999 μάλιστα, προτάθηκε ένα συνολικό μοντέλο ενεργοποίησης του ενζύμου FAK από ερεθίσματα εξαρτώμενα ή μη από τις ιντεγκρίνες [47]. Η διάδοση μηνυμάτων μέσω του ενζύμου FAK και η ρύθμιση των επακόλουθων πολύπλοκων μονοπατιών, είναι υπεύθυνα για τη ρύθμιση ενός σημαντικού αριθμού κυτταρικών λειτουργιών. Η πρωτεΐνη αυτή αντιπροσωπεύει έναν "κόμβο σηματοδότησης" που ενσωματώνει τις πληροφορίες που λαμβάνει από τουλάχιστον 4 διαφορετικές πηγές: i) από τον εξωκυττάριο χώρο (ECM) και τις αλληλεπιδράσεις μέσω των ιντεγκρινών, ii) από τη σηματοδότηση που μεσολαβείται μέσω των αυξητικών παραγόντων, iii) από σηματοδότηση μέσω υποδοχέων G-πρωτεϊνών και vi) από μηχανικές δυνάμεις που μεταδίδονται μέσω του κυτταροσκελετού [48, 49]. Επομένως, η πρωτεΐνη FAK εμπλέκεται σε κάποιο βαθμό σχεδόν σε όλες τις διαδικασίες μεταγωγής σήματος τόσο στα φυσιολογικά κύτταρα όσο και στα κύτταρα κάτω από παθολογικές καταστάσεις [50]. Κεντρικό

ρόλο στην επιλογή της κατεύθυνσης που θα ακολουθήσει το μήνυμα διαδραματίζει η δυναμική ισορροπία μεταξύ της φωσφορυλίωσης και της αποφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η ενζυμική διέγερση της πρωτεΐνης FAK συμβαίνει παροδικά και βρίσκεται υπό συνεχή έλεγχο μέσω μηχανισμών, όπως η γονιδιακή ενίσχυση και η δράση φωσφατασών. Στα καρκινικά κύτταρα όμως, ερευνητικά δεδομένα καθιστούν την κινάση FAK ως σημαντικό ρυθμιστικό μόριο του καρκινικού φαινότυπου. Αλλαγές στη διάδοση μηνυμάτων μέσω του ενζύμου FAK προωθούν την απόκτηση καρκινικών χαρακτηριστικών από τα κύτταρα, όπως η αυξημένη κυτταρική μετανάστευση [51], η αγγειογένεση [52], η ανοχή στην υποξία [53], η “άνοικη” [54], η μειωμένη απόπτωση [55], ο ανεξέλεγκτος κυτταρικός πολλαπλασιασμός [49] και η επιβίωσή τους μετά την αποκόλλησή τους από τη βασική μεμβράνη [56], καθώς και η εμφύτευσή τους σε θέσεις απομακρυσμένες της πρωτογενούς εστίας με συνέπεια τη δημιουργία μεταστάσεων [57]. Από τα παραπάνω καταδεικνύεται ο ρόλος της πρωτεΐνης FAK ως ογκογονίδιο ή τουλάχιστον ως ισχυρό μόριο ρύθμισης των κακοηθειών κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Το ένζυμο έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε διάφορα νεοπλάσματα [58] γεγονός που συνδέεται με αυξημένη μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και κυτταρική επιβίωση των κυττάρων [57]. Η υπερέκφραση ωστόσο του μορίου από μόνη της φαίνεται να μην καθίσταται αρκετή ώστε να προκαλέσει την εξαλλαγή του κυττάρου [59]. Ανάλυση διαφόρων τύπων καρκίνου στον άνθρωπο έχει δείξει πως η αυξημένη έκφραση του γονιδίου FAK [60], τα αυξημένα επίπεδα πρωτεΐνης [61-63] καθώς και τα αυξημένα επίπεδα ενεργοποίησης του μορίου [64], έχουν συσχετισθεί θετικά με αυξημένη μετάσταση και αρνητική κλινική εικόνα των ασθενών [65]. Αυξημένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FAK έχουν παρατηρηθεί σε ευρύ φάσμα κακοηθειών: σε αστροκυτώματα [66], σε καρκίνο του μαστού [60, 67, 68], τραχήλου της μήτρας [69, 70], παχέος εντέρου [67, 71], καρκίνου του ενδομητρίου [72], καρκίνου του οισοφάγου [73], στομάχου [74], εγκεφάλου [75], καρκίνου του ήπατος [76], λάρυγγα [77], πνεύμονα [78, 79], παγκρέατος [80], προστάτη [81] και θυρεοειδή [82].

Η ενεργή φωσφορυλιωμένη FAK λειτουργεί ως ικρίωμα στρατολογώντας πληθώρα δομικών και σηματοδοτικών μορίων προωθώντας τη συναρμολόγηση διαφόρων συμπλόκων σηματοδότησης μέσα στα πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα των ιντεγκρινών, όπως για παράδειγμα η ισομορφή γάμμα 1 της φωσφολιπάσης C (PLC-gamma1) [83], η πρωτεΐνη Shc [84], η Grb7 [85], η Nck-2 [86]. Ανάμεσα στα μόρια αυτά είναι και η κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) [87, 88]. Η κινάση FAK ενεργοποιεί το καθοδικό μονοπάτι της PI3K/Rac1/AKT/SGK1 στρατολογώντας τη ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K, p85, στη φωσφορυλιωμένη θέση τυροσίνης Y397 [89, 90]. Η επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης PI3K οδηγεί στην ενεργοποίηση της AKT κινάσης, οδηγώντας σε ρύθμιση της επιβίωσης των κυττάρων [37, 91-95], προάγει την κυτταρική προσκόλληση και τη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης [88].

Κινάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3 PI3K

Η οικογένεια των κινασών της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης-3' (phosphatidylinositol-3' kinase, PI3K) διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο σε όλους τους βασικούς μηχανισμούς της βιολογίας του κυττάρου και του μεταβολισμού [96]. Η σηματοδότηση μέσω των κινασών PI3K είναι απαραίτητη για την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, την ανάπτυξη, την αύξηση, την κυτταρική προσκόλληση, τη διαφοροποίηση, την κυτταρική κινητικότητα [97, 98] και τη διαίρεση των κυττάρων και αυτό, εξηγεί το γεγονός της ενεργοποίησης αυτών των κινασών σε διάφορους τύπους κακοηθειών. Η οικογένεια των πρωτεϊνών PI3K περιλαμβάνει ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις παραγωγής ειδικών φωσφολιπιδίων ινοσιτόλης [98]. Τα ένζυμα αυτά κατατάσσονται σε τρεις κύριες τάξεις (classes) I, II και III ανάλογα με την δομή και την ειδικότητά τους [99, 100]. Εξ αυτών, η πιο ευρέως μελετημένη τάξη είναι η I και κυρίως η IA, η οποία εμφανίζει και τη μεγαλύτερη συσχέτιση με την καρκινογένεση [101, 102]. Τα μέλη των PI3- κινασών (PI3Ks) της τάξης IA (PI3Kα, PI3Kβ και PI3Kδ) είναι ετεροδιμερή (p85/p110α) τα οποία αποτελούνται από μία καταλυτική υπομονάδα

5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, ii) Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι FAK/PI3K/Rac1/AKT/SGK1

των 110 kD και μία ρυθμιστική υπομονάδα των 85, 55 ή 50 Kd γενικότερα γνωστή ως p85 [99, 103]. Ερεθίσματα τα οποία επάγουν την ενεργοποίηση τυροσινικών κινασών οδηγούν στη συνέχεια στην ενεργοποίηση των PI3Ks της τάξης IA. Αυτή η ενεργοποίηση γίνεται μέσω μεμβρανικών υποδοχέων με δράση τυροσινικής κινάσης (Receptor tyrosine kinases-RTKs) ή μέσω τυροσινικών κινασών που δεν είναι μεμβρανικοί υποδοχείς (non-receptor tyrosine kinases) [104-106]. Μετά την ενεργοποίησή της, η PI3K φωσφορυλιώνει το υδροξύλιο που βρίσκεται στην θέση D3 των λιπιδίων της φωσφατίδυλο-ινοσιτόλης και μετατρέπει την 4,5- διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη PtdIns(4,5)P₂ σε λιπίδια PtdIns(3,4,5)P₃ ή PIP₃. Τα λιπίδια αυτά αποτελούν ένα σημαντικό ενδιάμεσο μηνύτορα που απουσιάζει ή δεν είναι ανιχνεύσιμος όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά αυξάνεται σε σημαντικά επίπεδα ως απόκριση σε πολλαπλά διεγερτικά σήματα και έχουν την δυνατότητα να συνδέονται με ένα φάσμα μορίων όπως είναι η κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT [99] και οι παράγοντες Rac. Η ενεργοποίηση των παραγόντων Rac από τα λιπίδια PI(3,4,5)P₃ παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδιάταξη της ακτίνης του κυτταροσκελετού, στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του ασβεστίου και στην γονιδιακή ρύθμιση [99]. Μία πρωτεϊνική κινάση που μπορεί επίσης να προσδεθεί με την παραγόμενη PI(3,4,5)P₃ είναι και η SGK (serine/threonine protein kinase) η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της διεγερσιμότητας των νευρώνων, της απέκκρισης νατρίου από τους νεφρούς και της κυτταρικής επιβίωσης. Ενεργοποιώντας την πρωτεΐνη AKT, η PI3K κινάση εμπλέκεται στη ρύθμιση μιας σειράς κυτταρικών λειτουργιών συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, της πρωτεϊνίωσης, της επιβίωσης, του μεταβολισμού της γλυκόζης και άλλων [107, 108]. Σε διάφορα είδη ανθρώπινων κακοηθειών έχουν παρατηρηθεί ενεργοποιητικές μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν τις κινάσες PI3K. Σωματικές μεταλλάξεις και/ή ενίσχυση του γονιδίου της PI3K, καθώς και σωματικές μεταλλάξεις οδηγούν σε υπερέκφραση της αντίστοιχης κινάσης και συνεπώς σε αυξημένη ενεργότητα, η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την ενισχυμένη κυτταρική ανάπτυξη και την μειωμένη απόπτωση [109] και έχουν περιγραφεί σε διάφορους τύπους κακοήθειας, και οδηγούν σε διαταραγμένη/συνεχή ενεργοποίηση (constitutive activation) της κινάσης PI3K [101, 110-113]. Η συνεχής παραγωγή PI(3,4,5)P₃ προκαλεί τη μόνιμη στρατολόγηση πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αδιάλειπτη μεταγωγή σημάτων. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις των υπομονάδων της PI3K κινάσης εμπλέκονται στην καρκινογένεση των ωοθηκών, του μαστού, του στομάχου, στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα [114], καθώς και στον καρκίνο του ενδομητρίου, του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του θυρεοειδή αδένος και του εγκεφάλου [113, 115]. Στα φυσιολογικά κύτταρα, η ρυθμιστική υπομονάδα p85 προσδέεται στην καταλυτική υπομονάδα p110α και καταστέλλει την δράση της PI3K κινάσης. Ελλείψεις ολόκληρου του γονιδίου, καθώς, και μεταλλάξεις του γονιδίου PIK3R1 που κωδικοποιεί για την p85 υπομονάδα έχουν εντοπιστεί σε γλοιοβλαστώματα, στον καρκίνο παχέος εντέρου και ωοθηκών [115, 116].

Η κινάση AKT

Η AKT -γνωστή και ως πρωτεϊνική κινάση B (Protein kinase B-PKB)- είναι μία κυτταρική πρωτεΐνη μεγέθους 57 Kd, μέλος της οικογένειας AGC των πρωτεϊνικών κινασών, και έχει δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης [117, 118]. Σήμερα θεωρείται μία από τις σημαντικότερες πρωτεϊνικές κινάσες των ανώτερων ευκαρυωτικών οργανισμών και της ανθρώπινης παθοφυσιολογίας γενικότερα [118]. Αρχικά ανακαλύφθηκε το ογκογονίδιο της το 1987 και μετέπειτα το 1991 απομονώθηκε η ίδια η πρωτεΐνη από τρεις διαφορετικές ερευνητικές ομάδες [119-122]. Οι δύο ομάδες αναγνώρισαν την κινάση λόγω της παρόμοιας δομής της (Homology) με τις πρωτεϊνικές κινάσες C και A (protein kinases PKC and PKA) [121, 122]. Η τρίτη ομάδα την αναγνώρισε ως το προϊόν του ογκογονιδίου v-AKT του ιού AKT8, ο οποίος απομονώθηκε από ένα T κυτταρικό λέμφωμα σε τρωκτικά [120, 123]. Η κινάση AKT αποτελεί τον κύριο διαμεσολαβητή του μονοπατιού μεταγωγής σημάτων της PI3K. Μέσω της ενεργότητας κινάσης σερίνης/ θρεονίνης, η

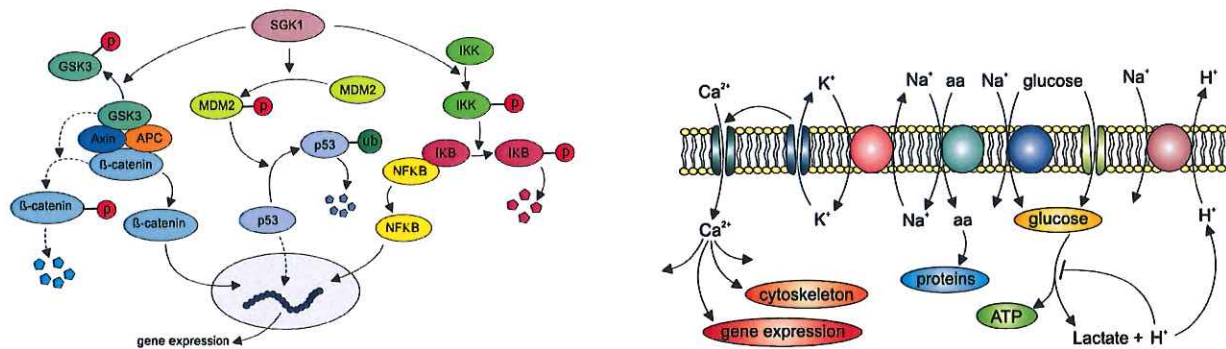
5. Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, ii) Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι FAK/PI3K/Rac1/AKT/SGK1

κινάση AKT συμμετέχει καθοριστικά στον έλεγχο της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, διαδραματίζοντας κεντρικό ρόλο στην αναστολή της απόπτωσης και την πρόωση του κυτταρικού κύκλου. Η AKT εμπλέκεται επίσης, στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων και λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό της γλυκόζης, στην αγγειογένεση, στη μεταγραφή γονιδίων και την πρωτεϊνολύση καθώς και σε αρκετές πυρηνικές διεργασίες όπως η συμπίκνωση της χρωματίνης. Η πρωτεϊνική κινάση AKT είναι συνεχώς ενεργή σε πολλούς τύπους καρκίνων, ως αποτέλεσμα γονιδιακής ενίσχυσης ή εξαιτίας μεταλλάξεων που αφορούν την ίδια ή άλλα μόρια του μονοπατιού PI3K/AKT [101, 124-127]. Η συνεχής ενεργοποίησή της έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται με τη μεταμόρφωση των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, την εξέλιξη ενός όγκου και την ανθεκτικότητα και αντίσταση στην χημειοθεραπεία και την ακτινοθεραπεία [101, 124, 125, 127]. Ενίσχυση και υπερέκφραση της κινάσης έχει βρεθεί σε καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών, του πνεύμονα, του παγκρέατος, του προστάτη, του στομάχου και στα μελανώματα. Οι κινάσες αυτές, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της ογκογένεσης, στην κυτταρική διήθηση και σε πολλές περιπτώσεις προσδίδουν ανθεκτικότητα στα νεοπλασματικά κύτταρα σε περιπτώσεις ορμονοθεραπείας [128-131] στον καρκίνο του μαστού, πνεύμονα, παχέος εντέρου, ωοθηκών, νεφρών, προστάτη, δέρματος, παγκρέατος, ήπαρ, εγκεφάλου, ενδομητρίου, στομάχου και του αίματος. Σε διάφορα είδη κακοηθειών η υπερ-έκφραση ή/και ενεργοποίηση των AKT κινασών, αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την κατάληξη της ασθένειας [132-136]. Η κινάση AKT, αφού ενεργοποιηθεί, αποδεσμεύεται από την κυτταρική μεμβράνη και φωσφορυλιώνει με την σειρά της μια μεγάλη ομάδα υποστρωμάτων τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Η ενεργοποίηση της κινάσης είναι μία ιδιαίτερα σύνθετη διαδικασία που απαιτεί αφενός μετατόπιση του μορίου προς την κυτταρική μεμβράνη και αφετέρου φωσφορυλίωσή του σε συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα. Ο αριθμός των προσδιορισμένων υποστρωμάτων των AKT κινασών, αυξάνει συνεχώς [137] και περισσότερες από 100 πρωτεΐνες έχουν αναγνωριστεί μέχρι στιγμής ως υποστρώματα της. Τα υποστρώματα αυτά συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η επιβίωση, η αύξηση, η διαίρεση, ο μεταβολισμός, η αγγειογένεση, η μετάσταση και η διήθηση [118, 138, 139]. Ένα από αυτά τα υποστρώματα είναι και το μόριο SGK1.

Η κινάση σερίνης/θρεονίνης SGK1

Η κινάση σερίνης/θρεονίνης SGK1 ανήκει στη συντηρημένη εξελικτικά οικογένεια των κινασών σερίνης/θρεονίνης AGC [140] μαζί με άλλα δύο μέλη κινασών, τα SGK2 και SGK3 [141] και εντοπίζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς [142]. Η ενεργοποίησή της ρυθμίζεται τοπικά και χρονικά μέσω φωσφορυλίωσης. Έχει δείχθει πως διάφορα σιγνάλα μπορούν να ενεργοποιήσουν την κινάση, όπως αυξητικοί παράγοντες [143, 144], μεταλοκορτικοειδή [145], κυτοκίνες [146], και κυρίως το κυτταρικό στρες, το οξειδωτικό στρες, η υπεριώδης ακτινοβολία και το θερμικό σοκ [147, 148]. Το 1999 μάλιστα, αποδείχτηκε πως ενεργοποιείται και φωσφορυλιώνεται με τρόπο εξαρτώμενο της κινάσης PI3K και του μονοπατιού FAK/PI3K/AKT γενικότερα [149, 150]. Η ενεργοποίηση της κινάσης SGK1 σχετίζεται με τη μετατροπή των φυσιολογικών κυττάρων σε καρκινικά, διαδικασία εξαρτώμενη του μονοπατιού PI3K/AKT [151, 152]. Έχει δείχθει πως διαφοροποίηση της έκφρασής της οδηγεί στην παθοφυσιολογία μιας ποικιλίας διαταραχών, συμπεριλαμβανομένης της υπέρτασης [153-156], της παχυσαρκίας [155, 157], του εγκεφαλικού επεισοδίου [155, 158], της αλλεργίας [155], του πεπτικού έλκους, της ινωδώδους νόσου, της ισχαιμίας, του διαβήτη [155, 159] και του νευροεκφυλισμού [155, 160, 161]. Αυξημένη έκφραση της κινάσης SGK1 έχει παρατηρηθεί σε κύτταρα καρκίνου του μαστού [162, 163], του παχέος εντέρου [164], του προστάτη [165], της μήτρας [166], του πνεύμονα [167], του μυελώματος [146] και του μυελοβλαστώματος [168]. Σε πολλές κακοήθειες, η SGK1 έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων [160, 161, 166, 169-171]. Η κινάση SGK1 αποτελεί έναν σημαντικό ρυθμιστή της ομοιόστασης του κυτταρικού ασβεστίου [160, 172-177]. Οι μηχανισμοί

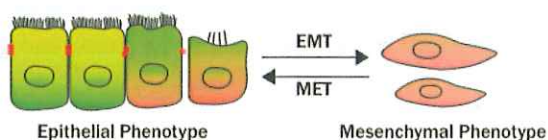
που αυξάνουν το κυτταρικό Ca^{2+} περιλαμβάνουν την απελευθέρωση του Ca^{2+} από ενδοκυτταρικά διαμερίσματα και/ή την είσοδο του μέσω της πλασματικής μεμβράνης [178]. Η απελευθέρωση του Ca^{2+} από ενδοκυτταρικά διαμερίσματα ακολουθείται από την ενεργοποίηση του καναλιού ασβεστίου [Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (I_{CRAC}) ή store-operated Ca^{2+} entry (SOCE)] [179]. Το κανάλι ασβεστίου συγκροτείται από τις καταλυτικές υπομονάδες του πόρου ORAI1, ORAI2, και ORAI3 [179-185] οι οποίες ενεργοποιούνται από τις ρυθμιστικές υπομονάδες STIM1 και STIM2 [186-192], οι οποίες με τη σειρά τους έχουν ήδη ενεργοποιηθεί από τη μείωση της ποσότητας του ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο [188, 191]. Η SGK1 μπορεί να ρυθμίσει θετικά τις υπομονάδες του πόρου μέσω δύο μοριακών μηχανισμών i) φωσφορυλιώνοντας την λιγάζη NEDD4L καταστέλλοντας έτσι την αποικοδόμηση της ORAI1 και οδηγώντας σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της και ii) ή με μεταγραφική επαγωγή των γονιδίων ORAI1 και STIM1, αυξάνοντας την έκφρασή τους [174, 175]. Αυτό πραγματοποιείται μέσω αύξησης της ενεργότητας του παράγοντα μεταγραφής NFκB, που ενεργοποιείται από την είσοδο του ασβεστίου στα κύτταρα [193] και στη συνέχεια αλληλεπιδρά άμεσα με τον υποκινητή των γονιδίων αυτών [174, 175, 177]. Η ομοίωση του ασβεστίου και κατ' επέκταση η ρύθμιση της έκφρασης των υπομονάδων ORAI/STIM1 του πόρου ρυθμίζουν βασικές πτυχές του φαινοτύπου των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός [152, 164], η ανάπτυξη του όγκου, η αγγειογένεση και η μετάσταση [173, 194].



Εικόνα 45. Ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων β-κατενίνη, p53 και NF-κB από την SGK1 [164] και ρύθμιση των καναλιών ιόντων και των μεταφορέων που σχετίζονται με την καρκινική ανάπτυξη από την SGK1 [164].

6. Επιθηλιακά και Μεσεγγυματικά κύτταρα

Από τα τέλη του 19ου αιώνα, είχαν αναγνωριστεί δύο κύριοι κυτταρικοί τύποι κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, επιθηλιακοί και μεσεγγυματικοί. Η αλληλομετατροπή μεταξύ των δύο κυτταρικών μορφών περιγράφηκε από τον Frank Lillie το 1908 [1]. Ο χαρακτηρισμός των κυττάρων ως επιθηλιακών ή μεσεγγυματικών βασίζεται στο σχήμα και την οργάνωση των πολυκύτταρων δομών που σχηματίζουν [2]. Με βάση τα παραπάνω, τα επιθηλιακά κύτταρα οργανώνονται σε στοιβάδες ή μονοστοιβάδες, οι οποίες συνδέονται στενά μεταξύ τους μέσω εξειδικευμένων μεμβρανικών δομών, όπως είναι οι στενοί ή στεγανοί σύνδεσμοι (tight junctions), οι συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions), τα δεσμοσώματα (desmosomes) και οι χασμοσύνδεσμοι (gap junctions) [3]. Οι στενοί διακυτταρικοί δεσμοί που παρατηρούνται στις επιθηλιακές στοιβάδες εμποδίζουν τη μεμονωμένη κίνηση ενός μεμονωμένου κυττάρου από το επιθήλιο. Οι ιδιότητες αυτές επομένως, επιτρέπουν στα επιθηλιακά κύτταρα να διαμορφώνουν έναν καλά οριοθετημένο τρισδιάστατο χώρο, με συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά και μηχανική ακαμψία [4]. Τα επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν κορυφαία - βασική (apical-basal) πολικότητα. Η επιφανειακή και η βασική στοιβάδα διαφέρουν όχι μόνο οπτικά και λειτουργικά αλλά και από τον τρόπο με τον οποίο συνδέονται με το εκάστοτε υπόστρωμα. Η πολικότητα αυτή εξασφαλίζεται από την εντοπισμένη κατανομή μορίων προσκόλλησης, όπως οι καδερίνες και οι ιντεγκρίνες, από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων και από την παρουσία μίας εξειδικευμένης δομής της εξωκυττάριας μήτρας, τη βασική λάμινα (basal lamina, basement membrane) κάτω από τη βασική τους επιφάνεια [3]. Τα μεσεγγυματικά κύτταρα, αντίθετα, δεν εμφανίζουν τα παραπάνω επιθηλιακά χαρακτηριστικά, αλλά διαθέτουν μορφολογία παρόμοια με αυτή των ινοβλαστών [3]. Το σχήμα τους είναι πιο επίμηκες και εκτεταμένο συγκριτικά με τα επιθηλιακά κύτταρα, και η πολικότητα που τα χαρακτηρίζει διατρέχει τον προσθιο - οπίσθιο άξονα και όχι τον κορυφαίο - βασικό όπως στα επιθηλιακά κύτταρα. Δεν εμφανίζουν ούτε χαρακτηριστική δομή, ούτε ισχυρές διακυτταρικές συνδέσεις όπως τα επιθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα μετακίνησης και μετανάστευσης. Η μορφολογία των μεσεγγυματικών κυττάρων ευνοεί την ελαστική χωροταξική τους τοποθέτηση και ως εκ τούτου οι δομές που σχηματίζουν έχουν ανομοιόμορφα και ακανόνιστα μεταξύ τους σχήματα. Επιπλέον, ο μηχανισμός της μετανάστευσης των μεσεγγυματικών κυττάρων διαφέρει από τον αντίστοιχο των επιθηλιακών στον οποίο τα κύτταρα κινούνται ως ενιαία μάζα (en block). Αντίθετα, τα μεσεγγυματικά κύτταρα μπορούν να μετακινηθούν μεμονωμένα, ως ενιαίες οντότητες. Οι διαφορές στην κίνηση μεταξύ των δύο τύπων κυττάρων που πραγματοποιούνται τόσο κατά την εμβρυογένεση όσο και κατά την καρκινογένεση, περιγράφηκαν αρχικά από την Elizabeth Hay [4]. Συμπεραίνουμε επομένως, ότι η μετατροπή ενός κυττάρου από επιθηλιακό σε μεσεγγυματικό, απαιτεί μεταβολές στη μορφολογία, την κυτταρική αρχιτεκτονική, την πρόσφυση στο υπόστρωμα και τη μεταναστευτική ικανότητα. Οι παραπάνω αλλαγές παρατηρούνται κατά τη διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής (EMT) των κυττάρων.

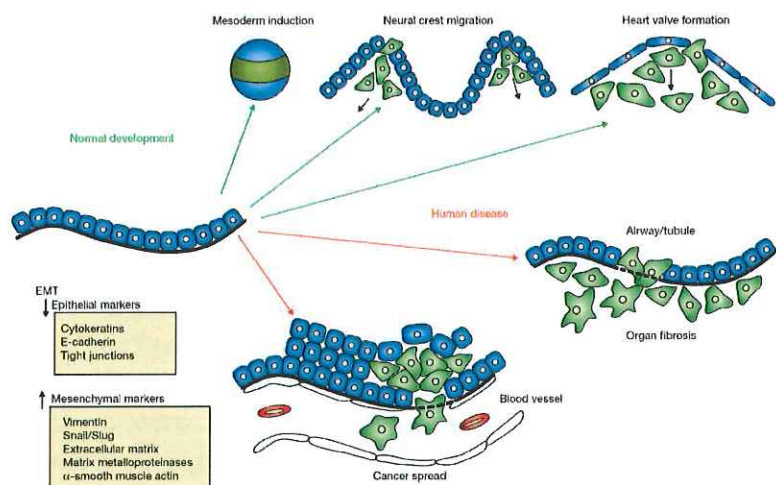


Εικόνα 27: Μορφολογία επιθηλιακών και μεσεγγυματικών κυττάρων.

Επιθηλιο-μεσεγγυματική μετατροπή (Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)

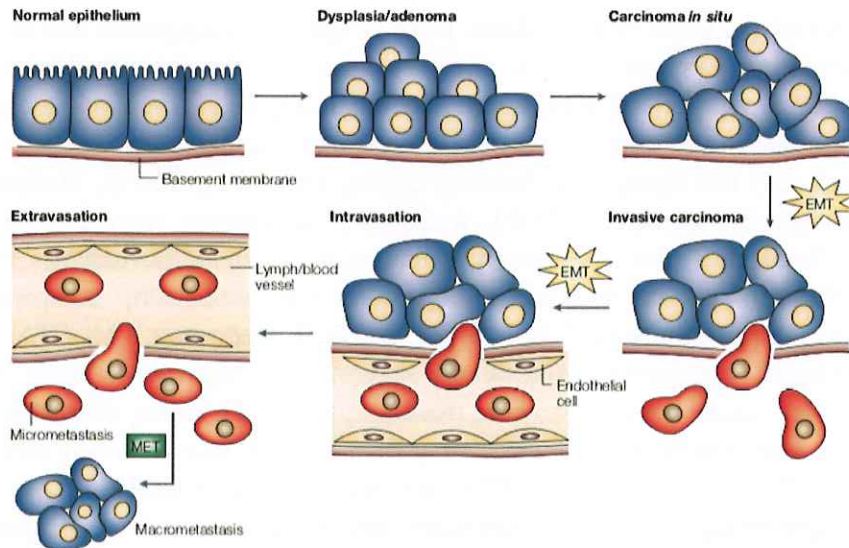
Ορισμός και ιστορική αναδρομή

Παρόλο που αρκετοί από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην EMT είναι σήμερα γνωστοί, δεν έχει ακόμα διατυπωθεί ένας ξεκάθαρος ορισμός για το φαινόμενο αυτό καθώς υπάρχει μεγάλη δυσκολία να εντοπιστεί και να αναγνωριστεί *in vivo*. Ωστόσο, ένας γενικός ορισμός για την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση μπορεί να είναι ότι η EMT είναι η διαδικασία που περιγράφει μία σειρά γεγονότων κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τον χαρακτήρα τους, αποκτούν νέες ιδιότητες τόσο στη μορφολογία όσο και στη συμπεριφορά τους και μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά. Η EMT αναγνωρίστηκε αρχικά ως ξεχωριστή διαδικασία από τους Garry Greenburg και Elisabeth Hay [5] και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της μορφογένεσης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [6-8]. Πρωτογενής EMT συμβαίνει κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, ακόμη και πριν από την εμφύτευση κατά το σχηματισμό του πλευρικού ενδοδέρματος [9] και στη συνέχεια, παρατηρείται κατά το στάδιο της γαστριδίωσης [9] όπου κύτταρα μεταναστεύουν από δομές που μοιάζουν με επιθήλιο ώστε να οργανώσουν το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, δύο από τα τρία κύρια εμβρυϊκά στρώματα [6, 7, 10, 11]. Η EMT είναι μία φυσιολογική διαδικασία απαραίτητη για πολλά μορφογενετικά γεγονότα, όπως είναι η γαστριδίωση και η οργανογένεση κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, η αναδιαμόρφωση των ιστών, η δημιουργία ινώδους ιστού κατά την επούλωση των πληγών καθώς και για το σχηματισμό της καρδιάς [3, 12].



Εικόνα 29: Η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) κατά την ανάπτυξη και σε παθολογικές καταστάσεις. Παρουσιάζονται παραδείγματα επιθηλιακών και μεσεγχυματικών μορίων που μειώνονται και αυξάνονται αντίστοιχως κατά την EMT [13].

Χρειάστηκε πολύς χρόνος ωστόσο για να αναγνωριστεί η EMT ως ένας πιθανός μηχανισμός που ευθύνεται για διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως επίσης και για να συνδεθεί με την πρόοδο του καρκίνου [8] καθώς υπάρχει μεγάλη δυσκολία να εντοπιστεί και να ακολουθηθεί χρονικά και τοπικά σε καρκινώματα *in vivo* [14]. Τα τελευταία χρόνια, όμως, η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή έχει βρεθεί στην πρώτη γραμμή έρευνας έναντι της διήθησης και της μετάστασης πολλών καρκινωμάτων [15-17] δεδομένου ότι η μεταναστευτική φύση των κυττάρων που υπόκεινται EMT προσομοιάζει την αντίστοιχη των καρκινικών κυττάρων και επίσης πολλά από τα γονίδια που εμπλέκονται στην εμβρυογένεση έχουν δείχθει ότι ελέγχουν και τη μετάσταση [7, 10].



Εικόνα 30: EMT και MET κατά την εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου. Τα κανονικά επιθήλια που φέρουν επικάλυψη από μια βασική μεμβράνη μπορούν να πολλαπλασιαστούν τοπικά για να προκαλέσουν αδένωμα. Περαιτέρω μετασχηματισμός με επιγενετικές μεταβολές και γενετικές μεταβολές οδηγεί σε ένα τοπικό καρκίνωμα (*in situ*), που περιβάλλεται ακόμα από μία ακέραια βασική μεμβράνη. Περαιτέρω μεταβολές μπορούν να επάγουν τοπική διήθηση των κυττάρων του καρκινώματος, πιθανώς μέσω επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής (EMT), και η βασική μεμβράνη κατακερματίζεται. Τα κύτταρα μπορούν να ενσωματωθούν σε λεμφικά ή αιμοφόρα αγγεία, επιτρέποντας την παθητική μεταφορά τους σε μακρινά όργανα. Στις δευτερεύουσες θέσεις, τα απομονωμένα κύτταρα του καρκινώματος μπορούν να εξαγγειωθούν και είτε να παραμείνουν μοναχικά (μικρομετάσταση) είτε να σχηματίσουν ένα νέο καρκίνωμα μέσω μεσεγγυματικής-επιθηλιακής μετάβασης (MET) [6].

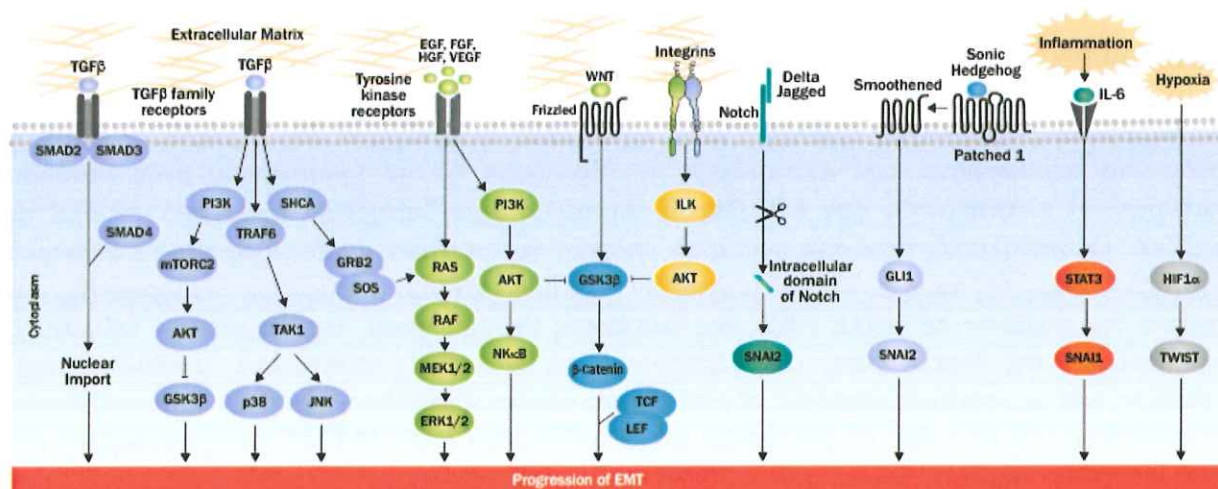
EMT κατά την φυσιολογική ανάπτυξη

Η ανάπτυξη των πιο πρωτόγονων ειδών, όπως τα σφουγγάρια, βασίζεται στην αναδιαμόρφωση ενός απλού επιθηλίου προς τη δημιουργία επιθηλίου δύο στρωμάτων. Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει την αποκόλληση, τη διείσδυση ή την εγκαθίδρυση ενός συνόλου κυττάρων. Η πλαστικότητα των επιθηλιακών κυττάρων έχει διατηρηθεί εξελικτικά σε όλα τα μετάζωα. Οι επιθηλιακές στρώσεις κυττάρων μπορούν να υποστούν αναδιαμόρφωση με διάφορες διεργασίες, όπως της παρεμβολής των κυττάρων (*cell intercalation*) (η βάση της διαμόρφωσης του σχεδίου του σώματος σε πολλά είδη), της διόγκωσης (*invagination*), της διαίρεσης - διάσπασης (*evagination*), της διακλάδωσης (*branching*) και της πολλαπλής επίστρωσης (*multi-layering*). Επιπλέον, στα περισσότερα μετάζωα, οι επιθηλιακές στρώσεις κυττάρων μπορούν να μετατραπούν με αναστρέψιμο ή μη τρόπο σε μεσεγγυματικά κύτταρα μέσω EMT. Η EMT, όπως αναφέραμε και προηγουμένως, αποτελεί σημαντικό κομμάτι της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Για παράδειγμα, στα σπονδυλωτά διευκολύνει το σχηματισμό τριών στρωμάτων του εμβρύου κατά τη γαστρίδωση [18, 19]. Η EMT είναι επίσης θεμελιώδους σημασίας για πολλές άλλες ιστογενετικές (*histogenic*) διεργασίες, ιδιαίτερα στα σπονδυλωτά, επειδή η καρδιά, το μυοσκελετικό σύστημα, οι περισσότερες κρνιακές δομές και το περιφερικό νευρικό σύστημα σχηματίζονται από αυτόν τον μηχανισμό. Οι μοριακές αναλύσεις, που βασίζονται εν μέρει στη μελέτη των επιθηλιο-μεσεγγυματικών διεργασιών (EMTs) και των μεσεγγυματο-επιθηλιακών διεργασιών (METs) κατά τη διάρκεια της ιστογένεσης και της οργανογένεσης *knock-out* ποντικών, οδήγησαν στην ταυτοποίηση των γονιδίων που φαίνεται να είναι απαραίτητα για αυτές τις διαδικασίες [6].

Μοριακά δίκτυα που ρυθμίζουν την EMT

Διάφορα εξωκυτταρικά ερεθίσματα μπορούν να ενεργοποιήσουν καταρράκτες σηματοδότησης που μεσολαβούν στην εξέλιξη της EMT κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, της αναγέννησης των ιστών και την εξέλιξη κακοηθειών [20]. Μια ποικιλία επίσης κλασικών

παραγόντων ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει EMT με τρόπο που εξαρτάται από το περιβάλλον. Οι παράγοντες αυτοί δεν εκκρίνονται μόνο από τα καρκινικά κύτταρα του όγκου αλλά και από κύτταρα του στρώματος [20]. Η EMT είναι μια δυναμική διαδικασία που ενεργοποιείται από ερεθίσματα που προέρχονται από μικροπεριβάλλοντα, όπως εξωκυττάρια ουσίες (π.χ. κολλαγόνο και υαλουρονικό οξύ) και εξωκρινείς διαλυτές ουσίες όπως Wnt, TGF-β, Hedgehog, αυξητικός παράγοντας επιδερμικών κυττάρων (EGF), αυξητικός παράγοντας ηπατοκυττάρων (HGF) και κυτοκίνες [21]. Σημαντική είναι η διερεύνηση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενώνουν τα παραπάνω ερεθίσματα με τη διαδικασία της EMT στη μετάσταση. Διάφορα αναπτυξιακά μονοπάτια σηματοδότησης όπως τα TGF-β, WNT, NOTCH, Hedgehog, JAK-STAT, AP-1, NF-κB, Hippo και υποδοχείς αυξητικών παραγόντων κινάσης της τυροσίνης, έχουν εμπλακεί στην πρόκληση EMT υπό ορισμένες φυσιολογικές συνθήκες [8, 9, 22]. Άλλες οδοί μεταγωγής σήματος που εμπλέκονται στην επαγωγή EMT είναι τα μονοπάτια των φλεγμονωδών κυτοκινών όπως η TNF-α μέσω της NF-κB [23] και το IL-6/STAT μονοπάτι [24] και η υποξία μέσω της HIF-1α [25]. Ο αυξητικός παράγοντας TGF-β, μια κυτοκίνη που εκκρίνεται από καρκινικά κύτταρα και ινοβλάστες του στρώματος στο μικροπεριβάλλον του όγκου, θεωρείται ως πρωταρχικός επαγωγέας της EMT [26]. Μεταξύ των διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών, τα σημαντικότερα είναι τα Wnt [27-30], TGF-β [31-45], Hedgehog [46-50], Notch [51-55] και NF-κβ [10, 56-58]. Τα μονοπάτια αυτά ορχηστρώνουν ένα συντονισμένο και περίτεχνο γονιδιακό πρόγραμμα που απαιτείται για την απώλεια των επιθηλιακών χαρακτηριστικών από τα κύτταρα και τη μετέπειτα απόκτηση των αντίστοιχων μεσεγγυματικών. Δεδομένου ότι πολλά από τα παραπάνω μονοπάτια λαμβάνουν χώρα κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης, δεν είναι περίεργο το ότι τα καρκινικά κύτταρα τα χρησιμοποιούν για να επιτύχουν τους σκοπούς του.



Εικόνα 31: Σηματοδοτικά μονοπάτια για την Επιθηλιο-Μεσεγγυματική Μετατροπή (EMT). Η εξέλιξη της επιθηλιο-μεσεγγυματικής μετατροπής ρυθμίζεται από μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία μπορούν να συνεργαστούν μεταξύ τους προωθώντας την EMT [59].

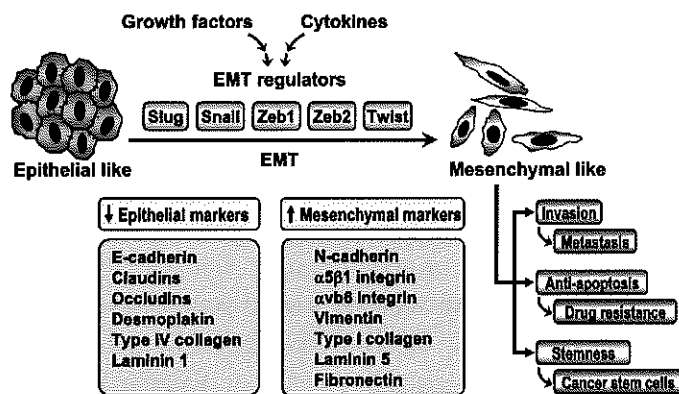
EMT και καρκίνος

Η αιτία για περισσότερο από 90% των θανάτων που συνδέονται με τον καρκίνο χαρακτηρίζεται από την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του πρωτογενούς όγκου να εισβάλλουν στον περιβάλλοντα ιστό, την ενδοαγγείωση ως μονοκύτταρα ή ως πολυκυτταρικές ομάδες, τη διάδοσή τους σε όλο το σώμα διά μέσου της ροής του αίματος ή της λεμφικής κυκλοφορίας, την εξαγγείωση και τέλος, τη δημιουργία δευτερογενών όγκων (μεταστάσεων) σε μακρινά όργανα [60]. Ο καταρράκτης αυτός των γεγονότων που οδηγεί στο σχηματισμό μεταστάσεων [20] ξεκινά με την απώλεια της ισχυρής διακυτταρικής προσκόλλησης με την αποδόμηση των διακυτταρικών συνδέσεων, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης,

την κατάργηση της επιθηλιακής πολικότητας και την ικανότητα σύνθεσης *de novo* συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας (ECM, extracellular matrix) και την τροποποίηση της προσκόλλησης σε αυτήν. Παράλληλα, τα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να αποκτήσουν επιπρόσθετες ικανότητες, ως μία προέκταση της κοινής EMT, που τους επιτρέπουν να δημιουργούν μεταστάσεις, όπως η αντίσταση στην απόπτωση, η προσκόλληση σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η αυτόνομη από την προσκόλληση ανάπτυξη και η έκκριση παραγόντων αγγειογένεσης [40].

Πολλές αναφορές υποστηρίζουν την ιδέα ότι κάθε φορά που διαμορφώνεται η λειτουργία ενός γονιδίου που εμπλέκεται στην EMT, επηρεάζεται και ο σχηματισμός των μεταστάσεων [61-63]. Κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι μοριακοί δείκτες για το χαρακτηρισμό της EMT [64]. Ο μετασχηματισμός των επιθηλιακών κυττάρων σε έναν πιο μεταναστευτικό και μεσεγχυματικό φαινότυπο χαρακτηρίζεται από την καταστολή της έκφρασης της E-καδερίνης και την έκφραση άλλων τύπων καδερινών, όπως η N-καδερίνη [65, 66]. Η αλλαγή αυτή είναι γνωστή ως “διακόπτης καδερίνης” (cadherin switch) [65] και είναι κατά κύριο λόγο το αποτέλεσμα της ενδοκυττάρωσης ή/και της μεταγραφικής ρύθμισης της έκφρασης των καδερινών μέσω ενός αριθμού μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι SNAIL1, SNAIL2 (SLUG), TWIST, ZEB1/EF1, ZEB2/SIP1 και E47 [64, 66, 67]. Η αποδόμηση των συνδέσεων προσκόλλησης (adherens junctions), η αποδιάταξη των συστατικών (διαμεμβρανικές πρωτεΐνες claudin και occludin και πρωτεΐνες ικριώματος όπως η ZO-1) των στενοσυνδέσμων ή στεγανών συνδέσμων (tight junctions) [68] που οδηγούν σε αυξημένη διηθητική και μεταναστευτική ικανότητα, καθώς και η αντοχή στην απόπτωση, χρησιμοποιούνται ως φαινοτυπικά κριτήρια της EMT. Καθώς καταστρέφονται οι διακυτταρικές συνδέσεις, οι καλά οργανωμένες επιθηλιακές στοιβάδες απελευθερώνουν μοναδιαία κύτταρα, στα οποία είναι μειωμένος ο επιθηλιακός δείκτης πολικότητας, η κορυφαία διαμεμβρανική πρωτεΐνη mucin-1 (MUC1), με αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να μην εμφανίζουν πολωμένη οργάνωση [69]. Η βασική ιντεγκρίνη $\alpha\beta4$ που μεσολαβεί την αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων με τη βασική λάμινα αντικαθίσταται από τη μεσεγχυματική ιντεγκρίνη $\alpha5\beta1$ [70] και η έκφραση και ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP2 και MMP9 επιτρέπουν την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας [40] και τη μετανάστευση των κυττάρων στο αίμα ή τη λεμφική κυκλοφορία. Σε μια δευτερεύουσα θέση, τα κύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο του οργάνου-στόχου, εξαγγειώνονται και μεταναστεύουν στο παρέγχυμα του οργάνου [71]. Στη θέση αυτή (“metastatic niche”), είτε εισέρχονται σε μία κατάσταση μακράς διάρκειας αδρανοποίησης ως ξεχωριστά διάσπαρτα κύτταρα όγκου (DTCs) [72] είτε ως πολυκυτταρικές μικρομεταστάσεις [73], οι οποίες τελικά πολλαπλασιάζονται για να σχηματίσουν μακροσκοπικές μεταστάσεις [74].

Η ιστολογική ομοιότητα της δευτερογενούς εστίας του όγκου με την πρωτογενή υποδεικνύει ότι η EMT που λαμβάνει χώρα κατά τη μετάσταση ακολουθείται από μια αντίστροφη διαδικασία μεσεγχυματικο - επιθηλιακής μετατροπής (MET) [75]. Η απόκτηση δηλαδή μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών είναι παροδική και αντιστρέφεται στη θέση της δευτερογενούς εστίας. Η ικανότητα αυτή των κυττάρων να εκφράζουν παράλληλα και επιθηλιακά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά ονομάστηκε “metastable phenotype” και η πλαστικότητα αυτή της ενδιάμεσης κατάστασης μπορεί να είναι και η αιτία της δυσκολίας παρατήρησης της EMT στην εξέλιξη της ογκογενετικής διαδικασίας. Υπάρχουν ωστόσο αρκετές δημοσιεύσεις που δείχνουν ακριβώς αυτήν την απεικόνιση, την παρουσία δηλαδή δεικτών της EMT στο μεταστατικό μέτωπο και όχι στο κυρίως σώμα του όγκου [76, 77]. Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές υποδεικνύουν ότι η EMT μπορεί να είναι κρίσιμη μόνο για τα αρχικά στάδια του μεταστατικού καταρράκτη, μέχρι δηλαδή την εξαγγείωση των κυττάρων του όγκου, αλλά όχι για τη μεταστατική ανάπτυξη στην απομακρυσμένη περιοχή, για την οποία είναι υπεύθυνη η αντίστροφη διαδικασία, MET [8, 9, 22]. Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν τη σημασία μιας αναστρέψιμης δυναμικής μεταξύ EMT/MET για την ανάπτυξη των μεταστάσεων [78].



Εικόνα 32: EMT-TFs, Επιθηλιακοί και μεσεγχυματικοί δείκτες της EMT.

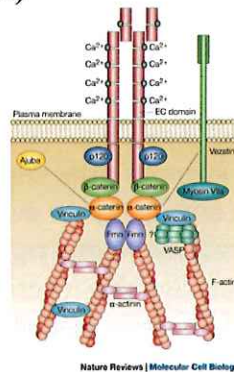
Partial EMT: συσχετισμός με την επούλωση πληγών (Wound Healing) [79]

Κατά την επούλωση των επιθηλιακών πληγών, τα κύτταρα στην άκρη του τραύματος κινούνται προς την κατεστραμμένη περιοχή για να αποκαταστήσουν την κανονική αρχιτεκτονική του ιστού σε μια διαδικασία που αναφέρεται ως επανα-επιθηλίωση. Δεδομένου ότι τα επιθηλιακά κύτταρα είναι αρκετά immotile, πρέπει να υποβάλλονται σε τέτοιες συμπεριφορικές αλλαγές ώστε να κινούνται ως μια συντονισμένη ομάδα κυττάρων για την επούλωση του τραύματος, και τελικά να επιστρέφουν στον αρχικό επιθηλιακό φαινότυπό τους για την ανασύσταση της ακεραιότητας του επιθηλίου. Τόσο τα basal όσο και τα suprabasal κύτταρα εμπλέκονται στη διαδικασία επούλωσης μέσω “partial EMT” [80]. Το partial EMT πιστεύεται ότι βασίζεται στη δράση του Snail2 που βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μονοπατιού της κινάσης 5 που ρυθμίζεται από τον υποδοχέα του αυξητικού επιδερμικού παράγοντα EGFR (epidermal growth factor receptor EGFR-extracellular signal-regulated kinase 5 pathway) στο δέρμα του ποντικού [81]. Ως εκ τούτου, η επούλωση των πληγών είναι ελαττωματική σε ενήλικα ποντίκια που παρουσιάζουν έλλειψη του Snail2 [82]. Η σηματοδότηση μέσω του υποδοχέα EGFR προάγει επίσης την επανεπιθηλίωση (epithelialization) σε διαγονιδιακούς στη N-ακετυλογλυκοζαμινυλτρανσφεράση V (GnT-V) ποντικούς μέσω της θετικής ρύθμισης στην έκφραση των Snail και Twist [83]. Επιπλέον, μόρια καθοδήγησης των αξόνων (axon guidance molecules) παίζουν σημαντικό ρόλο σε αυτή τη μερική μετάβαση κατά την επούλωση των πληγών στο δέρμα του ποντικού. Ως εκ τούτου, αυξημένη έκφραση της EphrinB1 στα basal και suprabasal κύτταρα ρυθμίζει αρνητικά τα μέλη των συμπλόκων προσκόλλησης των κυττάρων, χαλαρώνει τις συνδέσεις για να απελευθερωθεί η τάση και να επιτραπεί η κυτταρική κίνηση [84]. Σε μύγες στο στάδιο της λάρβας, η Netrin A ελέγχει την EMT στο πλακάδες επιθήλιο με μείωση της έκφρασης του Frazzled, ενός μέλους της οικογένειας των επιφανειακών υποδοχέων που καταστρέφονται στο καρκίνωμα του παχέος εντέρου (DCC) και οι οποίοι είναι γνωστό ότι σταθεροποιούν τους συνδέσμους προσκόλλησης μέσω της φωσφορυλίωσης της moesin [85]. Αυτές οι μελέτες παρέχουν πληροφορίες για την επιθηλιακή διάσπαση κατά τη διάρκεια της EMT, η οποία είναι σημαντική δεδομένου ότι η Netrin υπερεκφράζεται σε διάφορους καρκίνους και προκαλεί πολλαπλασιασμό και μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης της σηματοδότησης YAP [86]. Στον πνεύμονα, η επούλωση των πληγών συσχετίζεται επίσης με έναν φαινότυπο EMT, που χαρακτηρίζεται από τη μείωση των διακυτταρικών συνδέσεων, την απόκτηση μεταναστευτικών ιδιοτήτων και την έκφραση της βιμεντίνης. Ωστόσο, αυτή η παροδική φαινοτυπική αλλαγή περιορίζεται μόνο στα βασικά κύτταρα του αεραγωγού και δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι τα κύτταρα των κυψελίδων τύπου II, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή και την έκκριση του επιφανειοδραστικού υγρού για τη μείωση της επιφανειακής τάσης, υποβάλλονται σε EMT ή υιοθετούν μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά. Αντίθετα, τα κλασσικά (ή αλλιώς clara) κύτταρα των αεραγωγών (bronchiole airways) εμφανίζονται να υποβάλλονται σε μία μεταβατική διαδικασία EMT κατά την αναγέννηση του βρογχιολικού επιθηλίου. Τα κύτταρα clara δρουν ως

βλαστοκύτταρα και μπορούν τελικά να διαφοροποιηθούν σε ciliated κύτταρα κατά τη διάρκεια της επιδιόρθωσης του ιστού των πνευμόνων [87]. Η επούλωση τραυμάτων συχνά διερευνάται χρησιμοποιώντας το μοντέλο της ραχιαίας επούλωσης στη Δροσόφιλα, καθώς τα συμβάντα που μοιάζουν με EMT και MET μεσολαβούν κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Κατά τη διάρκεια του ραχιαίου κλεισίματος, οι επιδερμικές πλευρές -amnioserosa- μεταναστεύουν ώστε να εκτείνονται πέρα από το χάσμα στην επιδερμίδα και καθώς η επιδερμίδα επεκτείνεται σταδιακά στην εξωτερική επιφάνεια της ραχιαίας περιοχής, το μεταβατικό amnioserosa επιθήλιο εσωτερικεύεται. Τα πρωτόπορα επιδερμικά κύτταρα στην κορυφαία ακμή υφίστανται partial EMT, σχηματίζοντας φιλοπόδια και λαμελιπόδια που προάγουν ενεργά τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω της επαγόμενης από τις Cdc42/Rac ενεργοποίησης της συσταλτικότητας της ακτομυοσίνης. Το σύμπλοκο κορυφο-βασικής πολικότητας Scribble (Scribble apico-basal polarity complex), στρατολογεί την p21-activated kinase (PAK) στην πρόσθια άκρη των πολωμένων κυττάρων προωθώντας την κατευθυνόμενη μετανάστευσή τους. Όταν ολοκληρωθεί η επούλωση της πληγής, η PAK στρατολογεί το σύμπλοκο Scrib για την αποκατάσταση των septate junctions και της βασικής πολικότητας [88]. Η GRH, ομόλογη των GRHL-1, -2 και -3 στα θηλαστικά, ρυθμίζει την επούλωση του τραύματος στη Δροσόφιλα μέσω της δημιουργίας των septate συνδέσμων [89]. Η GRHL3 εμπλέκεται στην ομοιοστάση του επιθηλίου στα ποντίκια [90] και συμβάλλει στην επούλωση του τραύματος ενεργοποιώντας την τρανσγλουταμινάση 1 και την RhoGEF19 [91]. Η GRHL2 μπορεί να αντισταθμίσει την απώλεια της GRHL3 επουλώνοντας τα τραύματα των ακρωτηριασμένων πίσω άκρων σε έμβρυα ποντικών, υποδεικνύοντας ότι υπάρχει αλληλεπικάλυψη της δράσης των πρωτεϊνών αυτών [92]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, παρόλο που η EMT στον καρκίνο είναι επιβλαβής διαδικασία, η EMT που προκαλείται για την επούλωση του τραύματος είναι επωφελής. Επομένως, η ανάλυση των ομοιοτήτων και των διαφορών μεταξύ αυτών των δύο τύπων EMT είναι απαραίτητη για τον καλύτερο σχεδιασμό συγκεκριμένων θεραπειών [93]. Παρόλα αυτά, ορισμένες απόκρισεις EMT-επούλωσης μπορεί να είναι επιβλαβείς, όπως η opacification of the posterior capsular (PCO), μία σημαντική επιπλοκή μετά από χειρουργική επέμβαση για τη θεραπεία του καταρράκτη [94] ή οι υπερβολικές θεραπευτικές αποκρίσεις που οδηγούν σε fibrosis και ουλές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ελαττωματική επούλωση καθώς και η εμφάνιση αυξημένων αριθμών ουλών, συσχετίστηκαν πρόσφατα με παρατεταμένη φλεγμονή, επισημαίνοντας τη στενή σύνδεση μεταξύ μιας παρατεταμένης φλεγμονώδους απόκρισης και της εξέλιξης της fibrosis [95].

7. Μόρια Διακυτταρικής Προσκόλλησης

Το γονίδιο της E-Καδερίνης (CDH1)



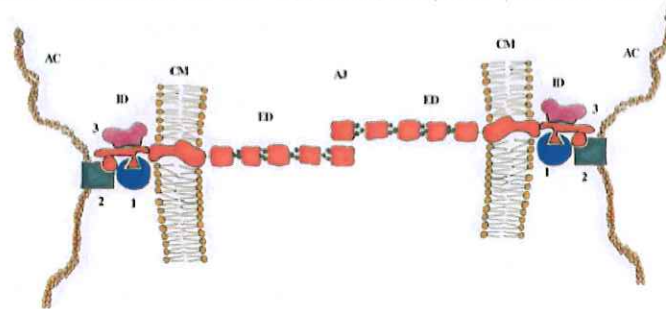
Εικόνα 33: Δομή της E-καδερίνης.

Η E-καδερίνη ανήκει στην υπερ-οικογένεια των εξαρτώμενων από το ασβέστιο, με ομοφυλικό μηχανισμό, μορίων προσκόλλησης. Τα πιο γνωστά μέλη αυτής της οικογένειας είναι η E-καδερίνη που εκφράζεται στα επιθηλιακά κύτταρα, η N-καδερίνη που βρίσκεται στο νευρικό, στο μυϊκό ιστό και στους ινοβλάστες, η R-καδερίνη που εντοπίζεται στα οστά και στον προσεγέφαλο και η VE-καδερίνη που απαντάται στα ενδοθηλιακά κύτταρα [64]. Η ποικιλία των διάφορων μορφών καδερίνης καθώς και τον προτύπων έκφρασης τους αντανακλά το σημαντικό ρόλο τους στην αλληλεπίδραση των κυττάρων κατά την ανάπτυξη, διαδικασία στην οποία ρυθμίζουν την κίνηση των κυττάρων, τη διαίρεση τους καθώς και τη διαμόρφωση των ιστικών ορίων [96]. Η υπερ-οικογένεια των εξαρτώμενων από το ασβέστιο καδερινών χωρίζονται σε δύο ομάδες, την ομάδα I και την ομάδα II. Και οι δύο ομάδες χαρακτηρίζονται από μία εξωκυττάρια δομή με πέντε επαναλήψεις (EC, External Cadherin), EC1-EC5, ωστόσο οι καδερίνες της ομάδας I (E-, N-, P- και R- καδερίνες) διαφέρουν από αυτές της ομάδας II στο ότι φέρουν ένα συντηρημένο τριπεπτίδιο (ιστιδίνη-αλανίνη-βαλίνη, HAV) στην πρώτη εξωκυττάρια επανάληψη της καδερίνης (EC1).

Η E-καδερίνη είναι πρότυπο μέλος των κλασικών καδερινών τύπου I και εντοπίζεται στους συνδέσμους προσκόλλησης (AJs) των κυττάρων, δομές που μεσολαβούν στις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Αρχικά ανακαλύφθηκε σε έμβryo ποντικού και χαρακτηρίστηκε ως πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας εξαρτώμενη από Ca^{2+} που μεσολαβεί στην προσκόλληση των κυττάρων στα πρώιμα βλαστομερή [97, 98]. Αποσιώπηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την E-καδερίνη στον ποντικό οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα, καθώς χάνεται η ικανότητα δημιουργίας επιθηλίου το οποίο απαιτείται για την ανάπτυξη των πολυκυτταρικών οργανισμών [97, 98]. Η E-καδερίνη είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη μονού περάσματος που περιέχει πέντε εξωκυτταρικές επαναλήψεις που μεσολαβούν στην εξαρτώμενη από το ασβέστιο ομοφυλική αλληλεπίδραση με τα αντιτιθέμενα μόρια των γειτονικών κυττάρων [99]. Περιέχει το συντηρημένο εξελικτικά τριπεπτίδιο (ιστιδίνη-αλανίνη-βαλίνη, HAV) στην πρώτη εξωκυττάρια επανάληψή της EC1. Το τριπεπτίδιο αυτό θεωρείται ότι είναι υπεύθυνο για τον μηχανισμό της ομοφυλική πρόσφυσης [100, 101]. Επιπλέον, ένα συντηρημένο εξελικτικά κατάλοιπο τρυπτοφάνης στην EC1 εξωκυττάρια περιοχή της πρωτεΐνης απαιτείται για την πρόσδεση των καδερινών [102, 103]. Η EC2 αλληλουχία, παρότι δεν περιέχει κατάλοιπα ειδικά για την ομοφυλική πρόσδεση του μορίου, ωστόσο είναι σημαντική για τη λειτουργία της EC1 [104]. Οι αλληλουχίες EC 3-5 πιθανά εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια [105] σχηματίζοντας έτσι ένα σύμπλοκο που διευκολύνει την κυτταρική κινητικότητα, τη διήθηση και τη μετάσταση των κυττάρων [105, 106]. Το κυτταροπλασματικό μέρος των κλασικών καδερινών είναι συντηρημένο εξελικτικά. Η κυτταροπλασματική περιοχή της E-καδερίνης δεσμεύεται με μέλη της οικογένειας των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών της κατενίνης, και συγκεκριμένα με τις β -κατενίνη και ρ 120-κατενίνη, οι οποίες συνδέουν το

πολυπρωτεϊνικό αυτό σύμπλοκο με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω της α -κατενίνης. Άλλος ένας παράγοντας που προσδένεται στις κλασσικές καδερίνες είναι η πρωτεΐνη presenillin 1 [107], μία γ -σεκρετάση η οποία διασπά τις καδερίνες στη μεμβράνη και απελευθερώνει το καρβοξυτελικό τμήμα τους (CTF) στο κυτταρόπλασμα. Η συσσωμάτωση των συμπλοκών καδερίνης-κατενίνης σε γειτονικά κύτταρα οδηγεί στη συνέχεια σε τοπική αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που απαιτείται για τη συναρμολόγηση των AJs. Η διατήρηση των AJs εξαρτάται επίσης από τον δυναμικό κυτταροσκελετό της ακτίνης. Πολλοί ρυθμιστές της ακτίνης, όπως το σύμπλεγμα Arp2/3 και τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Ena/VASP και Wiskott-Aldrich (WASP) εντοπίζονται στα AJs και η απορρύθμιση της λειτουργίας τους οδηγεί σε απώλεια της ακεραιότητας των συνδέσεων, δηλώνοντας μια στενή αλληλεπίδραση μεταξύ της δυναμικής των συνδέσεων προσκόλλησης και του κυτταροσκελετού της ακτίνης [108].

Το ανθρώπινο επιθηλιακό γονίδιο E-καδερίνη, CDH1 χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 16q22.1. Το γονίδιο πλήρους μήκους απομονώθηκε το 1995 [109]. Περαιτέρω ανάλυση του γονιδίου έδειξε ότι υπάρχουν 15 εσώνια με μήκος που κυμαίνεται από 120bp (εσώνιο 4) έως 65kb (εσώνιο 2). Τα όρια εσωνίου-εξωνίου είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένα εξελικτικά σε σύγκριση με άλλες "κλασσικές καδερίνες" και στην 5' περιοχή του ιντρονίου 1 αναγνωρίστηκε μία υψηλής πυκνότητας νησίδα CpG δινουκλεοτιδίων, η οποία έχει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής [109]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το ανθρώπινο γονίδιο της P-καδερίνης βρίσκεται μόλις 32kb ανοδικά του γονιδίου της E-καδερίνης [110] και επίσης το γονίδιο της M-καδερίνης χαρτογραφείται επίσης στο χρωμόσωμα 16, στη χρωμοσωμική περιοχή 16q24.1-qter [111]. Η συσώρευση των γονιδίων των καδερινών στο χρωμόσωμα 16 οδηγεί στη σκέψη πως τα γονίδια των καδερινών προέρχονται πιθανώς από γονιδιακό διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου, ενώ η πιθανή συν-εξέλιξη μπορεί να εξηγηθεί από τη μετατροπή των γονιδίων αυτών [109].



Εικόνα 35: Σχηματική αναπαράσταση της ομοτυπικής πρόσδεσης της E-καδερίνης στα AJ. CM: κυτταροπλασματική μεμβράνη, AJ: adherens junction, σύνδεσμος προσκόλλησης, ED: εξωκυτταρική περιοχή της πρωτεΐνης, ID: ενδοκυτταρική περιοχή, AC: κυτταροσκελετός της ακτίνης, 1: β -κατενίνη, 2: α -κατενίνη, 3: p120 [112].

Ο ρόλος της E-καδερίνης στα φυσιολογικά κύτταρα

Η έκφραση της E-καδερίνης στην εμβρυϊκή ανάπτυξη ξεκινά από πολύ νωρίς, μόλις στο στάδιο των δύο κυττάρων [113, 114]. Η επιθηλιακή διαφοροποίηση και η πόλωση (θεμελιώδεις διεργασίες για τη διαφοροποίηση των κυττάρων) εμφανίζονται νωρίς κατά την οντογένεση, στο στάδιο του μοριδίου, όταν το έμβρυο συμπιέζεται και κάθε κύτταρο αποκτά πολικότητα κατά μήκος του κορυφαίου-βασικού (apico-basal) άξονα αποκτώντας επιθηλιακό φαινότυπο. Η E-καδερίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόσφυση των βλαστομερών και τον ορισμό της πολικότητας στα κύτταρα του πρώιμου εμβρύου [115]. Εκφράζεται και εντοπίζεται στη μεμβράνη ακόμη και πριν από τη συμπίεση του μοριδίου (morula). Αρχικά, κατανέμεται με μη πολικό τρόπο κατά μήκος της μεμβράνης των κυττάρων και δεν παρουσιάζει συγκολλητική λειτουργία [97, 116]. Ο μηχανισμός που καθιστά λειτουργική την E-καδερίνη είναι προς το παρόν άγνωστος, αλλά είναι γνωστό ότι περιλαμβάνει σίγουρα τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης [117]. Η ελεγχόμενη επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετατροπή είναι η σημαντικότερη εκδήλωση της λειτουργίας της E-καδερίνης κατά

την ανάπτυξη [6] Η διαμεσολαβούμενη από τις καδερίνες προσκόλληση είναι μια δυναμική διαδικασία που ρυθμίζεται από διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι οι καδερίνες δεν είναι μόνο στόχοι για μονοπάτια σηματοδότησης που ρυθμίζουν την πρόσφυση και προσκόλληση των κυττάρων, αλλά μπορούν να αποστείλουν και οι ίδιες σήματα, ρυθμίζοντας έτσι βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η κυτταρική διαφοροποίηση [118-120]. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η E-καδερίνη συσσωρεύεται σε περιοχές επαφής των κυττάρων μεταξύ τους, συνενώνεται σε μακρομοριακά σύμπλοκα για να σχηματίσει τις συνδέσεις προσκόλλησης (AJs) και συνεργάζεται μέσω βοηθητικών μορίων με το φλοιώδη δακτύλιο της ακτίνης (subcortical ring of actin) προς σχηματισμό των κορυφαίων adherens zonula (ZA) [121].

Ο ρόλος της E-καδερίνης στα καρκινικά κύτταρα

Ως κύριος ρυθμιστής του επιθηλιακού φαινοτύπου, η E-καδερίνη είναι απαραίτητη για τη συνολική συντήρηση και την ομοιόσταση των πολωμένων επιθηλιακών μονοστοιβάδων. Η έκφρασή της ρυθμίζεται από πλήθος γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών που σχετίζονται με τον καρκίνο και η λειτουργία της διαμορφώνεται ανάλογα με τις μηχανικές δυνάμεις στις συνδέσεις, με την άμεση δέσμευση και φωσφορύλιωση των βοηθητικών πρωτεϊνών (που ονομάζονται συνολικά κατενίνες), με την ενδοκυττάρωση, την ανακύκλωση και την αποικοδόμηση του μορίου, καθώς επίσης και με πολλαπλές οδούς σηματοδότησης και αναπτυξιακές διεργασίες, όπως η επιθηλιο-μεσεγγυματική μετατροπή (EMT) [121]. Τα κακοήθη καρκινικά κύτταρα γενικά χαρακτηρίζονται από τη φτωχή διακυτταρική προσκόλληση, την απώλεια της διαφοροποιημένης επιθηλιακής μορφολογίας και την αυξημένη κυτταρική κινητικότητα. Μείωση ή αποσιώπηση της έκφρασης της E-καδερίνης, μεταλλάξεις στην αλληλουχία του γονιδίου της, ή άλλοι μηχανισμοί που παρεμποδίζουν την ακεραιότητα των συνδέσεων προσκόλλησης, παρατηρούνται στα καρκινικά κύτταρα. Στους ανθρώπινους όγκους, η απώλεια της κυτταρικής προσκόλλησης που προκαλείται από την έλλειψη της E-καδερίνης συσχετίζεται με την απώλεια της επιθηλιακής μορφολογίας των κυττάρων και με την απόκτηση μεταστατικού δυναμικού [114]. Έτσι, το γονίδιο αυτό έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικό και του έχει επίσης ανατεθεί ρόλος καταστολέα έναντι της μετάστασης. Πρόσθετα δεδομένα υποστηρίζουν το ρόλο αυτό. Για παράδειγμα, η απώλεια ετεροζυγωτίας στην περιοχή 16q του χρωμοσώματος ανιχνεύεται συχνά σε μεταστατικές κακοήθειες που προέρχονται από το ήπαρ, τον προστάτη και το μαστό [122]. Επίσης, μεταλλάξεις στο γονίδιο της CDH1 έχουν περιγραφεί σε έναν αριθμό ανθρώπινων καρκίνων συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του στομάχου, του ενδομητρίου, των ωοθηκών και του θυρεοειδούς [123, 124]. Πολλές ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν εξετάσει τις μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου της E-καδερίνης σε ανθρώπινες κακοήθειες. Σε σχεδόν όλους τους εξεταζόμενους non-colonic όγκους, τα πρότυπα αλλαγών στην έκφραση αυτού του γονιδίου είναι παρόμοια με εκείνα που παρατηρούνται στον καρκίνο του παχέος εντέρου, δηλαδή η απώλεια της πρωτεϊνικής έκφρασης συσχετίζεται θετικά με την απώλεια του βαθμού της διαφοροποίησης του όγκου. Η έκφραση της E-καδερίνης διατηρείται στους περισσότερους διαφοροποιημένους όγκους, συμπεριλαμβανομένων του καρκίνου του δέρματος, του οισοφάγου, του εγκεφάλου, του αυχένα, του μαστού, του πνεύμονα, του ήπατος, του παγκρέατος, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου και του προστάτη, αλλά φαίνεται να υπάρχει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της E-καδερίνης και του βαθμού κακοήθειας ή την επιβίωση των ασθενών [125, 126]. Η απώλεια της έκφρασης συσχετίζεται με υψηλό βαθμό αποδιαφοροποίησης, προχωρημένο στάδιο της διαταραχής και με κακή γενικότερη πρόγνωση [127]. Έχει αναφερθεί ότι οι αδρανοποιητικές μεταλλάξεις του γονιδίου της E-καδερίνης είναι ιδιαίτερα συχνές στα διηθητικά καρκινώματα του μαστού (infiltrating lobular breast carcinomas) [128] και στα διάχυτα γαστρικά καρκινώματα [123, 124]. Αυτές οι μεταλλάξεις εμφανίζονται κυρίως σε συνδυασμό με απώλεια της

ετεροζυγωτικότητας του αλληλόμορφου αγρίου τύπου. Μία άλλη ενδιαφέρουσα δημοσίευση σχετικά με την έκφραση της E-καδερίνης αποδεικνύει την επανεμφάνισή της σε μεταστατικά κύτταρα [129]. Σημαντική αύξηση στην εκ νέου έκφραση της E-καδερίνης, μαζί με την α - και β -κατενίνη παρατηρήθηκε σε μεταστατικές εναποθέσεις πρωτοπαθών λοβιακών καρκινικών κυττάρων του μαστού (metastatic deposit of primary lobular breast cancers). Οι πρωτεΐνες αυτές έλειπαν από τους πρωτογενείς όγκους της ίδιας προέλευσης. Αυτό υποδηλώνει ότι η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη έχει έναν ρόλο ακόμα και πριν ξεκινήσει η διαδικασία εισβολής των κυττάρων στους παρακείμενους ιστούς. Τα ευρήματα αυτά αποκαλύπτουν μια άλλη διάσταση των μορίων προσκόλλησης στις μεταστάσεις: η αποκατάσταση της κυτταρικής επαφής μπορεί να αποτρέψει την απόπτωση. Ο μηχανισμός παρεμπόδισης της μειωμένης έκφρασης της E-καδερίνης στους όγκους είναι μία από τις μελλοντικές προσεγγίσεις στη γονιδιακή θεραπεία. Η στόχευση αυτού του μορίου είναι μία λύση για την αποφυγή του μεταστατικού δυναμικού σχεδόν σε κάθε όγκο επιθηλιακής φύσης. Παρόλα αυτά, δεν είναι μια εύκολη πρακτική δεδομένου ότι η μείωση της έκφρασής της προκαλείται από πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς, που κυμαίνονται από μεταλλάξεις και διαγραφές μέχρι καταστολή της γονιδιακής μεταγραφής και διέγερση της μεταγωγής σήματος του σχηματισμού συμπλόκου προσκόλλησης με την E-καδερίνη (signal transduction stimulation of E-cadherin adhesion complex formation) [112].

Παράγοντες που επηρεάζουν την απώλεια της έκφρασης της E-καδερίνης στην ογκογενετική διαδικασία - Απορρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της E-καδερίνης στον καρκίνο [130]

Η μειωμένη έκφραση της E-καδερίνης θεωρείται ως ένα από τα κύρια μοριακά συμβάντα που εμπλέκονται στη δυσλειτουργία του συστήματος προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους, ενεργοποιώντας την εισβολή των καρκινικών κυττάρων στους παρακείμενους ιστούς και τη μετάσταση [112]. Εκτός από τον καλά μελετημένο ρόλο που διαδραματίζει στα φυσιολογικά κύτταρα, αυτό το εξαιρετικά συντηρημένο εξελικτικά γονίδιο μπορεί να διαδραματίσει μείζονα ρόλο και στο μετασχηματισμό των κυττάρων και ειδικότερα στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του όγκου. Η καταστολή της έκφρασης του γονιδίου ευθύνεται για τη δυσλειτουργία στη διακυτταρική προσκόλληση. Οι περισσότεροι όγκοι χαρακτηρίζονται από ανώμαλη κυτταρική αρχιτεκτονική και η απώλεια της ακεραιότητας των ιστών μπορεί να οδηγήσει σε τοπική διήθηση των κυττάρων. Έτσι, η απώλεια της λειτουργίας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης E-καδερίνης συσχετίζεται με αυξημένη διεισδυτικότητα και μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων [131], με αποτέλεσμα να αναφέρεται συχνά τόσο ως ογκοκατασταλτικό όσο και ως αντι-μεταστατικό γονίδιο [131-134]. Έχει τεκμηριωθεί πλέον καλά πως οι επιθηλιακοί όγκοι χάνουν την E-καδερίνη εν μέρει ή πλήρως καθώς προχωρούν προς την κακοήθεια [135]. Απώλεια της E-καδερίνης έχει παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του στομάχου, του μαστού, του παχέος εντέρου, του εγκεφάλου, του αυχένα, του τραχήλου της μήτρας και του πνεύμονα [126, 136].

Οι διαφορετικοί μηχανισμοί απενεργοποίησης και καταστολής της έκφρασης της E-καδερίνης που εμπλέκονται σε κακοήθεις όγκους περιλαμβάνουν:

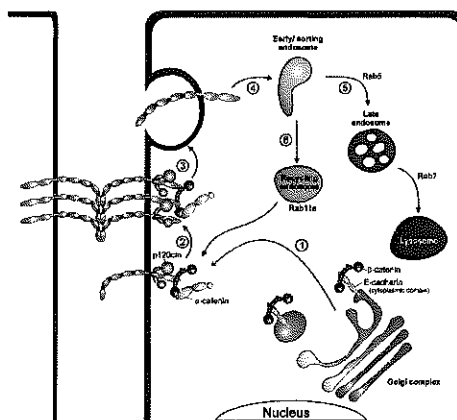
i) *Απώλεια ετεροζυγωτίας (LOH) και μεταλλάξεις απενεργοποίησης στην αλληλουχία του γονιδίου.* Μια σειρά μελετών έδειξε συχνή LOH στη χρωμοσωμική περιοχή 16q στον καρκίνο του στομάχου, του ήπατος, του προστάτη, του οισοφάγου [135] και του μαστού [137]. Οι μεταλλάξεις απενεργοποίησης στο γονίδιο της E-καδερίνης περιγράφηκαν για πρώτη φορά στον σποραδικό [138] και το διάχυτο (diffuse) γαστρικό καρκίνο [139], ενώ μεταλλάξεις στο γονίδιο της E-καδερίνης είναι σπάνιες σε καρκίνο της ουροδόχου κύστης, του παχέος εντέρου, του ενδομητρίου, του πνεύμονα, του οισοφάγου, των ωοθηκών, του θυρεοειδούς και του ενδοηπατικού χολαγγειοκαρκινώματος (intrahepatic cholangiocarcinoma) [137, 140-143].

ii) *Επιγενετική σίγηση του γενετικού τόπου της E-καδερίνης με υπερ-μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου* [99, 144]. Τα DNMTs στοχεύουν για μεθυλίωση αμινοξικά κατάλοιπα κυτοσίνης σε νησίδες δινοουκλεοτιδίων CpG στην 5' περιοχή ανοδικά της αλληλουχίας του υποκινητή του γονιδίου [109, 145-148] και έχουν πρόσφατα ενοχοποιηθεί για την καταστολή της έκφρασης της E-καδερίνης σε φυσιολογικές [149-152] αλλά και παθολογικές καταστάσεις [153-161]. Το ετερογενές πρότυπο μεθυλίωσης του υποκινητή του γονιδίου είναι δυναμικό και ασταθές, και μεταβάλλεται ανάμεσα στα δύο αλληλόμορφα [145, 162, 163].

iii) *Αυξημένη έκφραση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που καταστέλλουν την έκφραση της πρωτεΐνης αλληλεπιδρώντας με αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία του γονιδίου, τα E-στοιχεία (E-boxes)* [99]. Μεταξύ των παραγόντων αυτών περιλαμβάνονται οι SNAI1, SNAI2/SLUG, TWIST1, SIP-1/ZEB2 [164] και dEF-1/ZEB1 [165]. Το SNAI1 και το TWIST1, έχουν θεωρηθεί οι κύριοι ρυθμιστές της EMT [9, 164, 166]. Υπερέκφραση του Snail, του Twist και του Slug σε επιθηλιακά κύτταρα καταστέλλει την E-καδερίνη, επάγει έναν πιο επιθετικό φαινότυπο [167, 168] και συνήθως η έκφραση του αυξάνεται ανάλογα με την κακοήθεια [167, 169-171].

iv) *Ενδοκύτωση και πρωτεολυτική επεξεργασία της E-καδερίνης*. Εκτός από τη γενετική και επιγενετική σίγηση της E-καδερίνης υπάρχουν πολλοί ακόμα μηχανισμοί που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικοί τρόποι για την αναστολή ή την απορρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας της E-καδερίνης υπό παθολογικές συνθήκες. Η E-καδερίνη απομακρύνεται από την πλασματική μεμβράνη με ενδοκυττάρωση και στη συνέχεια ανακυκλώνεται σε νέες θέσεις επαφών μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Η μη φυσιολογική ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων, όπως τα c-Met, Src και EGFR, οδηγεί στη στρατολόγηση της E3 λιγάσης της ουβικουϊτίνης Hakai και στην επακόλουθη εσωτερίκευση της E-καδερίνης από τη μεμβράνη και την εξαρτώμενη από την ουβικουϊτίνη αποικοδόμησή της [172, 173]. Η MDM2, μια E3 λιγάση της ουβικουϊτίνης, γνωστή ως κύριος ανταγωνιστής του p53, αναφέρθηκε επίσης πρόσφατα ότι επάγει και αυτή την αποικοδόμηση της E-καδερίνης [174]. Άλλα ένζυμα, όπως η καλπαΐνη (calpain) και οι κασπάσες, διασπούν την E-καδερίνη εμποδίζοντας έτσι τον σχηματισμό σταθερών AJs [175-177]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πρωτεολυτική διάσπαση της E-καδερίνης επαγόμενη από τη στρωμελυσίνη ή αλλιώς μεταλλο-πρωτεϊνάση MMP3 [178].

v) *“Cadherin switching” κατά τη διάρκεια εξέλιξης του καρκίνου*. Η απώλεια της έκφρασης της E-καδερίνης στις καρκινικές κυτταρικές σειρές και στους όγκους των ιστών συχνά συνδέεται με την επαγόμενη αύξηση της έκφρασης των μεσεγγυματικών καδερινών, όπως η N-καδερίνη και η καδερίνη 11, ένα φαινόμενο που γενικά αναφέρεται ως “μετατροπή καδερινών” [39, 66, 179, 180].

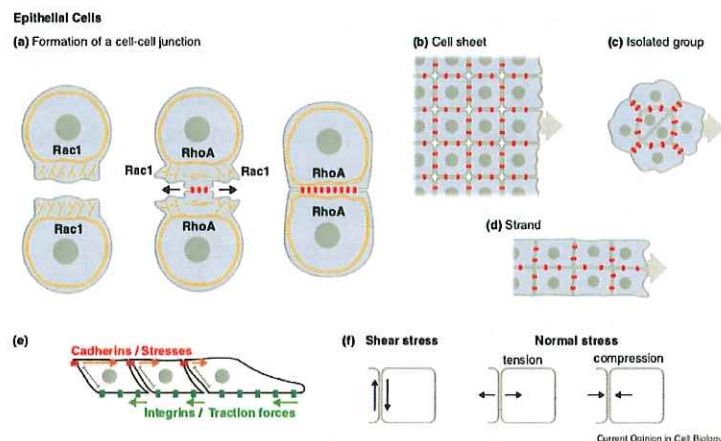


Εικόνα 37: Σύνθεση, ενδοκύτωση και ανακύκλωση της E-καδερίνης. Η b-κατενίνη συσχετίζεται με την E-καδερίνη νωρίς στο βιοσυνθετικό μονοπάτι. Τα σύμπλοκα καδερίνης-κατενίνης προέρχονται από το σύμπλεγμα Golgi (1) και μεταφέρονται προς τη basolateral κυτταρική επιφάνεια όπου συνδέονται με τις p120ctn και α-κατενίνη. Στην πλασματική μεμβράνη ολοκληρώνεται η λειτουργική σύνθεση του πολυπρωτεϊνικού αυτού συμπλέγματος (2). Έπειτα από την ενδοκύτωση (3), η E-καδερίνη μεταφέρεται σε ένα πρώιμο ενδοσώμα (early

sorting endosome) (4) από όπου θα ανακυκλωθεί είτε πίσω σε νέα θέση στην πλασματική μεμβράνη μέσω του ενδοσώματος ανακύκλωσης (6) το οποίο είναι εμπλουτισμένο με την Rab11a GTPάση, είτε θα κατευθυνθεί προς το ώριμο ενδόσωμα (5) το οποίο θα περάσει μέσα από κυτταρικά διαμερίσματα εμπλουτισμένα σε Rab5 και Rab7 με σκοπό την τελική διάσπαση και πρωτεόλυσή της στο λυσόσωμα [99].

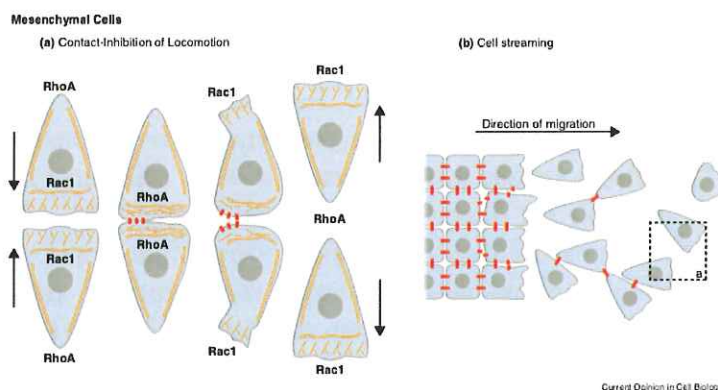
E-Καδερίνη και μικρές Rho GTPάσες

Αν και οι μικρές Rho GTPάσες, CDC42, Rac1 και RhoA είναι καλύτερα γνωστές για τον ρόλο τους στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της κατευθυνόμενης μετανάστευσης των κυττάρων [181], υπάρχει επίσης ένα σημαντικό σύνολο ενδείξεων που εμπλέκουν αυτές τις μικρές GTPάσες στη ρύθμιση της διακυτταρικής προσκόλλησης [182, 183]. Έχει προταθεί ότι η ομοφυλική αλληλεπίδραση των E-καδερινών είναι το πρώτο βήμα στη συναρμολόγηση των AJ και ότι ο σχηματισμός των λαμελλιποδίων, ο οποίος ενεργοποιείται από τη Rac1, μπορεί να διευκολύνει την αρχική επαφή κυττάρου-κυττάρου τοποθετώντας μόρια E-καδερίνης σε σημεία που βρίσκονται κοντά σε γειτονικά κύτταρα [184]. Μόλις δημιουργηθούν οι πρώτες επαφές, η συντονισμένη δράση των Rho και Rac ρυθμίζει τη σταθεροποίηση των προσκολλήσεων αυτών που προκαλούνται από την καδερίνη [185, 186]. Ωστόσο, είναι σαφές ότι πολλαπλά μονοπάτια σηματοδότησης καθοδικά των Rac και των Rho μπορούν να ρυθμίσουν τα AJs, οδηγώντας είτε σε σταθεροποίηση είτε σε αποδιοργάνωση της ακεραιότητας της προσκόλλησης. Για παράδειγμα, οι Sahai και Marshall ταυτοποίησαν δύο τελεστές της RhoA με αντίθετες επιδράσεις στους AJs: ο εξαρτώμενος από την mDia πολυμερισμός της ακτίνης σταθεροποιεί τα AJs, ενώ η συσταλτικότητα της ακτομυοσίνης που μεσολαβείται από τη ROCK διαταράσσει την ακεραιότητα των AJs [187]. Οι μικρές Rho GTPases έχουν επίσης δείξει ότι ρυθμίζουν τα AJs με μηχανισμούς που δεν περιλαμβάνουν την άμεση επίδραση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Για παράδειγμα, το CDC42 έχει αναφερθεί ότι έχει κρίσιμο ρόλο στην αποσυναρμολόγηση των AJs και την απόκτηση ενός μεσεγχυματικού και πιο μεταναστευτικού φαινοτύπου [173]. Η διακυτταρική προσκόλληση που μεσολαβείται από την καδερίνη ρυθμίζει επίσης τη δραστηριότητα άλλων μικρών Rho GTPασών [188]. Έτσι, οι μικρές Rho GTPάσες δρουν για να συντονίσουν τα σήματα που ενεργοποιούνται από εξωκυτταρικά ερεθίσματα, είτε μέσω των αλληλεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου είτε μέσω κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας (ECM) και εννοχηστρώνουν επακόλουθες μεταβολές στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον έλεγχο της κατευθυνόμενης κυτταρικής μετανάστευσης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων στους ιστούς.



Εικόνα 39: Καδερίνες στα επιθηλιακά κύτταρα. (a) Αλληλεπίδραση μεταξύ δύο γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων. Οι “εξερευνητικές” προεξοχές που οδηγούνται από τη δραστηριότητα της Rac1 προάγουν το σχηματισμό μιας αρχικής επαφής. Στη θέση επαφής, η RhoA ελέγχει τη μετατροπή της διακλαδισμένης ακτίνης σε παράλληλες δέσμες ακτομυοσίνης. Σταδιακά, η διακυτταρική επαφή επεκτείνεται σταθεροποιώντας το AJ. (b-d) Διαφορετικοί τύποι συλλογικής επιθηλιακής μετανάστευσης κυττάρων: φύλλο κυττάρων (b), απομονωμένες ομάδες (c) και strands (d). (e) Σε τέτοιους ιστούς, οι δυνάμεις έλξης από τις επαφές που προκαλούνται από την ιντεγκρίνη με την εξωκυτταρική μήτρα μεταδίδονται ως τοπικές καταπονήσεις (stresses)

κατά μήκος του κυτταρικού φύλλου μέσω συνδέσμων που μεσολαβούνται από την καδερίνη. (f) Δημιουργείται διατημητική και κανονική καταπόνηση στην επαφή κυττάρου-κυττάρου. Οι καδερίνες είναι με κόκκινο χρώμα, οι ιντεγρίνες είναι πράσινες. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης παρουσιάζεται ως πορτοκαλί ίνες [189-191].



Εικόνα 40: Καδερίνες σε μεσεγγυματικά κύτταρα (a) Αλληλεπίδραση μεταξύ μεσεγγυματικών κυττάρων που οδηγούν στην "Contact-Inhibition of Locomotion" (CIL). Οι επαφές που εξαρτώνται από την καδερίνη καθιερώνονται παροδικά μεταξύ των συγκρουόμενων κυττάρων. Η επαφή αναστέλλει την protrusive δράση και ακολουθείται από μια μέγιστη αύξηση (peak) της ενεργότητας της RhoA που επάγει την απόσυρση του σώματος του κυττάρου. Και τα δύο κύτταρα επαναπολώνονται προς αντίθετες κατευθύνσεις και απομακρύνονται το ένα από το άλλο. (b) Ένας επιθηλιακός ιστός υφίσταται EMT. Τα κύτταρα σταδιακά χάνουν τη διακυτταρική προσκόλλησή τους και αρχίζουν να μεταναστεύουν ως ρεύμα μεμονωμένων κυττάρων και μικρών ομάδων από χαλαρά συνδεδεμένα κύτταρα. Όταν δύο κύτταρα συγκρούονται, εμφανίζουν CIL (διακεκομμένη γραμμή). Τα κύτταρα εμφανίζονται ως μπλε σχήματα με ένα γκριζό κέντρο που αντιπροσωπεύει τον πυρήνα. Οι καδερίνες είναι κόκκινες. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης παρουσιάζεται ως πορτοκαλί ίνες [189-191].

Το γονίδιο της N-καδερίνης

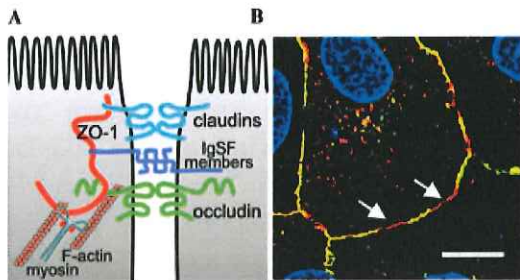
Ως μέλος μιας μεγάλης οικογένειας γονιδίων που κωδικοποιούν για εξαρτώμενα από ασβέστιο μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (CAMs), οι γλυκοπρωτεΐνες καδερίνης εκφράζονται από μια ποικιλία ιστών, μεσολαβώντας στην προσκόλληση μέσω ομοτυπικής σύνδεσης. Οι κλασσικές καδερίνες, E- και N- που έχουν χαρακτηριστεί καλύτερα, παίζουν σημαντικούς ρόλους στο σχηματισμό των ιστών κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης, της νευροποίησης και της οργανογένεσης [119, 192]. Τα μέλη της υπεροικογένειας των καδερινών έχουν ξεχωριστά μοτίβα έκφρασης τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης όσο και στον ενήλικα. Οι αλλαγές στην έκφραση των καδερινών συχνά σχετίζονται με αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και την αρχιτεκτονική των ιστών. Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης, τα επίπεδα έκφρασης της E-καδερίνης μειώνονται και καθώς τα κύτταρα υποβάλλονται σε επιθηλιακή-μεσεγγυματική μεταβολή αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης της N-καδερίνης στο μεσόδερμα [193]. Η N-καδερίνη εμφανίζει τοπολογική και ιστοειδική έκφραση στο έμβρυο. Στον ενήλικα, η έκφρασή της περιορίζεται στον νευρικό ιστό, τον αμφιβληστροειδή, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στους ινοβλάστες, στους οστεοβλάστες, στα μυοκύτταρα, στο χόνδρο των άκρων, στα ωοκύτταρα και στα κύτταρα Sertoli [192]. Η N-καδερίνη αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1982 [194] ως ένα μόριο μοριακού βάρους 130kDa στον αμφιβληστροειδή του γουρουνιού και το 1984 εντοπίστηκε και ως μόριο που μεσολαβεί στους συνδέσμους προσκόλλησης AJ [195]. Έχει χαρακτηριστεί ως παράγοντας προ-μετανάστευσης. Η αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης εμφανίζει ομολογία τόσο μεταξύ διάφορων οργανισμών όσο και μεταξύ διαφόρων μελών της οικογένειας των καδερινών [196]. Αποτελείται από πέντε εξοκυτταρικές επαναλήψεις (EC1- EC5), διαμεμβρανικό τμήμα και το ενδοκυτταρικό μέρος του μορίου. Ο υποκινητής της N-καδερίνης δεν περιέχει κουτιά CCATT ή TATA, αλλά χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε CpG δινοκυλεοτιδία [197]. Τυπικά η N-καδερίνη σχηματίζει ομοτυπικές ομοφυλικές αλληλεπιδράσεις ωστόσο έχουν περιγραφεί επίσης και ετεροφυλικές αλληλεπιδράσεις [101]. Ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGFR) φαίνεται πως εμπλέκεται στη λειτουργία της N-καδερίνης. Στο νευρικό σύστημα, η

λειτουργία της εμπλέκεται σε μια σειρά από σημαντικά γεγονότα που κυμαίνονται από τον έλεγχο της αξονικής ανάπτυξης ως την καθοδήγηση και το σχηματισμό των συνάψεων κατά τη συναπτική πλαστικότητα [198]. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι τόσο η N-καδερίνη όσο και ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών, FGFR ευθύνονται για την αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων επιδρώντας στη διαδικασία της μετάστασης [106]. Συγκεκριμένα, έπειτα από διέγερση του υποδοχέα με FGF-2, η μεταναστευτική ικανότητα καρκινικών κυττάρων του μαστού είναι ανάλογη με αυτή που παρατηρείται έπειτα από τη διαμόλυνση των κυττάρων με N-καδερίνη, υποδηλώνοντας ότι η N-καδερίνη και ο FGFR συνεργάζονται για να παραχθούν σήματα που επηρεάζουν την διηθητική συμπεριφορά των κυττάρων αυτών [106]. Έτσι, η N-καδερίνη είναι πιθανό πως εμπλέκεται τόσο σε αλληλεπιδράσεις εξαρτώμενες από συνδέτη όσο και σε ανεξάρτητες από προσδέματα αλληλεπιδράσεις με τον FGFR [199]. Επιμόλυνση επιθηλιακών κυττάρων με N-καδερίνη επηρεάζει τη μορφολογία και τη συμπεριφορά αυτών των κυττάρων επάγοντας έναν πιο “κινητικό- μεσεγχυματικό φαινότυπο” [200, 201]. Η επίδραση των καδερινών εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, προάγοντας την προσκόλληση ή την επαγωγή της μετανάστευσης. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της N-καδερίνης αλληλεπιδρά με ένα πλήθος μορίων, όπως οι κατενίνες p120 (p120ctn), α- και β-κατενίνη, οι οποίες ρυθμίζουν τη λειτουργία των καδερινών γενικότερα. Η δραστηριότητά της υπόκειται επίσης σε ρύθμιση από τις Rho GTPάσες. Σε ινοβλάστες, η p120ctn αναστέλλει την RhoA, με αποτέλεσμα την αύξηση της κινητικότητας και την ενεργοποίηση των Rac1 και Cdc42 [202, 203]. Η N-καδερίνη προάγει την επιβίωση κυττάρων μελανώματος και καρκινικών κυττάρων προστάτη, ενεργοποιώντας την κινάση PI3K η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί την κινάση AKT, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του προ-αποπτωτικού μορίου Bad [204, 205]. Ωστόσο, η N-καδερίνη μπορεί επίσης να έχει και ανασταλτική επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η υπερέκφραση της σε κύτταρα καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρατείνοντας τη φάση G2/M και επάγοντας την εξαρτώμενη από β-κατενίνη έκφραση της p21 (αναστολέας εξαρτώμενης από κυκλίνη κινάσης, cdk) που αναστέλλει τη δραστηριότητα της Cdc2 [206]. Οι λειτουργίες της N-καδερίνης επηρεάζονται από διάφορους ενδοκυτταρικούς και εξοκυτταρικούς παράγοντες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο μεταγραφικός παράγοντας snail, που είναι ένας ισχυρός και άμεσος καταστολέας της E-καδερίνης, ο οποίος αντίθετα ρυθμίζει θετικά την έκφραση της N-καδερίνης οδηγώντας σε αυξημένα επίπεδα έκφρασής της [179, 207]. Επίσης, παράγοντες ανάπτυξης όπως ο EGF και ο HGF είναι ικανοί να επάγουν τη μεταγωγή από E- σε N-καδερίνη. Σε καρκινικά κύτταρα του μαστού που εκφράζουν ταυτόχρονα E- και N-καδερίνη, προσθήκη EGF ή HGF οδηγεί σε υποέκφραση της E-καδερίνης και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της N-καδερίνης [208]. Το 1996 περιγράφηκε για πρώτη φορά η παρεκκλίνουσα αυξημένη έκφραση της N-καδερίνης σε ανθρώπινα πλακώδη κύτταρα καρκινώματος [209] και στη συνέχεια βρέθηκε διαφοροποιημένη έκφραση και σε καρκινικά κύτταρα μαστού [210, 211], προστάτη [212], στομάχου [213], κύτταρα μετασταστικού μελανώματος [214, 215] καθώς και στη λευχαιμία [216]. Συνοπτικά, πολλαπλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει πως σε διάφορους τύπους καρκίνου που υποεκφράζουν την E-καδερίνη, παρατηρείται *de novo* έκφραση της N-καδερίνης [212] και η διαφοροποιημένη αυτή έκφραση της N-καδερίνης σχετίζεται, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, με μορφολογικές μεταβολές προς έναν πιο μεσεγχυματικό φαινότυπο, που οδηγεί σε αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα και επιθετικότητα [192].

Πρωτεΐνη Οκλουδίνης ZO-1

Η πρωτεΐνη ZO-1 πρόκειται για μια πρωτεΐνη προσαρμογέα που ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών που περιλαμβάνει διαφορετικούς τύπους τομέων αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης/πρωτεΐνης όπως τρεις περιοχές μετασυναπτικής πυκνότητας 95/disc-large/zona occludens (PDZ) και μία περιοχή ομολογίας Src (SH3), περιοχή ομολογία προς την γουανυλική κινάση του ζυμομύκητα

(περιοχή GUK) και μία εναλλακτικά ματισμένη μεγάλη C-τερματική περιοχή που αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης [217-220]. Μεταξύ αυτών των διατηρημένων περιοχών δέσμευσης πρωτεϊνών βρίσκονται διασκορπισμένα τα αποκαλούμενα μοναδικά μοτίβα “U” [221]. Στη ZO-1, όπως και σε άλλες MAGUKs, η περιοχή-μοτίβο U5 (ή αλλιώς τομέας HOOK) βρίσκεται μεταξύ των περιοχών SH3 και GUK και απαιτείται για τον εντοπισμό της σύνδεσης, ενώ η περιοχή-μοτίβο U6 ρυθμίζει τη δραστηριότητα των περιοχών U5 και GUK, μηχανισμός που δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός [221]. Εκτός από τις χαρακτηριστικές πρωτεϊνικές περιοχές τους, οι πρωτεΐνες ZO περιλαμβάνουν αρκετές περιοχές πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και περιοχές σημάτων εξόδου από τον πυρήνα (NES) που τους επιτρέπουν να μεταφέρονται μεταξύ του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα [222-225].



Εικόνα 41: ZO-1 και στενοί-στεγανοί σύνδεσμοι. Μέρη και δυναμική των στενών συνδέσμων. Ο στενός σύνδεσμος αποτελείται από πολλαπλές αλληλεπιδρώντες διαμεμβρανικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό ακτίνης [226].

Οι πρωτεΐνες ZO δρουν σε διάφορα στάδια συναρμολόγησης των στεγανών συνδέσμων και ο ρόλος τους βασίζεται σε τρεις πολύ σημαντικές

ιδιότητες της οικογένειας των ZO MAGUKs: i) την ικανότητά τους να δρουν ως προσωρινά και χωρικά ρυθμιζόμενα κριώματα για άλλες πρωτεΐνες των TJs, ii) την ικανότητά τους να δεσμεύονται και να ρυθμίζουν συστατικά του κυτταροσκελετού της ακτίνης, και iii) την ικανότητά τους να προάγουν την διαμεσολαβούμενη μέσω καδερίνης διακυτταρική προσκόλληση [221]. Η πρωτεΐνη ZO-1 ήταν η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας πρωτεϊνών που ανακαλύφθηκε που σχετίζονται με τη γουανυλική κινάση [guanylate kinase (MAGuK)] και ρυθμίζει τη συναρμολόγηση των στεγανών- στενών συνδέσμων [227-232]. Το N- και το C- άκρο της πρωτεΐνης ZO-1 είναι ενσωματωμένα σε διαφορετικά λειτουργικά υποσυστήματα του TJ [233]. Αλληλεπιδρά με πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες των TJ, συμμετέχοντας σε διαφορετικά σύμπλοκα πρωτεϊνών με ξεχωριστές λειτουργίες που σχετίζονται τόσο με τη συναρμολόγηση των συνδέσεων όσο και με τη μεταγωγή σήματος [234-238]. Ο τρόπος με τον οποίο αλληλεπιδρά με τις διάφορες πρωτεΐνες φαίνεται να είναι ειδικός και μοναδικός για κάθε τύπο μεμβρανικής πρωτεΐνης [237, 239, 240]. Τα ZO-1 και ZO-2 knockouts λόγω της αυξημένης απόπτωσης και της μειωμένης αγγειογένεσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων του yolk sac είναι εμβρυϊκά θανατηφόρα στα ποντίκια [238, 241]. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης ZO-1 σχετίζονται με αυξημένο πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων μέσω αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος που συνδέεται με τη ZO-1, ZONAB (ZO-1- associated nucleic acid-binding protein) [242] και/ ή μετασχηματισμό. Ο μηχανισμός με τον οποίο η ZO-1 ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό μπορεί να συνεπάγεται πυρηνική μετατόπισή της, καθώς η ZO-1 έχει αναφερθεί ότι συσσωρεύεται παροδικά στον πυρήνα των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται. Ωστόσο, ο ρόλος της πυρηνικής ZO-1 δεν είναι ακόμα σαφής [223, 242-245]. Η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη ZO-1 υποεκφράζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου [246], οδήγησε στο συμπέρασμα ότι εμπλέκεται στην αποδιαφοροποίηση των κυττάρων και στο σχηματισμό νεοπλασιών. Μειωμένα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως σε καρκίνο του μαστού [247] και εγκεφάλου [248] και μάλιστα φαίνεται τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης να συσχετίζονται με αυξημένη επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT) [249-252].

ΥΛΙΚΑ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Όλα τα κοινά αντιδραστήρια τα οποία δεν αναφέρονται συγκεκριμένα παρακάτω ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τις εταιρείες Merck (Darmstadt, Germany), Sigma (St. Louis, USA), Mallinckrodt (St. Louis, USA), Biorad (Palo Alto, CA, USA) και Serva (N. York, USA).

Greiner

Τρυβλία καλλιέργειας 6, 12, 24 και 96 οπών (Greiner)
Φλάσκες επιφάνειας 75cm² και 25cm² (Greiner)
Τρυβλία διαμέτρου 35mm (p35), 60mm (p60) και 100mm (p100) (Greiner)
Αποστειρωμένες πιπέττες 2ml, 5ml, 10ml και 25ml
Σωληνάρια των 15ml και 50ml
Κίτρινα και μπλε tips για πιπέττες Gilson
tips φορτώματος για πιπέττες Gilson
tips με φίλτρο για πιπέττες Gilson
Σωληνάκια του 1.5ml και 2ml
Κυβέττες του 1ml
Σωληνάκια παγώματος κυττάρων των 2ml

Costar, Europe LTD, The Netherlands

Τρυβλία καλλιέργειας 6 και 12 οπών
Ξέστρο κυττάρων

Applichem

Υδροχλωρικό οξύ: HCl
Μεθανόλη
DTT
Γλυκίνη
Tris
TritonX-100
Nonidet P40
Υπερθειικό αμμώνιο: APS
Φορμαλδεΰδη 37%
Albumin Fraction V
Χλωριούχο νάτριο: NaCl
Νερό για τον κλίβανο
Απολυμαντικό για τον κλίβανο

GIBCO-BRL Co- LifeTechnologies, Inc.

RPMI1640 w/HEPES 52400025
DMED HG w/o PYR w/HEPES 42430025
Πουρομυκίνη
Τρυψίνη 0,25%/ EDTA
Πενικιλίνη/Στρεπτομυκίνη: Penicilline/Streptomycin
Ορός εμβρύου βοός: FBS, Foetal Bovine Serum
Ακρυλαμίδιο
N, N'-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδιο: Bis- Ακρυλαμίδιο
Hepes: N-2-υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ

L-γλουταμίνη: L-glutamine
Χλωριούχο κάλιο: KCl
Χλωριούχο μαγνήσιο: MgCl₂
Όξινο ανθρακικό νάτριο: NaHCO₃
Υπερθεϊκό αμμώνιο (Ammonium Per Sulfate)
ProLong Gold antifade reagent with DAPI
Fungizone antimycotic
Ροδαμίνη- Φαλλοϊδίνη
96-Well Fast Thermal Cycling Plates 10 Pkg
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor
SuperScript® II Reverse Transcriptase
Oligo(dT)20 Primer

Invitrogen- ThermoFisher Scientific

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ZO-1, anti-ZO-1 (339,100)
Αντίσωμα Alexa- Fluor- 488
Αντίσωμα Alexa- Fluor- 555
TRizol- RNAiso
Εκκινητές (Primers)

Sigma, USA

Αλβουμίνη ορού βοός: BSA
DMSO
TritonX-100
EDTA
EGTA
TEMED
β-μερκαπτοαιθανόλη
Φθοριούχο νάτριο: NaF
Λευπεπτίνη: Leupeptin
Απροτινίνη: aprotinin
Ορθοβαναδικό νάτριο: Na₃VO₄
Χλωριούχο ασβέστιο: CaCl₂
Άνυδρο διβασικό φωσφορικό νάτριο: K₂HPO₄
Κυανούν της βρωμοφαινόλης
Διβασικό φωσφορικό νάτριο
Αγαρόζη
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Τουμπουλίνης, anti-tubulin (clone 1A2)
Fibroblast Growth Factor 2, FGF-2
Αναστολέας PI3K, LY294002
Αναστολέας ROCK κινάσης, Y27632

Cell Signaling Technology- BioCompare

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Ezh2, anti-Ezh2 (D2C9)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της BMI1, anti-BMI1 (D20B7)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της N-Cadherin, anti-N-Cadherin (13A9)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της RhoC, anti-RhoC (D40E4)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της p-FAK, anti-p-FAK (#8556)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της PI3K-p85, anti-PI3K-p85 (#4228)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της pAKT, anti-pAKT (#9271)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της pSGK1, anti-pSGK1 (#5599)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της AKT, anti-AKT (#9272)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Vav-2, anti-vav2 (#2848)

Santa Cruz Biotechnology Inc.

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της RhoA, anti-RhoA (sc-418)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της RhoB, anti-RhoB (sc-180)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της PI3K, anti-PI3K (sc-377064)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Rac1, anti-Rac1 (sc-95)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Cdc42, anti-cdc42 (sc-8401)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της κοφιλλίνης, anti-cofillin (sc-8441)

TransductionLab BD Biosciences

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της E-Cadherin, anti-E-Cadherin (610,187)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της FAK, anti-FAK (F15020)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της παξιλλίνης, anti-paxillin (P13520), (ICN 696002)

Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της KDM2B, anti-JHDM1B (KDM2B) (09-864)
Δευτερογενές αντίσωμα anti-Rabbit IgG, horseradish peroxidase-conjugated (AP132P)
Δευτερογενές αντίσωμα anti-Mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated (AP124P)
Polybrene
Protease Inhibitor cocktail SetIII
Immobilon western chemilum HRP substrate 500ml

Calbiochem- Merck, Germany

Χλωριούχο νάτριο: NaCl
Καυστικό νάτριο: NaOH
Χλωριούχο Κάλιο: KCl
Απόλυτη αιθανόλη
Tween-20
Χλωροφόρμιο
Ισοπροπανόλη
Φαινόλη
Αναστολέας FAK, FAK Inhibitor II (#324878)

Biochrom, KG, Berlin, Germany

Ορός εμβρύου βοός, FBS
EDTA

SERVA, Germany

PMSF

Upstate Biotechnology

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Cdc42, anti-cdc42 (#20767)
Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της p190GAP, anti-p190GAP (#05-378)

Bio-Rad Labs, Palo Alto, CA, USA

Tris/HCl

SDS

Protein Assay Reagents

Μεμβράνη Νιτροκυτταρίνης

Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA

Ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη: Rhodamine-phalloidin

Amersham, USA

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Χαρτί Whatman

VWR, Germany

Καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm και 22mm

Promega (Madison, WI, USA)

Δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)

Τυχαίους εκκινητές (oligo-dT)

Fermentas, Glen Burnie, MD, USA

Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix

Νερό απαλλαγμένο από RNάσες (RNase free water)

Amersham Corp (Arlington Heights, Illinois, USA)

ECL Western blotting kit

φίλμ Hyperfilm ECL

Chemicon (Temecula, CA, USA)

Δευτερογενές αντίσωμα anti-Rabbit IgG, horseradish peroxidase-conjugated (AP132P)

Δευτερογενές αντίσωμα anti-Mouse IgG, horseradish peroxidase-conjugated (AP124P)

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της Βινκουλίνης, anti-vinculin (MAB1674)

FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG

FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG

Corning

Φίλτρα 0,45µm

Kisker

Developer (για 2x20L τελικού διαλύματος)

Cytoskeleton, Inc.

Σφαιρίδια G-Σεφαρόζης: GST- RBD Rhotekin sepharose beads

Μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της κοφιλλίνης, anti-cofillin (ACFL03)

Οι πλασμιδιακοί φορείς pBABEpuro-KDM2B, pBABEpuro-EmptyVector, pLKO.1KDM2Bsh και pLKO.1-scrambled-shRNA-EmptyVector είναι μία ευγενική χορηγεία του Δρ. Σωτήριου Καμπράνη.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Κυτταροκαλλιέργειες

Μέθοδος

Όλες οι εργασίες κυτταροκαλλιέργειας διεξήχθησαν με χρήση άσηπτων τεχνικών μέσα σε εστία ειδική για κυτταροκαλλιέργεια.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές:

- Για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων ιών, η ανθρώπινη κυτταρική επιθηλιακή σειρά 293 από ανθρώπινο νεφρό, HEK 293T. Περιέχουν το SV40 μεγάλο T-αντιγόνο που επιτρέπει την επισωματική αντιγραφή πλασμιδίων με τα οποία διαμολύνονται, εφόσον τα δεύτερα περιέχουν της SV40 περιοχή έναρξης της αντιγραφής.
- Για τα πειράματα διερεύνησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του επιγενετικού παράγοντα KDM2B, η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU-145 και η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά παχέως εντέρου HCT-116.
- Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά μαστού MDA-MB-231 και η ανθρώπινη επιθηλιακή κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων HaCaT.

Όλες οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται και διατηρούνται σε μονοστοιβάδες μέσα σε πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 75cm² ή 25cm², σε πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 35mm (p35) ή 60mm (p60) ή σε δάρια (6-well plate), 12άρια (12-well plate), 24άρια (24-well plate) ή 96άρια (96-well plate) πλαστικά πιάτα-τρυβλία, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες των πειραμάτων, σε επωαστήρα (Forma Series II, Thermo Electron Corporation, Ohio, USA, Forma Scientific, Ohio, USA) με υγρή ατμόσφαιρα συστάσεως 5% CO₂ - 95% αέρας και θερμοκρασία 37°C.

Ως βασικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιείται:

- Για τα DU-145 και τα HCT-116 κύτταρα RPMI 1640 (1X) medium που περιέχει L-Glutamine και 25mM HEPES (RPMI1640 w/HEPES), εμπλουτισμένο με 10% αδρανοποιημένο (μέσω θέρμανσης στους 56°C για 30 λεπτά) ορό εμβρύου βοός (FBS) (GIBCO-BRL Co, MD, USA), 1% πενικιλίνη (50 IU/ml) - στρεπτομυκίνη (50 mg/ml) (Gibco-BRL, MD, USA) και 2μg/ml Πουρομυκίνη.
- Για τα HEK 293T, τα MDA-MB-231 και τα HaCaT κύτταρα DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium_ DMED High Glucose w/o PYR w/HEPES) που περιέχει GlutaMAX™ I, 4500 mg/ml γλυκόζη (D-Glucose) και 110mg/L πυροϋβικό νάτριο (Sodium Pyruvate) (Gibco-BRL, MD, USA), εμπλουτισμένο με 10% αδρανοποιημένο (μέσω θέρμανσης στους 56°C για 30 λεπτά) ορό εμβρύου βοός (FBS) (GIBCO-BRL Co, MD, USA) και 1% πενικιλίνη (50 IU/ml) - στρεπτομυκίνη (50 mg/ml) (Gibco-BRL, MD, USA).

Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 48 με 72 ώρες.

Για την ανακαλλιέργεια, όταν οι καλλιέργειες φτάνουν σε πλήρη ανάπτυξη (100% πληρότητα στην επιφάνεια καλλιέργειας, confluence) εκτίθενται σε διάλυμα θρυψίνης [0,25% θρυψίνη, 5mM EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS)] (Gibco-BRL, MD, USA). Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα για περίπου 5 λεπτά ώστε να αποκολληθούν από την

επιφάνεια της φλάσκας. Στη συνέχεια, τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας παραλαμβάνονται με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, με ποσότητα τουλάχιστον τριπλάσια της αρχικής ποσότητας της θρυψίνης, και μοιράζονται σε νέες φλάσκες ή πλαστικά τρυβλία στην επιθυμητή αραιώση και σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Η επιθυμητή αραιώση και τελική συγκέντρωση των κυττάρων προσδιορίζεται με τη βοήθεια του αιματοκυτομέτρου.

Πριν από την επίδραση των διαφόρων παραγόντων, τα κύτταρα καλλιεργούνται για 12-24 ώρες σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας απουσία ορού. Συγκεκριμένα, για τα DU-145 και τα HCT-116 κύτταρα χρησιμοποιείται θρεπτικό μέσο καλλιέργειας RPMI 1640 (1X) medium που περιέχει L-Glutamine και 25mM HEPES (RPMI1640 w/HEPES), εμπλουτισμένο με 1% πενικιλίνη (50 IU/ml) - στρεπτομυκίνη (50 mg/ml) (Gibco-BRL, MD, USA). Για τις διάφορες μορφολογικές παρατηρήσεις τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες, στην επιθυμητή αραιώση. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν ενώ τα κύτταρα ήταν σε γενιές μεταξύ 10-30 από τη στιγμή της απόψυξης των κυττάρων και της εισαγωγής τους σε καλλιέργεια.

Κατάψυξη και Απόψυξη των Κυττάρων

Η διατήρηση των κυττάρων στο εύρος αυτό των γενεών έγινε με την κατάψυξη τους σε τακτά χρονικά διαστήματα. Για τη δημιουργία αποθεμάτων (stocks), κυτταρικό εναιώρημα περίπου 1×10^6 κύτταρα/ ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, συμπληρώνεται με 20% ορό (FBS) και 10% DMSO (Sigma, St Louis, MI, USA) και κλάσματα του 1ml μοιράζονται σε αποστειρωμένα σωληνάρια υψηλής κατάψυξης (cryovials) και φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80°C .

Για την απόψυξη των κυττάρων και την εκκίνηση νέας καλλιέργειας, τα καταψυγμένα φιαλίδια θερμαίνονται στους 37°C ώστε να ξεπαγώσει το κυτταρικό διάλυμα και στη συνέχεια το περιεχόμενο του φιαλιδίου αραιώνεται με 5ml θρεπτικό μέσο καλλιέργειας σε σωλήνα 15ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 1500 rpm για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (το οποίο ανανεώνεται την επόμενη ημέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν βλαβερές επιπτώσεις του DMSO) και όλο το κυτταρικό εναιώρημα μεταφέρεται σε φλάσκα επιφάνειας 75cm^2 ή 25cm^2 και ακολουθεί η καλλιέργειά τους όπως περιγράφεται παραπάνω.

Αναπαραγωγή ανασυνδιασμένων ιών και επιμόλυνση των κυττάρων

Για την αναπαραγωγή των ανασυνδιασμένων ιών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK 293 (human embryonic kidney cells, packaging cell line). Τα κύτταρα HEK 293 καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100mm, σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ τρυβλίο σε θρεπτικό μέσο με 10%v/v FBS, 1%v/v πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη.

Κύτταρα HEK 293 επιμολύνθηκαν ταυτόχρονα με ρετροϊκά σωματίδια pBABEpuro-KDM2B για υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B, ή με pBABEpuro-EmptyVector για κύτταρα αναφοράς (Ρετροϊός ελέγχου) και με Ampho-pac (amphotropic packaging construct) ή με λεντοϊκά σωματίδια pLKO-1KDM2Bsh για αποσιώπηση του γονιδίου KDM2B ή με pLKO.1-scrambled-shRNA-EmptyVector για κύτταρα αναφοράς (Λεντιϊός ελέγχου) και pVSV-G, χρησιμοποιώντας Fugene 6 (Roche Applied Science), ακολουθώντας τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν για τον ρετροϊό bug ρετροϊκά σωματίδια pBABEpuro-KDM2B ή pBABEpuro-EmptyVector με 2ug amphopac (amphopac: 0.5ug/ul) σε τελικό όγκο θρεπτικού μέσου καλλιέργειας 25ul optiMEM, ενώ για τον λεντοϊό 3ug λεντοϊκά σωματίδια pLKO-1KDM2Bsh ή pLKO.1-scrambled-shRNA-EmptyVector με 1ug pVSV-G και 2ug pΔ8.1 (pVSV-G: 0.8ug/ul, pΔ8.1: 0.4ug/ul), σε τελικό όγκο θρεπτικού μέσου καλλιέργειας 25ul optiMEM.

Η ποσότητα αυτή των ικόν σωματιδίων προστίθεται σε 555ul optiMEM που περιέχει 20ul fuge και αφήνεται να επωαστεί για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της επώασης, όλη η ποσότητα των ικόν σωματιδίων προστίθεται σταγόνα-σταγόνα στα κύτταρα HEK 293 και αφήνονται στους 37°C για όλο το βράδυ. Το επόμενο πρωί το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αντικαθίσταται με DMEM εμπλουτισμένο με 10%v/v FBS + 1%v/v Πεινικιλίνη/ Στρεπτομυκίνη. Υπερκείμενο από την καλλιέργεια που περιέχει τα ισοσώματα, συλλέγεται 24 και 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση, φυγοκεντρείται στις 2500rpm για 10 λεπτά στους 4°C για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα και φιλτράρεται σε 0.45µm φίλτρο. Διαμοιράζεται ποσότητα ίση με 3ml ανά σωληνάριο των 15ml και καταψύχεται στους -80°C μέχρι τη χρήση. Προκειμένου να διαμολύνουμε κύτταρα DU-145 και HCT-116 με τον ανασυνδυασμένο ρετροϊό ή λεντιό αντίστοιχα, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών (6-well plate) σε συγκέντρωση ίση με $3 \cdot 10^4$ κύτταρα ανά οπή και επωάζονται με την κατάλληλη ποσότητα ιικού εναιωρήματος υπό την παρουσία 5mg/ml polybrene για 24 ώρες στους 37°C. Στη συνέχεια, γίνεται επιλογή των κυττάρων- κλώνων που έχουν προσλάβει τον ιό προσθέτοντας στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αντιβιοτικό 2µg/ml πουρομυκίνη. Οι επιζήσαντες κλώνοι σχηματίζουν μοναδιαίες αποικίες μετά τη δράση του αντιβιοτικού. Μαζεύτηκαν με τη βοήθεια γυάλινων rings, μέρος της καλλιέργειας τοποθετήθηκε σε τρυβλία 6 οπών, αφέθηκαν να αναπτυχθούν παρουσία του αντιβιοτικού και το υπόλοιπο μέρος της αποικίας χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να παρασκευαστεί κυτταρικό εκχυλίσματα το οποίο στη συνέχεια ελέγχθηκε για την έκφραση του γονιδίου KDM2B με ανοσοαποτύπωση- Western Blot ή με Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου. Οι κλώνοι που ικανοποιούν τις συνθήκες έκφρασης του γονιδίου KDM2B (αποσιώπηση του γονιδίου και υπερέκφρασή του) αφήνονται να πολλαπλασιαστούν στην καλλιέργεια για μετέπειτα χρήση στα πειράματα που ακολουθούν.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ιοί:

Ρετροϊός pBABEpuro-KDM2B για υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B

Ρετροϊός pBABEpuro-EmptyVector για κύτταρα αναφοράς (Ρετροϊός ελέγχου)

Λεντιός pLKO-1KDM2Bsh για αποσιώπηση του γονιδίου KDM2B

Λεντιός pLKO.1-scrambled-shRNA-EmptyVector για κύτταρα αναφοράς (Λεντιός ελέγχου)

Από τους 5 συνολικά κλώνους που χρησιμοποιήθηκαν για την αποσιώπηση του γονιδίου, ο πιο αποτελεσματικός ήταν ο TRCN0000118437 [Open Biosystems (cat no. RH54533-NM_001005366)], με αλληλουχία στόχευσης: CGGCCTTTACAAGAAGACATT και Αλληλουχία Hairpin: 5'-CCGG-CGGCCTTTACAAGAAGACATT-CTCGAG-AATGTCTTCTTGTAAGGCCG-TTTTTG-3'.

Η έκφραση της πρωτεΐνης KDM2B από τους αντίστοιχους ιούς ελέγχεται με ανοσοαποτύπωση - Western Blot χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα το anti-JHDM1B(KDM2B) (09-864, Millipore) ή με Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.

Απομόνωση RNA

Απομόνωση RNA με το αντιδραστήριο TRizol

Το RNA που απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRizol (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιγενετικών παραγόντων KDM2B και Ezh2, των πρωτεϊνών διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης E-cadherin και Zo-1, καθώς επίσης και για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των RhoGTPασών RhoA και RhoB, με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου. Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα μονοφασικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη, το οποίο συμβάλλει στη λύση των κυττάρων, βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA και ταυτόχρονα αναστέλλει τις

ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά τη λύση των κυττάρων, με αποτέλεσμα να επιτρέπει την απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Η προσθήκη χλωροφορμίου ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση διαχωρίζει το διάλυμα σε μία υδατική φάση, η οποία περιέχει αποκλειστικά το RNA και σε μία οργανική φάση από φαινόλη/χλωροφόρμιο, η οποία περιλαμβάνει τις περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA (50b– 10Kb), ενώ μεγαλύτερα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση.

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται με Trizol σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen/Life Technologies και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 12 οπών (12-well plate) ή σε τρυβλία διαμέτρου 35mm. Αφού αφαιρεθεί το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και πραγματοποιηθούν δύο εκπλύσεις με PBS, τα κύτταρα λύνονται με την προσθήκη 300μl αντιδραστηρίου TRizol και το δείγμα επωάζεται για 5 λεπτά υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτραπεί η πλήρης αποδέσμευση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Το δείγμα στη συνέχεια μεταφέρεται σε σωληνάκια τύπου erppendorf των 1.5ml και τοποθετείται στους -80°C για μετέπειτα χρήση ή συνεχίζεται η διαδικασία απομόνωσης του RNA ως εξής. Αφού γίνει ομογενοποίηση του δείγματος ανακινώντας ελαφριά τα σωληνάκια, προστίθεται 200μl ανά ml TRizol χλωροφόρμιο, το μίγμα αναδεύεται ισχυρά για 10 περίπου δευτερόλεπτα και στη συνέχεια επωάζεται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 11000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντρηση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: στην κάτω οργανική φάση (ροζ χρώμα), στην ενδιάμεση φάση (λευκό χρώμα) και στην επάνω, άχρωμη και διαυγή υδατινή φάση, όπου βρίσκεται το ολικό RNA των κυττάρων. Η υδατική φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα καθαρό σωληνάριο τύπου erppendorf του 1.5ml, προστίθεται 500μl ανά ml TRizol ισοπροπανόλη, το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά και αφήνεται να επωαστεί για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000rpm για 15 λεπτά στους 4°C για να πραγματοποιηθεί η κατακρήμιση του RNA. Το ίζημα εκπλένεται με 500μl 75%v/v αιθανόλη, το διάλυμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται στις 7000rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο και στεγνώσει τελείως η πελέτα από την αιθανόλη εκτιθέμενη στον αέρα, η πελέτα επαναδιαλύεται σε 20μl απεσταγμένου νερού απαλλαγμένο από RNάσες (RNase free water). 1μl από το διάλυμα RNA χρησιμοποιείται για τη φωτομέτρηση με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). Τα δείγματα φυλάσσονται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Φωτομέτρηση του RNA

Ο προσδιορισμός της ποσότητας και της καθαρότητας των δειγμάτων RNA που απομονώθηκαν έγινε με φωτομέτρηση 1μl από το διάλυμα RNA στα 260nm και στα 280nm με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). Από την απορρόφηση στα 260nm προσδιορίζεται η συγκέντρωση των διαλυμάτων, ενώ ο λόγος των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260nm και στα 280nm (A_{260}/A_{280}) παρέχει μία εκτίμηση της καθαρότητας του RNA όσον αφορά στην παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών, οι οποίες απορροφούν στο UV, όπως πρωτεΐνες ή φαινόλη. Ένα δείγμα RNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε RT-PCR όταν ο παραπάνω λόγος κυμαίνεται από 1.6 έως 2.2, ενώ υψηλή τιμή απορρόφησης στα 280nm υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες εμποδίζουν τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA και παρεμποδίζουν την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής. Η τιμή του λόγου για κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε ng/μl. Για το επόμενο βήμα της διαδικασίας, της αντίστροφης μεταγραφής του RNA, χρησιμοποιούνται τόσα μl ποσότητας RNA ώστε η συγκέντρωση του RNA να είναι ίση με $x = 1\mu\text{g RNA}$. Πιο συγκεκριμένα: $x = [1(\mu\text{g}/\mu\text{l}) / (A_{260}/A_{280})] \mu\text{l}$

Σύνθεση Συμπληρωματικού DNA (cDNA)- Αντίδραση Αντίστροφης Μεταγραφής (reverse transcription)

Η αντίστροφη μεταγραφή του mRNA προς συμπληρωματικό DNA (cDNA) έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Invitrogen για τη χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II (Invitrogen). Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο 1000ng (1μg) ολικού RNA που έχει απομονωθεί από τα κύτταρα με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRizol.

Αρχικά παρασκευάζεται ένα πρώτο μίγμα το οποίο περιέχει τους τυχαίους εκκινητές (oligo-dT) (Promega), τα δεσοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs) (Promega), το RNA και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό απαλλαγμένο από RNάσες (RNase free water) μέχρι ο τελικός όγκος του μίγματος να είναι 13μl. Το μίγμα θερμαίνεται για 5 λεπτά στους 65°C, ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA.

Πρώτο Μίγμα	
Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση
oligo-dT (50μM)	1μl
dNTPs (10mM)	1μl
RNA	(x)μl, ώστε η τελική ποσότητα να είναι ίση με 1μg
RNase free dH ₂ O	(11- x)μl
Τελικός Όγκος ανά Αντίδραση	13μl

Το δείγμα τοποθετείται στον πάγο και προστίθεται 7μl από το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει το διάλυμα 5X First Strand Buffer (Invitrogen), τον αποδιατακτικό παράγοντα DTT (Invitrogen), τον αναστολέα των RNάσων RNase OUT (Invitrogen) και το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II (Invitrogen), ώστε ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης να είναι ίσος με 20μl. Το μίγμα επωάζεται για 50 λεπτά στους 50°C ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή και η αντίδραση τερματίζεται με την απενεργοποίηση του ενζύμου και την αποδιάταξη των υβριδίων RNA-cDNA θερμαίνοντας τα δείγματα στους 85°C για 55 λεπτά.

Δεύτερο Μίγμα	
Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση
5X First Strand Buffer	4μl
DTT	1μl
RNase OUT	0,5μl
RNase free dH ₂ O	0,5μl
Superscript II	1μl
Τελικός Όγκος ανά Αντίδραση	7μl

Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), είτε αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

Ποσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR)

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis et. al. και έφερε πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία με εφαρμογές από τη μοριακή έρευνα στην κλινική πράξη. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει σε ελάχιστο χρόνο, που δεν υπερβαίνει τις 2-3 ώρες, την ενίσχυση με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη τους και ο περαιτέρω χειρισμός τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων. Στο υπόστρωμα DNA προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την θερμοανθεκτική *Taq* DNA πολυμεράση (από θερμοφιλά βακτήρια), μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPS) και το ζεύγος των εκκινήτων (primers). Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95°C και ακολουθούν 30-45 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C , υβριδισμού των εκκινήτων στους $55-60^{\circ}\text{C}$ και πολυμερισμού στους 72°C . Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA.

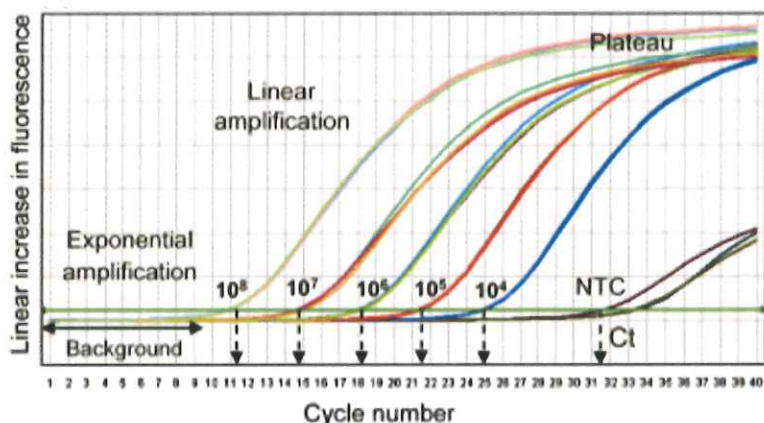
RT-PCR

Η RT-PCR (Reverse Transcription- PCR) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιείται συμπληρωματικό DNA (cDNA), μετά την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA στόχου. Μαζί με το γονίδιο στόχο ενισχύεται και ένα γονίδιο αναφοράς, συνήθως ένα γονίδιο βασικής ενδοκυτταρικής λειτουργίας (housekeeping gene), το οποίο εκφράζεται χωρίς μεγάλες αποκλίσεις στον ιστό που εξετάζουμε (π.χ. β-ακτίνη, GAPDH), με σκοπό την κανονικοποίηση (normalization) του mRNA στόχου.

Ποσοτική PCR με τη χρήση SYBR Green I

Η μέθοδος της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ως φθορίζοντα μόρια χρησιμοποιείται το SYBR Green το οποίο προσδένεται σε δίκλωνο μόριο DNA μη ειδικά, μόρια ιχνηθέτες τύπου TaqMan (TaqMan probes) και ιχνηθέτες υβριδισμού (hybridization probes) τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζοντα μόρια και αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες στην αλληλουχία του DNA που ενισχύεται με PCR. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως φθορίζον μόριο το SYBR Green, η πρόσδεση του οποίου στο DNA οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού που εκπέμπει κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τη χρωστική που βρίσκεται μη δεσμευμένη στο διάλυμα.

Μία αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη φάση "υποβάθρου" ή φάση "θορύβου" (background phase), την εκθετική φάση (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase) και τη φάση "κορεσμού" (plateau).



Εικόνα 1: Παρακολούθηση των τριών φάσεων της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο, την πρώιμη φάση "υποβάθρου" ή φάση "θορύβου" (background phase), την εκθετική φάση (exponential growth phase) ή λογαριθμική φάση (log phase) και τη φάση "κορεσμού" (plateau) [1].

Η φάση του θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος, οπότε η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο. Λόγω της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης εντός του εκμαγείου, τον περιορισμό των αντιδραστηρίων ή τη συσσώρευση πυροφωσφορικών κάποια στιγμή το προϊόν παύει να παράγεται με εκθετικό ρυθμό και η αντίδραση εισέρχεται στη φάση "κορεσμού". Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης η ενίσχυση του προϊόντος περιγράφεται από τη σχέση: $N=N_0(1+E)^n$, όπου

N: η ποσότητα του προϊόντος

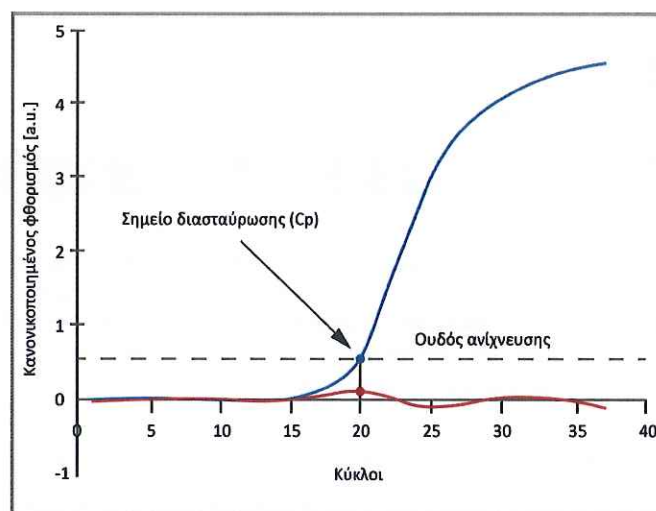
N_0 : η αρχική ποσότητα του DNA στόχου

n: ο αριθμός των κύκλων της PCR και

E: η μέση απόδοση (efficiency) της αντίδρασης PCR για κάθε κύκλο.

Θεωρητικά, η μέγιστη τιμή του $1+E$ είναι 2, δηλαδή το προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Όμως στην πράξη το E έχει μικρότερη τιμή από το 1 (απόδοση 100%), διότι εξαρτάται σημαντικά από τις πειραματικές συνθήκες, καθώς μεταβολές σε παράγοντες όπως η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, η θερμοκρασία και ο χρόνος επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης. Στο ξεκίνημα της λογαριθμικής φάσης η E θεωρείται ότι παραμένει σταθερή για 2-5 κύκλους και μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια προτύπων συγκεντρώσεων γενωμικού υλικού. Η συνεχής παρακολούθηση της έντασης φθορισμού στην αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο κάνει εύκολη την αναγνώριση των κύκλων αυτών.

Κατά την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος που έχει ενισχυθεί μέχρι εκείνο το σημείο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο υπόστρωμα είναι παρόν κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος αριθμός κύκλων θα απαιτείται για να οδηγηθούμε στο σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού καταγράφεται ως στατιστικά σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το σήμα υποβάθρου. Αυτό το σημείο ορίζεται ως Ct (σημείο τομής, crossing point). Το σημείο αυτό είναι ανάλογο της αρχικής ποσότητας του DNA ή RNA ή cDNA που υπήρχε στα δείγματα. Μικρότερα Ct υποδεικνύουν δείγματα με μεγαλύτερες αρχικές ποσότητες γενετικού υλικού [2].

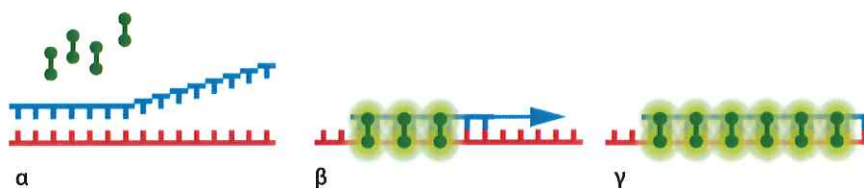


Εικόνα 2: Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή C_i , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης. Το σημείο αυτό είναι αλλιώς γνωστό ως σημείο διασταύρωσης, C_i (Crossing Point). Η τιμή C_i είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_i από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν με ποσοτική qRT-PCR τα mRNA των γονιδίων KDM2B, EZH2, E-CADHERIN, ZO-1, RHOA, RHOB, FAK, PI3K, AKT, SGK1, ORAI1 και STIM1. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β -ακτίνης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών των παραπάνω γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα με qRT-PCR είναι οι εξής:

h_Actin, forward CGGCATCGTCACCAACTG;
h_Actin, reverse GGCACACGCAGCTCATTG;
h_Kdm2b, forward TCTACGAGATCGAGGACAGGA;
h_Kdm2b, reverse ACCAGCACATCTCATAGTAGAAGG;
h_E-cadherin, forward TACAATGCCGCCATCGCTTA;
h_E-cadherin, reverse CGTAGGGAAACTCTCTCGGT;
h_Ezh2, forward ACGGGGATAGAGAATGTGGGTTTA;
h_Ezh2, reverse AGGTGGGGCGGCTTTCTTTATCATC;
h_Zo-1, forward GAGCGGGGACAAGATGAAGT;
h_Zo-1, reverse GAGGATGGCCGTTACCCACAG;
h_RhoA, forward CTCGTTAGTCCACGGTCTGG;
h_RhoA, reverse CAGCCATTGCTCAGGCAAC;
h_RhoB, forward TGCAACTGACTTGGGGAGG;
h_RhoB, reverse GACAGGCACAAAGTTCGCTT;
h_FAK, forward TGGGCGGAAAGAAATCCTGC;
h_FAK, reverse GGCTTGACACCCTCGTTGTA;
h_PI3K, forward CCCGATGCGGTTAGAGCC;
h_PI3K, reverse TGCCGATAGCAAAACCAATTTTC;
h_AKT, forward CGAAGGACGGGAGCAGG;
h_AKT, reverse TACTCCCCTCGTTTGTGTCAG;
h_SGK1, forward ATTGGCCGTATCCCACCGTC;
h_SGK1, reverse TCCACCTTCGTACCCGCTTC.

Η ανίχνευση των σχηματιζόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I: α. Αποδιάταξη, μη προσδεσμένα μόρια SYBR Green I, β. Υβριδοποίηση, η χρωστική SYBR Green I εκπέμπει περισσότερο φθορισμό όταν προσδένεται σε δίκλωνο DNA, γ. Πολυμερισμός, πλήρης ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο δίκλωνο προϊόν της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου [2, 3].

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το προϊόν Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). Το μίγμα της αντίδρασης για την ενίσχυση των mRNA περιέχει 2X SYBR Green Master Mix/ Rox, τον πρόσθιο και τον ανάστροφο εκκινητή για το κάθε mRNA και απεσταγμένο νερό απαλλαγμένο από RNάσες (RNase free water).

Μίγμα Αντίδρασης ανά αντίδραση	
Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά αντίδραση
2X Kapa SYBR Green Master Mix/ Rox	7,5μl
Πρόσθιος εκκινητής (10μM)	0,15μl
Ανάστροφος εκκινητής (10μM)	0,15μl
RNAse free dH ₂ O	4,2μl
Τελικός Όγκος ανά Αντίδραση	12μl

Για κάθε ποσότητα συστατικού που πρέπει να προστεθεί για η αριθμό δειγμάτων, προσθέτουμε μία περίσσεια 10%, λόγω σφαλμάτων και αποκλίσεων κατά το πιπετάρισμα. Αφού αναμειχθεί το μίγμα για κάθε γονίδιο προσεκτικά, μοιράζονται 12μl σε τρυβλίο 96 οπών (96-well plate) και ακολούθως προστίθενται 3μl cDNA (που παράχθηκε από το προηγούμενο βήμα της διαδικασίας) για κάθε δείγμα, το οποίο έχει ήδη αραιωθεί 1:3 με nuclease free dH₂O. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 15μl. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του τρυβλίου στις 1000rpm για 1 λεπτό, το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται στο μηχάνημα 7500 Real-Time System (Applied Biosystems). Μετά το πέρας των κύκλων του πολυμερισμού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τους (0.2°C/ sec) από τους 55°C στους 95°C ώστε να προσδιοριστεί η καμπύλη αποδιάταξης τους (Melting curve).

Οι συνθήκες για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων που μελετήσαμε είναι οι εξής:

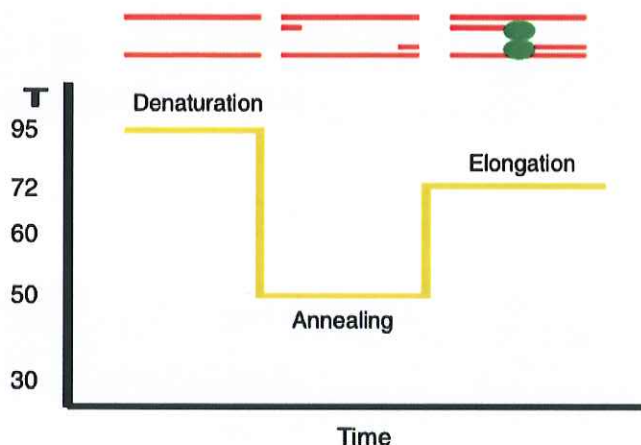
Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 10 λεπτά

Αποδιάταξη των κλώνων DNA (Denaturation): 95°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδοποίηση των εκκινητών (Annealing): 58°C-62°C (ανάλογα με την αλληλουχία του εκάστοτε εκκινητή) για 30 δευτερόλεπτα

Πολυμερισμός (Elongation- Extension): 72°C για 30 δευτερόλεπτα

Αριθμός κύκλων: 40- 45.



Εικόνα 4: Οι συνθήκες για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων: 1. Αποδιάταξη των κλώνων DNA (Denaturation), 2. Υβριδοποίηση των εκκινητών (Annealing), 3. Πολυμερισμός (Elongation- Extension) [4].

Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών πρωτεϊνών

Τα κύτταρα, επωασμένα ή μη για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα με διάφορους παράγοντες, καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 35mm ή πλαστικό πιάτο 6 οπών (6-well plate). Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και την πλύση των κυττάρων 2 φορές με παγωμένο διάλυμα φωσφορικών, PBS 1X, τα κύτταρα λύνονται με 700μl παγωμένου διαλύματος λύσης Triton X-100 (50 mM Tris-HCl, pH: 7.5, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Deoxycholate, 0,2% v/v SDS, 1% v/v Triton X-100) που περιέχει 1mM αποδιατακτικού παράγοντα DTT και αναστολείς πρωτεασών: 10μg/ml Aprotinin (Sigma-Aldrich), 10μg/ml Leupeptin (Sigma-Aldrich), 1mM Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich), 10mM NaF και φωσφατασών: 1mM Na₃VO₄ (Sodium Orthovanadate, Sigma-Aldrich) και 10mM Glycerophosphate, ειδικά όταν πρόκειται να προσδιοριστούν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες. Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων από τον πάτο του τρυβλίου με απόξεση, με τη βοήθεια πλαστικού ξύστρου και το κυτταρικό εκχύλισμα αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά. Στη συνέχεια ακολουθεί σπάσιμο των κυττάρων με τη χρήση υπερήχων (sonication) (2 φορές για κάθε δείγμα, 30 δευτερόλεπτα, pulse 70%). Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 12.000rpm, για 5 λεπτά στους 4°C. Από τη φυγοκέντρηση, παραλαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις ολικές πρωτεΐνες των κυττάρων και είτε προσδιορίζεται η συγκέντρωση του για να χρησιμοποιηθεί άμεσα στην προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση είτε φυλάσσεται στους -80°C για μετέπειτα χρήση. Μικρή ποσότητα του δείγματος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών με το σύστημα DC Bio-Rad protein assay.

PBS 10X, pH: 7.6	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
NaCl	8% w/v
KCl	0,2% w/v
Na ₂ HPO ₄	1,44% w/v
KH ₂ PO ₄	0,24% w/v

PBS IX, pH: 7.6

<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
PBS 10X	10% v/v
Απεσταγμένο Νερό	90% v/v

Διάλυμα Λύσης

<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
Tris-HCl	50 mM, pH: 7.5
NaCl	150 mM
Deoxycholate	0,1% v/v
SDS	0,2% v/v
Triton X-100	1% v/v
DTT	1mM
Aprotinin	10μg/ml
Leupeptin	10μg/ml
Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)	1mM
NaF	10mM
Na ₃ VO ₄	1mM
Glycerophosphate	10mM

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κυτταρικό εκχύλισμα που περιέχει απορρυπαντικά χρησιμοποιείται το σύστημα DC Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Palo Alto, CA, USA), το οποίο βασίζεται σε τροποποίηση της μεθόδου Lowry et al., 1951, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα, 5μl από κάθε δείγμα συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό (195μl) ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 200μl. Από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος φτιάχνονται τουλάχιστον δύο δείγματα προκειμένου να ληφθεί υπόψη η τιμή του μέσου όρου. Στο κάθε δείγμα προστίθεται 100μl διαλύματος A, όπου A: 20 μl αντιδραστήριου S σε 1 ml αντιδραστήριου A (A: αλκαλικό διάλυμα ταρταρικού χαλκού, copper tariate). Αφού προστεθούν και 800 μl αντιδραστήριου B (αντιδραστήριο folin) ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και τα δείγματα επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αναπτυχθεί το μπλε-μοβ χρώμα, το οποίο παραμένει σταθερό για 1 ώρα. Το τυφλό αποτελείται από το μείγμα των αντιδραστηρίων με τη διαφορά ότι στη θέση του πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιείται το διάλυμα στο οποίο έχουν λυθεί τα κύτταρα (Lysis Buffer). Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων γίνεται σε πλαστικές κυβέτες και μετράται στα 750nm του ορατού φάσματος. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα, χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργείται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας

(όπως περιγράφεται παραπάνω) δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων (πρότυπων διαλυμάτων) πρωτεΐνης βόειου αλβουμίνης (BSA, Bovine Serum Albumin). Από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης (μg/μl), η οποία διέπεται από εξίσωση της μορφής: $y=ax+b$, όπου $y=OD$ (τιμή φωτομέτρησης) $x=μg$ πρωτεΐνης. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Βάσει του μέσου όρου της απορρόφησης από κάθε δείγμα που μετρήθηκε, υπολογίζονται τα κατάλληλα μl από κάθε δείγμα πρωτεϊνικού εκχυλίσματος τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και κατ' επέκταση ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης παρουσία SDS (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση το μοριακό τους βάρος πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση κατά Laemmli 1970.

Προετοιμασία δειγμάτων

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται το 1:3 του όγκου του πρωτεϊνικού δείγματος 4X αποδιατακτικού διαλύματος (sample buffer: 0,25M Tris-HCl, pH: 6.8, 8% w/v SDS, 20% v/v Γλυκερόλη, 0.04% w/v Bromophenol blue. Πριν το χρησιμοποιήσουμε προσθέτουμε DTT σε τελική συγκέντρωση 0,4M) και ακολούθως θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών και η κάλυψή τους από μόρια SDS έχει σαν συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα στο πήκτωμα της πολυακρυλαμιδίου να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους κατά μήκος του πηκτώματος.

Sample Buffer 4X	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
Tris-HCl	0,25M, pH: 6.8
SDS (sodium dodecyl sulphate)	8% w/v
Glycerol	20% v/v
Bromophenol blue	0.04% w/v
DTT (πριν το χρησιμοποιήσουμε προσθέτουμε το DTT)	0,4M

Προετοιμασία πηκτώματος

Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αναμιγνύονται όλα τα συστατικά του διαλύματος εκτός από το APS και το TEMED, τα οποία λειτουργούν ως καταλύτες για την απαρχή και διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα, οπότε προστίθενται στο τέλος λίγο πριν την έγχυση του διαλύματος. Το πήκτωμα εκχύνεται στον κενό χώρο που δημιουργείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με κομμάτια πλαστικού (spacers) συγκεκριμένου πάχους (στην προκειμένη περίπτωση 1.5 mm). Αρχικά εκχύνεται το πήκτωμα διαχωρισμού [running gel: όγκος διαλύματος

πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα (π.χ. 6% w/v - 15% w/v), 0.375 M Tris-HCl, pH: 8.8, 0.1% w/v SDS, 0.1% w/v APS, 0.03% v/v TEMED] και η ελεύθερη επιφάνειά του καλύπτεται με μικρό όγκο απεσταγμένου νερού μέχρι να πολυμεριστεί. Αφού πολυμεριστεί, αφαιρείται η ποσότητα του απεσταγμένου νερού και προστίθεται το πήκτωμα επιστοιβαξης (stacking gel: διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 4.5% w/v, 0.125 M Tris-HCl, pH: 6.8, 0.1% w/v SDS, 0.1% w/v APS, 0.05% v/v TEMED) μέσα στο οποίο προστίθεται οδοντωτή μήτρα- “χτένι” (10 ή 15 θέσεων- πηγαδιών ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος) για το σχηματισμό θέσεων (πηγαδιών) στα οποία θα τοποθετηθεί το δείγμα προς ηλεκτροφόρηση. Αφού ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοιβαξης αφαιρείται το “χτένι” και τα πρωτεϊνικά δείγματα (ποσότητα ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος) τοποθετούνται στις θέσεις- “πηγαδάκια” που έχουν δημιουργηθεί με ειδικά tip που έχουν πολύ λεπτό ρύγχος.

Διάλυμα Πολυακρυλαμιδίου 30%	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
Ακρυλαμίδιο (acrylamide)	29,2% w/v
Δις-Ακρυλαμίδιο (bis-acrylamide)	0,8% w/v

Διάλυμα Πηκτώματος Διαχωρισμού (Running Gel)	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
Διάλυμα Πολυακρυλαμιδίου 30%	Επιθυμητή πυκνότητα (π.χ. 6% w/v - 15% w/v)
Tris-HCl	0,375M, pH: 8.8
SDS (sodium dodecyl sulphate)	0,1% w/v
APS (ammonium persulphate)	0,1% w/v
TEMED	0,03% v/v

Διάλυμα Πηκτώματος Επιστοιβαξης (Stacking Gel)	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
Διάλυμα Πολυακρυλαμιδίου 30%	4,5% w/v
Tris-HCl	0,125M, pH: 6.8
SDS (sodium dodecyl sulphate)	0,1% w/v
APS (ammonium persulphate)	0,1% w/v
TEMED	0,05% v/v

Ηλεκτροφόρηση

Μετά την τοποθέτηση των πρωτεϊνικών δειγμάτων, γεμίζουμε το δοχείο της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad) με 500ml διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X [διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrophoresis buffer) 10X: 1.92 M Γλυκίνη, 0.25 M TRIZMA-base, 1% w/v SDS. Το pH δεν

ρυθμίζεται αλλά πρέπει να είναι περίπου 8.3]. Εφαρμόζουμε ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης ρεύματος 25mA/ ανά πήκτωμα μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, δηλαδή μέχρι το μέτωπο της χρωστικής να φτάσει στο κάτω άκρο του πήκτωματος. Στη συνέχεια, αφού απομακρυνθεί το πήκτωμα επιστοίβαξης, το πήκτωμα διαχωρισμού υφίσταται ανοσοαποτύπωση (Western Blot).

Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (Electrophoresis Buffer) 10X, pH: 8.3	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
Γλυκίνη	1,92M
Tris (Base)	0,25M
SDS (sodium dodecyl sulphate)	1% w/v

Ανοσοαποτύπωση - Western Blot

Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (western blot) κατά Towbin et al. 1979

Ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης και τέσσερα κομμάτια χαρτιού Whatman 3mm κόβονται στις ακριβείς διαστάσεις του πήκτωματος και εμβαπτίζονται σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: 20% v/v μεθανόλη, 10% v/v διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X). Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης συναρμολογείται το “σάντουιτς” μεταφοράς ως εξής: μεταξύ δύο σφουγγαριών της συσκευής, εμβαπτισμένων και αυτών σε διάλυμα μεταφοράς, και από το διάφανο- λευκό τμήμα του πλαστικού υλικού προς τη μαύρη πλευρά της συσκευής, τοποθετούνται με τη σειρά, δύο χαρτιά Whatman 3mm, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και άλλα δύο χαρτιά Whatman 3mm (όλα αφού πρώτα έχουν εμβαπτισθεί στο διάλυμα μεταφοράς), με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ τους. Το “σάντουιτς” τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (Bio-Rad), στην οποία προστίθεται διάλυμα μεταφοράς μέχρι να γεμίσει πλήρως (περίπου 1000ml), με το πήκτωμα προς την κάθοδο.. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης ρεύματος 400mA για 1-1.5 ώρα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς φροντίζουμε ώστε το διάλυμα μεταφοράς να διατηρείται ψυχρόμενο σε θερμοκρασία 4°C.

Διάλυμα Μεταφοράς (Transfer Buffer) 1X	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
Μεθανόλη	20% v/v
Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 10X	10% v/v

Αντιστρεπτή χρώση της μεμβράνης με Ponceau S

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς μετά το πέρας της διαδικασίας γίνεται χρώση της μεμβράνης. Η νιτροκυτταρίνη εκπλένεται με απεσταγμένο νερό και κατόπιν εμβαπτίζεται στο διάλυμα της χρωστικής για 5 λεπτά. Στη συνέχεια εκπλένεται με απεσταγμένο νερό ώσπου να γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες (bands). Τέλος η πλήρης απομάκρυνση της χρωστικής επιτυγχάνεται με παρατεταμένη ανάδευση της μεμβράνης σε απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα Χρώσης Ponceau	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
Ponceau S	0,2%w/v
Trichloroacetic acid (TCA)	3%w/v
Sulfosalicylic acid	3%w/v

Διαδικασία Ανοσοανίχνευσης

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στη σύνδεση του αντισώματος κατά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, με τον αντιγονικό επίτοπο της πρωτεΐνης που είναι ακινητοποιημένη στη μεμβράνη. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ανοσοσφαιρίνη κατά αντιορού του ζώου-ξενιστή που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του πρώτου ειδικού αντισώματος, η οποία αναγνωρίζει και στοχεύει την ανοσοσφαιρίνη του πρώτου ειδικού αντισώματος και συνδέεται με αυτό. Η δεύτερη αυτή ανοσοσφαιρίνη είναι συνδεδεμένη μέσω χημικού δεσμού με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase, HRP). Για την ανίχνευση της θέσεως στην οποία βρίσκεται η υπεροξειδάση και κατά συνέπεια τη θέση της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε (σύμπλοκο πρωτεΐνη – πρώτο αντίσωμα – δεύτερο αντίσωμα – υπεροξειδάση) χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο εμφάνισης ECL (Western Blotting detection kit), το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης. Τελική συνέπεια της αντίδρασης του υποστρώματος με την υπεροξειδάση είναι η παραγωγή χημειοφωταύγειας (chemiluminescence) η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση του ειδικού φιλμ Hyperfilm ECL ή μέσω του μηχανήματος εμφάνισης XRS (ChemiDoc XRS+ System (BioRad).

Όλες οι παρακάτω διεργασίες γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και όλες οι εκπλύσεις με διάλυμα TBS-T 1X (TBS-T 10X: 20 mM Tris-HCl, pH:7.6, 137 mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20).

Διάλυμα Tris Buffered Saline-Tween (TBS-T) 10X	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
Tris-HCl	20 mM pH 7.6
NaCl	137 mM
Tween20	0.1%v/v

Αρχικά η μεμβράνη αναδεύεται μέσα σε διάλυμα 5% w/v αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS-T 1X (Blocking Buffer) είτε για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε για 14-16 ώρες στους 4°C, προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, έπειτα από τρεις εκπλύσεις με TBS-T 1X, μία των 15 λεπτών και δύο των 5 λεπτών, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επάζεται για 24 ώρες στους 4°C με την κατάλληλη συγκέντρωση του πρώτου αντισώματος αραιωμένο σε διάλυμα BSA/TBS-T 1X.

Διάλυμα Αντισωμάτων BSA/TBS-T 1X	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
BSA	5% w/v

Διάλυμα Αντισωμάτων BSA/TBS-T 1X

Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
NaN3	0,03% v/v

Για τις ανάγκες των πειραμάτων που πρόκειται να περιγραφούν, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα στις αντίστοιχες αραιώσεις:

anti-Tubulin, 1:20, clone 1A2, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-JHDM1B (KDM2B), 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Ezh2, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Bmi1, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-E-Cadherin, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-N-Cadherin, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Zo1, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-RhoA, 1:100, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-RhoB, 1:100, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-RhoC, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Rac1, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Vinculin, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Paxillin, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Cofilin, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Gapdh, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-FAK, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-pFAK, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-PI3K, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-PI3Kp85, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-AKT, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-pAKT, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-pSGK1, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-Vav2, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X
anti-p190GTPase, 1:1000, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X

Όταν τελειώσει ο χρόνος επώασης με το πρώτο αντίσωμα, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης εκπλένεται δύο φορές για 5 λεπτά κάθε φορά με TBS-T 1X και στη συνέχεια επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

anti-mouse-HRP, 1:10000 σε διάλυμα 5% w/v αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS-T 1X (Blocking Buffer)
anti-rabbit-HRP, 1:10000 σε διάλυμα 5% w/v αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS-T 1X (Blocking Buffer)
anti-goat-HRP, 1:10000 σε διάλυμα 5% w/v αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS-T 1X (Blocking Buffer)

Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές με TBS-T 1X, μία φορά για 15 λεπτά και 2 φορές για 5 λεπτά. Η αντίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με το

αντιδραστήριο εμφάνισης ECL (το οποίο αποτελείται από ίσους όγκους των αντιδραστηρίων εμφάνισης ECL 1 και 2) για 1 λεπτό στο σκοτάδι. Τέλος, η μεμβράνη εκτίθεται σε ακτινογραφικό φιλμ Hyperfilm-ECL ή Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm) για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας ή τοποθετείται στη θέση εμφάνισης στο μηχάνημα εμφάνισης XRS (ChemiDoc XRS+ System (BioRad). Η ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών (bands) γίνεται με το λογισμικό Image Lab Software (Bio-Rad).

Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (Stripping)

Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping. Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα απομάκρυνσης (stripping buffer: 62.5mM Tris-HCl, pH: 6.7, 2%w/v SDS, 100mM β-μερκαπταιθανόλη) και θερμαίνεται για 30 λεπτά στους 50°C. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T 1X και επανάληψη της ανοσοανίχνευσης από το στάδιο του blocking με διάλυμα 5% w/v αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS-T 1X (Blocking Buffer).

Διάλυμα Απομάκρυνσης Αντισωμάτων (Stripping Buffer)	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
Tris-HCl	62.5 mM pH 6.7
SDS	2% w/v
β-Μερκαπταιθανόλη	100mM

Ανοσοφθορισμός

Στην παρούσα μελέτη η τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την μικροσκοπική παρατήρηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης που μεσολαβούνται από την πρωτεΐνη E-cadherin και Zo-1, όπως επίσης και για τον έλεγχο των επιπέδων έκφρασης των επιγενετικών παραγόντων KDM2B και Ezh2 καθώς και των RhoGTPασών RhoA και RhoB.

Προετοιμασία καλυπτρίδων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm (VWR, Microscope cover glasses 12 mm, Germany) σε τρυβλία 24 οπών (24-well plate). Αρχικά η καλυπτρίδα αποστειρώνεται σε 100% καθαρή αιθανόλη και φλόγα και τοποθετείται μία καλυπτρίδα σε κάθε πηγαδάκι. Ακολουθεί έκπλυση μία φορά με PBS και δύο φορές με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και στη συνέχεια προσθήκη κατάλληλου αριθμού κυττάρων σε τελικό όγκο 1ml ανά οπή.

Άμεσος Ανοσοφθορισμός - Χρώση Ροδαμίνης/Φαλλοϊδίνης

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός εφαρμόστηκε για την μικροσκοπική παρατήρηση των ινιδίων της ακτίνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου της φαλλοϊδίνης που είναι σημασμένο με το χρωμοφόρο ροδαμίνη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική σύνδεση της φαλλοϊδίνης με τα μικροϊνίδια της ακτίνης με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης, η οποία καθιστά δυνατή στη συνέχεια την

παρατήρηση των ινιδίων με μικροσκοπία φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρατήρηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι η εξής:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm (VWR, Microscope cover glasses 12 mm, Germany) σε τρυβία 24 οπών (24-well plate), σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% Πενικιλίνη, 1% Στρεπτομυκίνη) σε θερμοκρασία δωματίου. Όλη η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και όλες οι εκπλύσεις υπό συνεχή ανάδευση. Έπειτα από τον επιθυμητό χειρισμό των κυττάρων (επώαση σε συγκέντρωση 1:1000 με τον αναστολέα των RhoGTPασών C3 Transferase), την ημέρα συλλογής, Μετά από την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων μία φορά με 1,5ml/well διαλύματος PBS 1X (Phosphate Buffer Saline 10X: 1.8mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH: 7.6) σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.

Διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline) 10X, pH: 7.6	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση</u>
NaCl	137mM
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	8mM
KH ₂ PO ₄	1.8mM

Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων (fixing) προσθέτοντας 1ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde (PFA) σε PBS για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση και επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης. Στη συνέχεια, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επώαση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας διάλυμα Triton X-100 (Triton X-100: 0,3%w/v BSA, 0,3%v/v Triton X-100 αραιωμένα σε PBS 1X) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανάδευση.

Διάλυμα Triton X-100 σε PBS	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση</u>
Triton X-100	0,3% v/v
BSA	0,3% w/v

Ακολουθούν 3 πλύσεις με διάλυμα γλυκίνης αραιωμένο σε PBS (20mM Γλυκίνη, 1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και εν συνεχεία επώαση με 1ml ανά δείγμα-well με το συγκεκριμένο διάλυμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να ανασταλλεί ο αυτοφθορισμός των κυττάρων.

Διάλυμα Γλυκίνης σε PBS	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση</u>
Γλυκίνη	20mM
BSA	1% w/v

Διάλυμα Γλυκίνης σε PBS	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση
NaN ₃	0,1%v/v

Με το τέλος της επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με διάλυμα blocking- BSA αραιωμένο σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων και παραμένουν με το συγκεκριμένο διάλυμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα 1% w/v BSA σε PBS	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση
BSA	1% w/v
NaN ₃	0,1%v/v

Ακολούθως, τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα Ροδαμίνης- Φαλλοϊδίνης (Invitrogen/ Molecular Probes) σε αραιώση 1:100 σε BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε υγρό και σκοτεινό περιβάλλον. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις με διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και μία τελική με διάλυμα PBS 1X για 3 λεπτά κάθε φορά. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες έχει προστεθεί μία σταγόνα από το αντιδραστήριο ProLong Gold Antifade reagent with Dapi (Invitrogen/ Molecular Probes) για τη χρώση των πυρήνων και για να αποφευχθεί η ταχεία απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα όρια επαφής καλυπτρίδας- αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C και σε σκοτεινό περιβάλλον, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DM LB και η φωτογράφησή τους με κάμερα LEICA DC 300F χρησιμοποιώντας Zeiss Plan-neofluar 40x/0.75 μεγεθυντικούς φακούς.

Έμμεσος Ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)

Οι βασικές αρχές της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι παρόμοιες με αυτές του Western Blot. Κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό οι κυτταρικές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από ειδικά για αυτές αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από τις αντίστοιχες ανοσοσφαιρίνες που είναι σημασμένες με κάποιο φθορίζον μόριο, όπως είναι για παράδειγμα η φλουορεσκεΐνη (FITC). Το σύμπλοκο πρωτεΐνη – αντίσωμα – ανοσοσφαιρίνη – φθορίζον μόριο εκπέμπει μέσω της φθορίζουσας ουσίας φθορισμό μετά από διέγερση με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, καθιστώντας έτσι εφικτή την παρατήρηση του με μικροσκοπία φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 12mm (VWR, Microscope cover glasses 12 mm, Germany) σε τρυβία 24 οπών (24-well plate), σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% Πενικιλίνη, 1% Στρεπτομυκίνη) σε θερμοκρασία δωματίου. Όλη η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και όλες οι εκπλύσεις υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων μία φορά με 1,5ml/well διαλύματος PBS 1X (Phosphate Buffer Saline 10X: 1.8mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, pH: 7.6) σε αργά περιστρεφόμενη

πλατφόρμα. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων (fixing) προσθέτοντας 1ml/well διαλύματος 3% *p*- formaldehyde (PFA) σε PBS για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση και επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης. Στη συνέχεια, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επώαση των δειγμάτων χρησιμοποιώντας διάλυμα Triton X-100 (Triton X-100: 0,3%w/v BSA, 0,3%v/v Triton X-100 αραιωμένα σε PBS 1X) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανάδευση. Ακολουθούν 3 πλύσεις με διάλυμα γλυκίνης αραιωμένο σε PBS (20mM Γλυκίνη, 1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και εν συνεχεία επώαση με 1ml ανά δείγμα-well με το συγκεκριμένο διάλυμα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να ανασταλλεί ο αυτοφθορισμός των κυττάρων. Με το τέλος της επώασης, τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με διάλυμα blocking- BSA αραιωμένο σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και παραμένουν με το συγκεκριμένο διάλυμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται με το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα, σε συγκέντρωση που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία, το οποίο αραιώνεται σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι συγκεντρώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

anti-JHDM1B(KDM2B) (09-864, Millipore), 1:100 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

anti-EZH2 (D2C9, Cell Signaling Technology), 1:100 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

anti-E-Cadherin (610.187, TransductionLab BD Biosciences), 1:100 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

anti-ZO-1 (339.100, Invitrogen), 1:100 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

anti-RhoA (sc-418, Santa Cruz Biotechnology) 1:50 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

anti-RhoB (sc-180, Santa Cruz Biotechnology), 1:50 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

Ακολουθούν 2 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει ήδη περιγραφεί με διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και κατόπιν επωάζονται με το κατάλληλο αντίσωμα κατά των ανοσοσφαιρινών σημασμένο με φθορίζουσα ουσία, σε συγκέντρωση που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία, αραιωμένο σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε υγρό και σκοτεινό περιβάλλον. Οι συγκεντρώσεις των δεύτερων αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

FITC-conjugated anti-mouse IgG (Chemicon), 1:100 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) ή

Alexa-Fluor-488 anti-mouse IgG (Invitrogen), 1:500 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και

FITC-conjugated anti-rabbit IgG (Chemicon), 1:100 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) ή

Alexa-Fluor-555 anti-rabbit IgG (Invitrogen), 1:600 σε διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃)

Ακολουθούν 2 εκπλύσεις με διάλυμα BSA σε PBS (1% w/v BSA, 0,1% v/v NaN₃) και μία τελική με διάλυμα PBS 1X για 3 λεπτά κάθε φορά. Οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες έχει προστεθεί μία σταγόνα από το αντιδραστήριο ProLong Gold Antifade reagent with Dapi (Invitrogen/ Molecular Probes) για τη χρώση των πυρήνων και για

να αποφευχθεί η ταχεία απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα όρια επαφής καλυπτρίδας-αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C και σε σκοτεινό περιβάλλον, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DM LB και η φωτογράφησή τους με κάμερα LEICA DC 300F χρησιμοποιώντας Zeiss Plan-neofluar 40x/0.75 μεγενθυντικούς φακούς.

Κατακρήμνιση της ενεργής Rho-GTP πρωτεΐνης από κυτταρικό εκχύλισμα σε σφαιρίδια γλουταθειόνης GST-RBD (GST-RBD Rhotekin assay)

Προσδιορισμός της ενεργοποίησης των μικρών RhoGTPασών πρωτεϊνών, RhoA και RhoB

Η μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων της ενεργής RhoA ή RhoB σε κυτταρικά εκχυλίσματα βασίζεται στο γεγονός ότι οι Rho GTPάσες αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες τελεστές τους (Rho effectors) μόνο όταν είναι ενεργοποιημένες, δηλαδή όταν είναι συνδεδεμένες με GTP (Guanosine Tri-Phosphate: τριφωσφορική γουανοσίνη). Η δέσμευση της Rho με το ολιγοπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή δέσμευσης της Rho της πρωτεΐνης Rhotekin, RBD (Rho Binding Domain), παρεμποδίζει την ενδογενή και την επαγόμενη από τις πρωτεΐνες GAP (GTPase Activating Protein) δράση της ως GTPάση κατά Ren et al., 1999 και Reid et al., 1996. Για το λόγο αυτό για την κατακρήμνιση συγγένειας των ενεργών RhoA και RhoB χρησιμοποιούνται σφαιρίδια γλουταθειόνης – σεφαρόζης (glutathione – sepharose beads) συνδεδεμένα με τη χμιαϊκή πρωτεΐνη GST- RBD, η οποία συνίσταται στη σύζευξη της πρωτεΐνης GST (glutathione-S-transferase) με τη δομική περιοχή που αλληλεπιδρά με την ενεργό Rho (RBD, Rho Binding Domain) της πρωτεΐνης-τελεστή Rhotekin. Για τον προσδιορισμό της ενεργοποίησης των Rho GTPασών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία των σφαιριδίων GST- RBD Rhotekin sepharose beads (Cytoskeleton, Inc.).

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100mm (χρησιμοποιήθηκαν 2 τρυβλία ανά κυτταρικό κλώνο και συνθήκη). Αφού εκπλυθούν 2 φορές με παγωμένο διάλυμα PBS 1X, τα κύτταρα λύνονται με 500μl διαλύματος λύσης Μαγνησίου (Cell Lysis Buffer- Mg²⁺: 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 300mM NaCl, 2%v/v NP-40) συμπληρωμένο με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (80μM Aprotinin, 1M Leupeptin, 1M NaF, 1M Na₃VO₄, 1M Glycerophosphate, 1mM Pepstatin A, 1.5mM E-64, 5mM Bestatin, 100mM AEBSF) και παραλαμβάνονται με απόξεση.

Διάλυμα Λύσης- Cell Lysis Buffer- Mg²⁺	
Συστατικά	Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα
Tris-HCl	50mM, pH: 7.5
MgCl ₂	10mM
NaCl	300mM
NP-40	2%v/v
Aprotinin	80μM
Leupeptin	1M
Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF)	1mM

Διάλυμα Λύσης- Cell Lysis Buffer- Mg²⁺	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
NaF	1M
Na ₃ VO ₄	1M
Glycerophosphate	1M
Pepstatin A	1mM
E-64	1,5 mM
Bestatin	5mM
AEBSF	100mM

Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 14.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Μικρή ποσότητα από το υπερκείμενο, ίση με 100μl, φυλάσσεται ώστε να προσδιοριστεί στη συνέχεια η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο δείγμα με τη μέθοδο κατά Lowry. Ίσοι όγκοι από κάθε δείγμα, περίπου 900μl, επωάζονται με 20μl σφαιριδίων συγκέντρωσης 3,5μg/μl, για 1 ώρα στους 4°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 5000rpm για 1 λεπτό στους 4°C και απόρριψη του υπερκείμενου διαλύματος. Τα σφαιρίδια στη συνέχεια εκπλένονται 2 φορές με 1ml από το διάλυμα έκλυσης (wash buffer: 25mM Tris-HCl, pH: 7.5, 30mM MgCl₂, 40mM NaCl). Ανάμεσα σε κάθε πλύση τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 5000rpm για 1 λεπτό στους 4°C και απορρίπτεται κάθε φορά το υπερκείμενο.

Διάλυμα Έκλυσης- wash buffer	
<u>Συστατικά</u>	<u>Τελική Συγκέντρωση στο Διάλυμα</u>
Tris-HCl	25mM, pH: 7.5
MgCl ₂	30mM
NaCl	40mM

Μετά την τελευταία πλύση αφαιρείται το μέγιστο δυνατό υπερκείμενο διάλυμα, προστίθεται 30μl αποδιατακτικού διαλύματος 2X (sample buffer 2X) και τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 95°C. Παράλληλα, ετοιμάζεται ίσος όγκος ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα, από το υπερκείμενο που είχε φυλαχθεί προηγουμένως, όπου προστίθεται κατάλληλος όγκος αποδιατακτικού διαλύματος 4X και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Η συγκέντρωση της ενεργής RhoA πρωτεΐνης στα σφαιρίδια σεφαρόζης εκτιμάται με την έκλυση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια και την ανάλυση της με SDS-PAGE. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 15%, ανοσοαποτύπωση με ειδικά για κάθε Rho GTPάση πρώτα αντισώματα, ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με πυκνομετρία και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές που προκύπτουν από τις ζώνες των ολικών πρωτεϊνών. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

anti-RHOA, 1:100, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X, (sc-418, Santa Cruz Biotechnology)

anti-RHOB, 1:100, αραιωμένο σε διάλυμα αντισωμάτων 5%w/v BSA/TBST-1X, (sc-418, Santa Cruz Biotechnology)

Η ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών έγινε με το πρόγραμμα Image Lab Software (BioRad) και η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με βάση το λόγο της ενεργής προς την ολική RhoA ή RhoB πρωτεΐνη σε κάθε δείγμα.

Προσδιορισμός του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Cell proliferation)

Για τη μέτρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του μεταβολισμού του MTT κατά Mosmann 1983.

Η MTT ανάλυση είναι στην πραγματικότητα μία μέτρηση της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων και συγκεκριμένα των μιτοχονδρίων που μεταβολίζουν την ουσία, άρα και κατ' επέκταση μία μέτρηση κυτταρικής επιβίωσης-πολλαπλασιασμού. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 96 οπών (96-well plate) σε συγκέντρωση 5000 κύτταρα ανά οπή, με τελικό όγκο σε κάθε οπή ίση με 100μl θρεπτικού μέσου καλλιέργειας. Μετά τον κατάλληλο χρόνο καλλιέργειας αναρροφάται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και προστίθεται σε κάθε οπή ίση ποσότητα με πριν θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς phenol red και MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) σε τελική συγκέντρωση 0.5mg/ml. Οι πλάκες επωάζονται στον κλίβανο (37°C, CO₂) για 4 ώρες. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα συμβαίνει μεταβολισμός του δακτυλίου του τετραζολίου στα ενεργά μιτοχόνδρια (δηλαδή στα μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων) και σχηματισμός μπλε κρυστάλλων. Μετά το πέρας της επώασης απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο και οι κρύσταλλοι διαλύονται σε οξινοσμένη ισοπροπανόλη (διάλυμα 0.04 N HCl σε ισοπροπανόλη) ή σε 100μl διαλύματος DMSO ανά οπή. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετράται σε φωτόμετρο ELISA (Anthos Reader 2001) σε μήκος κύματος 550nm και μήκος κύματος αναφοράς 655nm.

Δοκιμασία Τραυματισμού Μονοστοιβάδας- Πείραμα Επούλωσης Πληγής (Scratch Wound Healing Assay)

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 12 οπών (12-well plates) σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας μέχρις ότου καλύψουν όλη την επιφάνεια του πάτου του τρυβλίου. Στη συνέχεια, αφαιρείται το πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας από τα κύτταρα και προστίθεται για 24 ώρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς αυξητικούς παράγοντες (FBS). Με το πέρας των 24 ωρών προστίθεται ξανά πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας παρουσία ή απουσία παραγόντων που θέλουμε να μελετήσουμε την επίδρασή τους στη συνολική μετακίνηση των κυττάρων. Οι παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν στις εξής συγκεντρώσεις:

Αναστολείς	Τελική Συγκέντρωση στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας
Rho Inhibitor I, C3 Transferase	1:1000
PI3K Inhibitor, LY294002	1:1000
FAK Inhibitor II	1:1000

Στη συνέχεια, δημιουργείται μία εγκάρσια τομή (πληγή) στο κέντρο της κυτταροκαλλιέργειας με τη βοήθεια αποστειρωμένης αιχμηρής ακίδας ή tip (χρόνος μηδέν) και η επούλωση της πληγής παρακολουθείται στη διάρκεια του χρόνου, σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η παρακολούθηση της

πληγής γίνεται με μικροσκόπιο LEICA DMIRE2 και οι φωτογραφίες γίνονται με κάμερα LEICA DC 300F. Η μετακίνηση των κυττάρων και κατ' επέκταση το κλείσιμο της τομής- πληγής εκφράζεται ως ποσοστό του αρχικού πλάτους της πληγής. Για τον προσδιορισμό της διαμέτρου της πληγής, για κάθε χρονική στιγμή και συνθήκη τραβήχθηκαν 12 φωτογραφίες από κάθε δείγμα και σε κάθε φωτογραφία μετρήθηκε η διάμετρος της πληγής σε τρία διαφορετικά σημεία. Η κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη βοήθεια των προγραμμάτων Image J Analysis Software και Microsoft Excel.

Προσδιορισμός Απορρόφησης Ασβεστίου- Ca^{2+} measurements- SOCE

Για να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του ενδοκυττάρου ασβεστίου στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το Fura-2 χρωμοφόρο και ακολουθήθηκε η διαδικασία με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε γυάλινες καλυπτρίδες διαμέτρου 22mm (VWR, Microscope cover glasses 12 mm, Germany) σε τρυβλία 6 οπών (6-well plate). Επιάζονται με Fura-2/AM (2 μ M, Invitrogen, Goettingen, Germany) για 30 λεπτά στους 37°C και στη συνέχεια were excited σε μήκος κύματος 340nm ή 380nm και παρατηρείται ο φθορισμός με καταβυθικό φακό (Fluor 40x/1.30 oil) σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού (Axiovert 100, Zeiss, Oberkochen, Germany). Η εκπεμπόμενη ένταση του φθορισμού καταγράφεται στα 505nm και τα αποτελέσματα της καταγραφής αποθηκεύονται σε ειδικό πρόγραμμα λογισμικού (Metafluor, Universal Imaging, Downingtown, USA). Η ενεργότητα του κυττοσολικού ασβεστίου υπολογίζεται από το λόγο των τιμών απορροφήσεων στα 340nm/ 380nm. Το SOCE προσδιορίστηκε από την απομάκρυνση του εξωκυττάρου ασβεστίου και την επακόλουθη προσθήκη του ασβεστίου υπό την παρουσία thapsigargin (1 μ M, Invitrogen) [5]. Για την ποσοτικοποίηση της εισόδου του ασβεστίου στα κύτταρα υπολογίστηκε η κλίση (slope- delta ratio/s) και η κορυφή (peak- delta ratio) της καμπύλης που προκύπτει από την ανάλυση των τιμών μέσω του προγράμματος λογισμικού καταγραφής (Metafluor, Universal Imaging, Downingtown, USA), έπειτα από την εκ νέου προσθήκη διαλύματος ασβεστίου [6, 7]. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με διάλυμα Ringer pH 7.4 (125mM NaCl₂, pH 7.4, 5mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 2mM CaCl₂, 2mM Na₂HPO₄, 32mM HEPES, 5mM glucose).

Διάλυμα Ringer, pH 7.4	
Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
NaCl ₂	125mM
KCl	5mM
MgSO ₄	1.2mM
CaCl ₂	2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM
HEPES	32mM
glucose	5mM

Για να επιτευχθούν συνθήκες επώασης απουσία ασβεστίου το πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διάλυμα Ringer pH 7.4 χωρίς ασβέστιο (125mM NaCl₂, pH 7.4, 5mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 2mM Na₂HPO₄, 32mM HEPES, 0.5mM EGTA, 5mM glucose).

Διάλυμα Ringer Free-Ca²⁺, pH 7.4

Αντιδραστήρια	Τελική Συγκέντρωση
NaCl ₂	125mM
KCl	5mM
MgSO ₄	1.2mM
CaCl ₂	2mM
Na ₂ HPO ₄	2mM
HEPES	32mM
EGTA	0.5mM
glucose	5mM

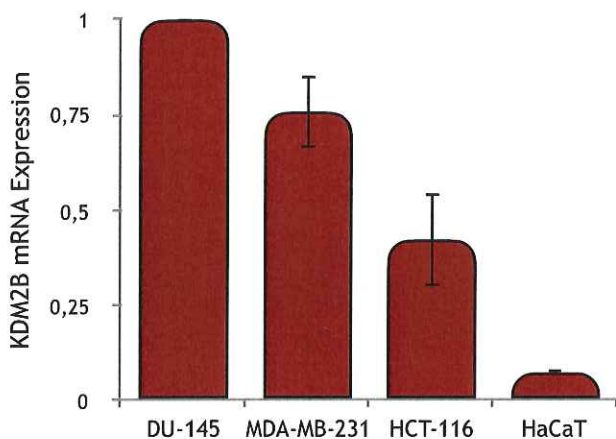
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η απομεθυλάση Ιστονών KDM2B στις καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη DU-145 και παχέος εντέρου HCT-116

Έκφραση του γονιδίου KDM2B σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές

Προκειμένου να επιλέξουμε τα κύτταρα στα οποία θα μελετήσουμε το ρόλο του ογκογονιδίου KDM2B, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές που διαθέτουμε στο εργαστήριο [DU-145 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη), MDA-MB-231 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού), HCT-116 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου), HaCat (ανθρώπινη επιθηλιακή κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων)]. Αρχικά, μελετήσαμε τον επιγενετικό αυτό παράγοντα στην κυτταρική σειρά που εμφανίζει τη μέγιστη έκφραση (DU-145, ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη) και στη συνέχεια, επαναλάβαμε τα καίρια πειράματα σε μία καρκινική σειρά με μικρότερη βασική έκφραση του παράγοντα αυτού (HCT-116, ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου), προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι τα ευρήματα έχουν καθολικό χαρακτήρα και δεν ισχύουν μόνο σε έναν καρκινικό κυτταρικό τύπο.

Διαπιστώσαμε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) πως η καρκινική κυτταρική σειρά DU-145 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη) παρουσίαζε τη μέγιστη έκφραση και για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να ξεκινήσουμε να μελετάμε το ρόλο του ογκογονιδίου KDM2B στην επιγενετική ρύθμιση του κυτταροσκελετού στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Διαφορετική μεταγραφική έκφραση του γονιδίου KDM2B σε διάφορες ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών και ανεξάρτητων μεταξύ τους μετρήσεων.

i. Καρκινική κυτταρική σειρά DU-145, ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη

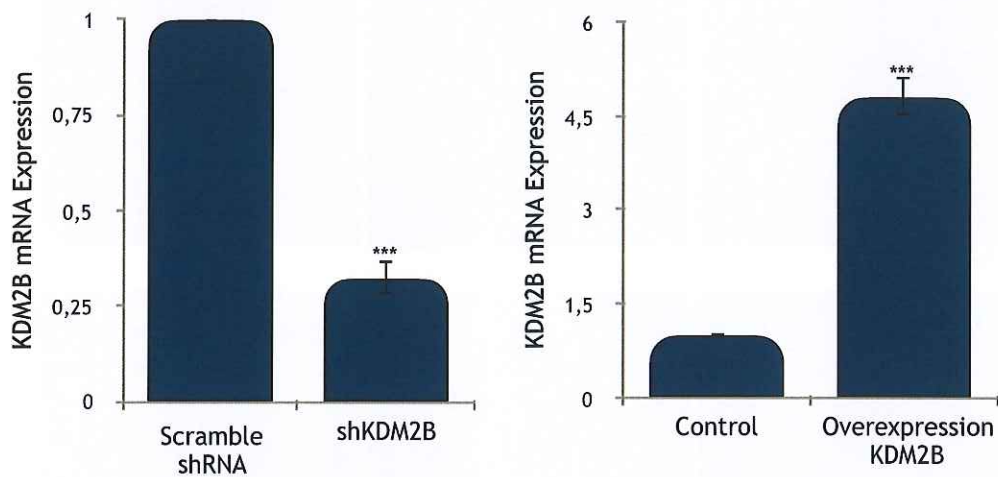
Αποσιώπηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145

Προκειμένου να διαπιστώσουμε κατά πόσο η απορρύθμιση του γονιδίου KDM2B επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης διάφορων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και τη διακυτταρική προσκόλληση, επηρεάζοντας κατ' επέκταση τη διαδικασία της κυτταρικής μετανάστευσης, δημιουργήσαμε κλώνους ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων προστάτη DU-145, με

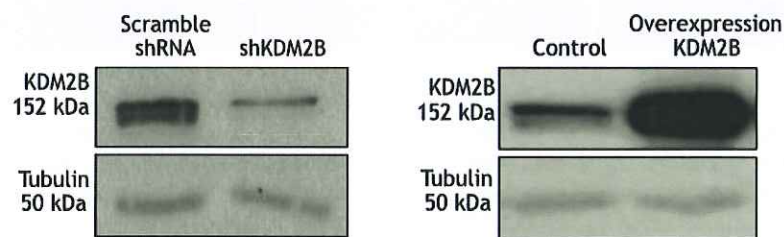
αποσιωπημένη (τρεις διαφορετικοί κυτταρικοί κλώνοι) ή υπερέκφραση (δύο διαφορετικοί κυτταρικοί κλώνοι) την πρωτεΐνη KDM2B.

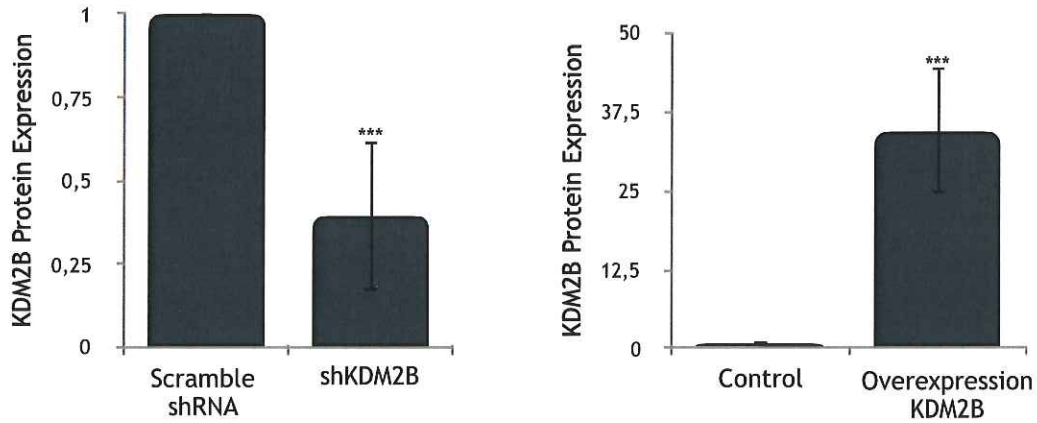
Η αποσιώπηση και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B στα κύτταρα προστάτη DU-145 επιβεβαιώθηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot (Εικόνα 2). Παρατηρούμε πως το ποσοστό αποσιώπησης στους κλώνους (shKDM2B) αγγίζει το 60-70% τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο (mRNA) όσο και σε μεταφραστικό-πρωτεϊνικό επίπεδο σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (scramble shRNA), ενώ όσο αφορά την υπερέκφραση του γονιδίου στους κυτταρικούς κλώνους (overexpression KDM2B) παρατηρούμε αύξηση 4,5-5 φορές σε μεταγραφικό επίπεδο σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (control). Παράλληλα, η αποσιώπηση και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B οδήγησε σε μειωμένα (μέση) ή αυξημένα (δεξιά) αντίστοιχα πρωτεϊνικά επίπεδα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (αριστερά), αποτέλεσμα που ήταν εμφανές και σε επίπεδο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 2).

A

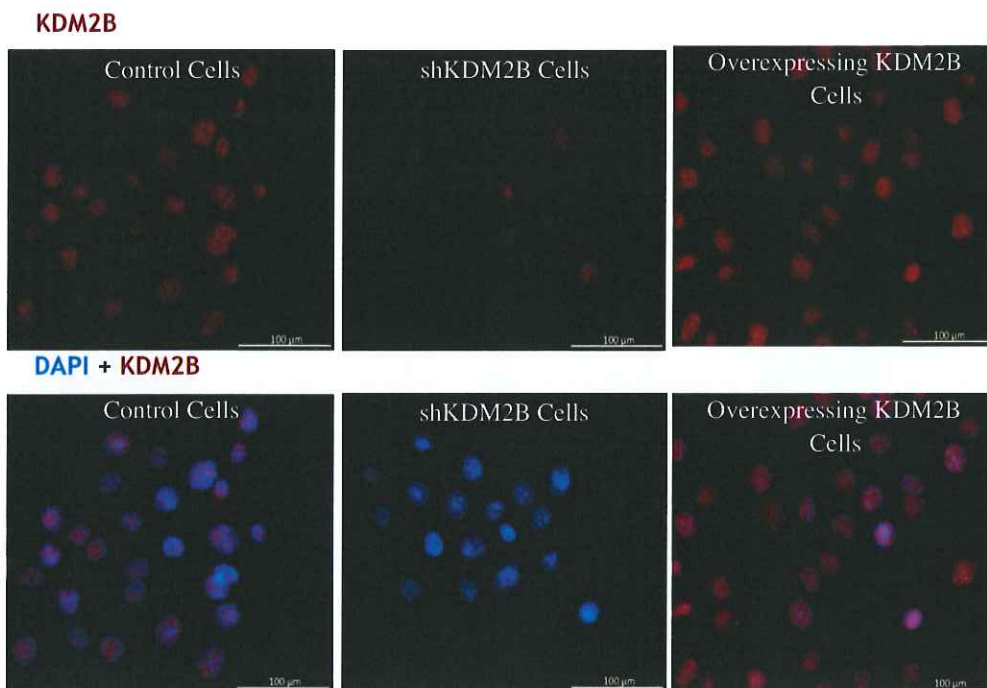


B





C

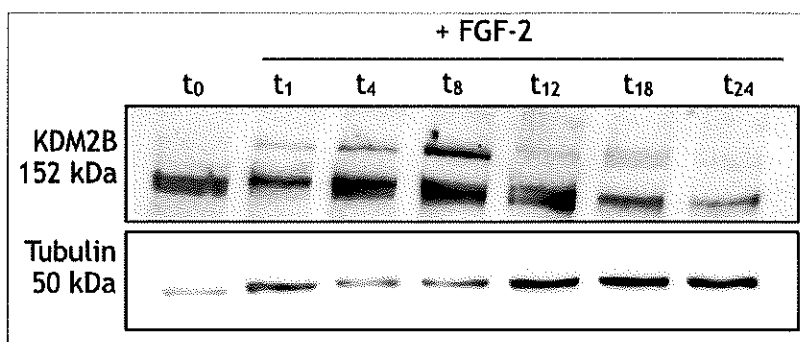


Εικόνα 2: Αποσιώπηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145. (A) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 6 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου KDM2B και της τουμουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 8 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (C) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης KDM2B (κόκκινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm .

Το γονίδιο KDM2B είναι λειτουργικά ενεργό στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 και ρυθμίζει την έκφραση Polycomb πρωτεϊνών

Η λειτουργικότητα της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 επιβεβαιώθηκε με δύο τρόπους. Με τη ρύθμιση της έκφρασής της από τον βασικό αυξητικό παράγοντα FGF-2 (bFGF, basic fibroblast growth factor 2) και με τη ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης EZH2, έπειτα από την αποσιώπηση ή/ και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B.

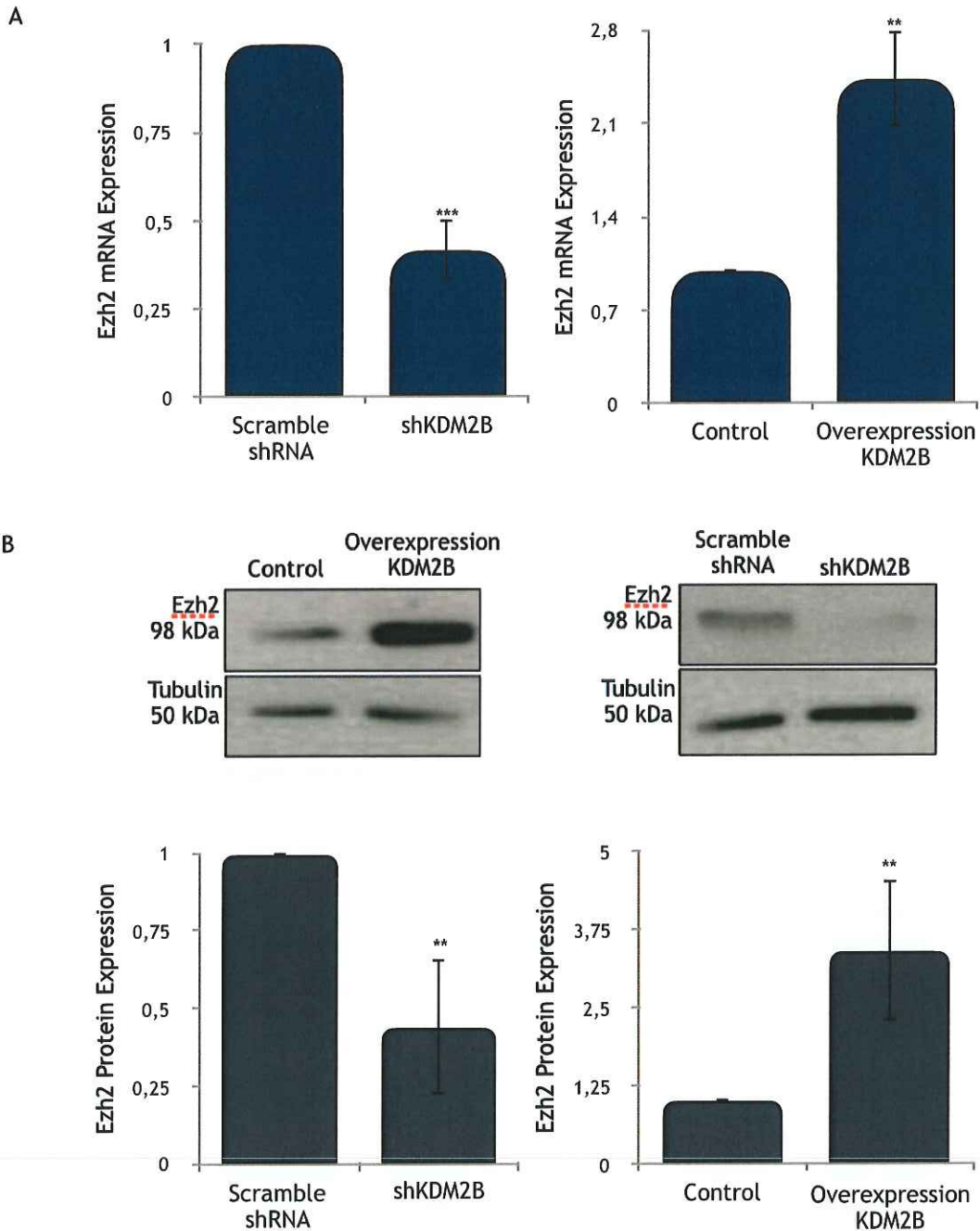
Είναι γνωστό από ήδη δημοσιευμένες μελέτες [8] ότι η έκφραση του γονιδίου KDM2B βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του βασικού αυξητικού παράγοντα FGF-2 (bFGF, basic fibroblast growth factor 2), ο οποίος επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετακίνηση και τη διεισδυτικότητα των κυττάρων, καθώς επίσης και την αγγειογένεση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό, ελέγξαμε κατά πόσο η παρουσία ή μη του αυξητικού παράγοντα FGF-2 (bFGF, basic fibroblast growth factor 2) επηρεάζει τα βασικά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης KDM2B και κατά πόσο επάγει την έκφρασή της στο συγκεκριμένο καρκινικό κυτταρικό τύπο. Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων DU-145 υπέστησαν ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot έπειτα από την επώαση με FGF-2 (bFGF, basic fibroblast growth factor 2) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Παρατηρείται προοδευτική αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης KDM2B με μέγιστη πρωτεϊνική έκφραση στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο να εμφανίζεται έπειτα από 8 ώρες επώασης με τον αυξητικό παράγοντα (Εικόνα 3).



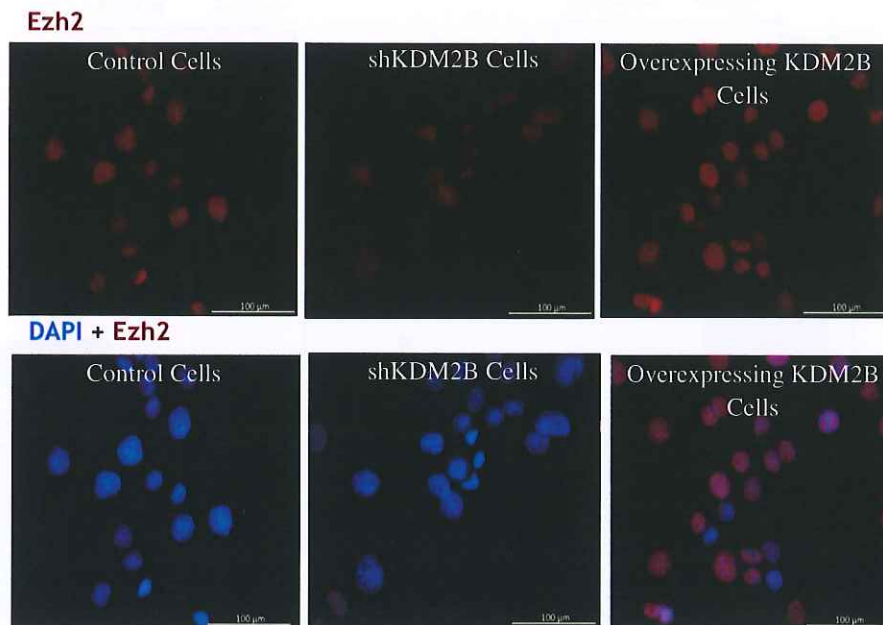
Εικόνα 3: Η πρωτεΐνη KDM2B είναι λειτουργικά ενεργή στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145. Η έκφραση του γονιδίου KDM2B ρυθμίζεται από τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot της διαφορετικής πρωτεϊνικής έκφρασης της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την προεπώαση για τις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές με 20 ng/ml FGF-2.

Η πρωτεΐνη KDM2B και η πρωτεΐνη EZH2 είναι μέλη των PRC σύμπλοκων (polycomb repressive complexes), πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία λειτουργούν ως μεταγραφικοί καταστολείς διαφόρων γονιδίων. Τα σύμπλοκα αυτά εμπλέκονται τόσο στη ρύθμιση της αυτοανανέωσης των βλαστοκυττάρων όσο και στην ανάπτυξη κακοηθειών και οποιαδήποτε αλλαγή, υπερέκφραση ή μερική απώλεια της λειτουργίας των PcG γονιδίων- πρωτεϊνών, οδηγεί σε καρκινική ανάπτυξη. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου EZH2 αναλύθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου EZH2 μειώθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση της πρωτεΐνης KDM2B, ενώ αντίστοιχα αυξήθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τα ευρήματα ήδη δημοσιευμένων μελετών [9, 10]. Στα κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (shKDM2B), η μείωση της EZH2 τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο αγγίζει το 60% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (scramble shRNA) ενώ στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο KDM2B (overexpression KDM2B) παρατηρήθηκε

αύξηση των επιπέδων έκφρασης της τάξης του 2,5 σε μεταγραφικό και 3,5 φορές σε μεταφραστικό επίπεδο αντίστοιχα, της πρωτεΐνης EZH2 σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (control) (Εικόνα 4). Επιπλέον, έμμεσος ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης EZH2 επιβεβαίωσε για ακόμη μια φορά την παραπάνω παρατήρηση (Εικόνα 4).

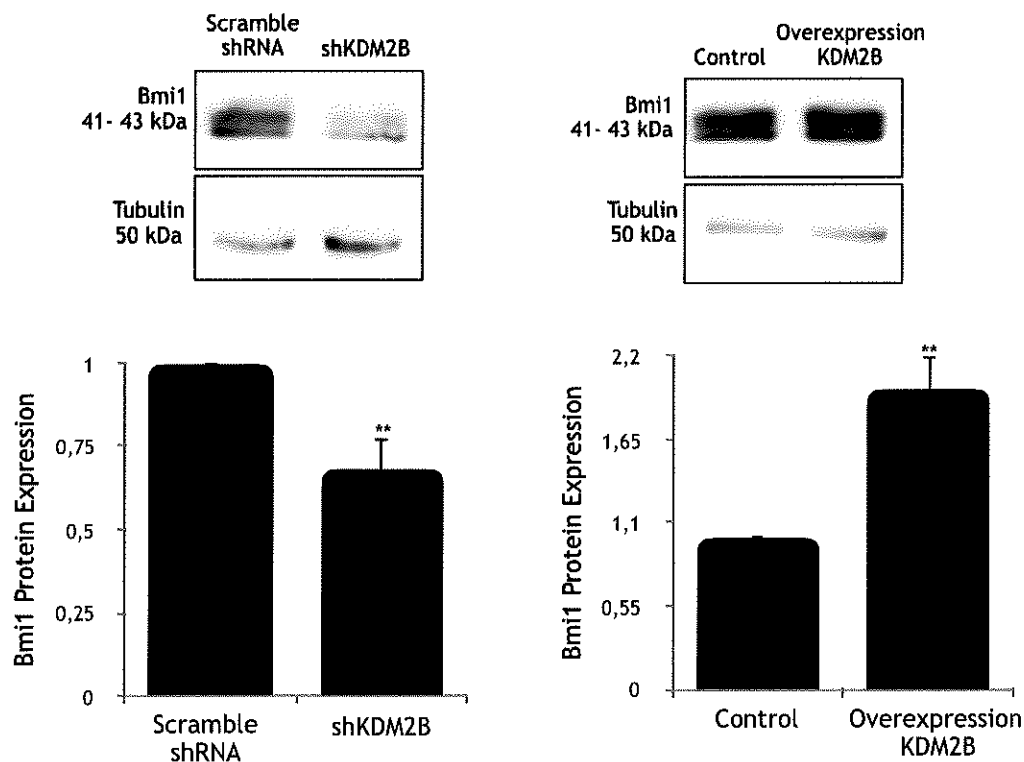


C



Εικόνα 4: Η KDM2B είναι λειτουργικά ενεργή στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145. (A) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *ezh2* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) και *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 4 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. $** (p < 0.01)$, $*** (p < 0.001)$ αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της Ezh2 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *ezh2* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 8 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. $** (p < 0.01)$ αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (C) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης Ezh2 (κόκκινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm .

Ίδιο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε και για την πρωτεΐνη BMI1, πρωτεΐνη που επίσης συμμετέχει στο PRC σύμπλοκο. Στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο KDM2B (*shKDM2B*) τα πρωτεϊνικά επίπεδα της BMI1 μειώθηκαν κατά 30%, σε σχέση με τους κλώνους αναφοράς (*scramble shRNA*), ενώ υπήρξε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο KDM2B (*overexpression KDM2B*) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς των κλώνων αυτών (*control overexpression*) (Εικόνα 5). Ήδη δημοσιευμένες μελέτες έχουν δείξει πως υπερέκφραση των γονιδίων Ezh2 και BMI1 σχετίζεται με ανάπτυξη κακοηθειών και αυξημένη επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων [11, 12], γεγονός που επιβεβαιώνεται και στη δική μας περίπτωση καθώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν στους κυτταρικούς κλώνους που υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο KDM2B.



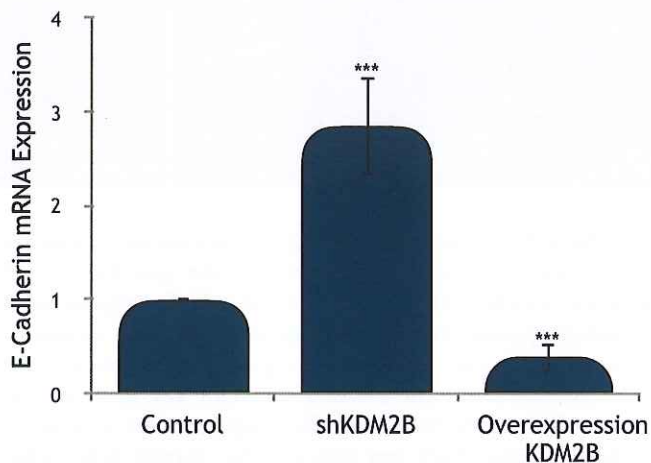
Εικόνα 5: Πρωτεϊνική έκφραση της BMI1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτόπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου bmi1 και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 4 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. **($p < 0.01$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης, E-καδερίνης και ZO-1

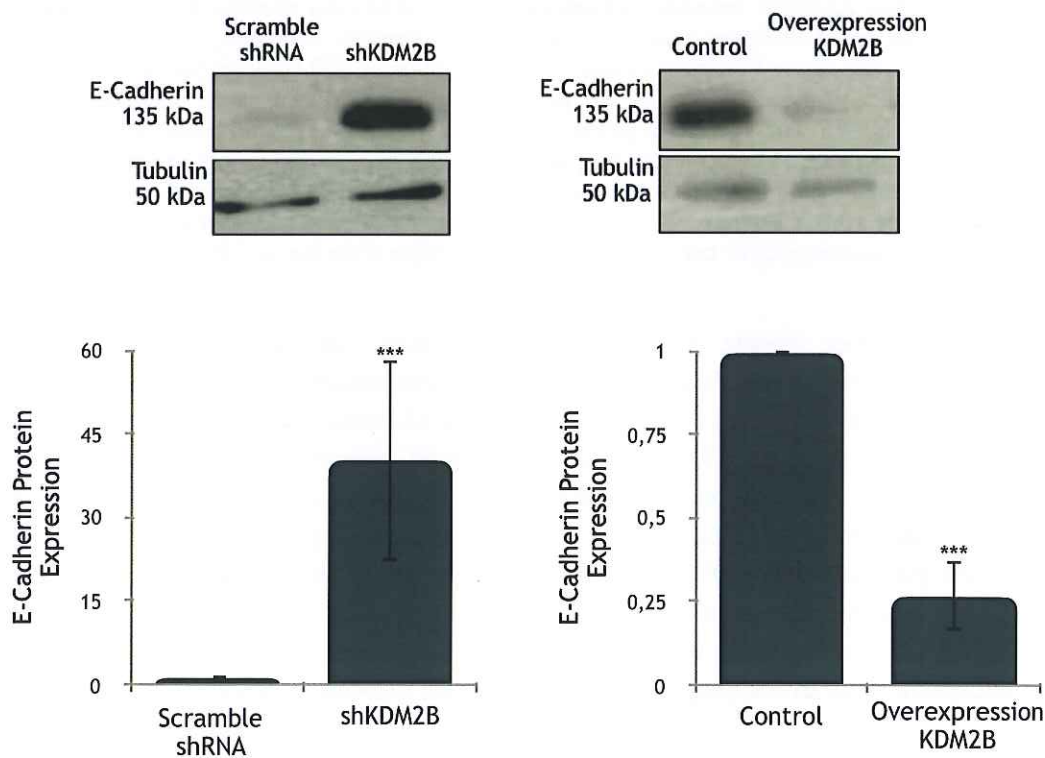
Η έκφραση της πρωτεΐνης EZH2 είναι γνωστό πως αυξάνεται με την πορεία εξέλιξης του καρκινικού όγκου. Η πρωτεΐνη EZH2 έχει την ικανότητα να οδηγεί σε σίγηση μερικά αντι-μεταστατικά microRNAs, όπως για παράδειγμα τα miR-101, let-7c και miR-200b, τα οποία με τη σειρά τους στοχεύουν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ένα από αυτά τα γονίδια-στόχος είναι το γονίδιο της E-καδερίνης [8, 11, 13]. Μειωμένη έκφραση του γονιδίου της E-καδερίνης θεωρείται ως ένα από τα κύρια γεγονότα που σχετίζονται με την απορρύθμιση και τη δυσλειτουργία της διακυτταρικής προσκόλλησης, πυροδοτώντας έτσι την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) και τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων. Θέλοντας να διαπιστώσουμε επομένως, κατά πόσο τα διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου KDM2B (αποσιώπηση και/ή υπερέκφραση) και κατ'επέκταση του γονιδίου EZH2 οδηγούν σε αυξημένα ή μειωμένα αντίστοιχα επίπεδα έκφρασης της E-καδερίνης, ελέγξαμε το πρότυπο έκφρασης της επιθηλιακής αυτής πρωτεΐνης στους διάφορους κλώνους των DU-145 κυττάρων. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μάς έδειξαν πως η απορρύθμιση της KDM2B οδηγεί σε σημαντικές διαφοροποιήσεις των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης E-καδερίνης, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και τη διακυτταρική προσκόλληση και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση. Όπως αναμέναμε, τόσο τα μεταγραφικά όσο και τα μεταφραστικά επίπεδα της E-καδερίνης αυξήθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση της KDM2B, ενώ αντίστοιχα μειώθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση της KDM2B. Η αύξηση και η μείωση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης

του γονιδίου της E-καδερίνης επιβεβαιώθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot (Εικόνα 6). Επιπλέον, το αποτέλεσμα ήταν εμφανές και σε επίπεδο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 6).

A

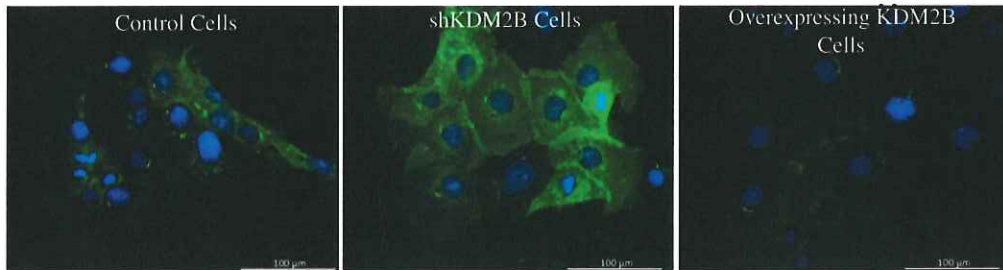


B



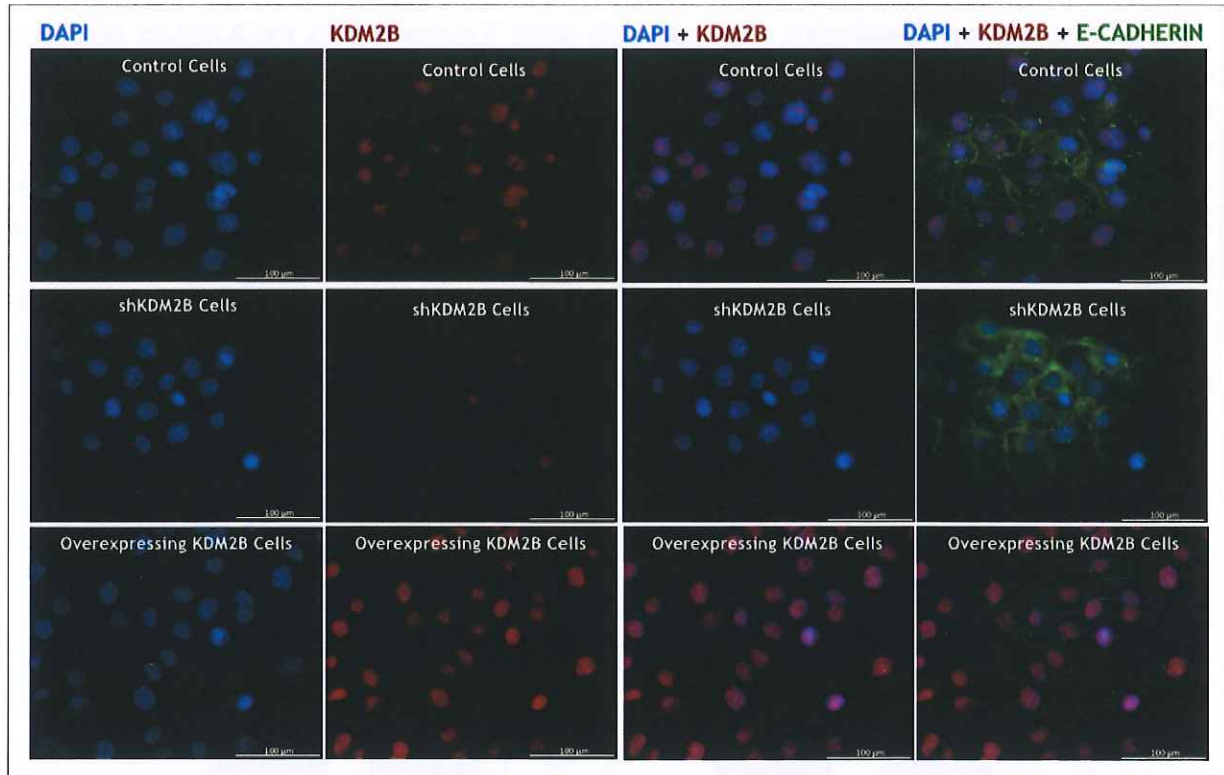
C

DAPI + E-Cadherin

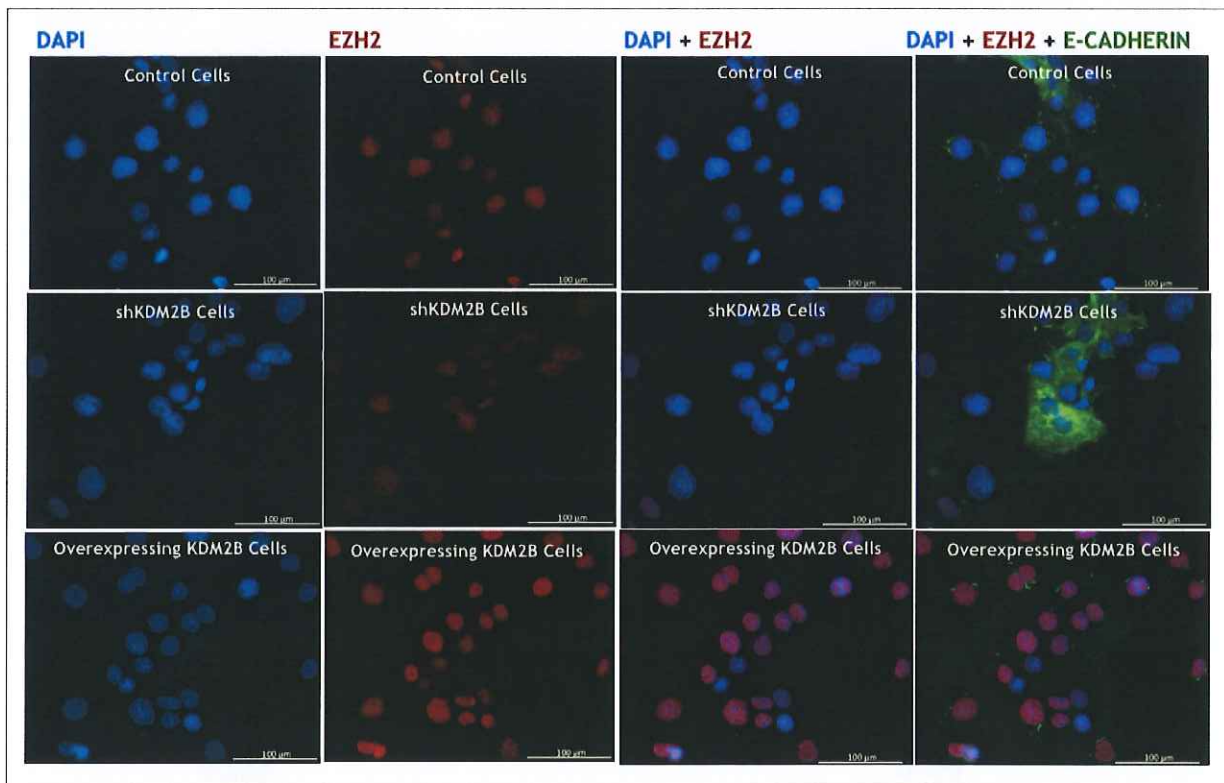


Εικόνα 6. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης κυτταρικής προσκόλλησης *E*-καδερίνης. (Α) Μεταγραφική έκφραση της *E*-καδερίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) και *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 4 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (Β) Πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου της *E*-καδερίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου της *E*-καδερίνης και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 8 διαφορετικά ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (Δ) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης *E*-καδερίνης (πράσινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη *KDM2B* (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την *KDM2B* (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm .

Πραγματοποιήθηκε επίσης, τριπλός ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες *KDM2B*, *E*-καδερίνη και του πυρήνα (Εικόνα 7) καθώς και τριπλός ανοσοφθορισμός για τις πρωτεΐνες *EZH2*, *E*-καδερίνη και του πυρήνα (Εικόνα 8) στους κυτταρικούς κλώνους που υπερεκφράζουν είτε έχουν αποσιωπημένο το γονίδιο της *KDM2B* και σε κύτταρα αναφοράς με βασική έκφραση του γονιδίου αυτού. Και στις δύο περιπτώσεις, επειδή η *KDM2B* και η *EZH2* είναι πυρηνικές πρωτεΐνες και το πρότυπο έκφρασης της *EZH2* ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της *KDM2B*, δηλαδή αποσιώπηση του γονιδίου της *KDM2B* οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα έκφρασης της *EZH2* και αντίστοιχα υπερέκφραση του γονιδίου της *KDM2B* συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων έκφρασης της *EZH2*, ήταν εμφανές το αντίθετο πρότυπο έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών με αυτό της *E*-καδερίνης στον ανοσοφθορισμό των κυτταρικών κλώνων (Εικόνες 7 και 8).



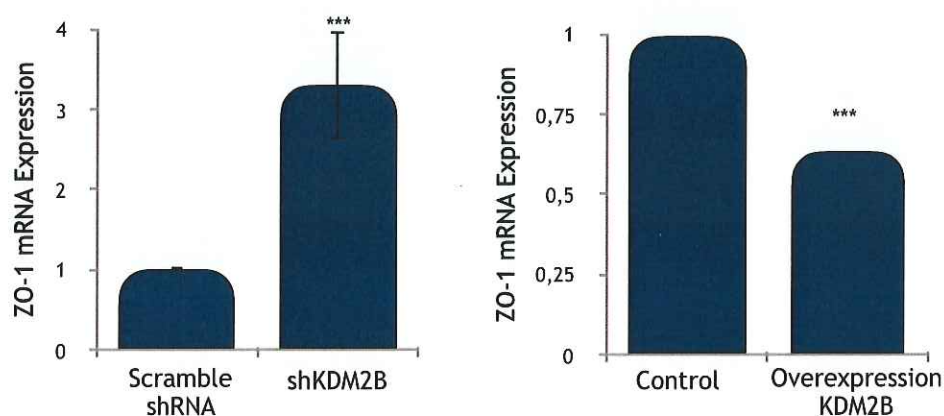
Εικόνα 7. Τριπλός ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών KDM2B (κόκκινο χρώμα), E-καδερίνη (πράσινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (πάνω), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (κάτω). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm.



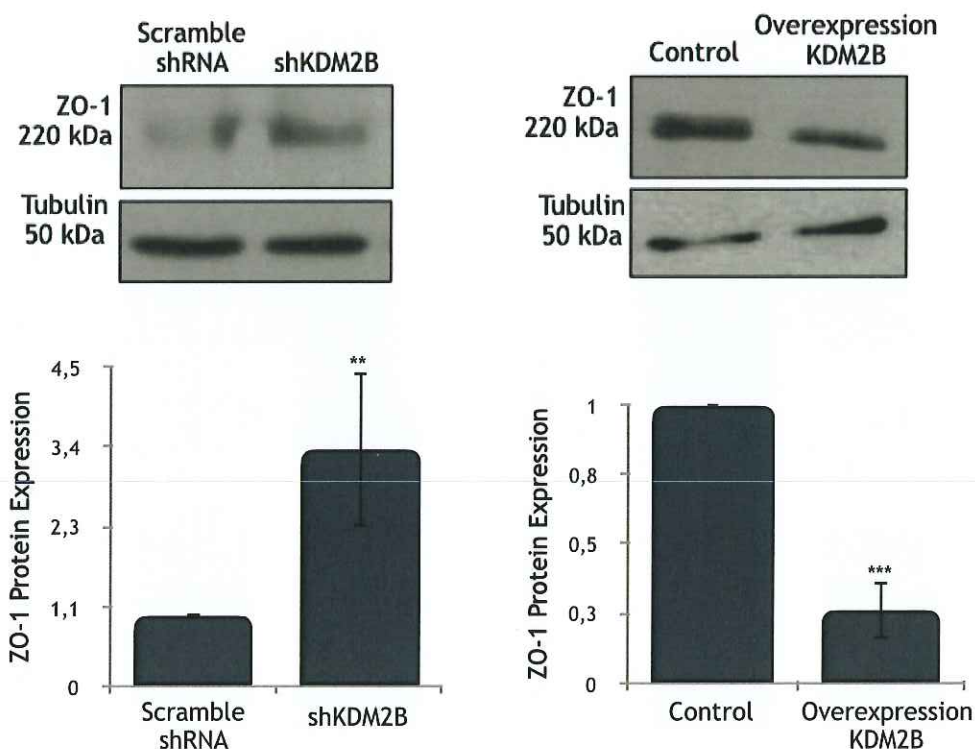
Εικόνα 8. Τριπλός ανοσοφθορισμός των πρωτεϊνών EZH2 (κόκκινο χρώμα), E-καδερίνη (πράσινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (πάνω), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (κάτω). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm.

Εκτός από την E-καδερίνη, ελέγξαμε κατά πόσο η απορρύθμιση της KDM2B οδηγεί σε σημαντικές διαφοροποιήσεις των επιπέδων έκφρασης και άλλων πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και τη διακυτταρική προσκόλληση και για το λόγο αυτό εξετάσαμε την έκφραση μιας άλλης πρωτεΐνης κυτταρικής προσκόλλησης, της ZO-1, η οποία ανήκει και αυτή στους επιθηλιακούς δείκτες της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (epithelial EMT marker) όπως η E-καδερίνη. Όπως αναμέναμε, το πρότυπο έκφρασής της ήταν παρόμοιο με την εικόνα του προτύπου έκφρασης της E-καδερίνης. Τα μεταγραφικά και μεταφραστικά επίπεδα της ZO-1 αυξήθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση της KDM2B, ενώ αντίστοιχα μειώθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B (Εικόνα 9). Οι αλλαγές αυτές στην πρωτεϊνική έκφραση αντανακλώνται και σε επίπεδο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 9).

A

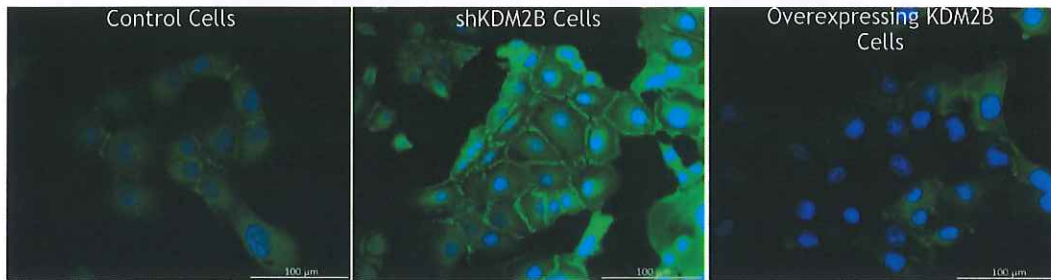


B



C

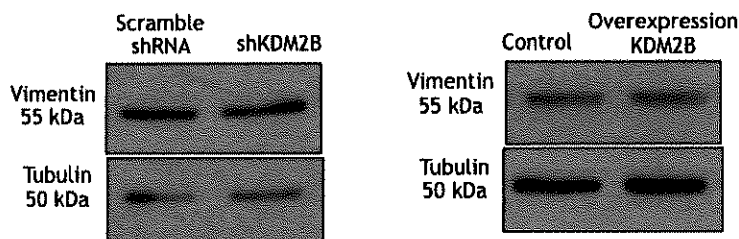
DAPI + ZO-1



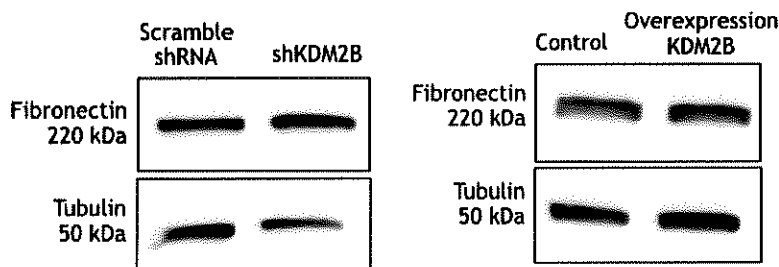
Εικόνα 9: Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την έκφραση του επιθηλιακού δείκτη κυτταρικής προσκόλλησης ZO-1. (A) Μεταγραφική έκφραση της ZO-1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) και *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 3 διαφορετικές ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. $** (p < 0.01)$, $*** (p < 0.001)$ αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της ZO-1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου ZO-1 και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 4 διαφορετικά ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. $** (p < 0.01)$, $*** (p < 0.001)$ αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (C) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης ZO-1 (πράσινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm.

Η Ε-καδερίνη και η ZO-1 εντοπίζονται στις επιφάνειες των επιθηλιακών κυττάρων σε περιοχές επαφής γειτονικών κυττάρων και ανήκουν στους επιθηλιακούς δείκτες της επιθηλιακής-μεσεγγυματικής μετάβασης (epithelial EMT marker). Στην αντίθετη ομάδα, στην ομάδα των μεσεγγυματικών δεικτών ανήκουν πρωτεΐνες όπως οι N-καδερίνη, φμπρονεκτίνη, β-κατενίνη και η βιμεντίνη. Συνήθως, στους περισσότερους καρκινικούς τύπους οι δύο αυτές ομάδες πρωτεϊνών παρουσιάζουν αντίθετα πρότυπα έκφρασης και ειδικότερα όσο πιο επιθετικός είναι ο καρκινικός τύπος των κυττάρων η έκφραση των μεσεγγυματικών δεικτών αυξάνεται, ενώ αντίστοιχα αυτή των επιθηλιακών δεικτών μειώνεται. Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε και στον συγκεκριμένο καρκινικό κυτταρικό τύπο την παραπάνω παρατήρηση, ελέγξαμε τους κυτταρικούς κλώνους που εκφράζουν είτε ένα ειδικό shRNA έναντι της KDM2B ή υπερεκφράζουν την KDM2B, τα επίπεδα έκφρασης των μεσεγγυματικών δεικτών διακυτταρικής προσκόλλησης N-καδερίνη, φμπρονεκτίνη, β-κατενίνη και βιμεντίνη. Ωστόσο, για τους δείκτες αυτούς, είτε δεν υπήρξε κάποιο αποτέλεσμα λόγω της φύσης του αντισώματος (περίπτωση της β-κατενίνης) ή της πολύ μικρής εγγενούς ποσότητας της πρωτεΐνης αυτής στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά (περίπτωση της N-καδερίνης) είτε δεν υπήρξε κάποιο εμφανές στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα διαφοροποίησης των επιπέδων της πρωτεϊνικής έκφρασης (περίπτωση της βιμεντίνης και της φμπρονεκτίνης) (Εικόνα 10).

A



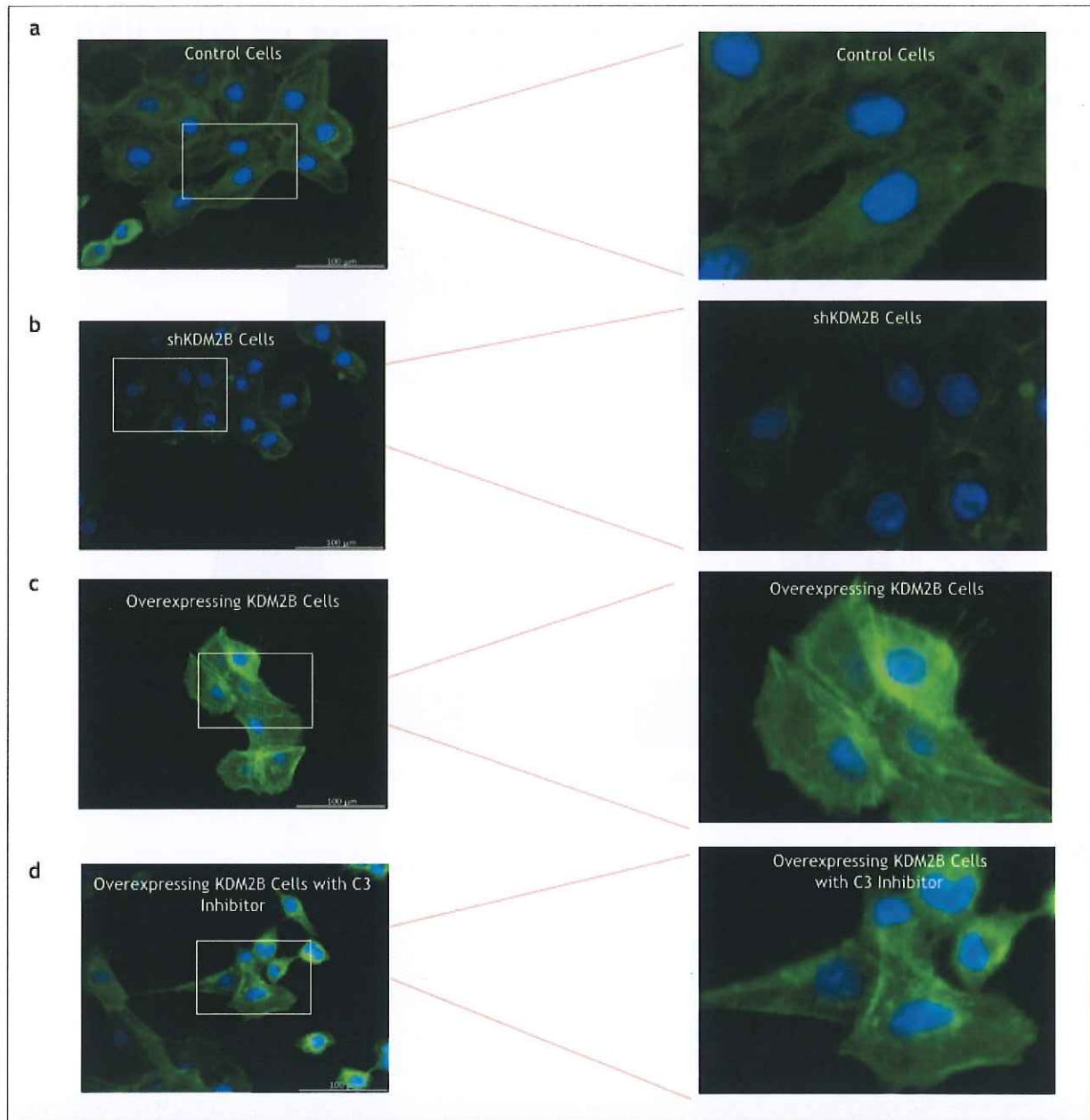
B



Εικόνα 10: Πρωτεϊνική έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών διακυτταρικής προσκόλλησης βιμεντίνης και φιβρονεκτίνης. (A) Πρωτεϊνική έκφραση της βιμεντίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot του γονιδίου της βιμεντίνης και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της φιβρονεκτίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot του γονιδίου της φιβρονεκτίνης και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα.

Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και τις μικρές Rho GTPάσες

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει έναν λειτουργικό συσχετισμό μεταξύ της διακυτταρικής προσκόλλησης και του κυτταροσκελετού της ακτίνης [14-18]. Για το λόγο αυτό, αφού επιβεβαιώσαμε ότι οι κυτταρικοί κλώνοι που εκφράζουν είτε ένα ειδικό shRNA έναντι της KDM2B ή υπερεκφράζουν την KDM2B εμφανίζουν διαφοροποιημένα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη διακυτταρική προσκόλληση, το επόμενο βήμα ήταν να ελέγξουμε κατά πόσο επηρεάζεται και η οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Με ανοσοφθορισμό έναντι της ακτίνης παρατηρήσαμε πως στους κυτταρικούς κλώνους με υπερεκφρασμένο το γονίδιο της KDM2B δημιουργούνται πιο πυκνά ινίδια του στρες καθώς και πιο πολλά και πιο μακριά φιλοπόδια (Εικόνα 11c) ενώ στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο της KDM2B ο ανοσοφθορισμός της ακτίνης ήταν σημαντικά μειωμένος (Εικόνα 11b) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 11a). Επιπλέον, προεπάση των κυτταρικών κλώνων με υπερεκφρασμένο το γονίδιο της KDM2B με τον αναστολέα των Rho GTPασών C3 transferase οδήγησε στην αναστολή των μικρονημάτων αυτών της ακτίνης (Εικόνα 11d), υποδεικνύοντας πως η ενεργοποίηση των Rho GTPασών, RhoA, RhoB και RhoC, ρυθμίζεται μέσω του γονιδίου της KDM2B. Είναι γνωστό πως η δημιουργία φιλοποδίων στα κύτταρα ελέγχεται από τη δράση της μικρής Rho GTPάσης Cdc42. Ελέγχοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στους διαφορετικούς κλώνους της κυτταρικής σειράς που μελετάμε, δεν λάβαμε κάποιο αποτέλεσμα. Αυτό πιθανά μπορεί να οφείλεται στη φύση του ίδιου του αντισώματος, καθώς χρήση του και σε άλλες κυτταρικές σειρές (HCT-116, MDA-MB-231, MCF7, HaCaT) δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western blot.

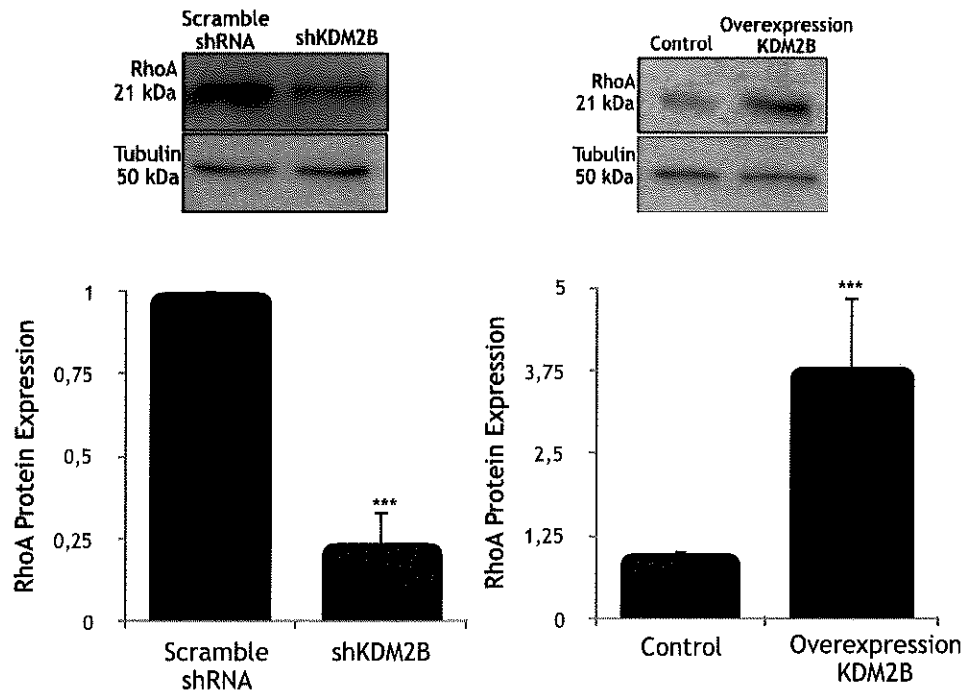


Εικόνα 11. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει την οργάνωση του κυτταροσκελετού. Αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης σε κύτταρα προστάτη *DU-145* έπειτα από (b) την αποσιώπηση του γονιδίου *KDM2B* ή (c) την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Η προεπάωση των κυττάρων που υπερεκφράζουν το γονίδιο της *KDM2B* με τον ειδικό αναστολέα των *Rho* GTPασών, *Rho* GTPase inhibitor *C3 transferase* (d) απέτρεψε τον εκτενή σχηματισμό των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Η μπάρα είναι ίση με 100 μm .

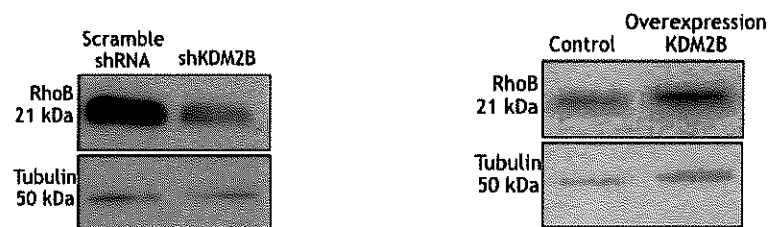
Ελέγχοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα των *RhoA*, *RhoB* και *RhoC* GTPασών διαπιστώσαμε πως η έκφρασή τους ρυθμίζεται από το γονίδιο *KDM2B*. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της *KDM2B* οδήγησε σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των *RhoA* (μείωση περίπου ίση με 75%), *RhoB* (μείωση περίπου ίση με 50%) και *RhoC* (μείωση περίπου ίση με 40%) GTPασών σε σχέση με τους κυτταρικούς κλώνους αναφοράς, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του γονιδίου αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GTPασών αυτών (Εικόνα 12). Η μείωση και η αύξηση των *RhoA* και *RhoB* GTPασών ήταν εμφανής και σε επίπεδο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 13). Αξίζει να σημειωθεί πως η γονιδιακή μεταγραφή των συγκεκριμένων δύο μικρών GTPασών δεν παρουσίασε κάποια αυξομείωση στα επίπεδά τους και δεν επηρεάστηκε έπειτα από την αποσιώπηση ή/και την υπερέκφραση του

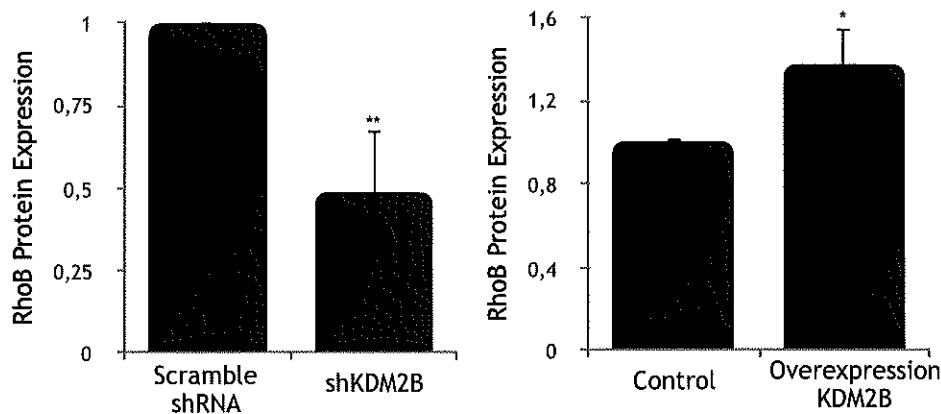
γονιδίου KDM2B. Αυτή η παρατήρηση έχει αναφερθεί επίσης και από άλλους [19-21], και συνεπάγεται μάλλον λειτουργικό έλεγχο αυτών των σηματοδοτικών μορίων από την KDM2B (Εικόνα 14).

A

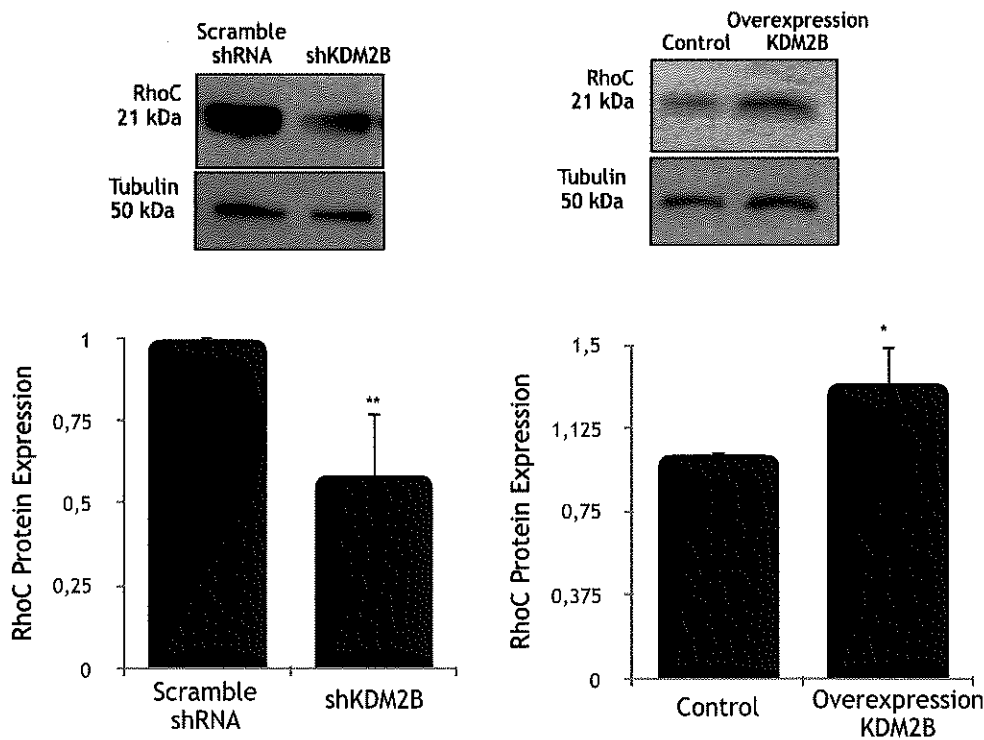


B



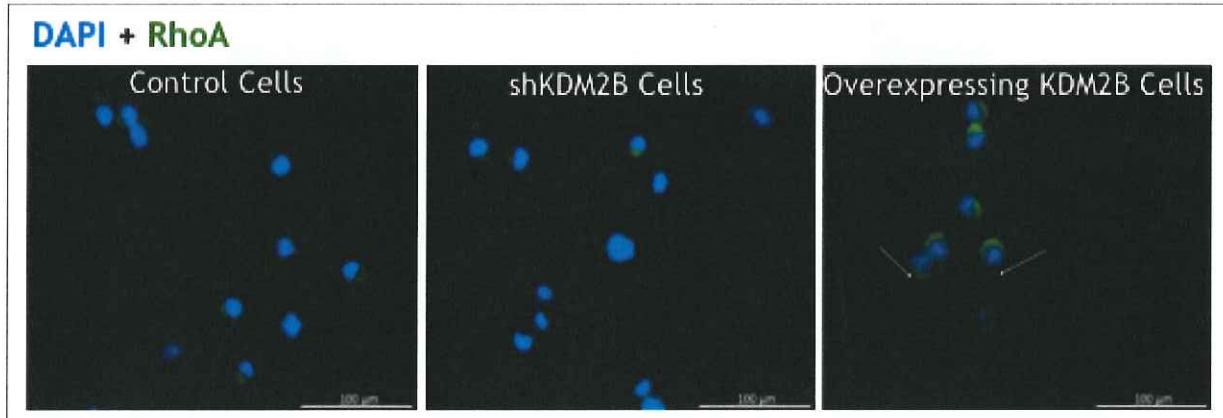


C

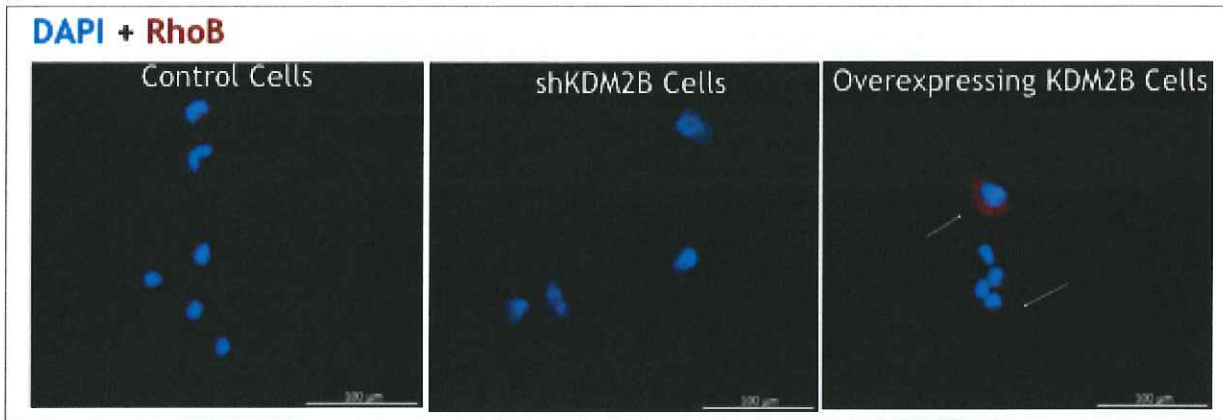


Εικόνα 12. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει την έκφραση των *RhoGTP*ασών. Πρωτεϊνική έκφραση της *RhoA* (A), *RhoB* (B) και *RhoC* (C) στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *RhoA* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από τουλάχιστον 3 διαφορετικά ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

A

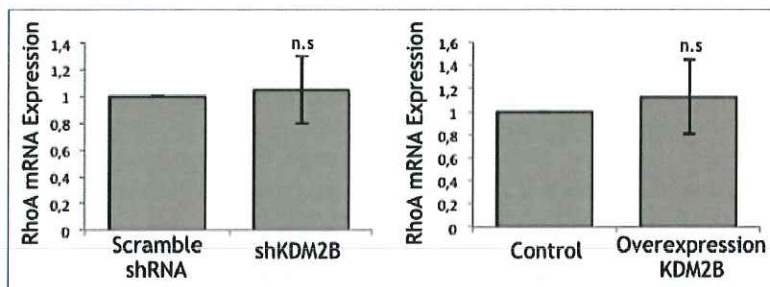


B

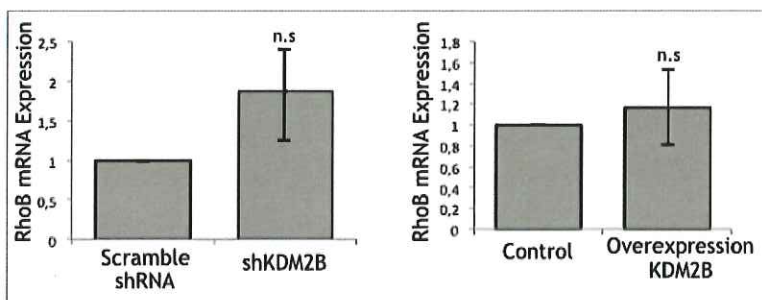


Εικόνα 13. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των RhoGTPασών. (A) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης RhoA (πράσινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένο το γονίδιο, shKDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm. (B) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης RhoB (κόκκινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένο το γονίδιο, shKDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm.

A



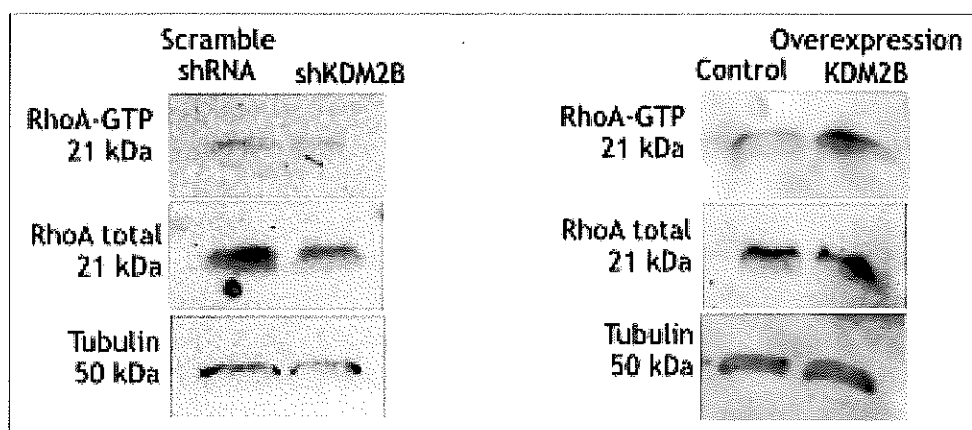
B



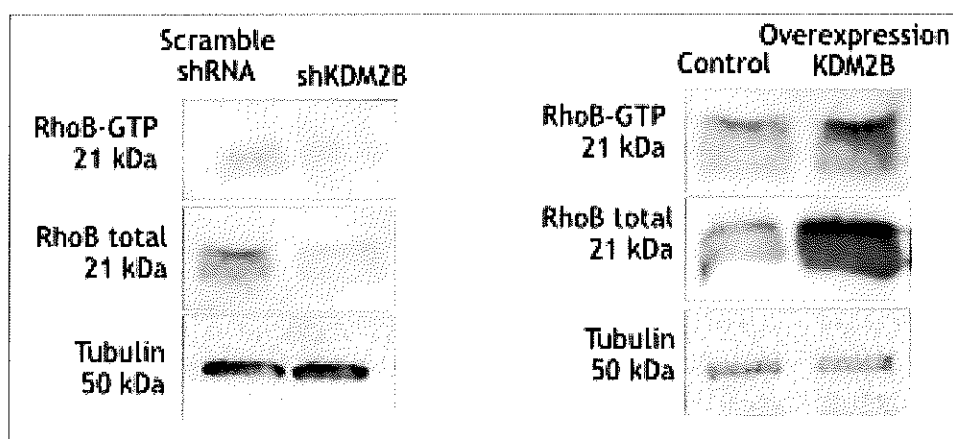
Εικόνα 14. Μεταγραφική έκφραση της RhoA (A) και της RhoB (B) στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκγολίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικές ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. n.s αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος, n.s (non statistical significance).

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως, το γεγονός ότι τα μεταγραφικά επίπεδα των RhoA και RhoB μικρών GTPασών δεν επηρεάστηκαν από την αποσιώπηση ή/και την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B, συνεπάγεται κάποιο λειτουργικό έλεγχο των σηματοδοτικών αυτών μορίων από την KDM2B. Αρχικά θελήσαμε να ελέγξουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα γνωστών ρυθμιστών της δραστηριότητας των κινασών αυτών, και συγκεκριμένα των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ενεργότητα της μικρής RhoA GTPάσης, VAV2 (van guanine nucleotide exchange factor 2), NET1 (neuroepithelial cell transforming 1) και της p190GAP, που είναι παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (guanine nucleotide-exchange factors, GEFs) ή πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τις GTPάσες (GTPase-activating proteins, GAP). Ελέγχοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης των συγκεκριμένων πρωτεϊνών στους διαφορετικούς κλώνους της κυτταρικής σειράς DU-145, δεν λάβαμε κάποιο αποτέλεσμα. Αυτό πιθανά μπορεί να οφείλεται στη φύση των ίδιων των αντισωμάτων, καθώς χρήση τους και σε άλλες κυτταρικές σειρές (HCT-116, MDA-MB-231, MCF7, HaCaT) δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western blot. Επόμενό μας βήμα, ήταν να δούμε κατά πόσο τα επίπεδα των ενεργών GTP-μορφών των RhoA και RhoB μικρών Rho GTPασών διαφοροποιούνται κατά την αποσιώπηση και την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα πρωτεϊνικά επίπεδα των ενεργών μορφών των RhoA και RhoB GTPασών, RhoA-GTP και RhoB-GTP, ήταν αυξημένα στους κυτταρικούς κλώνους των κυττάρων που υπερεκφράζουν το γονίδιο KDM2B και αντίστοιχα μειωμένα στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το εν λόγω γονίδιο (Εικόνα 15). Μπορούμε να συμπεράνουμε πως αντίστοιχη εικόνα θα λαμβάναμε και για την RhoC GTPάση.

A

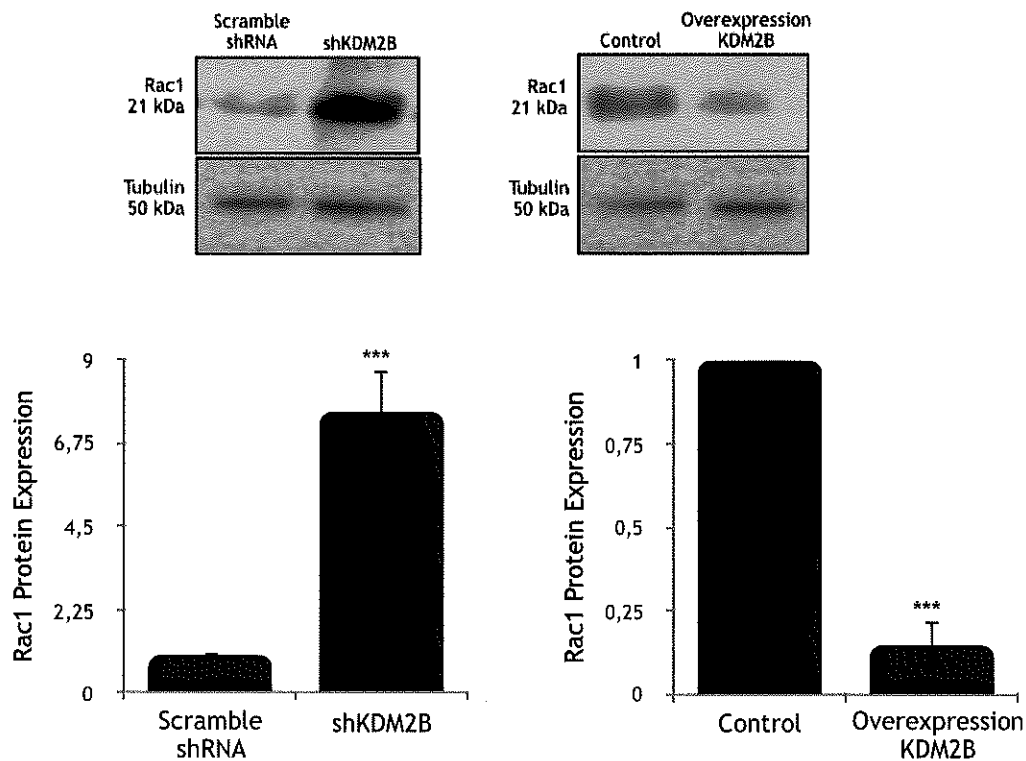


B



Εικόνα 15. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει τη φωσφορύλιωση και την ενεργότητα των Rho GTPασών RHOA και RHOB. (A) Ανάλυση της μεταφραστικής ενεργότητας με GST-RBD RhoGTPase assay της πρωτεΐνης RhoA σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Η τουμποουλίνη λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς. (B) Ανάλυση της μεταφραστικής ενεργότητας με GST-RBD RhoGTPase assay της πρωτεΐνης RhoB σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Η τουμποουλίνη λειτουργεί ως γονίδιο αναφοράς.

Πέρα από την έκφραση των RhoA, RhoB και RhoC GTPασών, ελέγξαμε την πρωτεϊνική έκφραση και ενός άλλου μέλους της οικογένειας των μικρών GTPασών πρωτεϊνών και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης Rac1. Διαπιστώσαμε πως παρουσιάζει αντίθετη εικόνα έκφρασης από αυτή των RhoA, RhoB και RhoC GTPασών. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της Rac1 στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο KDM2B (περίπου 7,5 φορές πάνω από την αντίστοιχη έκφραση στα κύτταρα αναφοράς), ενώ αντίθετα έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Rac1 μειώθηκαν σημαντικά (περίπου κατά 85% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς) (Εικόνα 16). Η ρύθμιση της λειτουργίας του σηματοδοτικού μονοπατιού των GTPασών εμπλέκεται σε λειτουργίες όπως η κυτταρική αύξηση και διαίρεση, η μετανάστευση, η απόπτωση, η μεταφορά κυστιδίων, η φαγοκυττάρωση, η διακυτταρική επικοινωνία, η κυτταρική προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων αλλά και με την εξωκυττάρια ουσία, η αναδιοργάνωση της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, η κυτταρική πολικότητα και η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων. Η χωροχρονική ενεργοποίηση των Rho GTPασών καθορίζεται από ποιοι παράγοντες GEF και GAP εμπλέκονται κάθε φορά. Οι παράγοντες αυτοί δρουν σαν ικρίωματα για να φέρουν τις Rho GTPάσες και άλλες πρωτεΐνες σηματοδότησης κοντά με τις πρωτεΐνες-τελεστές τους. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορετικές ή και αντίθετες σε μερικές περιπτώσεις εικόνες προτύπου έκφρασης και κατ'επέκταση λειτουργιών, στενά σχετικών Rho GTPασών [22], στη περίπτωση μας RhoA, RhoB, RhoC και της Rac1, σε διάφορες πτυχές της προόδου του καρκίνου. Οι Rho GTPάσες εμπλέκονται στο σχηματισμό των ινιδίων του στρες της ακτίνης (stress fibers) [23, 24] ενώ η πρωτεΐνη Rac1 προωθεί την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού έναντι της δημιουργίας λαμελλιποδίων [23, 25-27]. Τα ευρήματά μας, η αντίθετη αυτή εικόνα δηλαδή της πρωτεϊνικής έκφρασης που παρουσιάζουν οι RhoA-RhoB-RhoC και Rac1 GTPάσες, μπορεί να υποδηλώνουν πως ο επιγενετικός παράγοντας KDM2B διαδραματίζει διαφορετικούς ρόλους στην αναδιοργάνωση της ακτίνης. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την προώθηση του σχηματισμού λαμελλιποδίων με ταυτόχρονη αναστολή των ινών του στρες και αντίστροφα. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να είναι κρίσιμος για τον έλεγχο ταυτόχρονα τόσο της ανάπτυξης, όσο και της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων ή τον έλεγχο της εισβολής τους στους παρακείμενους ιστούς [26, 28-30].



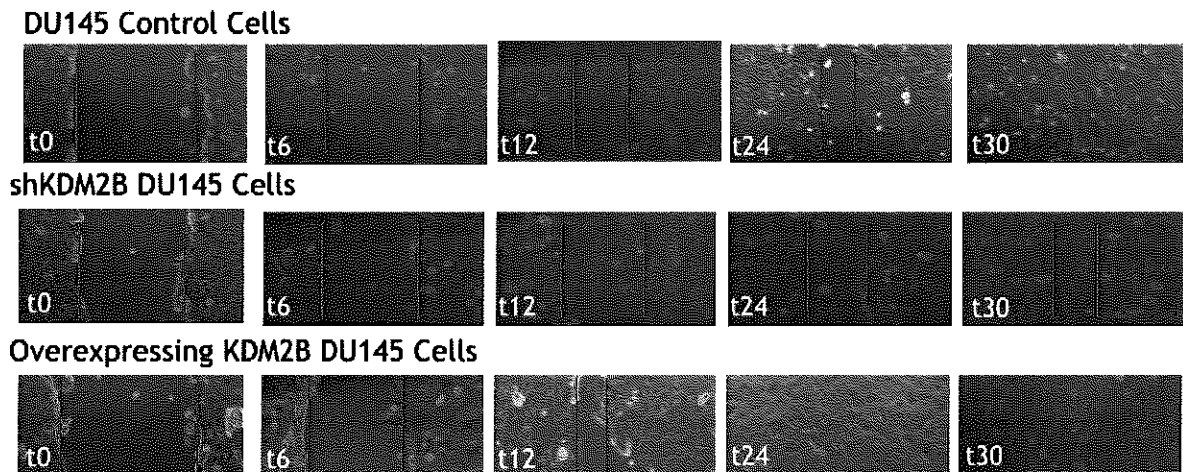
Εικόνα 16. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει την πρωτεϊνική έκφραση της *Rac1* μικρής GTPάσης. Πρωτεϊνική έκφραση της *Rac1* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *Rac1* και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of *KDM2B* (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of *KDM2B*, από 3 διαφορετικά ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Η *KDM2B* ρυθμίζει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145

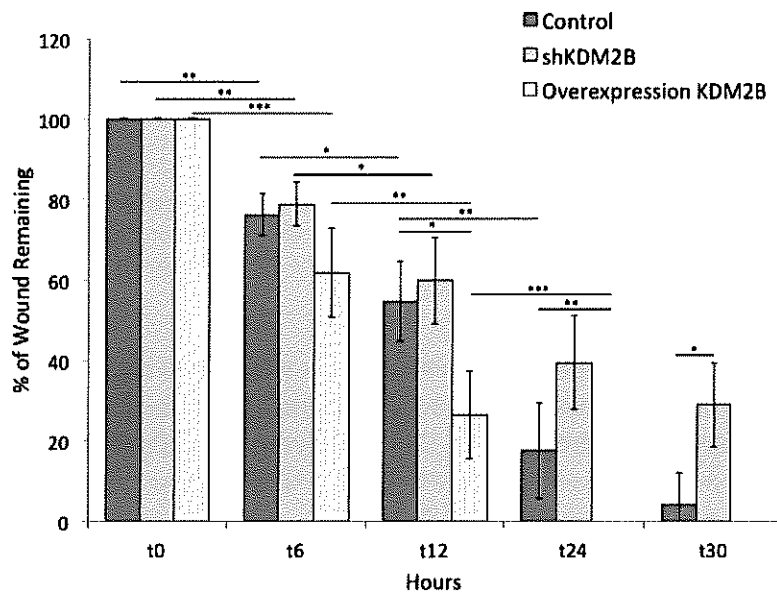
Προηγούμενες μελέτες καθιέρωσαν το σημαντικό ρόλο αυτής της απομεθυλάσης των ιστονών στη μετανάστευση των κυττάρων [8, 31]. Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τη συγκεκριμένη παρατήρηση και στο συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο, διαπιστώσαμε πως όντως η διαφορετική πρωτεϊνική έκφραση των διάφορων πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού και της κυτταρικής προσκόλλησης, η οποία λαμβάνει χώρα έπειτα από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση του γονιδίου *KDM2B*, αντανακλάται και στην συνολική μετακίνηση των κυττάρων αυτών, όπως αυτή αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας την δοκιμασία τραυματισμού μονοστοιβάδας (wound healing assay). Η τεχνική αυτή μιμείται την κυτταρική μετανάστευση *in vivo*, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη μελέτη της μετανάστευσης των κυττάρων και των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων στο τρυβλίο. Όπως αναμέναμε, παρατηρήσαμε μειωμένη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων με αποσιωπημένο το γονίδιο της *KDM2B* σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς, ενώ κύτταρα με υπερεκφρασμένο το συγκεκριμένο γονίδιο παρουσίασαν αυξημένο ρυθμό μετακίνησης συγκρινόμενα τόσο με τα κύτταρα αναφοράς όσο και με τους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο της *KDM2B* (Εικόνα 17). Συγκεκριμένα, αρκετές ώρες πριν την πάροδο 24 ωρών από τη δημιουργία της πληγής στη μονοστοιβάδα των κυττάρων στο τρυβλίο, τα κύτταρα που υπερεκφράζουν τον επιγενετικό παράγοντα *KDM2B* έχουν καλύψει πλήρως την περιοχή της πληγής και η μονοστοιβάδα των κυττάρων έχει αποκατασταθεί εντελώς. Αντίθετα, οι

κυτταρικές μονοστοιβάδες των κυττάρων με αποσιωπημένο το γονίδιο της KDM2B, ακόμα και μετά από 30 ώρες από τη δημιουργία της πληγής, δεν έχουν καλύψει την περιοχή αυτή και ένα μεγάλο ποσοστό της αρχικής πληγής είναι ακόμα εμφανές.

A



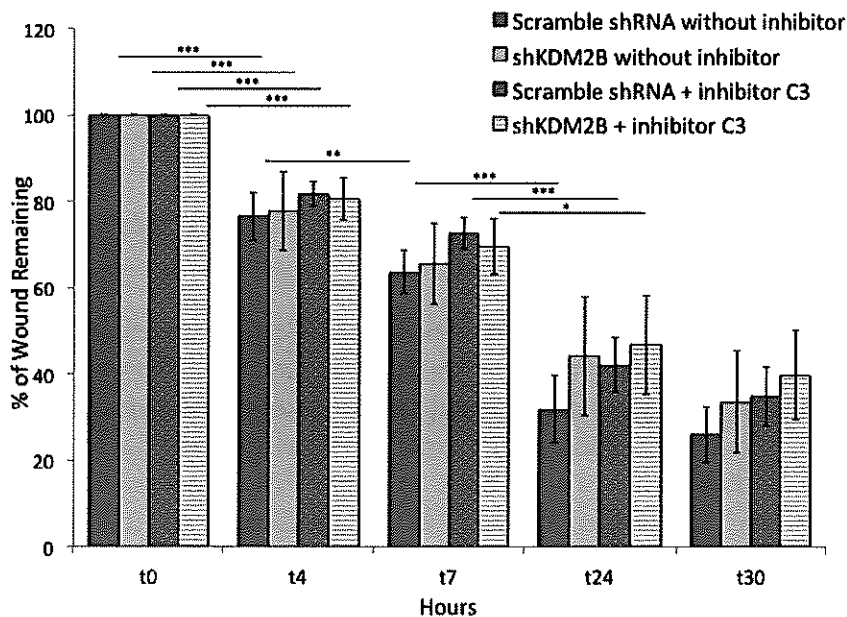
B



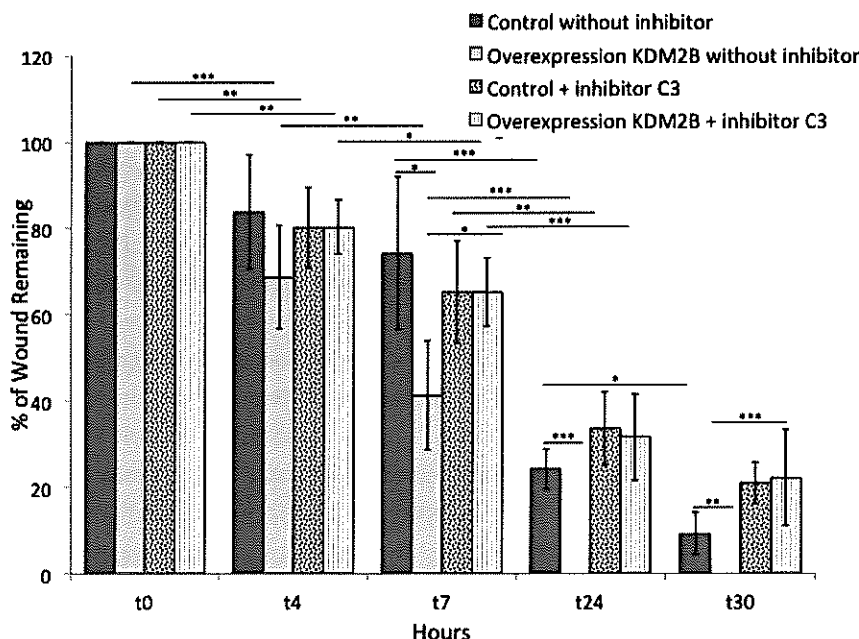
Εικόνα 17. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει τη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145. (A) Αντιπροσωπευτικά στιγμιότυπα φωτογραφιών μικροσκοπίου που απεικονίζουν το μέγεθος της “πληγής” σε κυτταρικές μονοστοιβάδες κυττάρων αναφοράς (πάνω), κυττάρων με αποσιωπημένο το γονίδιο KDM2B (μέση) και κυττάρων που υπερεκφράζουν τον επιγενετικό παράγοντα, στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. (B) Διάγραμμα που απεικονίζει το επί τις εκατό ποσοστό κλεισίματος της πληγής σε σχέση με το αρχικό μέγεθος της, σε κυτταρικές μονοστοιβάδες κυττάρων αναφοράς, κυττάρων με αποσιωπημένο το γονίδιο KDM2B και κυττάρων που υπερεκφράζουν τον επιγενετικό παράγοντα, στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. Το διάγραμμα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο από τις μετρήσεις 6 διαφορετικών και ανεξάρτητων μεταξύ τους πειραμάτων. *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύουν τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Περαιτέρω πειράματα απέδειξαν πως το αποτέλεσμα αυτό της αλλαγής της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων με βάση τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου KDM2B, συσχετίζεται με την παρατηρούμενη ρύθμιση της σηματοδότησης μέσω των Rho GTPασών από την KDM2B. Πράγματι, η προ-επώαση των κυτταρικών κλώνων που υπερεκφράζουν την KDM2B με τον αναστολέα C3 transferase της οικογένειας των Rho GTPασών μείωσε σημαντικά το δυναμικό μετανάστευσης των κυττάρων αυτών. Συγκεκριμένα, οι κυτταρικοί κλώνοι που υπερεκφράζουν τον επιγενετικό αυτό παράγοντα, αρκετές ώρες πριν την πάροδο 24 ωρών από τη δημιουργία της πληγής στη μονοστοιβάδα των κυττάρων στο τρυβλίο, έχουν καλύψει πλήρως την περιοχή της πληγής. Με χρήση του αναστολέα C3 transferase ωστόσο, παρατηρούμε πως ακόμα και μετά το πέρασμα 30 ωρών από τη δημιουργία της πληγής, η κινητική δυναμική των κυττάρων μειώθηκε σε τέτοιο βαθμό που η περιοχή της πληγής δεν έχει καλυφθεί ακόμα και ένα μεγάλο ποσοστό της αρχικής πληγής είναι ακόμα εμφανές. Το μέγεθος της πληγής μάλιστα που παραμένει ανοιχτό, πλησιάζει αυτό που παρατηρείται στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B, χωρίς τη χρήση του αναστολέα, στη χρονική στιγμή των 7 ωρών μετά τη δημιουργία της πληγής. Από την άλλη πλευρά, η επιβράδυνση της κυτταρικής μετανάστευσης που εμφανίζεται σε κύτταρα με αποσιωπημένο το γονίδιο του επιγενετικού παράγοντα, ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο όταν οι κυτταρικοί αυτοί κλώνοι προ-επώασηκαν με τον αναστολέα C3 transferase (Εικόνα 18). Αυτά τα ευρήματα καθιερώνουν ένα σημαντικό ρόλο της σηματοδότησης μέσω των RhoA/RhoB GTPασών που ελέγχεται από την KDM2B για τη ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU-145.

A



B



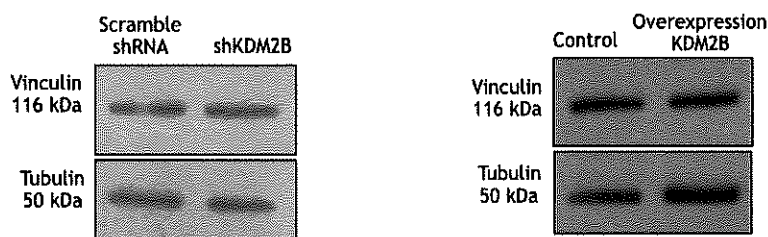
Εικόνα 18. Ο αναστολέας των Rho GTPασών C3 transferase αναστέλει τη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145. Διάγραμμα που απεικονίζει το επί τις εκατό ποσοστό κλεισίματος της πληγής σε σχέση με το αρχικό μέγεθός της, στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές, παρουσία ή απουσία του αναστολέα των Rho GTPασών C3 transferase σε (A) scramble shRNA και shKDM2B κυτταρικούς κλώνους και (B) control overexpression, overexpression of KDM2B. Το διάγραμμα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο από τις μετρήσεις 3 διαφορετικών και ανεξάρτητων μεταξύ τους πειραμάτων. *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύουν τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Το γονίδιο KDM2B ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες FAK και PI3K που ελέγχουν την κινητικότητα των κυττάρων

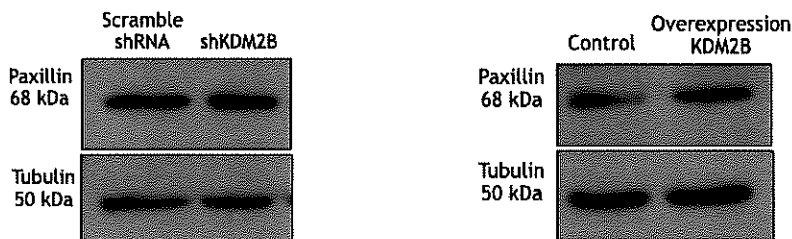
Πέρα από το σηματοδοτικό μονοπάτι των Rho GTPασών, το γονίδιο KDM2B μπορεί να ρυθμίζει και άλλα καίρια μονοπάτια που σχετίζονται με τη ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, την προσκόλληση των κυττάρων τόσο μεταξύ τους όσο και με την εξωκυττάρια ουσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετακίνηση των κυττάρων. Για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να μελετήσουμε και κατά πόσο το σηματοδοτικό μονοπάτι της FAK/PI-3K είναι ενεργό, ρυθμίζεται από το γονίδιο KDM2B και επηρεάζεται από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση του γονιδίου.

Τα σημεία προσκόλλησης ή αλλιώς “εστιακές προσφύσεις” (focal adhesions) σε μία κυτταροκαλλιέργεια παρατηρούνται ως περιοχές στενής σύνδεσης με την κυτταρική μεμβράνη στην οποία “αγκυροβολεί” δίκτυο ινιδίων ακτίνης [32, 33]. Η οργάνωσή τους περιλαμβάνει τόσο κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες (FAK-focal adhesion kinase) όσο και κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες όπως η βινκουλίνη και η παξιλλίνη. Η διαδικασία σχηματισμού και αναδιοργάνωσης των εστιών πρόσφυσης ρυθμίζεται από τις κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες, από τις μικρές Rho GTPάσες και από πρωτεΐνες που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης όπως είναι η κοφιλίνη. Ελέγχοντας την έκφραση των πρωτεϊνών της βινκουλίνης, παξιλλίνης και κοφιλίνης δεν παρατηρήσαμε κάποια αξιοσημείωτη εμφανή, στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών αυτών (Εικόνα 19).

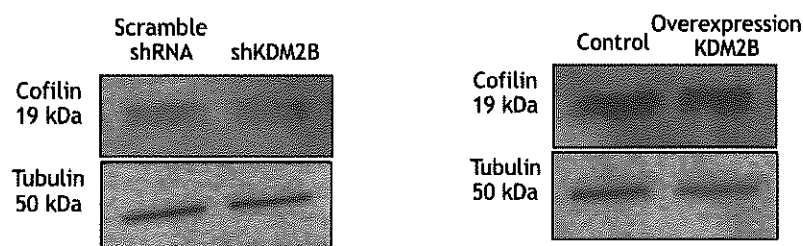
A



B



C

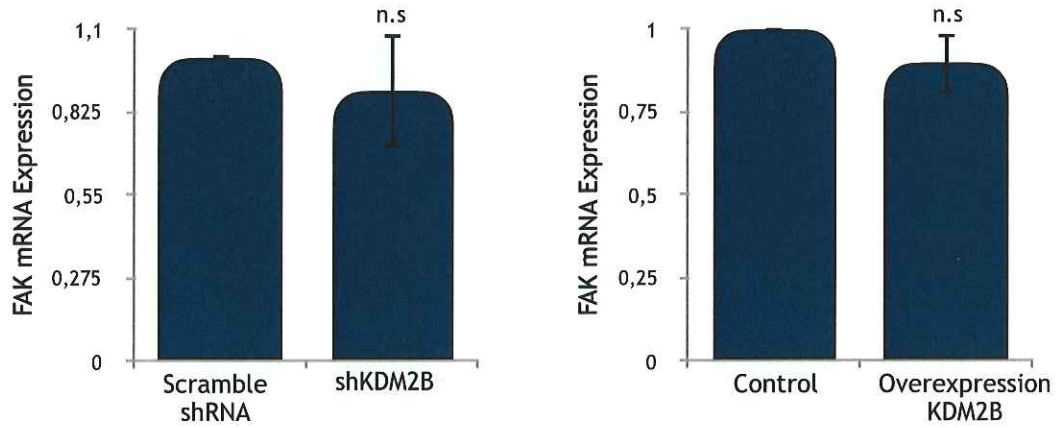


Εικόνα 19: Πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών της βινκουλίνης, παξιλλίνης και κοφιλίνης που εμπλέκονται στη ρύθμιση των εστιακών προσφύσεων. (A) Πρωτεϊνική έκφραση της βινκουλίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot του γονιδίου της βινκουλίνης και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της παξιλλίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot του γονιδίου της παξιλλίνης και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (C) Πρωτεϊνική έκφραση της κοφιλίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot του γονιδίου της κοφιλίνης και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα.

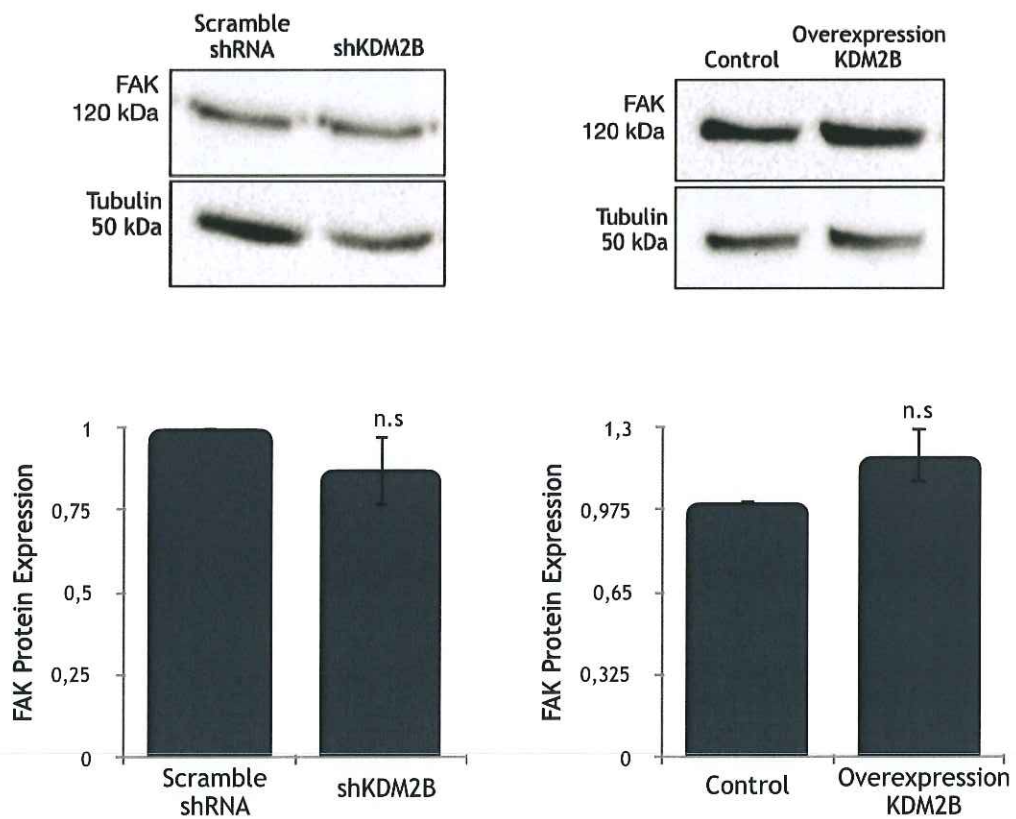
Στη συνέχεια αναλύσαμε το ρόλο της KDM2B στη ρύθμιση της έκφρασης και της δραστηρότητας της κυτταροπλασματικής πρωτεϊνικής κινάσης FAK στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU-145. Παρατηρήσαμε πως η μεταγραφή του γονιδίου FAK παρέμεινε ανεπηρέαστη κατά την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση της KDM2B στους κυτταρικούς κλώνους. Σύμφωνα με αυτό το αποτέλεσμα, τα αντίστοιχα επίπεδα της πρωτεΐνης επίσης δεν επηρεάστηκαν (Εικόνα 20). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον ωστόσο παρουσίασαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης της ενεργής, φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεϊνικής αυτής κινάσης, pFAK, τα οποία εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αλλαγή στους διαφορετικούς κλώνους. Η αποσιώπηση του γονιδίου KDM2B οδήγησε σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της pFAK ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του γονιδίου αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ενεργής μορφής της πρωτεΐνης (Εικόνα 20). Τα

ευρήματα αυτά δείχνουν ότι η KDM2B ελέγχει τη δραστηριότητα της FAK χωρίς να επηρεάζει την έκφρασή της.

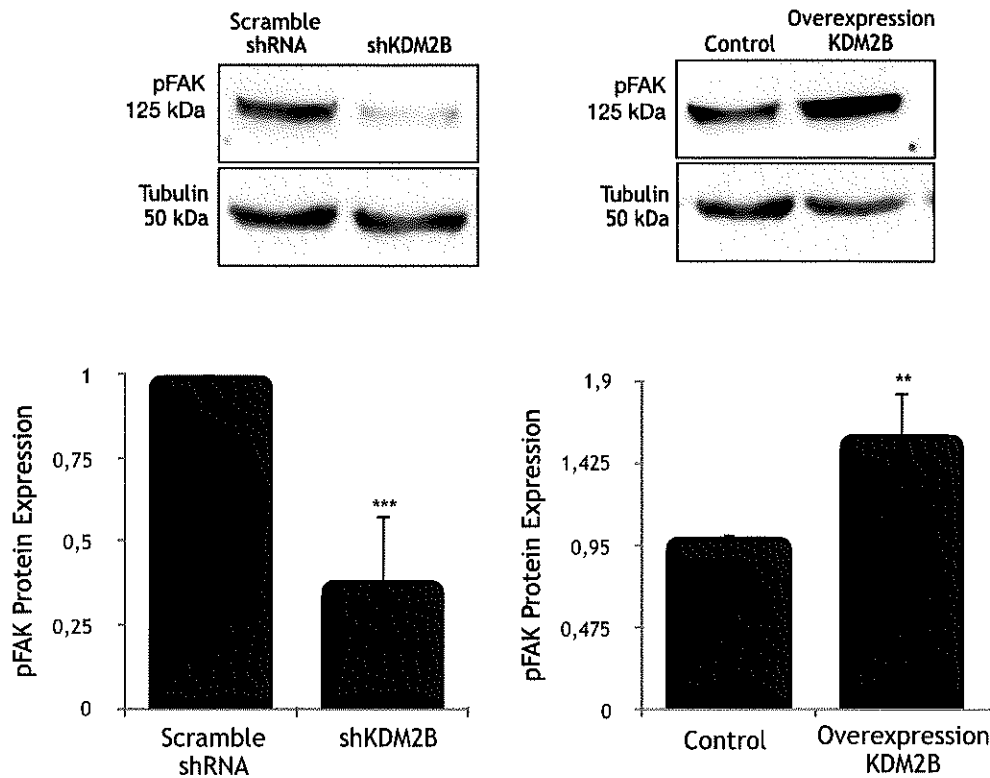
A



B



C

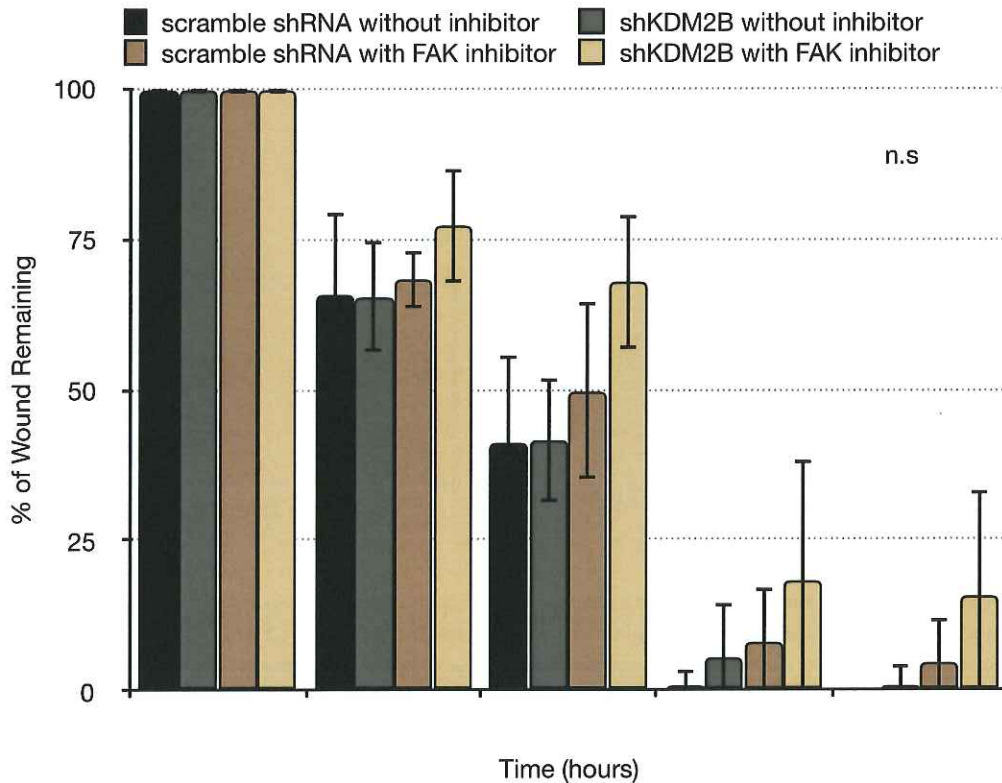


Εικόνα 20. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης *p-FAK*. (A) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *FAK* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη *DU-145* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble *shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) και control overexpression, overexpression of *KDM2B* (δεξιά) *DU-145* κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble *shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of *KDM2B*, από 3 διαφορετικές ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. n.s (non statistical significance) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της *FAK* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη *DU-145* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *FAK* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble *shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and control overexpression, overexpression of *KDM2B* (δεξιά) *DU-145* κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble *shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of *KDM2B*, από 4 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. n.s (non statistical significance) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (C) Πρωτεϊνική έκφραση της ενεργής φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης *p-FAK* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη *DU-145* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της *p-FAK* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble *shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and control overexpression, overexpression of *KDM2B* (δεξιά) *DU-145* κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble *shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of *KDM2B*, από 4 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

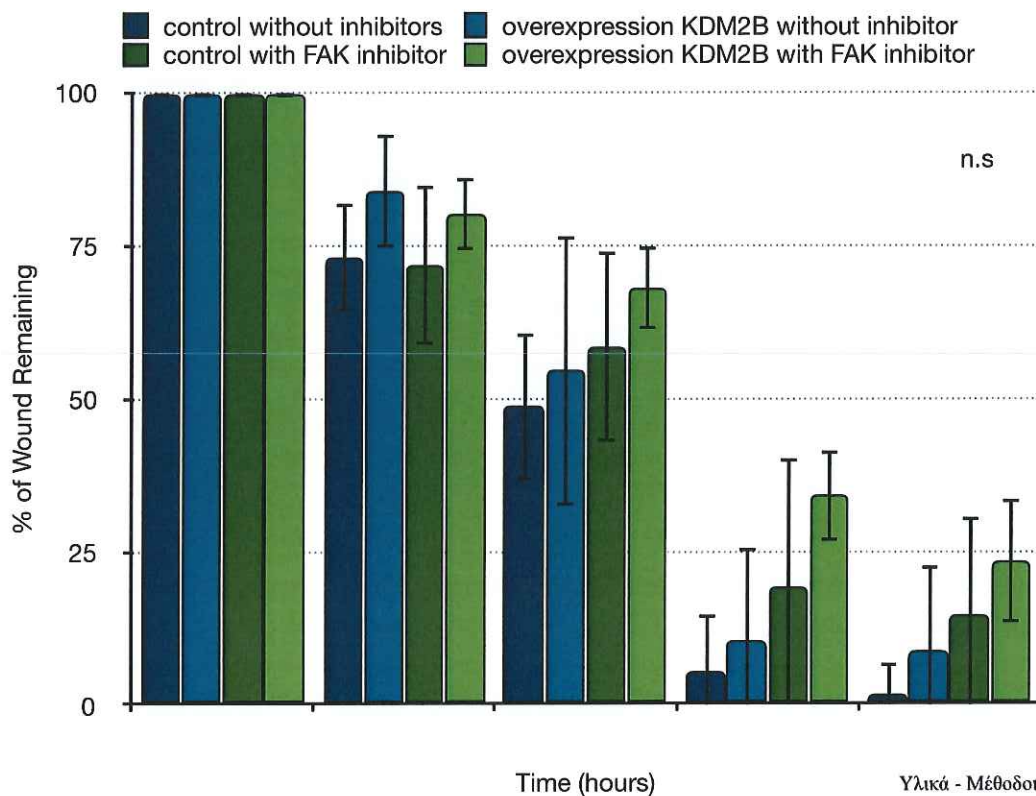
Η σηματοδότηση μέσω της κυτταροπλασματικής πρωτεϊνικής κινάσης *FAK* ενεργοποιεί την καθοδικά πρωτεΐνη του μονοπατιού, *PI3K*, και τους καθοδικούς τελεστές της *Rac1/Cdc42* που στοχεύουν τη δυναμική της ακτίνης καθώς και τις κινάσες προ-επιβίωσης και πολλαπλασιασμού *AKT/SGK1* που αντιπροσωπεύουν μια σημαντική οδό σηματοδότησης που ρυθμίζει την αρχιτεκτονική του κυτταροσκελετού της ακτίνης [34-36], την κυτταρική ανάπτυξη [37] και τη

μετανάστευση [38, 39]. Κατά συνέπεια εξετάσαμε περαιτέρω την πιθανή συμμετοχή αυτού του καταρράκτη σηματοδότησης πρωτεϊνικών κινασών στην αναφερόμενες επιδράσεις της KDM2B στο δυναμικό μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων DU-145 [8, 40, 41]. Τα αρχικά πειράματα με τη χρήση του αναστολέα της FAK, αναστολέας FAK II, απέτυχαν να δώσουν σαφή αποτελέσματα, πιθανότατα εξαιτίας της καθιερωμένης τοξικότητας αυτών των μορίων [42] (Εικόνα 21).

A



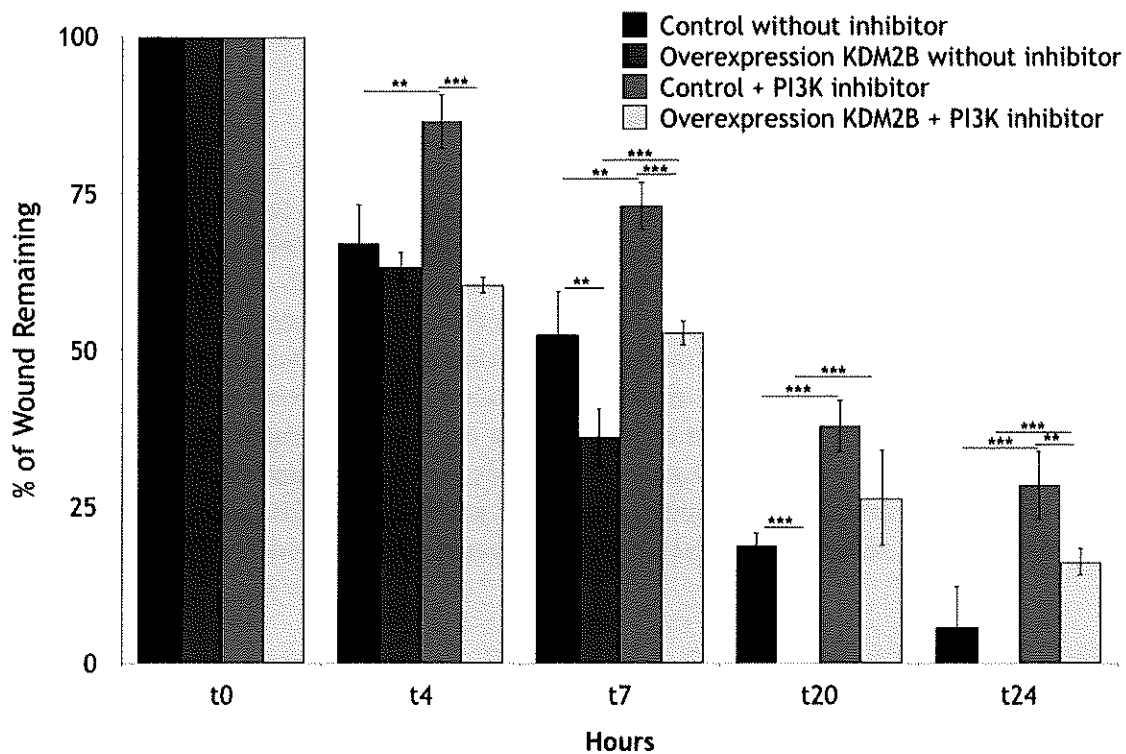
B



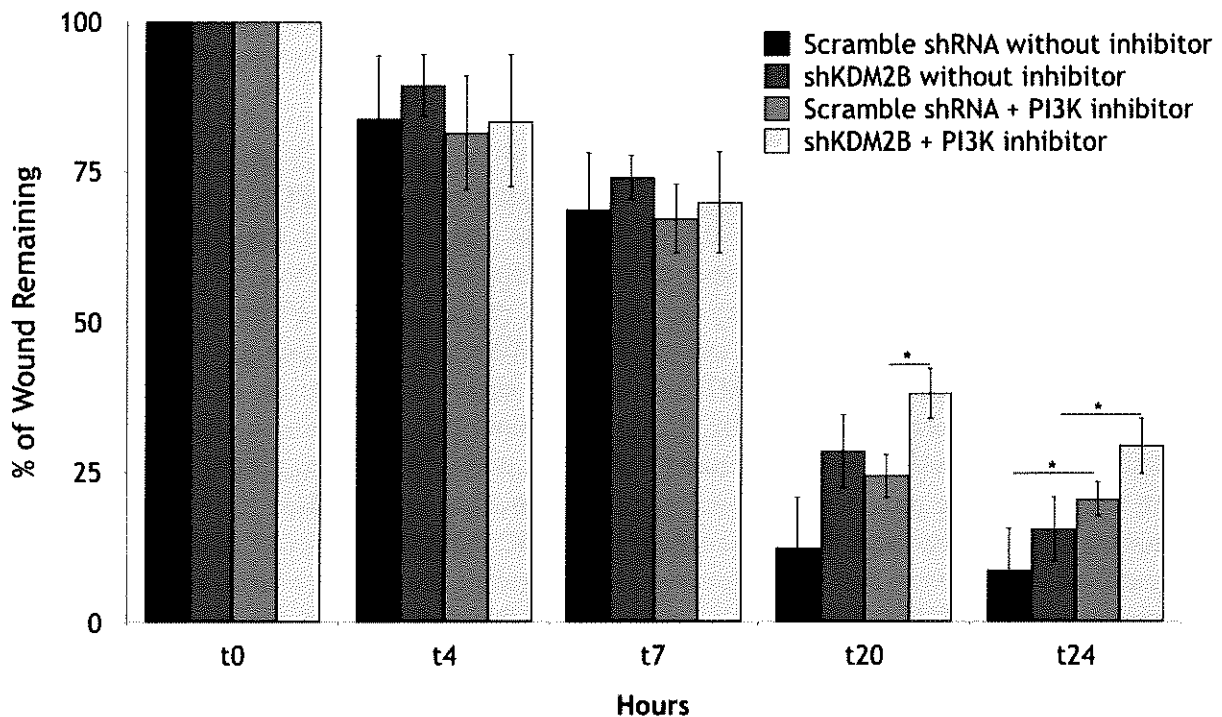
Εικόνα 21. Ο αναστολέας της κινάσης FAK, FAK Inhibitor I, απέτυχε να δώσει σαφή αποτελέσματα, πιθανά λόγω της καθιερωμένης τοξικότητας του μορίου αυτού. Διάγραμμα που απεικονίζει το επί τις εκατό ποσοστό κλεισίματος της πληγής σε σχέση με το αρχικό μέγεθός της, στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές, παρουσία ή απουσία του αναστολέα της κινάσης FAK σε (A) scramble shRNA και shKDM2B κυτταρικούς κλώνους και (B) control overexpression, overexpression of KDM2B. Το διάγραμμα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο από τις μετρήσεις 3 διαφορετικών και ανεξάρτητων μεταξύ τους πειραμάτων. n.s (non statistical significance) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήσαμε τον ειδικό αναστολέα LY294002 που στοχεύει καθοδικά της κινάσης FAK, την ενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή της PI3K, και εξετάσαμε το δυναμικό μετανάστευσης των κυτταρικών κλώνων που υπερεκφράζουν την KDM2B ή έχουν αποσιωπημένο το γονίδιο αυτό, παρουσία και απουσία του αναστολέα. Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα απεικόνισης του μεγέθους της πληγής η οποία δημιουργήθηκε σε μονοστοιβάδα κυττάρων στο τρυβλίο, η ενισχυμένη κυτταρική μετανάστευση που παρατηρείται κανονικά σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B ουσιαστικά καταργείται όταν τα κύτταρα αυτά προεπωαστούν με τον αναστολέα της PI3K, LY294002. Επιπλέον, στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο του επιγενετικού παράγοντα που μελετάμε, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης απουσία του αναστολέα, όπως άλλωστε έχει αναφερθεί και προηγουμένως, και παρουσία του αναστολέα της PI3K, LY294002, η επιβράδυνση αυτή του δυναμικού μετανάστευσης των κυττάρων ενισχύθηκε ακόμα περισσότερο υποδεικνύοντας ότι η αποσιώπηση της KDM2B με κάποιο τρόπο recapitulates the effect of PI3K inhibition (Εικόνα 22). Η προσθήκη μάλιστα του αναστολέα LY294002 σε κύτταρα με αποσιωπημένη την KDM2B κατέληξε σε περαιτέρω μείωση της κυτταρικής μετανάστευσης, υποδηλώνοντας ότι η ένωση LY294002 καταστέλλει ακόμα περισσότερο την υπολειμματική δραστηριότητα της PI3K σε κύτταρα με μειωμένη έκφραση της KDM2B (Εικόνα 22).

A



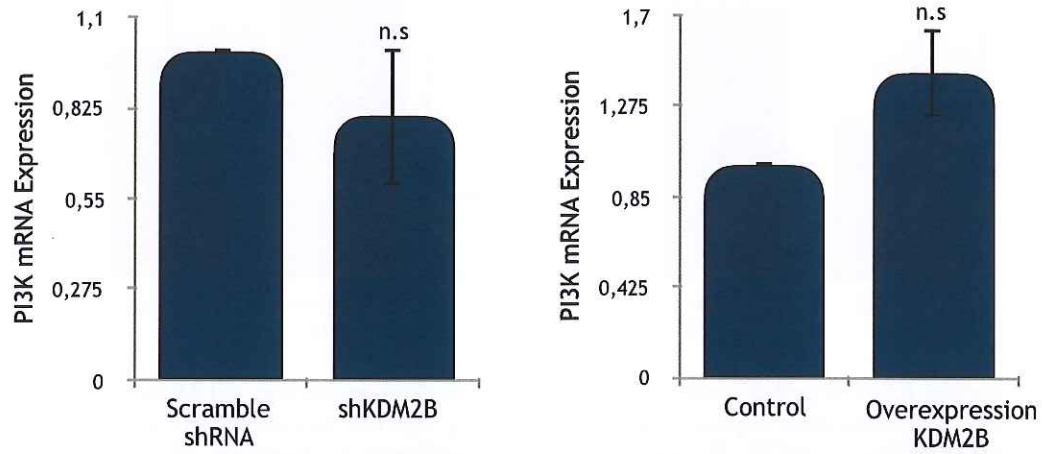
B



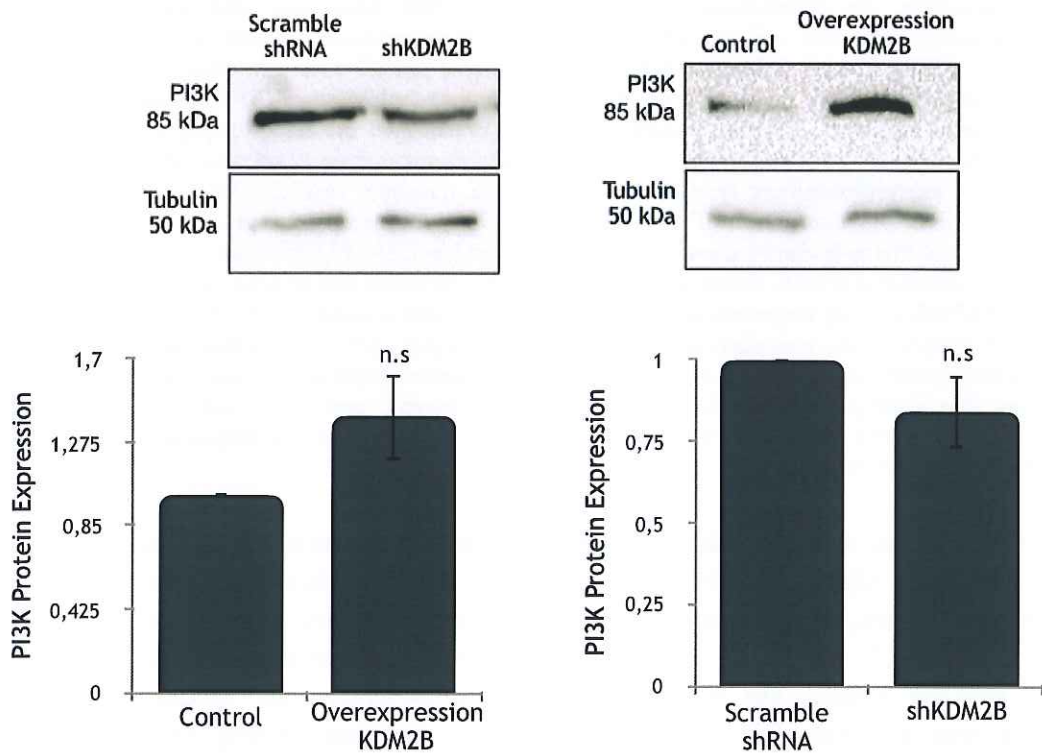
Εικόνα 22. Ο αναστολέας της PI3K, LY294002, αναστέλει τη μεταναστευτική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145. Διάγραμμα που απεικονίζει το επί τις εκατό ποσοστό κλεισίματος της πληγής σε σχέση με το αρχικό μέγεθός της, στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές, παρουσία ή απουσία του αναστολέα της PI3K, LY294002, σε (A) control overexpression, overexpression of KDM2B κυτταρικούς κλώνους και (B) scramble shRNA και shKDM2B κύτταρα. Το διάγραμμα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο από τις μετρήσεις 3 διαφορετικών και ανεξάρτητων μεταξύ τους πειραμάτων. *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύουν τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η σηματοδότηση μέσω της κινάσης PI3K που δρα καθοδικά της πρωτεϊνικής κινάσης FAK εμπλέκεται στην κυτταρική κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη. Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω αυτή την υπόθεση, εξετάσαμε το ρόλο της KDM2B στο προφίλ δραστηριότητας της PI3K σε κύτταρα DU-145. Ανάλογη εικόνα με αυτή της FAK λάβαμε και για τη συγκεκριμένη κινάση. Όπως και με τις παρατηρήσεις για την FAK, τα μεταγραφικά και μεταφραστικά επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου PI3K παραμένουν ανεπηρέαστα και δεν επηρεάζονται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση της KDM2B (Εικόνα 23). Ωστόσο, η δραστηριότητά της επηρεάζεται σημαντικά. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης, ενεργής μορφής της πρωτεΐνης αυτής, p85PI3K, μειώθηκαν σημαντικά έπειτα από την αποσιώπηση του γονιδίου KDM2B, ενώ η υπερέκφραση της KDM2B έχει ακριβώς το αντίθετο αποτέλεσμα, αυξάνοντας την υπομονάδα p85 της PI3K (Εικόνα 22).

A

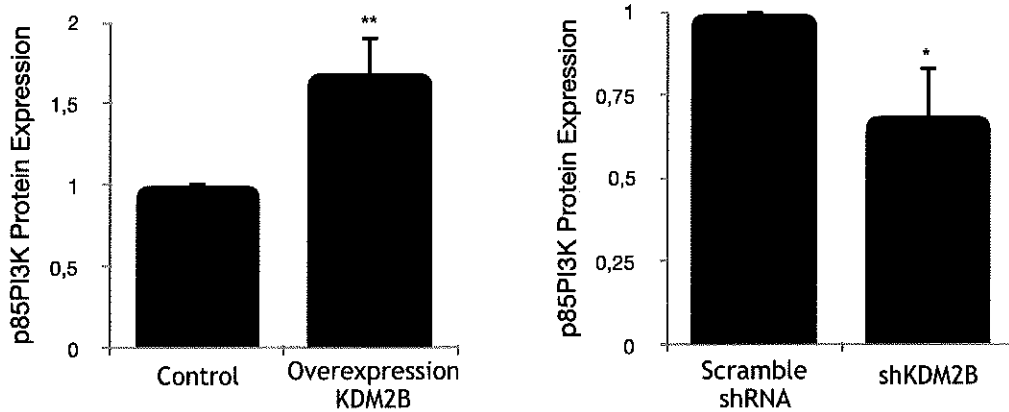


B



C



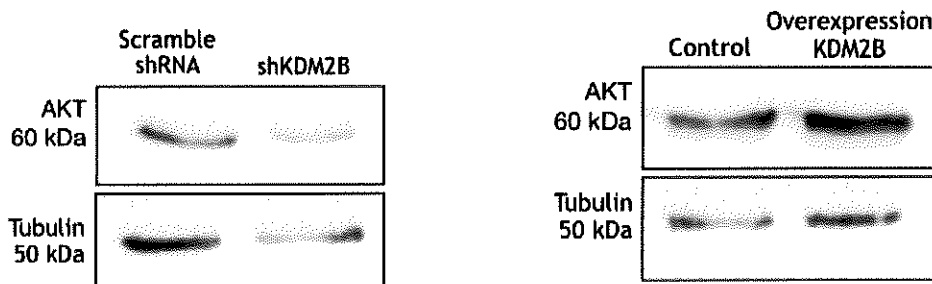


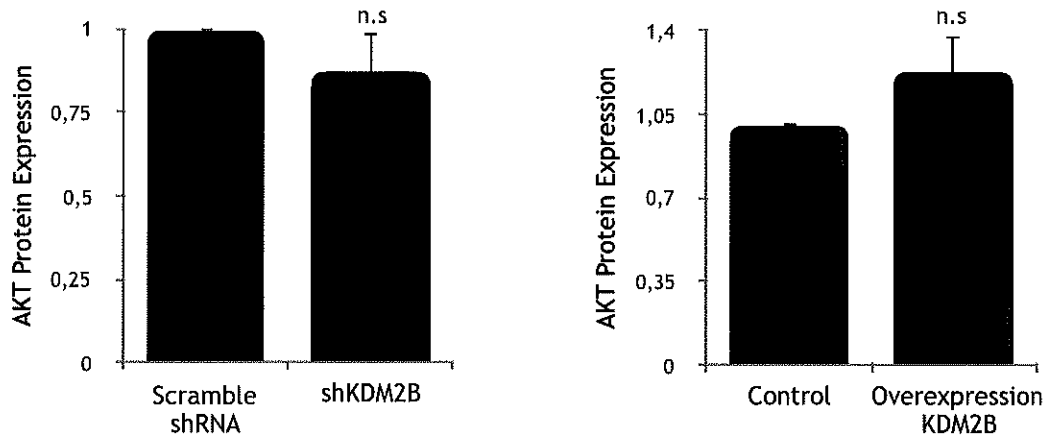
Εικόνα 23. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την ενεργοποίηση της p85PI3K πρωτεΐνης. (A) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου PI3K στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. n.s (non statistical significance) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της PI3K στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου PI3K και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (C) Πρωτεϊνική έκφραση της p85PI3K στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p85PI3K και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 4 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Το γονίδιο KDM2B και οι κινάσες προ-επιβίωσης και πολλαπλασιασμού AKT και SGK1

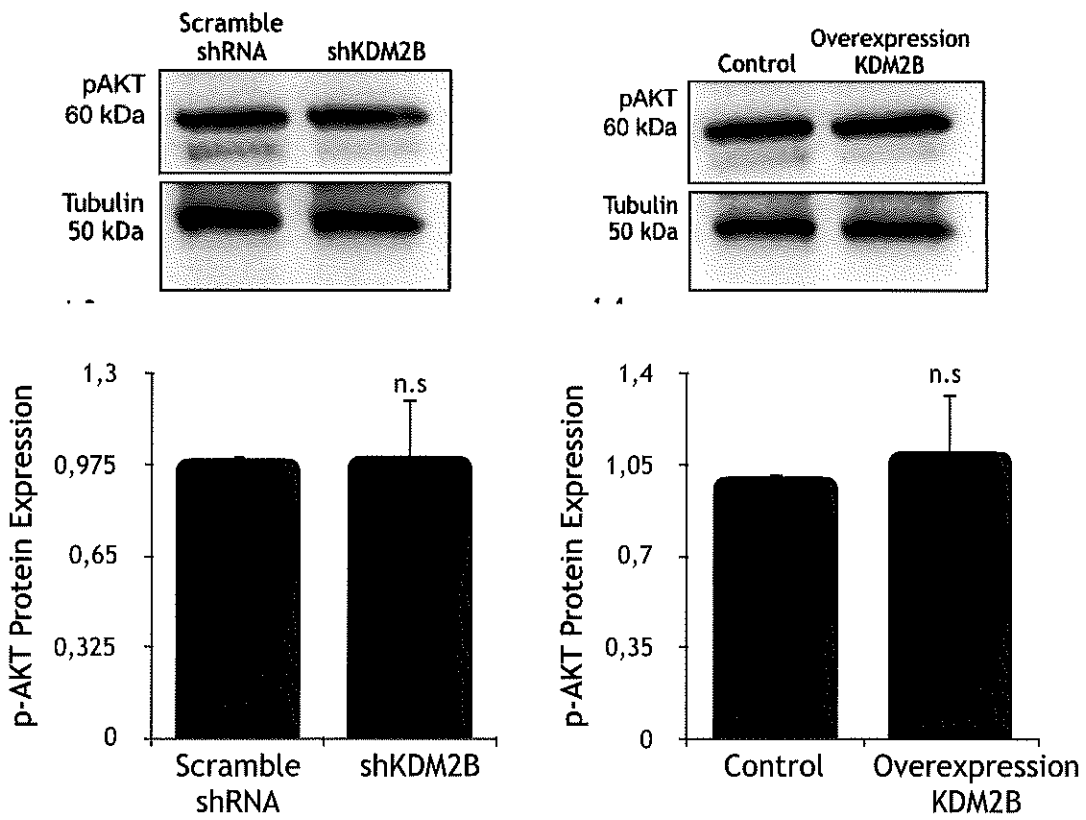
Στη συνέχεια, εξετάσαμε το ρόλο της KDM2B στη ρύθμιση πρόσθετων καθοδικών τελεστών σηματοδότησης του μονοπατιού FAK/PI3K, εστιάζοντας στις κινάσες προ-επιβίωσης και πολλαπλασιασμού AKT και SGK1 [43, 44]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα καθώς και η φωσφορυλίωση αμφοτέρων των κινασών παραμένουν ανεπηρέαστα στα κύτταρα DU-145 που είτε έχουν αποσιωπημένη την KDM2B είτε υπερεκφράζουν τον επιγενετικό αυτό παράγοντα (Εικόνα 24).

A

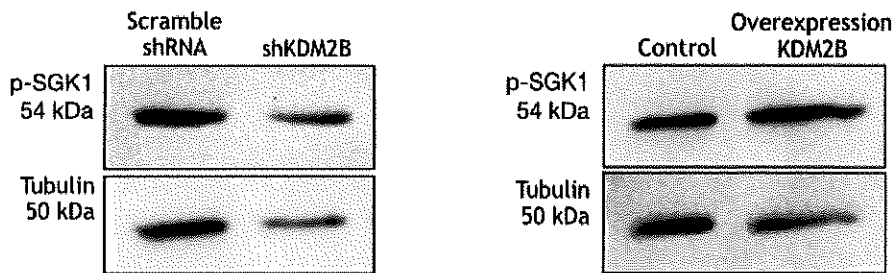


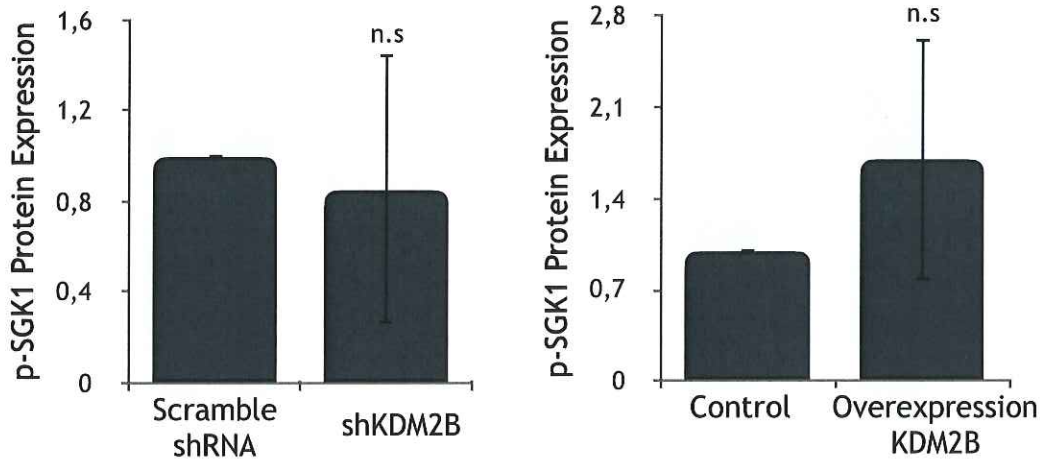


B



C

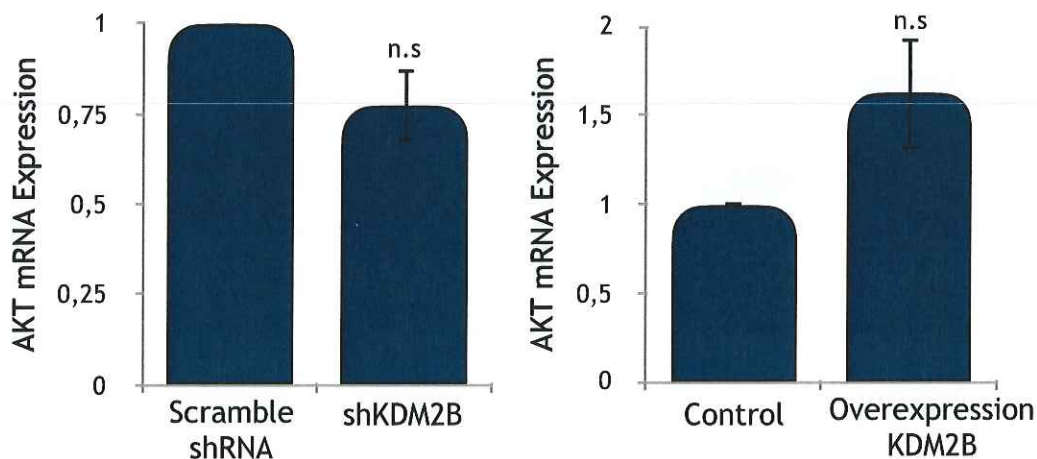




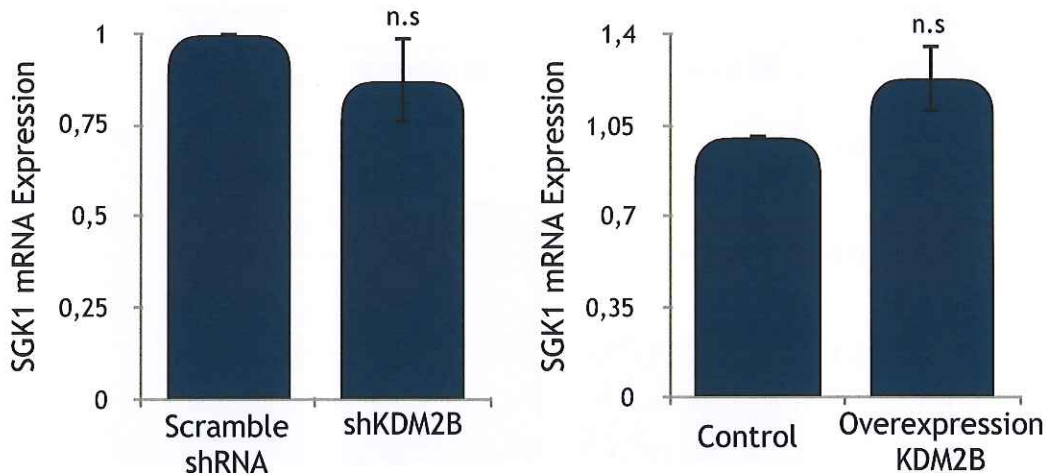
Εικόνα 24. Το γονίδιο KDM2B και οι κινάσες AKT και SGK1. (A) Πρωτεϊνική έκφραση της AKT στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της AKT και της τουμπολίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της p-AKT στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p-AKT και της τουμπολίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (C) Πρωτεϊνική έκφραση της p-SGK1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της p-SGK1 και της τουμπολίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από τουλάχιστον 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. n.s (non statistical significance) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Επιπλέον, τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων AKT και SGK1, έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B παρέμειναν ανεπηρέαστα, υποδεικνύοντας ότι αυτή η απομεθυλάση δεν έχει επίδραση στις συγκεκριμένες κινάσες και ως εκ τούτου, πιθανά δεν επηρεάζει το δυναμικό ανάπτυξης των κυττάρων, καθώς οι κινάσες αυτές εμπλέκονται στην κυτταρική πολλαπλασιαστική ικανότητα (Εικόνα 25).

A



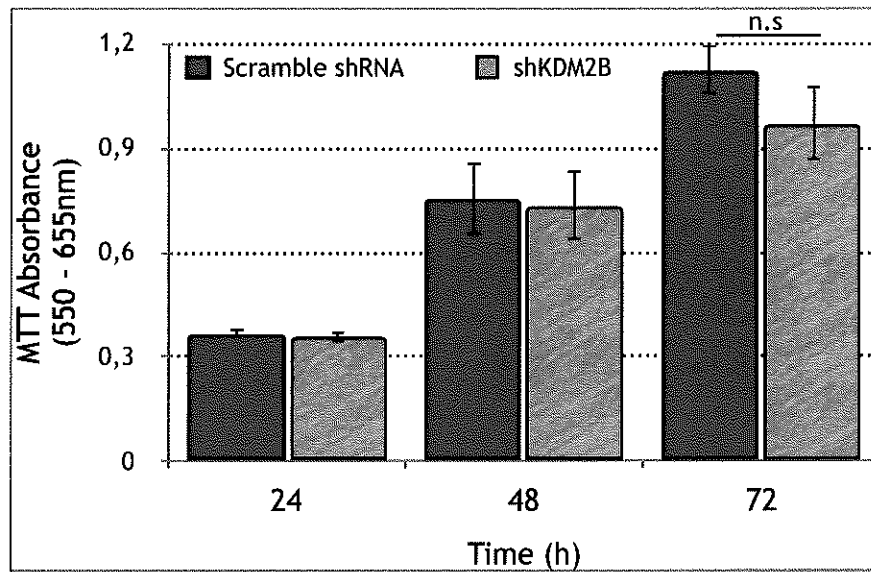
B



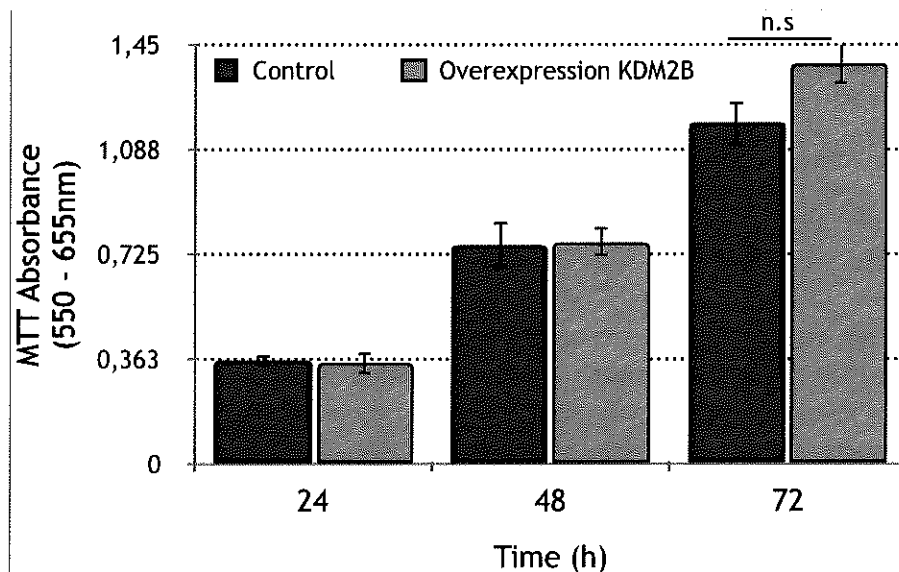
Εικόνα 25: Το γονίδιο *KDM2B* και οι κινάσες *AKT* και *SGK1*. (Α) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *AKT* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη *DU-145* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*rt-PCR*), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) και *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) *DU-145* κυτταρικά εκχυλίσματα. (Β) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου *SGK1* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη *DU-145* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*rt-PCR*), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) και *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) *DU-145* κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 3 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. *n.s.* (*non statistical significance*) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση, η δοκιμασία *MTT*, μια χρωματομετρική δοκιμασία που σχεδιάστηκε για να εκτιμήσει την μεταβολική δράση των κυττάρων, και κατ' επέκταση την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στους κυτταρικούς κλώνους έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*, παρατήρηση που βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με το προηγούμενο προφίλ έκφρασης των ενεργών φωσφορυλιωμένων κινασών *p-AKT* και *p-SGK1* (Εικόνα 23). Αποκάλυψε ωστόσο, μία μόνο μικρή τάση στο να μετριαστούν οι αλλαγές στα προφίλ βραχυπρόθεσμου πολλαπλασιαστικού δυναμικού των κυττάρων (έως 72 ώρες), χωρίς όμως οι αλλαγές αυτές να φτάσουν σε στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις (Εικόνα 26).

A



B



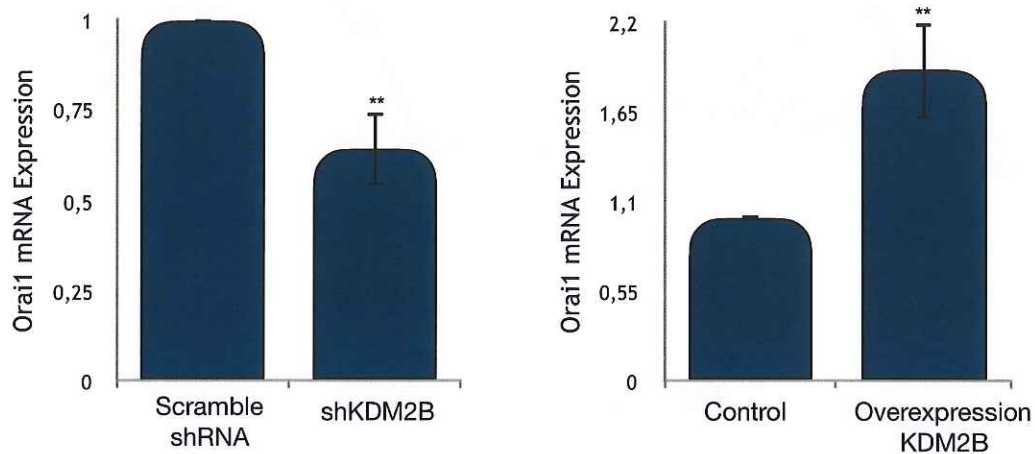
Εικόνα 26. Το γονίδιο *KDM2B* και η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων του προστάτη *DU-145*. (A) Το διάγραμμα αναπαριστά τους μέσους όρους των τιμών απορρόφησης στις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές σε (A) *scramble shRNA*, *shKDM2B* και (B) *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* κυττάρων *DU-145*. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, σε 5-πλέτες, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *n.s* (*non statistical significance*) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Η απομεθυλάση *KDM2B* και η ομοιόσταση του κυττοσολικού ασβεστίου

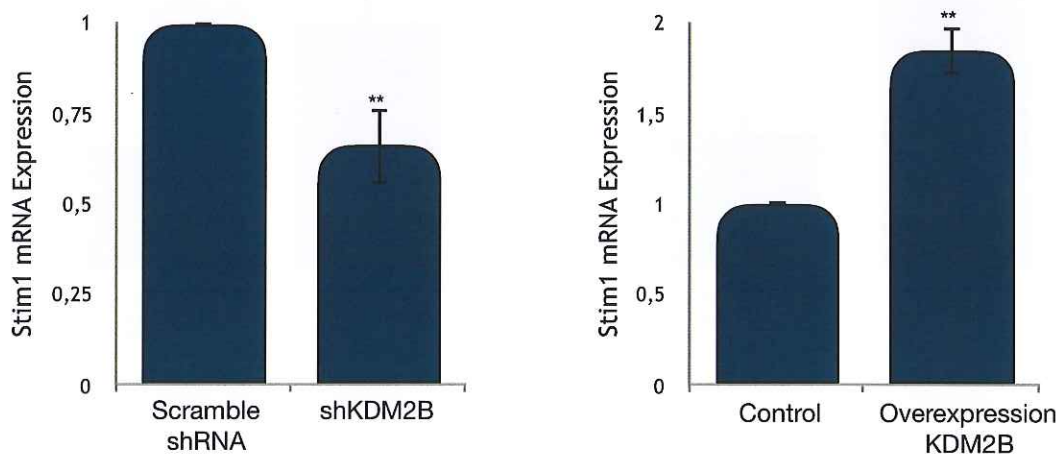
Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση των κυττάρων καθώς και ο κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση ρυθμίζονται από την ομοιόσταση του κυττοσολικού ασβεστίου. Για το λόγο αυτό, μελετήσαμε και το μονοπάτι ομοιόστασης του ασβεστίου εξετάζοντας τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων *Orai1*, που αποτελεί την υπομονάδα του καναλιού του ασβεστίου, και *Stim1*, ο οποίος είναι ο ρυθμιστής των υπομονάδων αυτών, καθώς και την ίδια την απελευθέρωση του

ασβεστίου από τους κυτταρικούς κλώνους που υπερεκφράζουν το γονίδιο της KDM2B (Store Operated Calcium Entry_SOCE). Τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων Orai1 και Stim1 αυξήθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B, ενώ αντίθετα μειώθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση του συγκεκριμένου γονιδίου (Εικόνα 27). Επιπλέον σημαντική ήταν και η αλλαγή στην απελευθέρωση του ασβεστίου από τα κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο της KDM2B σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (Εικόνα 28). Η μέτρηση του peak του SOCE επιτεύχθηκε έπειτα από την εξάντληση των αποθεμάτων του Ca^{2+} με τη χρήση θραυσιγκαρσίνης (thapsigargin), έναν αναγνωρισμένο αναστολέα της ΑΤΡάσης του Ca^{2+} του σαρκοενδοπλασματικού δικτύου.

A

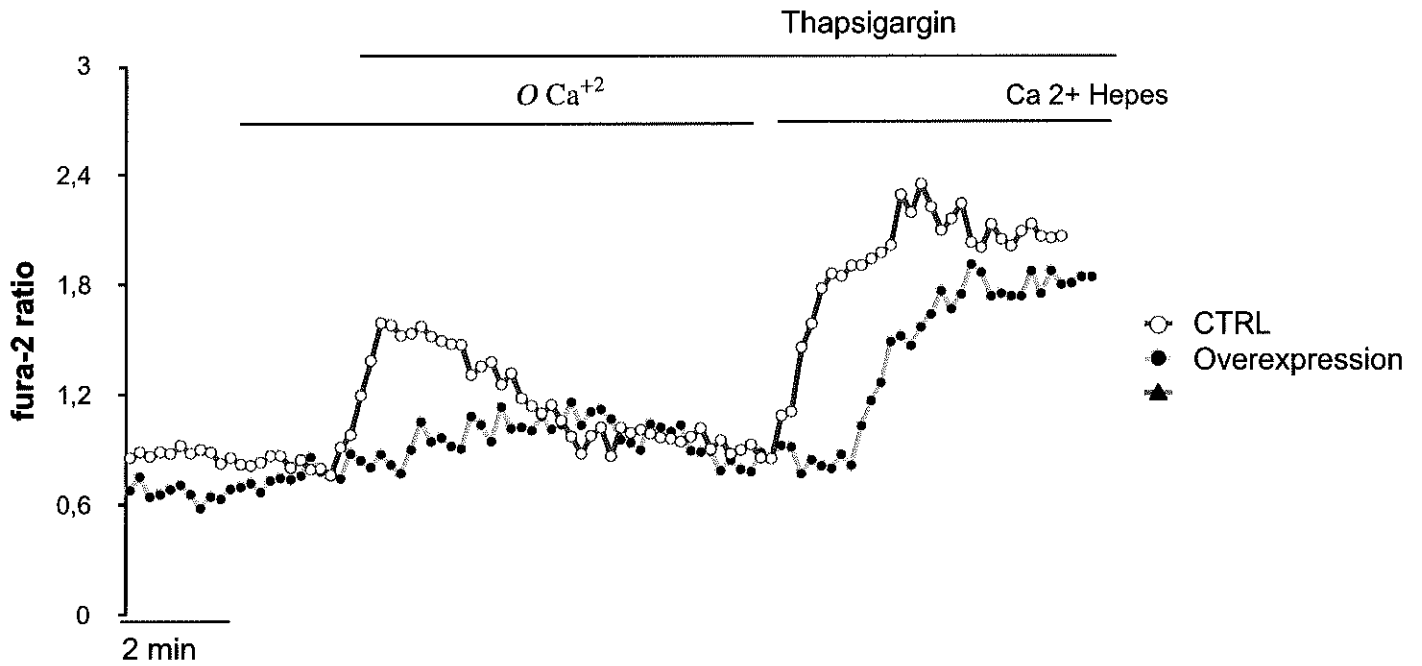


B

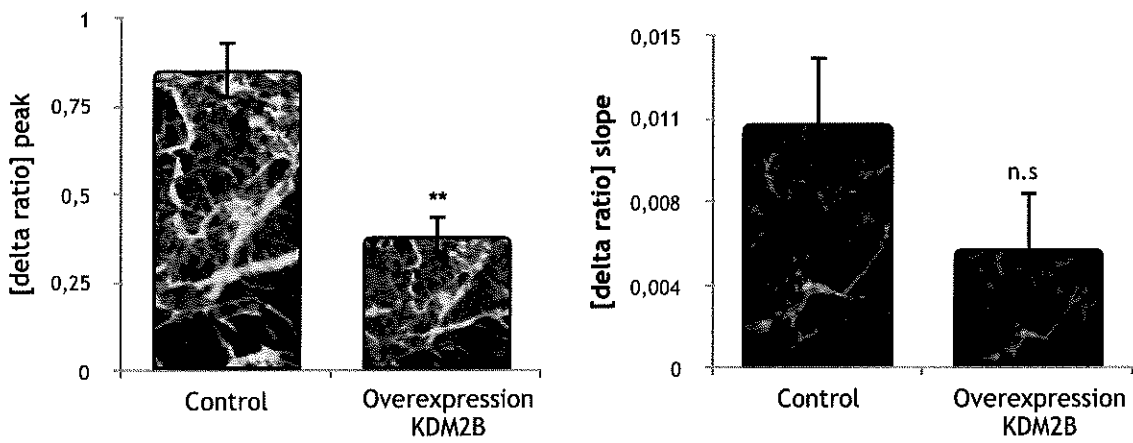


Εικόνα 27. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την απορρόφηση του ασβεστίου στα κύτταρα του προστάτη DU-145. (A) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου Orai1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Μεταγραφική έκφραση του γονιδίου Stim1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) DU-145 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις τριών διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικές και

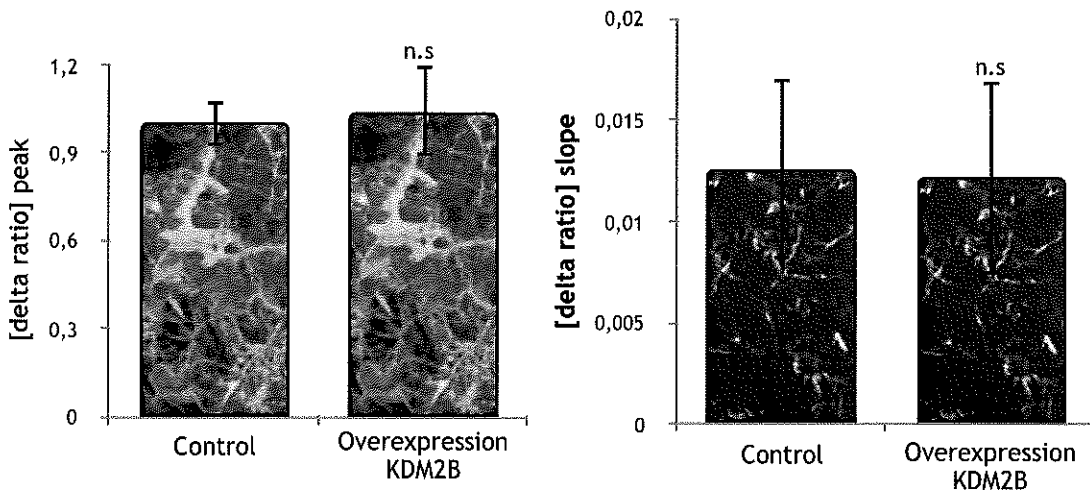
ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. ** ($p < 0.01$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.



Calcium Release



Calcium Entry

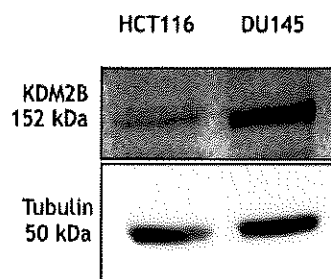


Εικόνα 28. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει την ομοιόσταση του ασβεστίου στα κύτταρα του προστάτη DU-145. Η απελευθέρωση του ασβεστίου στους κυτταρικούς κλώνους που υπερεκφράζουν το γονίδιο της *KDM2B* (*Store Operated Calcium Entry* -*SOCE*) διαφοροποιείται σε σχέση με αυτή των κυττάρων αναφοράς. (Α) Αντιπροσωπευτικές ενδείξεις του λόγου του φθορισμού Fura-2 σε φασματοσκοπία φθορισμού πριν και μετά την απομάκρυνση του εξωκυτταρικού Ca^{2+} και την προσθήκη θραυγικαρσίνης ($1 \mu M$), καθώς και η εκ νέου προσθήκη εξωκυτταρικού Ca^{2+} σε κύτταρα αναφοράς (λευκά σύμβολα) και σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την *KDM2B* (μαύρα σύμβολα). (Β) Μέσος όρος των τιμών της κορυφής (peak) (αριστερά) και της κλίσης (slope) (δεξιά) αύξησης του λόγου του φθορισμού Fura-2 από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες (C) και έπειτα από *SOCE* μετά την προσθήκη της θραυγικαρσίνης ($1 \mu M$) σε κύτταρα αναφοράς και σε κύτταρα που υπερεκφράζουν την *KDM2B*. n.s. (non statistical significance), **($p < 0.01$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

ii. Κυτταρική σειρά HCT-116, καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου

Αποσιώπηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης *KDM2B* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε πως τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν ισχύουν μόνο στην συγκεκριμένη καρκινική κυτταρική σειρά προστάτη DU-145 αλλά έχουν καθολικό χαρακτήρα και ισχύουν και σε άλλες καρκινικές κυτταρικές σειρές, προχωρήσαμε στη διερεύνηση του ρόλου και μελέτη των μηχανισμών της *KDM2B* και στην καρκινική κυτταρική σειρά HCT-116 (ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου), στην οποία τα βασικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *KDM2B* είναι μειωμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα βασικά επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα του προστάτη DU-145 (Εικόνα 1 και 29).

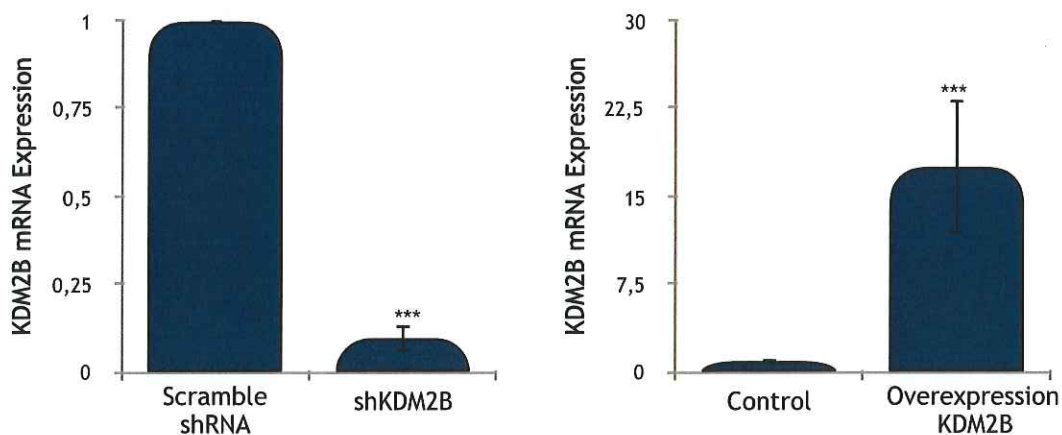


Εικόνα 29. Διαφορετική βασική πρωτεϊνική έκφραση του γονιδίου *KDM2B* στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές παχέος εντέρου HCT-116 και προστάτη DU-145. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot της

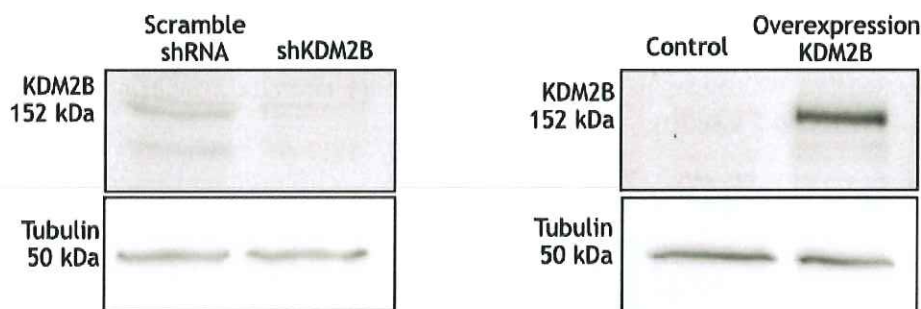
πρωτεϊνικής έκφρασης της *KDM2B* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 και στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116

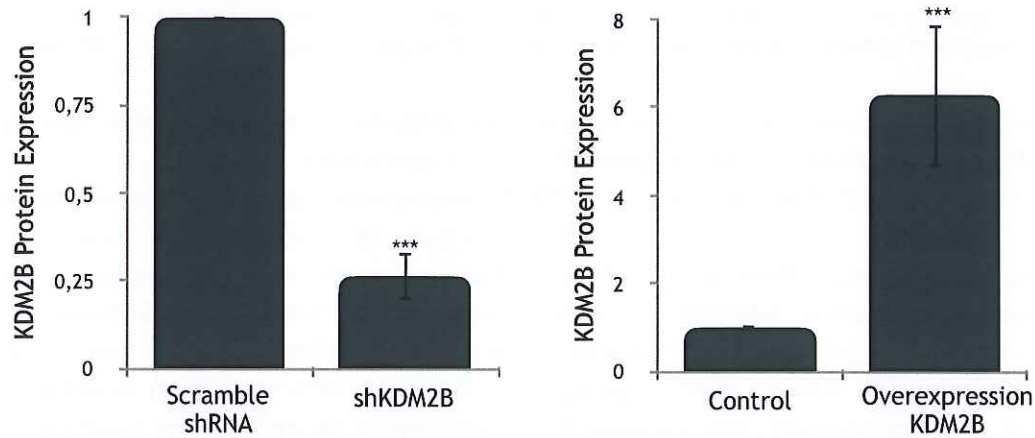
Προκειμένου να διαπιστώσουμε κατά πόσο η απορρύθμιση του γονιδίου *KDM2B* επηρεάζει τη φυσιολογία και του συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου, δημιουργήσαμε κλώνους ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων παχέος εντέρου HCT-116, με αποσιωπημένη (τρεις διαφορετικοί κυτταρικοί κλώνοι) ή υπερέκφρασμένη (δύο διαφορετικοί κυτταρικοί κλώνοι) την πρωτεΐνη *KDM2B*. Η αποσιώπηση και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *KDM2B* στα κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 επιβεβαιώθηκε και σε αυτή την περίπτωση με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot (Εικόνα 30). Παρατηρούμε πως το ποσοστό αποσιώπησης στους κυτταρικούς κλώνους (sh*KDM2B*) αγγίζει περίπου το 90% σε μεταγραφικό επίπεδο (mRNA) και περίπου το 70% σε μεταφραστικό- πρωτεϊνικό επίπεδο σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (scramble shRNA), ενώ και η υπερέκφραση του γονιδίου στους κυτταρικούς κλώνους (overexpression *KDM2B*) ήταν επίσης στατιστικά σημαντική αυξάνοντας την ποσότητα του mRNA της πρωτεΐνης κατά 15 περίπου φορές σε σύγκριση με τα κύτταρα αναφοράς (control). Παράλληλα, η αποσιώπηση και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης *KDM2B* ήταν εμφανή και σε επίπεδο ανοσοφθορισμού (Εικόνα 30).

A

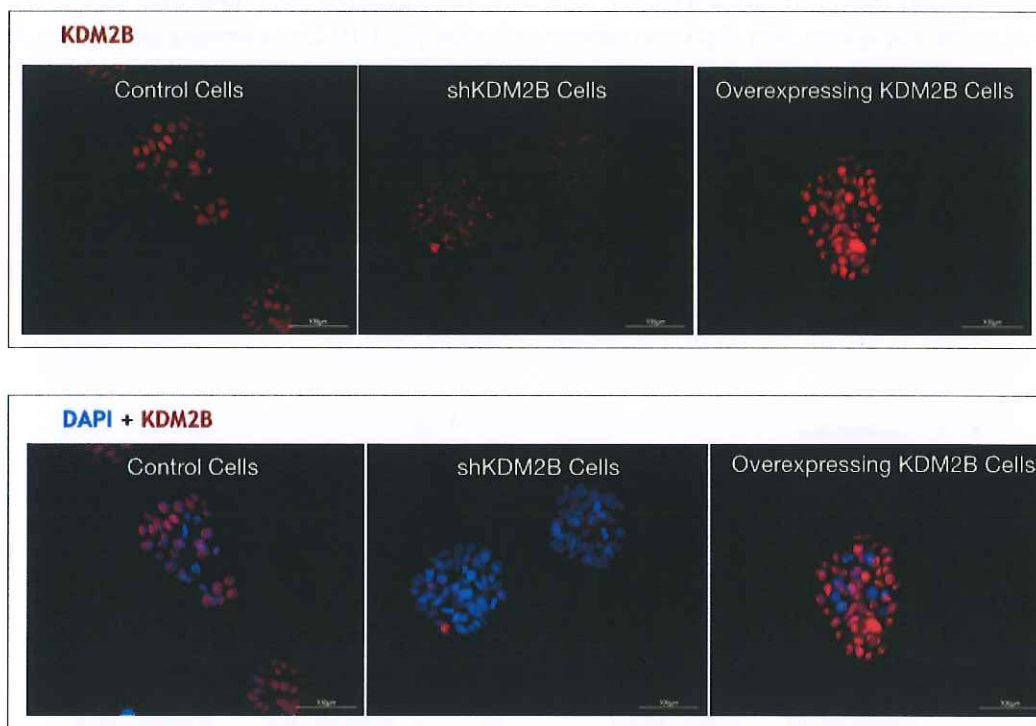


B





C



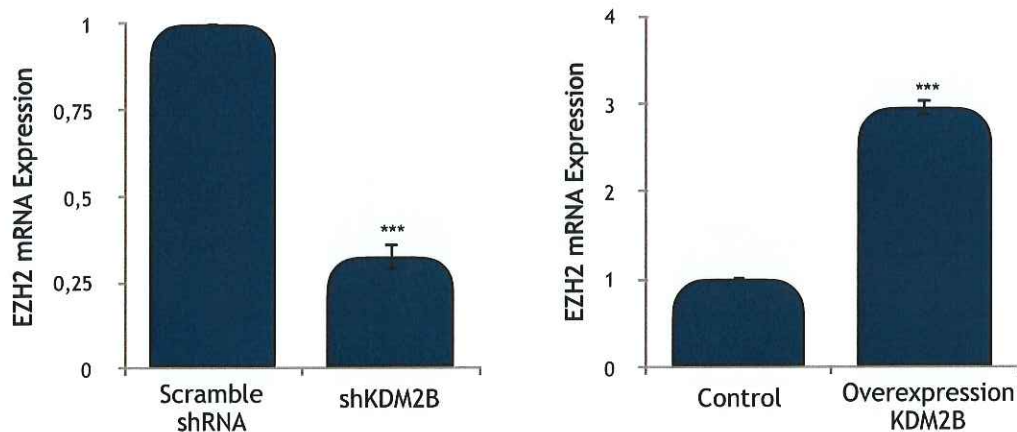
Εικόνα 30. Αποσιώπηση και υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116. (A) Μεταγραφική έκφραση της KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της KDM2B στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου KDM2B και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (C) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης KDM2B (κόκκινο χρώμα) και του

πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B, shKDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm.

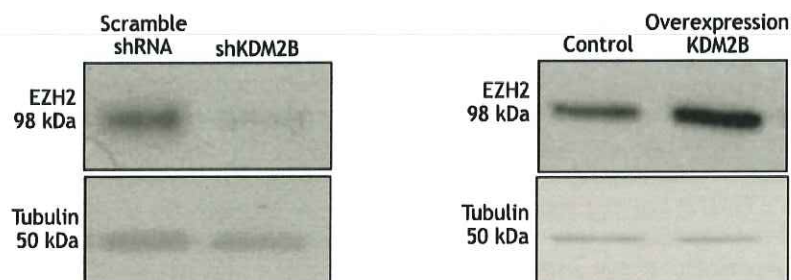
Το γονίδιο KDM2B είναι λειτουργικά ενεργό στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 και ρυθμίζει την έκφραση Polycomb πρωτεϊνών

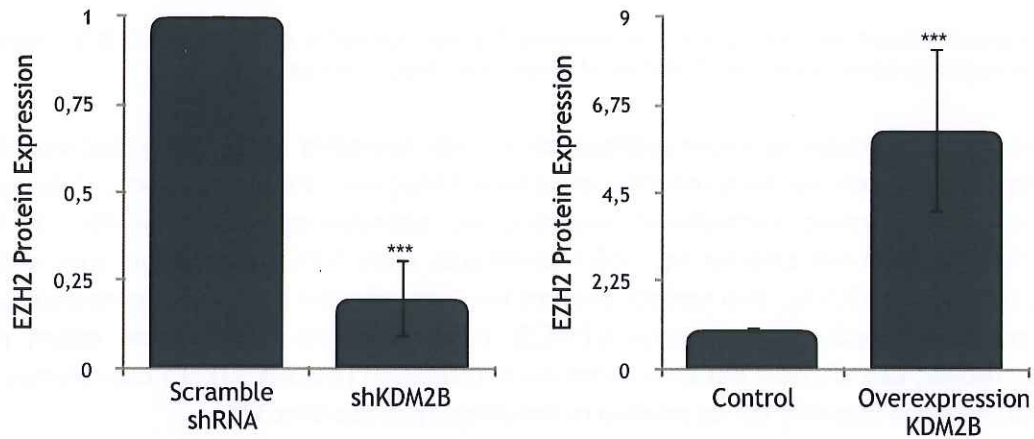
Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε πως η KDM2B είναι λειτουργικά ενεργή και στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116, ελέγξαμε τη γονιδιακή μεταγραφή και την πρωτεϊνική έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2, έπειτα από την αποσιώπηση ή/ και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης KDM2B. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου EZH2 αναλύθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western Blot. Συγκεκριμένα, όπως και στην κυτταρική σειρά προστάτη DU-145, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου EZH2 μειώθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση της πρωτεΐνης KDM2B, ενώ αντίστοιχα αυξήθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του επιγενετικού αυτού παράγοντα, τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε μεταφραστικό επίπεδο, αποτέλεσμα που συμφωνεί με τα ευρήματα ήδη δημοσιευμένων μελετών [9, 10]. Στα κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B (shKDM2B), η μείωση της EZH2 αγγίζει το 70% περίπου σε μεταγραφικό επίπεδο και το 80% στο επίπεδο της πρωτεΐνης σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (scramble shRNA) ενώ στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο KDM2B (overexpression KDM2B) παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων έκφρασης της τάξης των 3 φορές σε επίπεδο mRNA και 6 περίπου φορές σε μεταφραστικό επίπεδο αντίστοιχα, της πρωτεΐνης EZH2, σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς (control) (Εικόνα 31). Επιπλέον, έμμεσος ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης EZH2 επιβεβαίωσε για ακόμη μια φορά την παραπάνω παρατήρηση (Εικόνα 31).

A

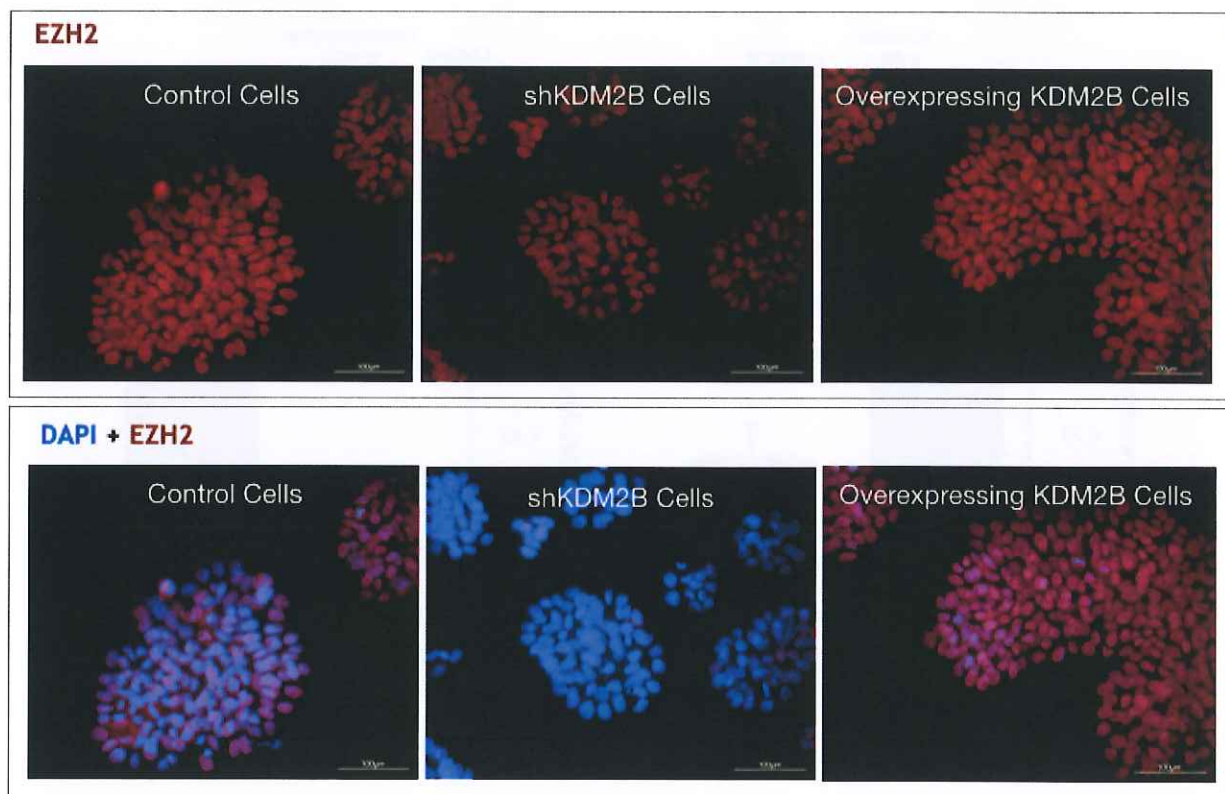


B





C

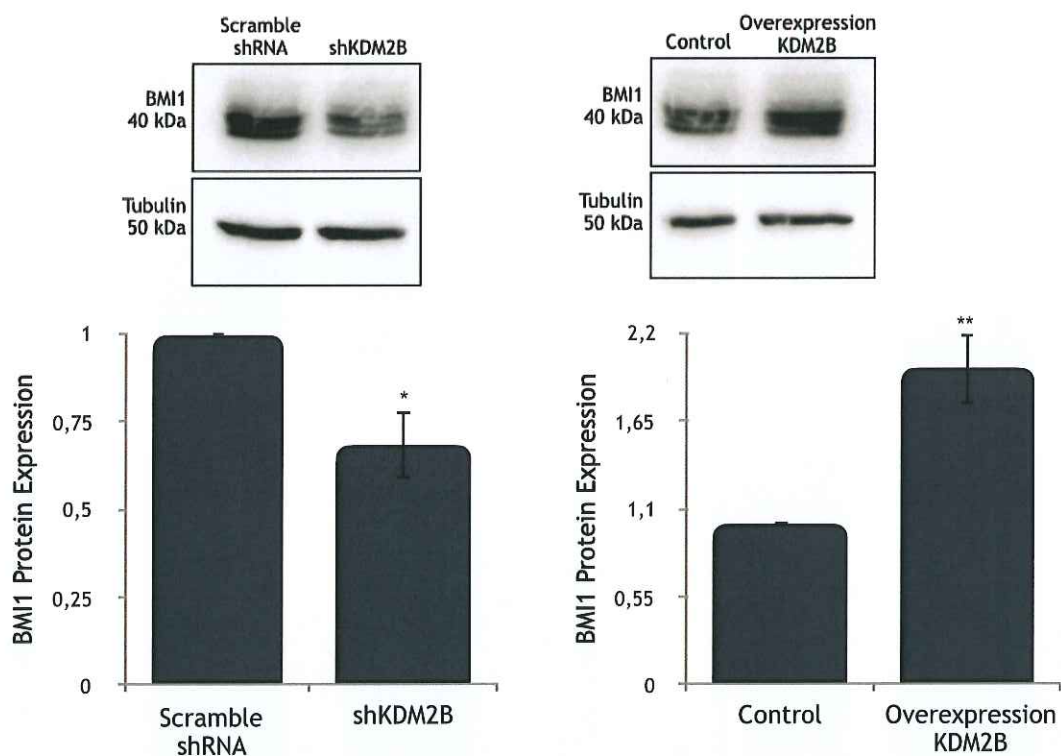


Εικόνα 31: Η KDM2B είναι λειτουργικά ενεργή στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116. (A) Μεταγραφική έκφραση της EZH2 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της EZH2 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου EZH2 και της τουμπολίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (C) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης EZH2 (κόκκινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε

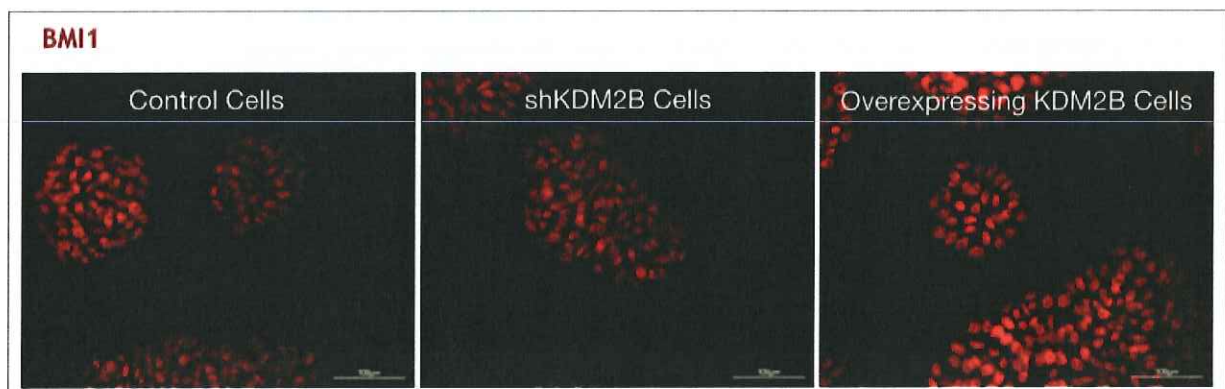
κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B, *shKDM2B* (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm.

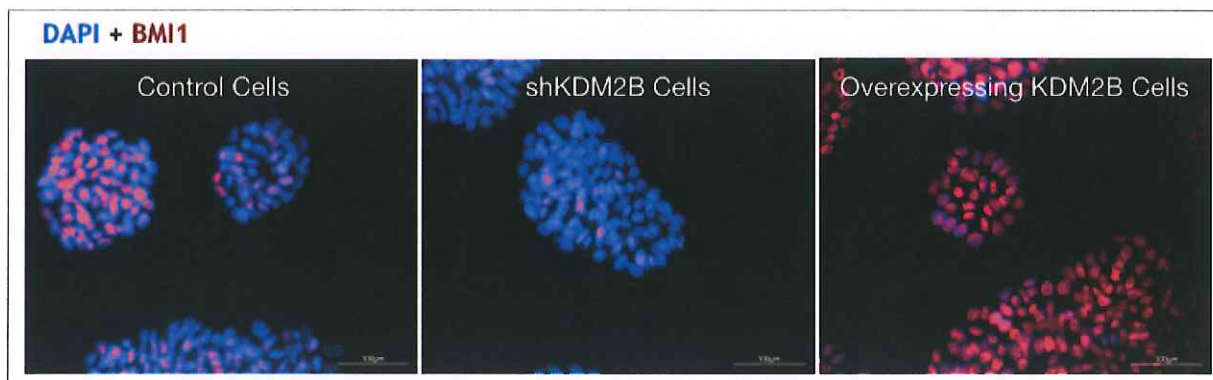
Ίδιο πρότυπο έκφρασης παρατηρήθηκε και για την πρωτεΐνη BMI1, που όπως αναφέραμε και προηγουμένως ανήκει και αυτή στο PRC σύμπλοκο. Όπως και στους κυτταρικούς κλώνους των DU-145 κυττάρων, στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο KDM2B (*shKDM2B*) τα πρωτεϊνικά επίπεδα της BMI1 μειώθηκαν κατά 30%, σε σχέση με τους κλώνους αναφοράς (*scramble shRNA*), ενώ υπήρξε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης στα κύτταρα που υπερεκφράζουν το γονίδιο KDM2B (*overexpression KDM2B*) σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς των κλώνων αυτών (*control overexpression*) (Εικόνα 32). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν ακόμα μια φορά εμφανές και σε επίπεδο ανασοφορισμού (Εικόνα 32).

A



B



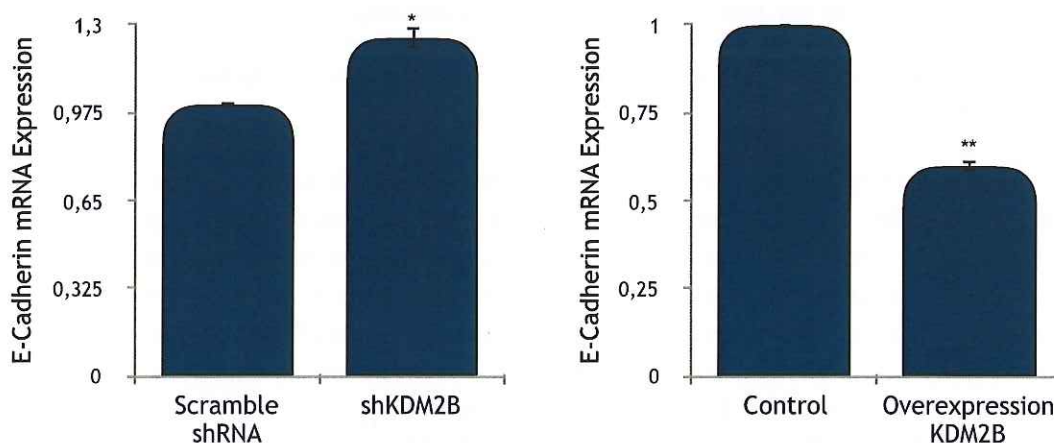


Εικόνα 32: Πρωτεϊνική έκφραση της BMI1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. (A) Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου BMI1 και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) D HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. $^*(p < 0.05)$, $^{**}(p < 0.01)$ αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Ανοσοφθορισμός της πρωτεΐνης BMI1 (κόκκινο χρώμα) και του πυρήνα (μπλε χρώμα) σε κύτταρα αναφοράς (αριστερά), κύτταρα με αποσιωπημένη την πρωτεΐνη KDM2B, shKDM2B (μέση) και κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B (δεξιά). Η μπάρα είναι ίση με 100 μm .

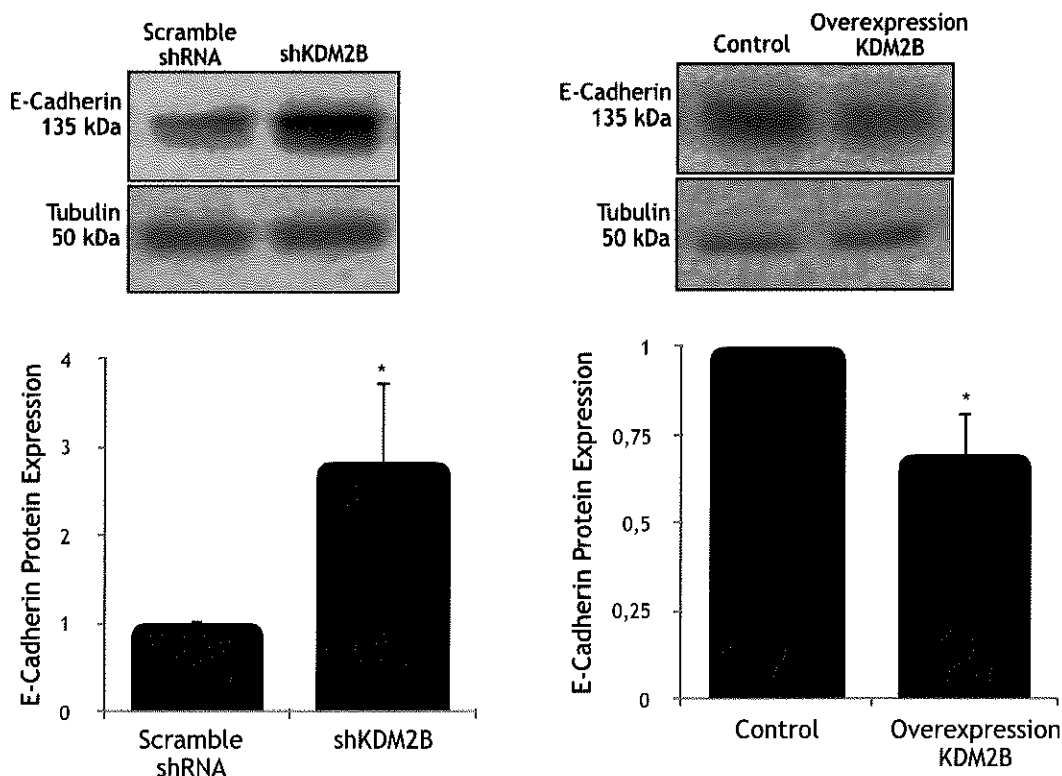
Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των δεικτών της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT markers) E-καδερίνης, ZO-1 και N-καδερίνης

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε πως και στον συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο η απορρύθμιση της έκφρασης της KDM2B οδηγεί σε διαφοροποιήσεις των επιπέδων έκφρασης πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού και τη διακυτταρική προσκόλληση, ελέγξαμε τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών της επιθηλιακής- μεσεγχυματικής μετάβασης E-καδερίνης, ZO-1 και N-καδερίνης. Παρατηρήσαμε πως τα μεταγραφικά και μεταφραστικά επίπεδα της E-καδερίνης αυξήθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση της KDM2B, ενώ αντίστοιχα μειώθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση της KDM2B, εικόνα παρόμοια με αυτή των αντίστοιχων κυτταρικών κλώνων της κυτταρικής σειράς προστάτη DU-145. Η αύξηση και η μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης E-καδερίνης επιβεβαιώθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR) και με ανοσοαποτύπωση κατά western blot (Εικόνα 33).

A



B

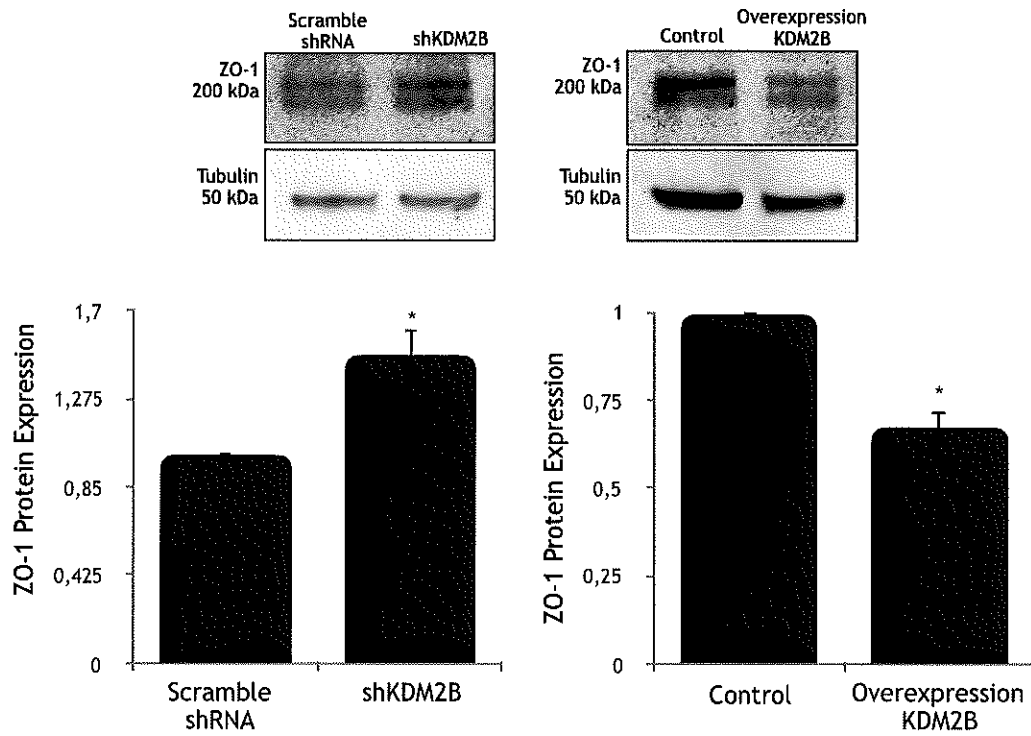


Εικόνα 33: Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση της πρωτεΐνης κυτταρικής προσκόλλησης, E-καδερίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116. (A) Μεταγραφική έκφραση της E-καδερίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Τα mRNA επίπεδα μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (rt-PCR), χρησιμοποιώντας την ακτίνη ως γονίδιο αναφοράς σε scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) και control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικές και ανεξάρτητες μεταξύ τους μετρήσεις. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της E-cadherin στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου E-καδερίνης και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *($p < 0.05$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

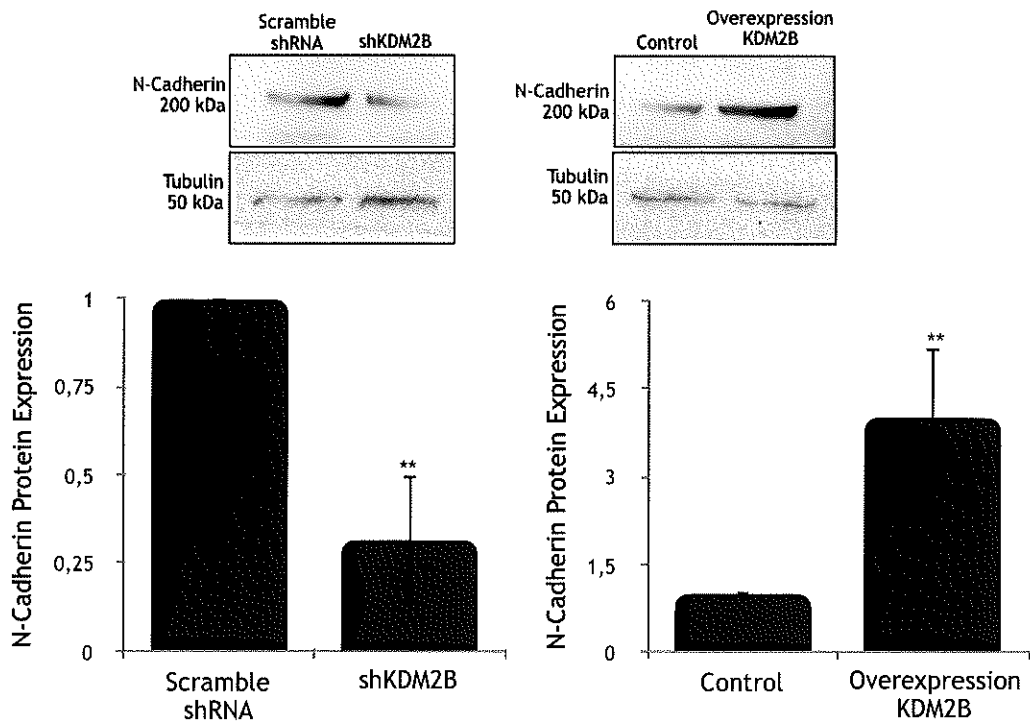
Ίδιο πρότυπο έκφρασης με αυτή της E-καδερίνης παρατηρήθηκε και με την πρωτεΐνη ZO-1. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ZO-1 αυξήθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση της KDM2B, ενώ αντίστοιχα μειώθηκαν έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου της απομεθυλάσης αυτής (Εικόνα 34). Η N-καδερίνη, μαζί με τη φιμπρονεκτίνη, τη β-κατενίνη και τη βιμεντίνη, ανήκει στους μεσεγχυματικούς δείκτες της επιθηλιακής- μεσεγχυματικής μετάβασης (mesenchymal EMT marker) σε αντίθεση με τις E-καδερίνη και ZO-1 που ανήκουν στους επιθηλιακούς δείκτες της EMT (epithelial EMT marker). Επομένως, το πρότυπο έκφρασης των δύο αυτών ομάδων πρωτεϊνών παρουσιάζει αντίθετη εικόνα, κάτι που επιβεβαιώθηκε στους κυτταρικούς κλώνους του παχέος εντέρου HCT-116. Συγκεκριμένα, ελέγξαμε στους κυτταρικούς κλώνους που εκφράζουν είτε

ένα ειδικό shRNA έναντι της KDM2B ή υπερεκφράζουν την KDM2B, τα επίπεδα έκφρασης του μεσεγχυματικού δείκτη διακυτταρικής προσκόλλησης N-καδερίνη και παρατηρήσαμε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο KDM2B και αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα στους κλώνους που υπερεκφράζουν την απομεθυλάση (Εικόνα 34).

A



B

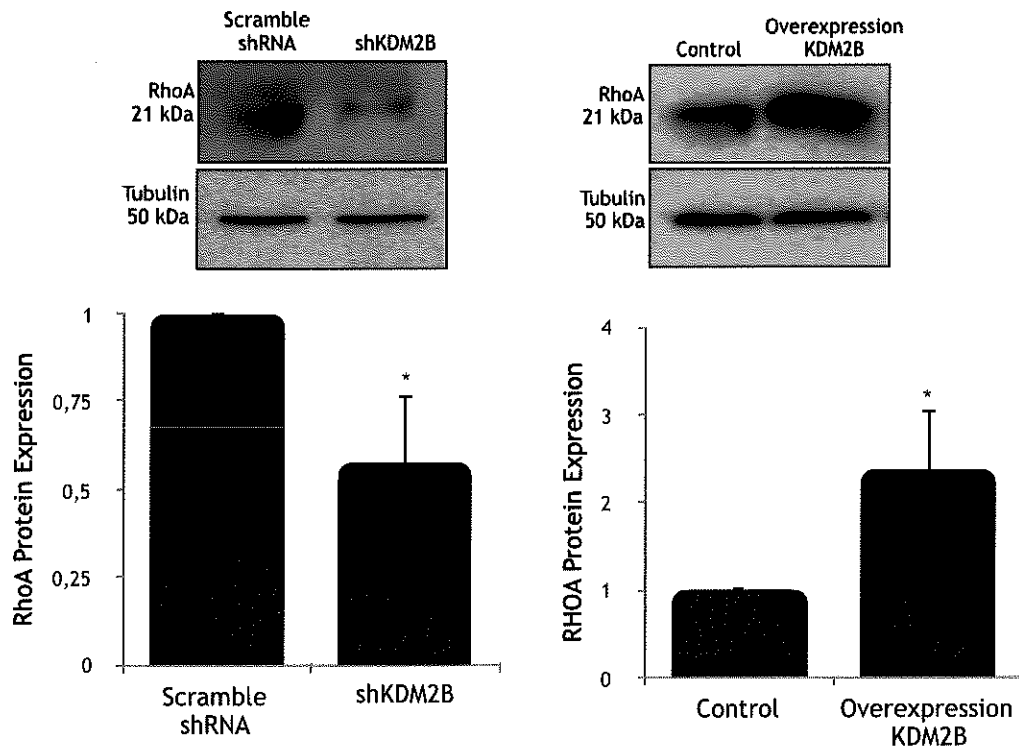


Εικόνα 34: Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των δεικτών της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT markers) ZO-1 και N-καδερίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116. (A) Πρωτεϊνική έκφραση της ZO-1 στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτίπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου ZO-1 και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της N-καδερίνης στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτίπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου N-καδερίνης και της τουμποουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) αντιπροσωπεύουν τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

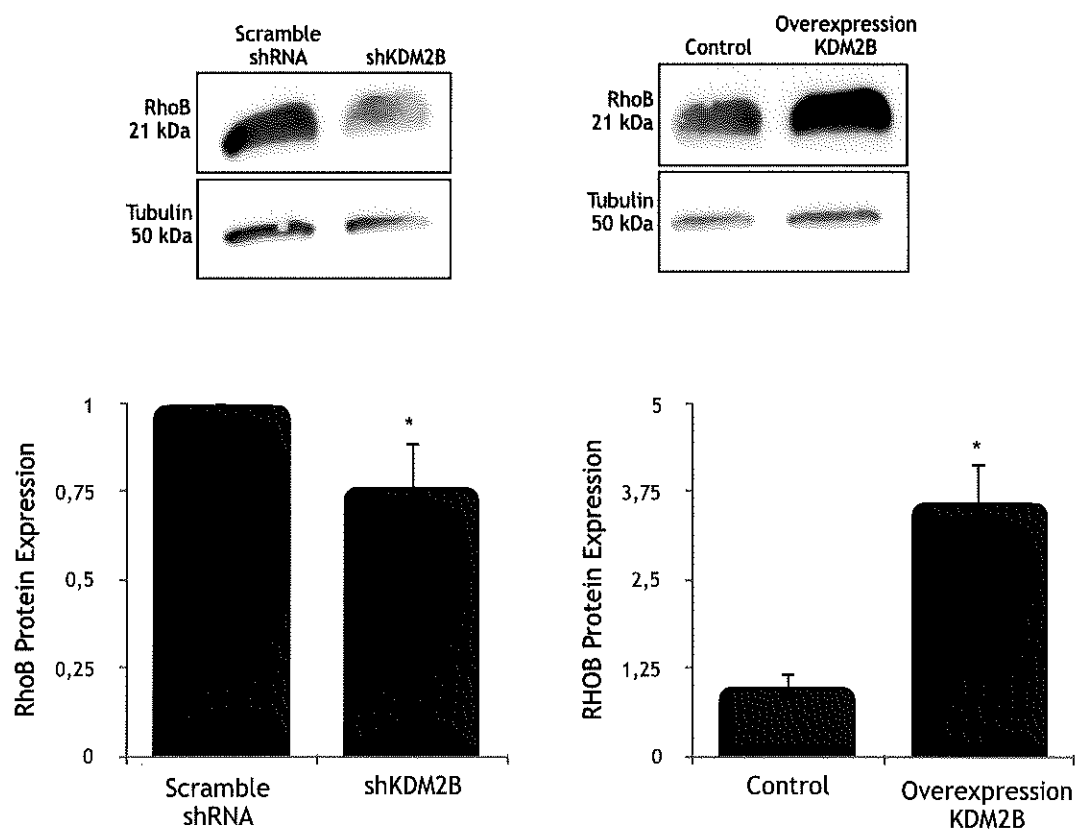
Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των μικρών Rho GTPασών, RhoA, RhoB, RhoC και Rac1

Θέλοντας να επιβεβαιώσουμε πως η KDM2B δεν ρυθμίζει την έκφραση των μικρών Rho GTPασών μόνο στην καρκινική σειρά προστάτη DU-145 αλλά και στην κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HCT-116, προχωρήσαμε στον έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης των Rho GTPασών, RhoA, RhoB, RhoC και Rac1 στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά και λάβαμε παρόμοια εικόνα έκφρασης με αυτή της κυτταρικής σειράς προστάτη DU-145. Η αποσιώπηση της KDM2B οδήγησε σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα των RhoA (μείωση περίπου ίση με 75%), RhoB (μείωση περίπου ίση με 75%) και RhoC (μείωση περίπου ίση με 77%) GTPασών σε σχέση με τους κυτταρικούς κλώνους αναφοράς, ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του γονιδίου αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα των GTPασών αυτών (Εικόνα 35).

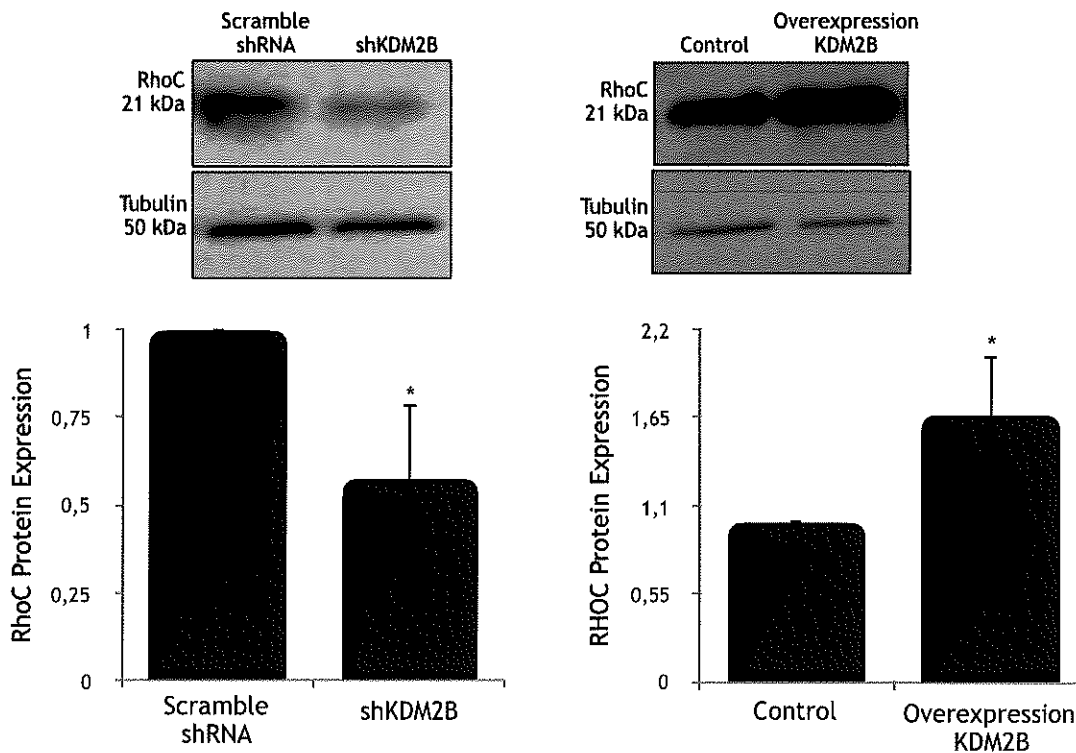
A



B



C

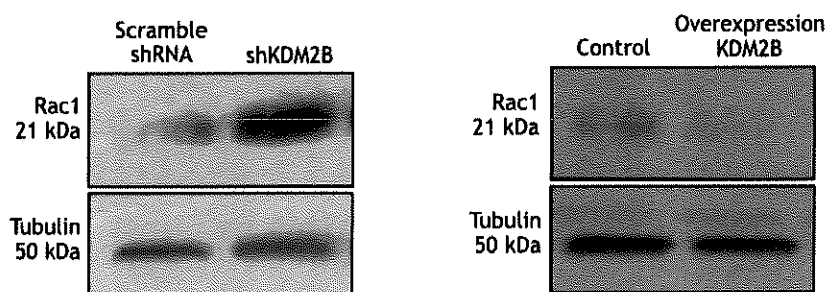


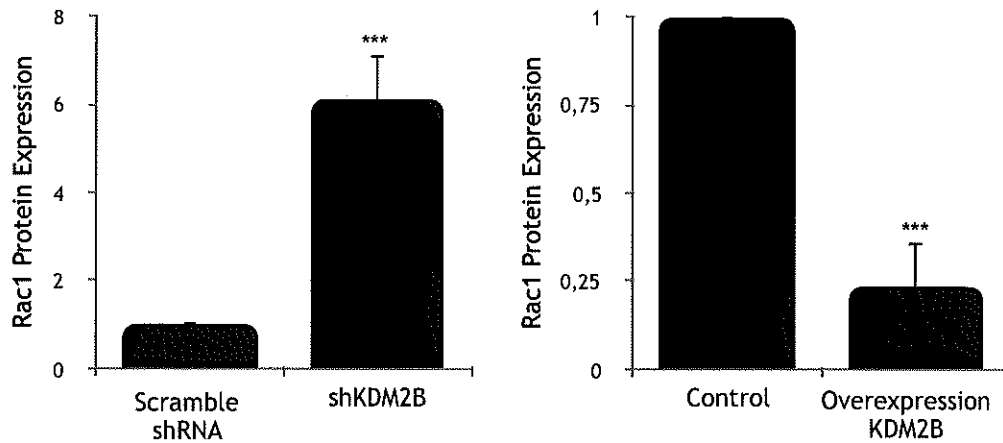
Εικόνα 35: Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των μικρών Rho GTPασών στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116. (Α) Πρωτεϊνική έκφραση της RhoA στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση

κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *RhoA* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της *RhoB* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτίπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *RhoB* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. (C) Πρωτεϊνική έκφραση της *RhoC* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτίπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *RhoC* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$) αντιπροσωπεύουν τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Ελέγχοντας στη συνέχεια την έκφραση της *Rac1*, διαπιστώσαμε πως παρουσιάζει αντίθετη εικόνα έκφρασης από αυτή των *RhoA*, *RhoB* και *RhoC* GTPασών, όπως και στην κυτταρική σειρά DU-145. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της *Rac1* στους κυτταρικούς κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο *KDM2B* (περίπου 6 φορές πάνω από την αντίστοιχη έκφραση στα κύτταρα αναφοράς), ενώ αντίθετα έπειτα από την υπερέκφραση του γονιδίου τα πρωτεϊνικά επίπεδα της *Rac1* μειώθηκαν σημαντικά (περίπου κατά 75% σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς) (Εικόνα 36). Τα ευρήματά μας αυτά, η αντίθετη αυτή εικόνα δηλαδή της πρωτεϊνικής έκφρασης που παρουσιάζουν οι *RhoA-RhoB-RhoC* και *Rac1* GTPάσες, μπορεί να υποδηλώνουν πως ο επιγενετικός παράγοντας *KDM2B* διαδραματίζει διαφορετικούς ρόλους στην αναδιοργάνωση της ακτίνης. Η έκφραση της *Rac1* GTPάσης στα κύτταρα HCT-116 μπορεί να συσχετιστεί με τον έλεγχο της εισβολής των καρκινικών αυτών κυττάρων από το επιθήλιο του εντέρου στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων μέσω του σχηματισμού λαμελλιποδίων, και όχι με τον έλεγχο της μετανάστευσης σε πειράματα τραυματισμού μονοστοιβάδας και επούλωσης “πληγών” στο επίπεδο μονοκυτταρικό υπόστρωμα της φιάλης των κυτταροκαλλιιεργειών.

Αξίζει να σημειωθεί, πως η δοκιμασία τραυματισμού μονοστοιβάδας (wound healing assay) και κατ' επέκταση ο προσδιορισμός της μετανάστευσης των κυττάρων HCT-116 απέτυχε να καθιερώσει μια σαφή σχέση μεταξύ της έκφρασης και της κινητικότητας της *KDM2B*, πιθανά λόγω της μικρότερης βασικής έκφρασης της *KDM2B* στην κυτταρική αυτή σειρά σε σχέση με τα κύτταρα προστάτη DU-145. Η παρατήρηση αυτή, ότι η *KDM2B* δηλαδή δεν επηρεάζει το δυναμικό μετανάστευσης των HCT-116 κυττάρων, δείχνει ότι τα βασικά επίπεδα έκφρασης της *KDM2B* ρυθμίζουν διαφορετικά τη μεταναστευτική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων.



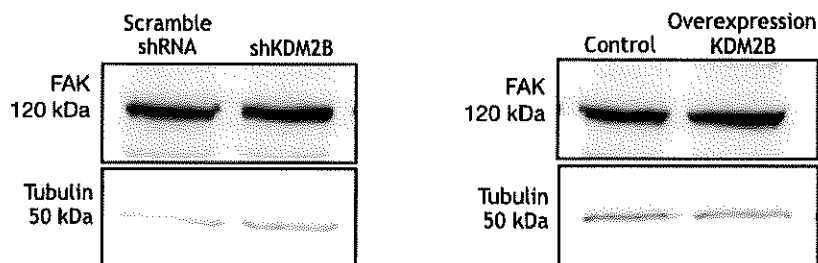


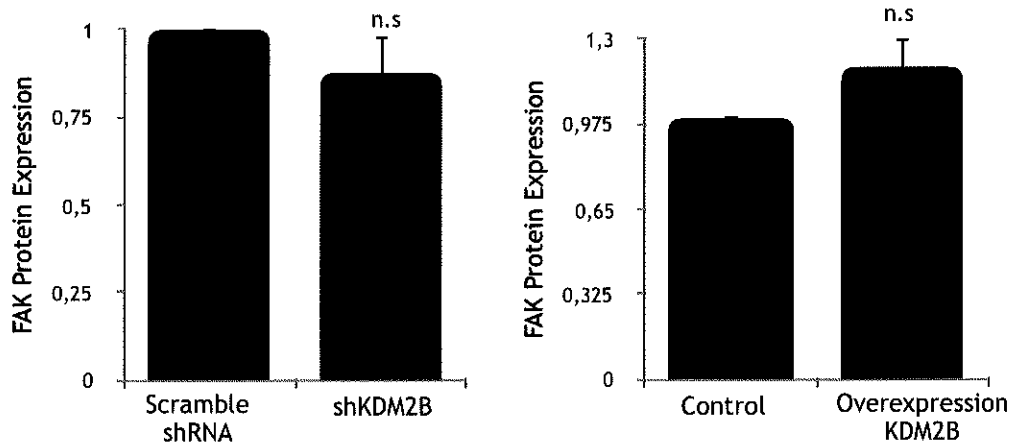
Εικόνα 36: Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει την πρωτεϊνική έκφραση της *Rac1* μικρής GTPάσης. Πρωτεϊνική έκφραση της *Rac1* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *Rac1* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of *KDM2B* (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of *KDM2B*, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Η *KDM2B* και το σηματοδοτικό μονοπάτι FAK/PI3K στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116

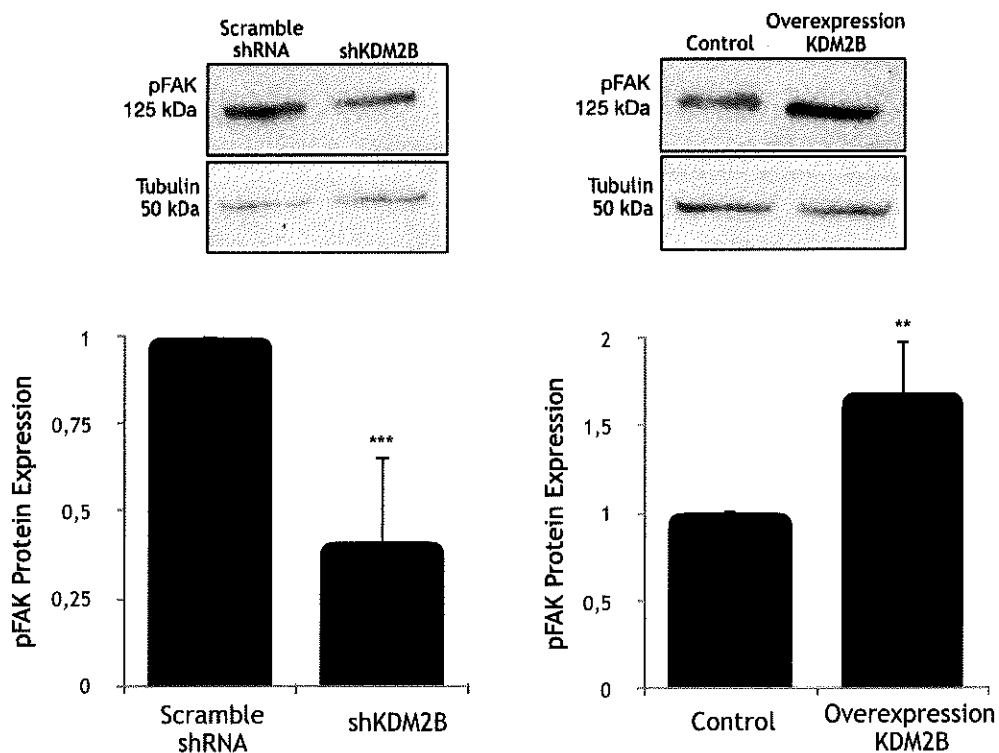
Τέλος, μελετήσαμε το μονοπάτι της FAK/PI3K και όπως αναμέναμε λάβαμε αποτελέσματα παρόμοια με αυτά που είδαμε μελετώντας το ίδιο μονοπάτι στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145. Τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης FAK παρέμειναν ανεπηρέαστα κατά την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση της *KDM2B* στους κυτταρικούς κλώνους. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα έκφρασης όμως της ενεργής, φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεϊνικής αυτής κινάσης, pFAK, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αλλαγή στους διαφορετικούς κλώνους. Η αποσιώπηση του γονιδίου *KDM2B* οδήγησε σε μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα της pFAK ενώ αντίθετα η υπερέκφραση του γονιδίου αύξησε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφορυλιωμένης ενεργής μορφής της πρωτεΐνης (Εικόνα 37). Η *KDM2B* επομένως, ελέγχει τη δραστηριότητα της FAK χωρίς να επηρεάζει την έκφρασή της στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116.

A





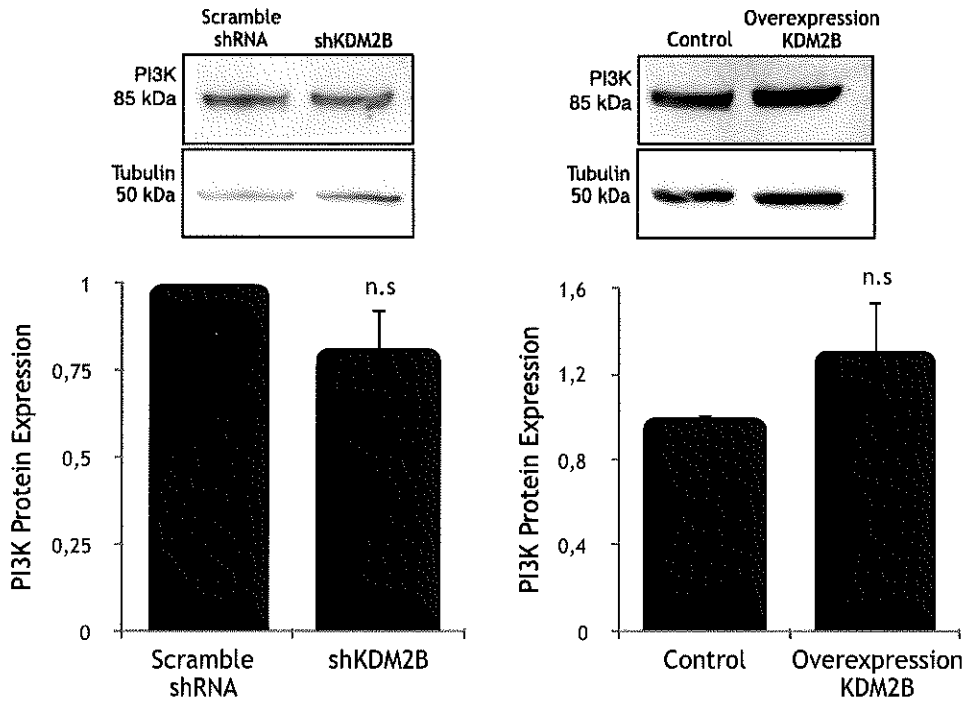
B



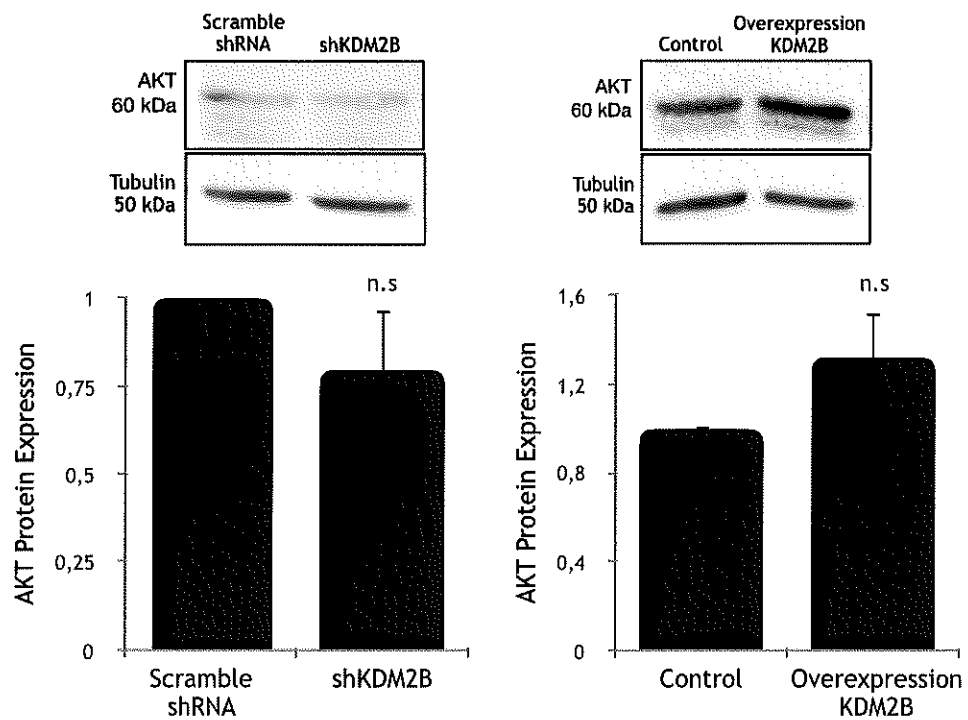
Εικόνα 37. Το γονίδιο *KDM2B* ρυθμίζει τη φωσφορύλιωση της πρωτεϊνικής κινάσης *p-FAK*. (Α) Πρωτεϊνική έκφραση της *FAK* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου *HCT-116* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου *FAK* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) *HCT-116* κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. *n.s* (*non statistical significance*) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος. (Β) Πρωτεϊνική έκφραση της ενεργής φωσφορυλιωμένης μορφής της κινάσης *p-FAK* στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου *HCT-116* έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου *KDM2B*. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης της *p-FAK* και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα *scramble shRNA*, *shKDM2B* (αριστερά) and *control overexpression*, *overexpression of KDM2B* (δεξιά) *HCT-116* κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων *scramble shRNA*, *shKDM2B* και δύο διαφορετικών κλώνων *control overexpression*, *overexpression of KDM2B*, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Επιπλέον, όπως και στην κυτταρική σειρά προστάτη DU-145, έτσι και στην κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HCT-116, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου PI3K και AKT παρέμειναν ανεπηρέαστα και δεν επηρεάστηκαν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση της KDM2B (Εικόνα 38)

A



B



Εικόνα 38. Το γονίδιο KDM2B και οι πρωτεΐνες καθοδικά του μονοπατιού FAK/PI3K, PI3K και AKT. (A) Πρωτεϊνική έκφραση της PI3K στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου PI3K και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. (B) Πρωτεϊνική έκφραση της AKT στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116 έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B. Ανοσοαποτύπωση κατά Western blot και ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής έκφρασης του γονιδίου AKT και της τουμπουλίνης (γονίδιο αναφοράς) στα scramble shRNA, shKDM2B (αριστερά) and control overexpression, overexpression of KDM2B (δεξιά) HCT-116 κυτταρικά εκχυλίσματα. Τα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο από τις μετρήσεις δύο διαφορετικών κλώνων scramble shRNA, shKDM2B και δύο διαφορετικών κλώνων control overexpression, overexpression of KDM2B, από 3 διαφορετικά και ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. n.s (non statistical significance) αντιπροσωπεύει τη στατιστική σημαντικότητα του αποτελέσματος.

Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει καίρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και της EMT

Βασιζόμενοι σε όλα τα παραπάνω αποτελέσματα και από τις δύο κυτταρικές σειρές που μελετήσαμε, μπορούμε να συμπεράνουμε πως η απομεθυλάση των ιστονών KDM2B ρυθμίζει τουλάχιστον 4 καίρια μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία ελέγχουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και την επιθηλιο-μεσεγγυματική μετατροπή των κυττάρων (EMT) και ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις ρυθμίζουν βασικές διεργασίες και χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων, όπως είναι η μετανάστευση, η κινητικότητα και η επιθετικότητα έναντι των ιστών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το DNA προκειμένου να χωρέσει μέσα στα όρια του κυτταρικού πυρήνα περιτυλίγεται γύρω από τις ιστόνες ώστε να επιτευχθεί συμπυκνωμένη δομή υψηλότερης τάξης πολυπλοκότητας, η λεγόμενη χρωματίνη. Η συμπύκνωση αυτή ωστόσο εμποδίζει σημαντικές διαδικασίες, όπως η μεταγραφή, η αντιγραφή, η επιδιόρθωση και ο ανασυνδυασμός. Διάφορες ομοιοπολικές τροποποιήσεις στις ιστόνες ή και στο ίδιο το DNA, σε συνδυασμό με την ενεργή επανατοποθέτηση των νουκλεοσωμάτων, ρυθμίζουν την προσβασιμότητα στο DNA. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι λειτουργικά συνδεδεμένες και αλληλορρυθμιζόμενες και ο συνδυασμός τους αποτελεί έναν κώδικα για την ερμηνεία της γενετικής πληροφορίας. Ορισμένες από αυτές τις τροποποιήσεις κληρονομούνται από τα μητρικά στα θυγατρικά κύτταρα ή ακόμα και από τη μία γενεά ενός πολυκύτταρου οργανισμού στην επόμενη. Οι κληρονομικές αυτές μεταβολές της χρωματίνης που δεν συνοδεύονται από μεταβολές στην αλληλουχία του DNA ονομάζονται επιγενετικές και είναι απαραίτητες για τη χρονική και χωρική ερμηνεία του γονιδιώματος. Οι μεταβολές στη δομή της χρωματίνης επηρεάζουν θεμελιώδεις κυτταρικές διεργασίες και παίζουν κεντρικό ρόλο στις ανθρώπινες ασθένειες και, ειδικότερα, στον καρκίνο.

Ο καρκίνος έχει θεωρηθεί γενετική ασθένεια. Όμως τελευταία στοιχεία των ερευνών αμφισβητούν αυτή την άποψη δείχνοντας ότι και οι μη γενετικές κληρονομικές αλλαγές που επηρεάζουν τη δομή της χρωματίνης και την έκφραση των γονιδίων μπορούν να διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη βιολογία ενός καρκινικού κυττάρου. Με βάση τα στοιχεία αυτά, η ανάπτυξη και εξέλιξη ενός καρκινικού όγκου εξαρτάται από το συνδυασμό των γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που οδηγούν σε απορρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας [1]. Αυτές οι γενετικές και οι επιγενετικές αλλαγές δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Έτσι, η επιγενετική σίγαση των γονιδίων που εμπλέκεται στην απόκριση σε βλάβες του DNA μπορεί να προκαλέσει γενετική αστάθεια και συσσώρευση γενετικών αλλαγών στα καρκινικά κύτταρα. Από την άλλη πλευρά, οι γενετικές αλλαγές που επηρεάζουν γονίδια που εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση, μπορούν να αλλάξουν το επιγονιδίωμα του καρκινικού κυττάρου.

Ο κεντρικός ρόλος των επιγενετικών μεταβολών στην εξέλιξη ενός όγκου έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν στην αναστροφή των επιγενετικών αυτών αλλαγών. Για παράδειγμα, τα ανάλογα κυτοσίνης 5-αζακυτοσίνη [5-azacytosine (azacytidine)] και 2-δεοξυ-5-αζακυτιδίνη [2-deoxy-5-azacytidine (decitabine)] θεωρούνται σήμερα τα πιο προηγμένα φάρμακα στη θεραπεία του καρκίνου που οφείλεται σε απορρύθμιση επιγενετικών μηχανισμών. Αυτοί οι αναστολείς των DNA μεθυλοτρανσφερασών μέχρι στιγμής έχουν δείξει αξιοσημείωτη αποτελεσματικότητα στην απο-καταστολή των μεταγραφικά σιωπηλών ογκοκατασταλτικών γονιδίων από επιγενετικούς μηχανισμούς [2, 3]. Μετά την επιτυχία στη χρήση των αναστολέων των DNA μεθυλοτρανσφερασών, η έρευνα έχει στραφεί προς τη μελέτη του ογκοκατασταλτικού δυναμικού μιας άλλης κατηγορίας πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση, εκείνη των απομεθυλασών των ιστονών. Έτσι, με τους αναστολείς για άλλα κύρια συστατικά του επιγενετικού μηχανισμού που ήδη δείχνουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, οι απομεθυλάσες των ιστονών αναδύονται ως νέοι πιθανοί στόχοι αντικαρκινικών φαρμάκων. Αρκετές μελέτες υποδεικνύουν ότι οι απομεθυλάσες των ιστονών μπορούν όντως να είναι καλοί υποψήφιοι στόχοι για την ανάπτυξη επιγενετικών θεραπειών έναντι του καρκίνου. Για παράδειγμα, η PLU-1/KDM5B εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού και η αποσιώπησή της από καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7 έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων και την

επανεκφραση αρκετών ογκοκατασταλτικών γονιδίων [4]. Επίσης, η αποσιώπηση της NDY1/KDM2B όπως επίσης και η απομάκρυνση της εξωγενούς NDY1/KDM2B σε κύτταρα MEFs μειώνει την έκφραση της EZH2 και οδηγεί στην έκφραση της p16INK4A που προκαλεί κυτταρική γήρανση [5-7]. Έτσι, οι αναστολείς των απομεθυλασών των ιστονών, είτε μόνοι τους είτε σε συνδυασμό με αναστολείς αποακετυλασών των ιστονών ή αναστολείς μεθυλοτρανσφερασών του DNA, μπορεί να αποδειχθούν αποτελεσματικοί επιγενετικοί θεραπευτικοί παράγοντες.

Πολλές φυσιολογικές κυτταρικές δραστηριότητες στα καρκινικά κύτταρα μεταβάλλονται και αλλοιώνονται, με αποτέλεσμα τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την ενισχυμένη επιβίωση και την ελαττωματική κυτταρική μορφολογία. Η διαφοροποιημένη μορφολογία των κυττάρων παρέχει στα καρκινικά κύτταρα τα χαρακτηριστικά εκείνα που τους προσδίδουν αυξημένη μεταναστευτική και διηθητική ικανότητα, χαρακτηριστικά απαραίτητα για την εξέλιξη της νόσου. Κατά τη μεταναστευτική διαδικασία, τα καρκινικά κύτταρα εγκαταλείπουν τον πρωτογενή όγκο και διασκορπίζονται στο σώμα για να δημιουργήσουν δευτερογενείς αποικίες καρκινικών κυττάρων σε απομακρυσμένες περιοχές. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητα τους, τη διακυτταρική προσκόλληση και την προσκόλληση με την εξωκυττάρια ουσία αποκτώντας με τον τρόπο αυτό μεταναστευτικές και διηθητικές ιδιότητες, σε μία διαδικασία που ονομάζεται επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάπτωση (EMT), η οποία περιλαμβάνει μία δραματική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού συνοδευόμενη από το σχηματισμό μεμβρανικών προεξοχών που απαιτούνται για τη διήθηση και μετακίνηση των κυττάρων.

Πολλά μόρια έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη και εξέλιξη των κακοηθειών. Αρκετά ευρήματα υποδηλώνουν ότι αλλοιώσεις και διαφοροποιήσεις των ρυθμιστών της χρωματίνης συνδέονται με απορρύθμιση των κυτταροσκελετικών λειτουργιών και της διακυτταρικής προσκόλλησης, ωστόσο οι μηχανισμοί πίσω από αυτές τις διαδικασίες μόνο τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να μελετώνται [8-10]. Το ότι ο κυτταροσκελετός ρυθμίζεται από επιγενετικούς μηχανισμούς έχει υποστηριχθεί από πολλές έρευνες. Για παράδειγμα, τα θυγατρικά κύτταρα ινοβλαστών 3T3 εμφανίζουν παρόμοια οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και των ινών του στρες και έχουν παρόμοια κινητική συμπεριφορά [11, 12], ενώ κύτταρα που είναι γενετικά ταυτόσημα με κύτταρα αγρίου τύπου κληρονομούν τις αλλαγές στον προσανατολισμό των κροσσών για εκατοντάδες γενεές [13, 14].

Τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα ερευνών έχουν καταστήσει σαφές ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί αλληλεξαρτώνται και ενσωματώνονται στο ρυθμιστικό μηχανισμό του κυττάρου. Η δράση των επιγενετικών ρυθμιστών τροποποιείται από τα πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία όμως απορρυθμίζονται στα καρκινικά κύτταρα. Μελλοντικές μελέτες που θα σχετίζονται με την κατανόηση της ρύθμισης της επιγενετικής του καρκίνου, θα επαναπροσδιορίσουν την κατανόησή μας για το καρκινικό κύτταρο και θα αποκαλύψουν νέους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση. Στην παρούσα μελέτη, εστίασαμε σε έναν τύπο επιγενετικών ρυθμιστών, και συγκεκριμένα σε ένα ένζυμο που ρυθμίζει την απομεθυλίωση μεθυλιωμένων ιστονών. Εστιάζοντας έτσι, στο ρόλο της απομεθυλάσης των ιστονών KDM2B και βασιζόμενοι στην υπόθεση ότι στον καρκίνο οι επιγενετικές αλλοιώσεις συχνά οδηγούν στην απορρύθμιση των μηχανισμών που διατηρούν τη φυσιολογική οργάνωση του κυτταροσκελετού και την κυτταρική προσκόλληση, μελετήσαμε πώς η ρύθμιση της χρωματίνης και οι επιγενετικοί μηχανισμοί επηρεάζουν την εμφάνιση και την εξέλιξη του καρκίνου. Για την προσέγγιση αυτής της υπόθεσης, είναι σημαντικό να διασαφηνιστούν οι παράγοντες της χρωματίνης που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό, να αποκρυπτογραφηθούν οι επιγενετικοί μηχανισμοί με τους οποίους αυτοί οι κρίσιμοι κυτταρικοί

παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων του κυτταροσκελετού και να καθοριστεί πώς αυτοί οι μηχανισμοί συνεισφέρουν στην επιβίωση, την εισβολή και τη μετανάστευση. Ο μηχανισμός με τον οποίο οι βασικοί ρυθμιστές της κυτταρικής μετανάστευσης και της διήθησης των καρκινικών κυττάρων αλληλοεπιδρούν και ρυθμίζονται από την απομεθυλάση των ιστονών KDM2B οδηγεί σε ένα καινούριο πεδίο έρευνας. Διευκρινίζοντας το μηχανισμό αυτό, στοχεύουμε στον καθορισμό ενός βασικού πλαισίου επιγενετικής ρύθμισης που ελέγχει τη δομή και τη λειτουργία του κυτταροσκελετού και της προσκόλλησης των κυττάρων.

Η κυτταρική κίνηση αποτελεί μια θεμελιώδη διαδικασία. Τα ινίδια της ακτίνης και οι πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτά είναι τα κύρια δομικά συστατικά που ελέγχουν όλα τα στάδια της κίνησης του κυττάρου. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την κινητικότητα των κυττάρων και ρυθμίζονται από τον παράγοντα KDM2B δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς. Για τη μελέτη της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον επιγενετικό αυτό παράγοντα, χρησιμοποιήσαμε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 και τα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT116, τα οποία εκφράζουν είτε ένα ειδικό shKDM2B έναντι της KDM2B είτε υπερεκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Στόχος ήταν να αποσαφηνιστεί κατά πόσο ο επιγενετικός αυτός παράγοντας ρυθμίζει άμεσα ή έμμεσα βασικά μόρια σηματοδότησης, ελέγχοντας έτσι την κυτταρική φυσιολογία. Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει για πρώτη φορά τον κεντρικό ρόλο της απομεθυλάσης αυτής των ιστονών στην επιγενετική ρύθμιση του κυτταροσκελετού και κατ' επέκταση την κινητικότητα και τη διηθητική ικανότητα των κυττάρων, τη μετανάστευση και την EMT.

Το πρώτο μας βήμα ήταν να βεβαιωθούμε αρχικά αν ο παράγοντας αυτός εκφράζεται και είναι ενεργός στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές με τις οποίες εργαστήκαμε. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι σήματα από αυξητικούς παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν στην υπερέκφραση της KDM2B, η οποία σε συνεργασία με τις πρωτεΐνες του PRC συμπλόκων προάγει την κινητικότητα και την εισβολή σε κυτταρικές σειρές όγκων και όγκους [9]. Όπως αναμέναμε, προεπάση με τον αυξητικό παράγοντα FGF-2 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της απομεθυλάσης KDM2B. Ο FGF-2 ρυθμίζει την έκφραση της KDM2B στα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU-145 και παχέος εντέρου HCT-116, η οποία στη συνέχεια ελέγχει την έκφραση των PRC πρωτεϊνών EZH2 και BMI1. Ήδη δημοσιευμένες μελέτες έχουν δείξει πως η έκφραση της μεθυλοτρανσφεράσης των ιστονών EZH2 και της BMI1 αυξάνεται με την εξέλιξη του όγκου και η διαφοροποίηση των επιπέδων έκφρασής τους αλλάζει τον επιθετικό φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. Υπερέκφραση των γονιδίων σχετίζεται με την ανάπτυξη κακοηθειών, την αυξημένη επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων, και συνδέεται με κακή πρόγνωση και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό σε διάφορους τύπους καρκίνου [15, 16]. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν τις εν λόγω παρατηρήσεις, καθώς αυξημένα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν στους κυτταρικούς κλώνους που υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο KDM2B και οι οποίοι σε πειράματα επούλωσης πληγής εμφανίζουν αυξημένη κινητικότητα σε σχέση με τα κύτταρα αναφοράς ή τα κύτταρα με αποσιωπημένο το συγκεκριμένο γονίδιο.

Η EZH2 είναι η καταλυτική υπομονάδα του κατασταλτικού συμπλόκου μεταγραφής 2 (PRC2), το οποίο μεθυλιώνει τη λυσίνη 27 της ιστόνης H3, καταστέλλοντας έτσι ογκοκατασταλτικά και αντι-μεταστατικά γονίδια. Ο πιο γνωστός μοριακός μηχανισμός που εμπλέκεται η EZH2 και έχει αναλυτικά μελετηθεί είναι η επαγόμενη από την EZH2 μετάσταση των κυττάρων (Ezh2-dependent metastatization). Αρχικά, η μεθυλοτρανσφεράση EZH2 δρα μαζί με αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) και οδηγούν στην καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της E-

καδερίνης, βήμα κρίσιμο για την EMT [17]. Επιπλέον, η EZH2 βρίσκεται στο σταυροδρόμι ενός πολύπλοκου και σύνθετου δικτύου microRNAs. Έχει αναφερθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα DU-145, μειώνεται η έκφραση 63 microRNAs σε σχέση με φυσιολογικές κυτταρικές σειρές. Αποσιώπηση της EZH2 αποκαθιστά την έκφραση των microRNAs αυτών [18]. Η πλειοψηφία των microRNAs αυτών, έχουν ενταχθεί σε πολλά γνωστά clusters και οικογένειες microRNAs, όπως για παράδειγμα των miR-200b και miR-200c στην οικογένεια miR-200, η οποία έχει αναφερθεί προηγουμένως ότι καταστέλλει την BMI1 [19, 20]. Τα επίπεδα έκφρασης της EZH2 συσχετίζονταν σε μεγάλο βαθμό με αυτά της πρωτεΐνης BMI1, υποστηρίζοντας περαιτέρω έναν μοριακό δεσμό (molecular link) μεταξύ της έκφρασης των συστατικών των συμπλόκων PRC1 και PRC2 και των δραστηριοτήτων τους κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου. Η επιγενετική καταστολή των miR-181a, miR-181b, miR-200b, miR-200c και miR-203 που μεσολαβείται από την EZH2, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων έκφρασης της PRC1 πρωτεΐνης BMI1 [18]. Επιπλέον, σε μεταστατικούς όγκους, η έκφραση ορισμένων αντι-μεταστατικών microRNAs, όπως τα miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-101 και το let7, είναι αισθητά μειωμένη [21]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα miR-101, let7 και miR-26a καταστέλλουν την έκφραση της EZH2 σε καρκινικά κύτταρα [22, 23] και ότι η δράση τους αυτή είναι απαραίτητη για την καταστολή της εξέλιξης του όγκου [24, 25]. Με τη σειρά της, η EZH2 οδηγεί σε σίγαση μερικά αντι-μεταστατικά microRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-101, let-7c, miR-200b, miR-139-5p και miR-125b [18], τα οποία στη συνέχεια στοχεύουν ογκοκατασταλτικά γονίδια. Ένα από αυτά τα γονίδια είναι και η E-καδερίνη. Η μειωμένη έκφραση της E-καδερίνης θεωρείται ως ένα από τα κύρια μοριακά συμβάντα που εμπλέκονται στη δυσλειτουργία της διακυτταρικής προσκόλλησης, προωθώντας την αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων και τη μετάσταση στον καρκίνο [26]. Αυτό, έρχεται σε συμφωνία και με τα δικά μας ευρήματα, καθώς, υπερέκφραση του ογκογονιδίου KDM2B οδήγησε σε μειωμένη έκφραση της E-καδερίνης, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε έπειτα από την αποσιώπηση του γονιδίου.

Τα τελευταία χρόνια το ήδη περίπλοκο δίκτυο της γονιδιακής έκφρασης και της επιγενετικής ρύθμισης περιπλέκεται περαιτέρω έπειτα από την ανακάλυψη του ζωτικού ρόλου των microRNAs [27]. Τα microRNAs είναι σε θέση να ελέγχουν τη γονιδιακή έκφραση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω στόχευσης συγκεκριμένων συμπληρωματικών ρυθμιστικών στοιχείων στην 3'-UTR περιοχή των mRNAs γονιδίων- στόχων, αντιπροσωπεύοντας έτσι μια νέα σημαντική κατηγορία ρυθμιστικών μορίων. Τα microRNAs διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε πολυάριθμες βιολογικές διαδικασίες και η απορρύθμιση της λειτουργίας τους αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό του καρκίνου στον άνθρωπο [28, 29]. Σχεδόν κάθε γονίδιο ρυθμίζεται από ένα microRNA. Για παράδειγμα, τα microRNAs miR-31, miR-21 και miR-138 έχει δείχθει ότι καταστέλλουν τα mRNA των Rho GTPασών RhoA, RhoB και RhoC, αντίστοιχα. Επίσης, τα microRNAs miR-151 και miR-155 έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη βασική ενεργοποίηση των RhoA, Rac1 και Cdc42 μορίων [30]. Τέλος, το microRNA miR-101 έχει αποδειχθεί ότι ελέγχεται από την KDM2B μέσω ενός δικτύου επανατροφοδότησης και ρυθμίζει τα επίπεδα της E-καδερίνης, μέσω της μεθυλοτρανσφεράσης EZH2 [31]. Η ρύθμιση της έκφρασης των microRNAs επηρεάζεται από τους ίδιους μηχανισμούς που διαμορφώνουν και τη ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες (protein-coding genes, PCGs), συμπεριλαμβανομένης και της επιγενετικής ρύθμισης. Όχι μόνο τα microRNAs διαμορφώνονται και ρυθμίζονται με επιγενετικούς μηχανισμούς, αλλά και αρκετά microRNAs αυτά καθ' αυτά, μπορούν να στοχεύσουν άμεσα και να ρυθμίσουν την έκφραση συστατικών του επιγενετικού μηχανισμού, δημιουργώντας έτσι ένα μηχανισμό υψηλής

ελεγχόμενης ανάδρασης (feedback mechanism) [27]. Έτσι, τα microRNAs και τα επιγενετικά μονοπάτια φαίνεται να σχηματίζουν ένα σύνθετο ρυθμιστικό κύκλωμα που ρυθμίζει την έκφραση ενός ολοένα αυξανόμενου αριθμού γονιδίων κατά μήκος του γονιδιώματος. Η αποδιοργάνωση αυτού του κυκλώματος συμβάλλει σε διάφορες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου [27].

Η E-καδερίνη, όπως αναφέραμε και παραπάνω, αποτελεί ένα από τα βασικά συστατικά των συνδέσμων προσκόλλησης των κυττάρων. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η E-καδερίνη συμμετέχει σε ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις δημιουργώντας σταθερές συνδέσεις προσκόλλησης (AJ) μέσω στρατολόγησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Οι συνδέσεις προσκόλλησης συμβάλλουν, όπως είναι γνωστό, στον καθορισμό ενός κορυφαίου-βασικού άξονα στα επιθηλιακά κύτταρα και λόγω αυτού, δρουν ως σημείο αναφοράς για το συντονισμό της επιθηλιακής πολικότητας. Ένα χαρακτηριστικό των AJ είναι ότι είναι εξαιρετικά δυναμικές δομές καθώς η συνεχής σύνδεση και αποσύνδεση είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της επιθηλιακής ακεραιότητας [32]. Πέρα από το σημαντικό ρόλο της E-καδερίνης, σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και συγκρότηση των διαφορετικών συμπλόκων διακυτταρικής προσκόλλησης και στην ακόλουθη καθιέρωση της πολικότητας στα επιθηλιακά κύτταρα και διατήρησή τους, διεργασίες βασικές κατά τη μορφογένεση, παίζουν και οι Rho GTPάσες RhoA και Rac1, αφού η καθιέρωση της αρχικής ζώνης των AJ και η προαγωγή της δημιουργίας νέων επαφών μεταξύ των γειτονικών κυττάρων όπου μεσολαβεί η E-καδερίνη απαιτούν την τοπική ενεργοποίησή τους [33, 34]. Από την άλλη πλευρά, η επίπτωση της παρατηρούμενης ρύθμισης της διακυτταρικής προσκόλλησης στη μετανάστευση των κυττάρων DU-145 μέσω του μεταγραφικού ελέγχου των επιθηλιακών δεικτών παραμένει ασαφής. Πράγματι, η προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου μπορεί να διέπει το διηθητικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων [35]. Επιπλέον, πρόσφατα ευρήματα έδειξαν ότι η μικρή GTPάση RhoB και η E-καδερίνη συν-εντοπίζονται σε συμφύσεις μεταξύ των κυττάρων σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU-145 [36]. Σε αυτή τη μελέτη αναφέρθηκε ότι η μείωση της RhoB από το siRNA μείωσε τη διακυτταρική προσκόλληση με μείωση της E-καδερίνης, γεγονός που συνοδεύεται από αυξημένη μετανάστευση των κυττάρων DU-145. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν το συμπέρασμα αυτό, καθώς δείχνουν σημαντικά αυξημένη μετανάστευση σε κυτταρικούς κλώνους DU-145 που υπερεκφράζουν την KDM2B, η οποία με τη σειρά της μειώνει την E-καδερίνη. Από την άλλη πλευρά, αφού η KDM2B δεν επηρεάζει τη μεταγραφή των γονιδίων RhoA/B GTPασών, παραμένει ασαφές αν η παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση της μετανάστευσης.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ουσιαστική αναδιάρθρωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που ρυθμίζεται από τη σηματοδότηση μέσω των Rho/ROCK συσχετίζεται με την EMT [32, 37-39]. Το εάν η KDM2B μπορεί να ελέγξει την EMT σε κύτταρα DU-145 παραμένει αδιευκρίνιστο, καθώς οι προσπάθειες εκτίμησης του προφίλ έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών, N-Καδερίνης, φιμπρονεκτίνης και βιμεντίνης, απέτυχαν να δώσουν κάποιο αποτέλεσμα, πιθανότατα λόγω των πολύ μικρών χαμηλών επιπέδων των πρωτεϊνών αυτών στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά [40]. Συνεπώς, υποθέτουμε ότι για τη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, η παρατηρούμενη ουσιαστική ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης ελέγχεται κυρίως από την αναδιάταξη του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τις Rho GTPάσες, όπως άλλωστε έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως για διάφορους άλλους όγκους [41-48]. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω και από τα ευρήματά μας που δείχνουν τον έλεγχο των παρατηρούμενων επιδράσεων της μετανάστευσης που προκαλούνται από την KDM2B από την C3

τρανσφεράση, έναν κλασικό αναστολέα των μικρών GTPασών RhoA/B/C που εμποδίζει τη δραστηριότητά τους και την ανακατανομή της ακτίνης [49, 50]. Οι περισσότερες μελέτες πάνω στη λειτουργία των Rho πρωτεϊνών βασίζονται στη χρήση του ενζύμου αυτού, το οποίο καταστέλει και τις τρεις Rho πρωτεΐνες μέσω ADP ριβοζυλίωσης της συντηρημένης Ασπαραγίνης 41. Η άμεση συσχέτιση της συμμετοχής του επιγενετικού παράγοντα KDM2B στον έλεγχο της EMT επιβεβαιώθηκε πειστικά στην κυτταρική σειρά του παχέος εντέρου HCT-116. Αυτό έγινε σαφές από τα αντίθετα αποτελέσματα έκφρασης των επιθηλιακών δεικτών της E-Καδερίνης και της ZO-1 έναντι του μεσεγγυματικού δείκτη N-Καδερίνη, που παρατηρήθηκαν έπειτα από την αποσιώπηση ή την υπερέκφραση του γονιδίου KDM2B στα κύτταρα αυτά. Στην περίπτωση αυτή, στη κυτταρική σειρά παχέος εντέρου HCT-116, τα βασικά επίπεδα έκφρασης της N-Καδερίνης είναι σαφώς αυξημένα σε σχέση με την κυτταρική σειρά του προστάτη DU-145 και για το λόγο αυτό ήταν δυνατή η παρατήρησή τους κατά τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής [40]. Είναι ενδιαφέρον ωστόσο, ότι άμεσος προσδιορισμός της μετανάστευσης με την τεχνική επούλωσης της πληγής, απέτυχε να καθιερώσει μια σαφή σχέση μεταξύ της έκφρασης και της κινητικότητας της KDM2B στα καρκινικά κύτταρα παχέος εντέρου HCT-116. Δεδομένου ότι τα επίπεδα της πρωτεΐνης KDM2B σε κύτταρα HCT-116 είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με κύτταρα καρκίνου του προστάτη DU-145, αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι τα μεταβλητά βασικά επίπεδα έκφρασης της απομεθυλάσης KDM2B μπορεί να ρυθμίζουν διαφορετικά τη μεταναστευτική συμπεριφορά των καρκινικών κυττάρων. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν το σημαντικό ρόλο της KDM2B κατά τη διάρκεια της ογκογένεσης και επιπλέον την επίδραση και συμμετοχή του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της σηματοδότησής του μέσω των μικρών GTPασών στο φαινόμενο αυτό. Η παρατήρηση αυτή άλλωστε έχει προταθεί και προηγουμένως σε διάφορα μοντέλα καρκινικών κυττάρων αναλύοντας τη συσχέτιση της EMT με τη σηματοδότηση της ακτίνης και τη μετανάστευση [36, 38, 39, 42, 51-56].

Επιπροσθέτως, εκτός από τη σηματοδότηση μέσω των Rho GTPασών, η KDM2B μπορεί επίσης να ελέγξει πρόσθετους τελεστές σηματοδότησης που ρυθμίζουν την αναδιοργάνωση της ακτίνης, την κυτταρική ανάπτυξη και την κινητικότητα. Η ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης στους όγκους είναι εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία και περιλαμβάνει τη συντονισμένη ρύθμιση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών και τελεστών [57-60]. Η σηματοδότηση μέσω της κινάσης FAK αντιπροσωπεύει ένα τέτοιο κύριο μονοπάτι. Η FAK και οι πρωτεΐνες καθοδικά του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K/Rac1/AKT/SGK1 ρυθμίζουν τη συντήρηση της επιβίωσης των κυττάρων [61-66] ενώ η απενεργοποίηση της FAK οδηγεί σε απώλεια προσκόλλησης από το υπόστρωμα, προωθεί αποπτωτικές αποκρίσεις και αναστέλλει τη μετανάστευση [42, 67-71]. Πράγματι, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ο επιγενετικός παράγοντας KDM2B εμπλέκεται στη ρύθμιση της δραστηριότητας των κινάσων εστιακής προσκόλλησης (FAK) και φωσφοϊνοσιτόλης-3 (PI3K). Η ενεργή φωσφορυλιωμένη μορφή της κινάσης FAK αλληλεπιδρά με τις κινάσες Src και αυτό το σύμπλεγμα πυροδοτεί μέσω φωσφορυλίωσης, την ενεργοποίηση πολλαπλών καθοδικών καταρρακτών σηματοδότησης που οδηγούν σε διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις περιλαμβανομένης της μετανάστευσης [72]. Η οδός σηματοδότησης FAK/PI3K και οι τελεστές καθοδικά του μονοπατιού μικρές GTPάσες Rac1 και Cdc42 ή η σηματοδότηση μέσω Src-Rho-ROCK είναι σημαντικά μόρια που ρυθμίζουν την οργάνωση και ανακατανομή του κυτταροσκελετού της ακτίνης καθώς επίσης και την κυτταρική ανάπτυξη και κινητικότητα σε διάφορους όγκους [42, 44, 62, 67, 73-76]. Τα ευρήματά μας που δείχνουν την αλληλεπίδραση της KDM2B με αυτήν τη σηματοδοτική οδό που εκδηλώνεται με την ενεργοποίηση της κινάσης FAK

και των καθοδικών ενεργών τελεστών της όπως η κινάση PI3K που συμβάλλει στον έλεγχο κυτταρικής κινητικότητας ή η μικρή GTPάση Rac1, υποδηλώνουν ότι η KDM2B εμπλέκεται στην παρατηρούμενη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης στους όγκους μέσω της κινάσης FAK. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται περαιτέρω και από τα ευρήματά μας που δείχνουν τον έλεγχο των παρατηρούμενων επιδράσεων της μετανάστευσης που προκαλούνται από την KDM2B από τον LY-294002, έναν κλασικό αναστολέα της κινάσης PI3K που εμποδίζει τη δραστηριότητά της. Επιπρόσθετα, ένας καίριος ρόλος που έχει προταθεί για την κινάση FAK στη ρύθμιση της καθοδηγούμενης μετανάστευσης, είναι ότι αφενός φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την p190RhoGAP στις αναπτυσσόμενες εστιακές προσκολλήσεις των κυττάρων στο οδηγό άκρο με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας της RhoA, και αφετέρου προάγει την ωρίμανση και τελικά την ανακύκλωση των εστιακών προσκολλήσεων στο πίσω μέρος, στρατολογώντας την p190RhoGEF, εξασφαλίζοντας έτσι την ενεργοποίηση της RhoA στο πίσω μέρος του κυττάρου [77]. Η RhoA δρα στο πίσω μέρος του μεταναστεύοντος κυττάρου προκαλώντας συσταλτικότητα (contractile force) μέσω φωσφορυλίωσης της MLC που μεσολαβείται από την κινάση ROCK. Επιπλέον, η κινάση ROCK αναστέλλει τις πλευρικές αναδιπλώσεις της μεμβράνης, πιθανώς μέσω περιορισμού της δημιουργίας νέων συμπλόκων προσκόλλησης από ιντεγκρίνες [78-80]. Παράλληλα, η λιγάση Smufl που ουβικουτυλιώνει την RhoA, εντοπίζεται μόνο στο μπροστινό μέρος των μεταναστευόντων κυττάρων, εξασφαλίζοντας έτσι χαμηλά επίπεδα για τη RhoA στις περιοχές που δημιουργούνται νέες προεκβολές [81]. Η παρατήρηση ότι η KDM2B ρυθμίζει τις κινάσες FAK/PI3K μέσω φωσφορυλίωσης, χωρίς όμως να επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση ή τη μεταγραφή των αντίστοιχων αυτών γονιδίων, αποτελεί ένα ενδιαφέρον εύρημα που υποδηλώνει ότι αυτή η απομεθυλάση των ιστονών μπορεί να προκαλέσει μεταγραφική ενεργοποίηση παραγόντων που προάγουν τη δραστηριότητα σηματοδοτικών τελεστών, όπως έχει ήδη αναφερθεί για σύμπλοκα SWI/SNF αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [82] ή φυσικούς αναστολείς ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν προηγούμενες αναφορές που υποδηλώνουν ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν τις κυτταρικές οδούς σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα που μπορεί να περιλαμβάνουν γονίδια αναδιάρθρωσης του κυτταροσκελετού ή γονίδια που εμπλέκονται με την EMT [82] και ως εκ τούτου είναι κρίσιμοι μεσολαβητές που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα μεταναστευτικά και επιθετικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες κατέδειξαν ότι πρόσθετες οδοί σηματοδότησης, όπως η σηματοδότηση μέσω των Rho/ROCK και η ανακατανομή της ακτίνης που είναι γνωστό ότι ελέγχουν την κυτταρική κίνηση [59, 83-85] είναι κρίσιμες για την επαγόμενη από την KDM2B ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η KDM2B μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορες οδούς σηματοδότησης ρυθμίζοντας και ως εκ τούτου χρησιμοποιώντας παράλληλα παράγοντες από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια προκειμένου να ελέγξει την κυτταρική μετανάστευση στους όγκους. Απαιτούνται επιπρόσθετες μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί ο συντονισμός αυτών των παράλληλων μηχανισμών.

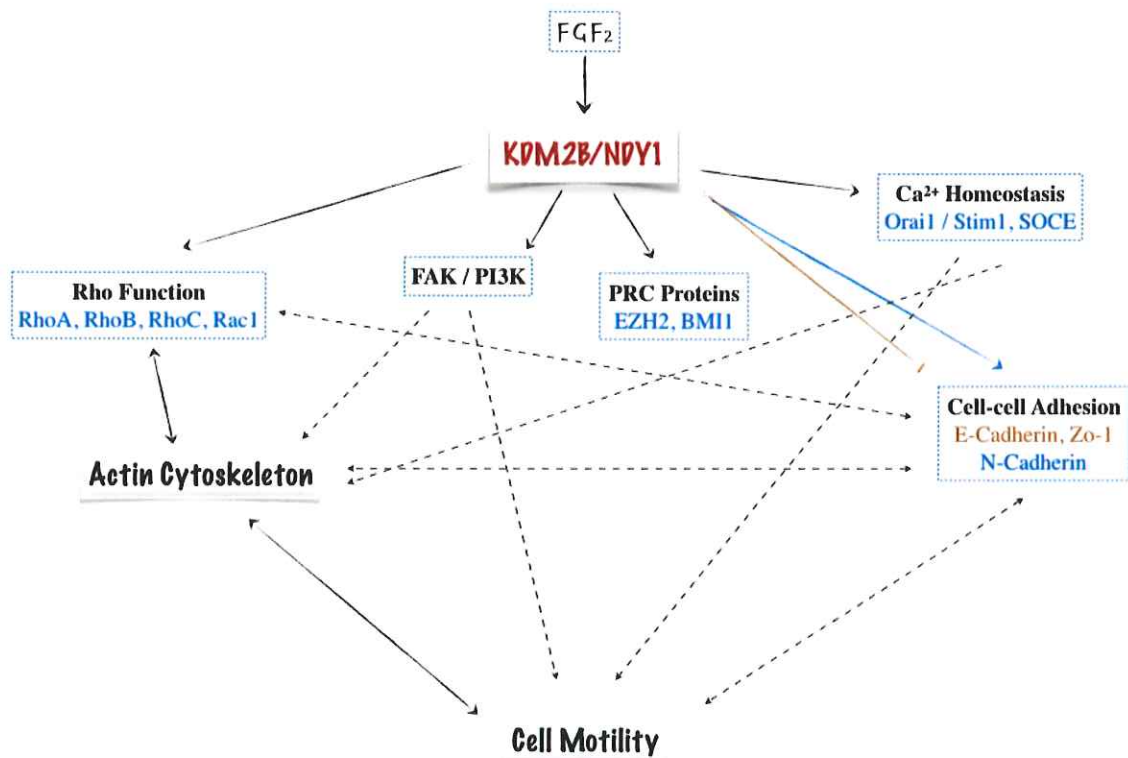
Παρόλο που η KDM2B ενεργοποιεί τις κινάσες FAK/PI3K μέσω φωσφορυλίωσης, τα πειράματά μας έδειξαν ότι δεν αλλοιώνει τα προφίλ φωσφορυλίωσης των μορίων που ενεργοποιούνται καθοδικά, όπως των κινασών προ-επιβίωσης και πολλαπλασιασμού AKT και SGK1 στα κύτταρα. Επιπλέον, ενώ υπάρχει μία τάση ελαφριάς αύξησης της πολλαπλασιαστικής ικανότητας στα κύτταρα που υπερεκφράζουν την KDM2B και αντίστοιχα μία τάση μείωσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στους κλώνους με αποσιωπημένο το γονίδιο της KDM2B, η δράση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική τις πρώτες 72 ώρες της μέτρησης. Η παρατήρηση

αυτή, αν και έρχεται σε συμφωνία με την μη ενεργοποίηση των κινασών AKT και SGK1, είναι ένα μάλλον απροσδόκητο εύρημα. Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει σημαντική αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την απομεθυλάση KDM2B και το αντίθετο φαινόμενο ήταν εμφανές σε κύτταρα με αποσιωπημένο το γονίδιο αυτό [9, 76, 86]. Αντίθετα, το εύρημα της παρούσας μελέτης πιθανόν υποδηλώνει ότι η KDM2B δρα με διαφορετικό τρόπο στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU-145, ρυθμίζοντας τη μετανάστευση και όχι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών. Εναλλακτικά, μπορεί να υποδηλώνει ότι η απομεθυλάση αυτή επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων αλλά μόνο μακροπρόθεσμα και σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και όχι μέσα σε 72 ώρες που κράτησε το πείραμα για τη μέτρηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των κυττάρων. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοκορτικοειδής κινάση του ορού 1 (Serum glucocorticoid kinase 1, SGK1) έχει βασικό ρόλο στην EMT στον καρκίνο του παχέος εντέρου [36]. Επιπρόσθετα, η SGK1 ρυθμίζει την επιγονιδιωματική ανακατάταξη (epigenomic re-alignment) και την ανοχή σε φάρμακα μέσω του ελέγχου των GTP-πρωτεϊνών RANBP1 και RAN [87]. Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό η KDM2B και η SGK1 να ρυθμίζονται από κοινού (co-regulation), υπόθεση που ωστόσο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Η ρύθμιση της λειτουργίας των μικρών Rho GTPασών είναι ένα κρίσιμο βήμα στην ογκογονική συμπεριφορά διαφόρων καρκινικών κυττάρων, καθώς ελέγχει μία ευρεία ποικιλία κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της απόπτωσης, της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της ανάπτυξης και της μετανάστευσης [44, 47, 88-91]. Οι Rho GTPases έχουν κεντρικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, μέσω αλληλο-επιδράσεων στη δυναμική ισορροπία του πλέγματος της ακτίνης [58, 63, 83, 92-98] και των μικροσωληνίσκων, της δραστηριότητας της μυοσίνης και των συμφύσεων μεταξύ κυττάρων ή κυττάρου-ECM [99]. Επίσης, εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις που περιλαμβάνουν την προσκόλληση μεταξύ των κυττάρων και την EMT [36, 38, 52, 75, 100-102]. Δεδομένου ότι οι Rho GTPases ρυθμίζουν ένα τόσο ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η ενεργότητά τους υπόκεινται σε συντονισμένη ρύθμιση. Ωστόσο, η σηματοδότηση μέσω των Rho GTPασών μπορεί να απορρυθμιστεί στον καρκίνο [103]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι στην παρούσα εργασία, αναφέρθηκαν αντίθετα αποτελέσματα έκφρασης των RhoA / RhoB / RhoC και της Rac1 GTPάσης, έπειτα από την υπερέκφραση ή την αποσιώπηση του γονιδίου της απομεθυλάσης KDM2B. Εντούτοις, δεδομένου ότι οι Rho GTPάσες εμπλέκονται στο σχηματισμό των ινιδίων του στρες της ακτίνης [104, 105], ενώ η Rac1 προωθεί την αναδιάρθρωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης προς δημιουργία συγκεκριμένων μεμβρανικών προεξοχών που καλούνται λαμελλιπόδια [104, 106-108], τα ευρήματά μας μπορεί να υποδηλώνουν ότι ο επιγενετικός παράγοντας KDM2B διαδραματίζει διαφορετικό ρόλο στην αναδιοργάνωση της ακτίνης. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει την προώθηση του σχηματισμού των λαμελλιποδίων με ταυτόχρονη αναστολή των ινιδίων του στρες και αντίστροφα. Ένας τέτοιος μηχανισμός μπορεί να είναι κρίσιμος για τον ταυτόχρονο έλεγχο τόσο της ανάπτυξης όσο και της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων [74, 107, 109, 110]. Η ρύθμιση της έκφρασης της Rac1 από την KDM2B ήταν εμφανής και στις δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές που μελετήσαμε. Επομένως, πέρα από το ρόλο στην αναδιοργάνωση της ακτίνης, υποθέτουμε ότι ο παράγοντας αυτός μπορεί επίσης να συμβάλλει στον αναφερόμενο έλεγχο της κυτταρικής μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων του προστάτη, όπως άλλωστε έχει ήδη περιγραφεί προηγουμένως και σε καρκινικά κύτταρα του μαστού [67]. Από την άλλη πλευρά, η ρύθμιση της έκφρασης της Rac1 GTPάσης στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου HCT-116, μπορεί να

συσχετιστεί με τον έλεγχο της μετάβασης των καρκινικών αυτών κυττάρων από το επιθήλιο του εντέρου στο ενδοθήλιο των αιμοφόρων αγγείων μέσω του σχηματισμού των λαμελλιποδίων, παρά με τον έλεγχο της μετανάστευσης, όπως αυτός αξιολογείται από πειράματα επούλωσης πληγής σε επίπεδο υπόστρωμα. Δεδομένου ότι τα πειράματα επούλωσης πληγής με το συγκεκριμένο καρκινικό κυτταρικό τύπο (παχέος εντέρου HCT-116) απέτυχαν να δώσουν σαφή αποτελέσματα, η ρύθμιση της μικρής αυτής GTPάσης ίσως συσχετίζεται καλύτερα με το τρισδιάστατο περιβάλλον ενός όγκου. Αξίζει να σημειώσουμε πως πρόσφατες μελέτες μετανάστευσης κυττάρων σε τρισδιάστατη καλλιέργεια έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν με μηχανισμούς που εξαρτώνται ή είναι ανεξάρτητοι από τη δραστηριότητα των Rho και ROCK πρωτεϊνών. Οι ROCK-I/II (Rho Associated Coiled-Coil-Containing Protein Kinases) είναι κινάσες σερίνης/θρεονίνης και αντιπροσωπεύουν τις καλύτερα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες-τελεστές που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη RhoA. Η ενεργοποίησή τους μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικά κυτταρικά γεγονότα που ρυθμίζουν αλλαγές στον κυτταροσκελετό, οι οποίες με τη σειρά τους επηρεάζουν τις διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμά τους και τη μετανάστευση των κυττάρων. Αυτά τα γεγονότα θεωρούνται αποτέλεσμα της κυτταρικής σύσπασης εξαιτίας των μορίων ακτινομοσίνης. Αντιθέτως, η Rac1 χρειάζεται και στους δύο τύπους μετανάστευσης [77]. Η ισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας των GTPασών Rac1 και RhoA καθορίζει τον κυτταρικό φαινότυπο και τη βιολογική συμπεριφορά διαφόρων κυτταρικών συστημάτων, όπως της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, του σχηματισμού των εστιακών συμφύσεων, την επέκταση των νευρώνων και τη μυογένεση [111-114]. Στους ινοβλάστες για παράδειγμα, η ενεργοποίηση της RhoA οδηγεί στη δημιουργία ινιδίων του στρες και εστιακών επαφών (focal contacts), οι οποίες προκαλούν αυξημένη πρόσφυση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία. Εντούτοις, η ενεργοποίηση των Rac1 και Cdc42 έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λαμελλιποδίων και φιλοποδίων, αντίστοιχα. Σε ινοβλάστες ποντικού, η σηματοδότηση μέσω της Rac1 είναι ικανή να ανταγωνιστεί τη δραστηριότητα των Rho GTPασών. Η ενεργοποίηση της Rac1 από τη GEF Tiam1 σε αυτά τα κύτταρα επάγει την υιοθέτηση επιθηλιακής μορφολογίας από τα κύτταρα, τη δημιουργία αυξημένου αριθμού προσφύσεων από καδερΐνη και την αναστολή της μετανάστευσης [112, 115, 116]. Η ισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας των Rac1 και RhoA, δηλαδή μεταξύ δύο κινασών της ίδιας οικογένειας είναι κρίσιμη όπως είπαμε για πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως οι διακυτταρικές συνδέσεις, η προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμά τους, η μετανάστευση και η EMT [117]. Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου η κινάση Rac1 μπορεί να ρυθμίσει τη δραστηριότητα της RhoA, είναι μέσω της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS). Αυξημένα επίπεδα ROS αναστέλλουν την πρωτεΐνη χαμηλού μοριακού βάρους φωσφατάση τυροσίνης (Low-Molecular-Weight Protein Tyrosine Phosphatase, LMW-PTP), η οποία οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης και ενεργοποίηση του στόχου της p190RhoGAP. Η εξαρτώμενη από τη Rac1 ενεργοποίηση της p190RhoGAP μπορεί τελικά να οδηγήσει σε μειωμένη δραστηριότητα της RhoA σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα [118]. Επιπλέον, ένας ακόμη τρόπος ρύθμισης της ισορροπίας μεταξύ της δραστηριότητας των Rac1 και RhoA σχετίζεται με τη χωροχρονική ενεργοποίηση των GTPασών αυτών. Η χωροχρονική ενεργοποίηση των Rho GTPασών καθορίζεται από ποιες GEFs και GAPs κάθε φορά εμπλέκονται για την ενεργοποίηση αυτή. Με τη σειρά τους, τα μόρια αυτά (GEFs και GAPs), μπορούν συχνά να δράσουν ως ικριώματα προκειμένου να φέρουν τις Rho GTPάσες και άλλες πρωτεΐνες σηματοδότησης μαζί και κοντά με τους καθοδικούς τους στόχους. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορετικές ή ακόμη

και αντίθετες σε αρκετές περιπτώσεις λειτουργίες στενά σχετιζόμενων Rho GTPασών σε διάφορες πτυχές της προόδου του καρκίνου, για παράδειγμα RhoA/B/C έναντι της Rac1 [119, 120].



Σε αυτή τη μελέτη εξετάσαμε το ρυθμιστικό ρόλο του επιγενετικού παράγοντα KDM2B σε δύο καρκινικές κυτταρικές σειρές, τα κύτταρα του προστάτη DU-145 και τα κύτταρα του παχέος εντέρου HCT-116. Και στις δύο κυτταρικές σειρές παρατηρήσαμε παρόμοιες αλλαγές, κάτι που μας έκανε να υποθέσουμε πως η KDM2B διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των καρκινικών κυττάρων και πως η δράση της είναι καθολική και δεν περιορίζεται μόνο σε μία κυτταρική σειρά. Τα αποτελέσματά μας επιβεβαίωσαν ότι η υπερέκφραση ή η αποσιώπηση της συγκεκριμένης απομεθυλάσης των ιστονών επιδρά με σημαντικό τρόπο στη ρύθμιση σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζουν τη φυσιολογία και τη λειτουργία των κυττάρων.

Η παρούσα μελέτη καθιερώνει για πρώτη φορά έναν λειτουργικό σύνδεσμο μεταξύ του επιγενετικού παράγοντα KDM2B και της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, της σηματοδότησης μέσω των Rho GTPασών πρωτεϊνών, της σηματοδότησης μέσω των κινασών FAK/PI3K που με τη σειρά τους ελέγχουν την κυτταρική προσκόλληση και το δυναμικό μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων, και την ομοιόσταση του ασβεστίου η οποία συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων. Περιληπτικά, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η υπερέκφραση ή η σίγηση της απομεθυλάσης των ιστονών KDM2B ρυθμίζει τη μεταγραφή των γονιδίων και την πρωτεϊνική έκφραση των πρωτεϊνών των PRC συμπλόκων EZH2 και BMI1, των επιθηλιακών δεικτών E-καδερίνη και ZO-1 και του μεσεγγυματικού δείκτη N-καδερίνη, την έκφραση και τη δραστηριότητα των μικρών Rho GTPασών RHOA, RHOB και RHOC, την έκφραση της μικρής GTPάσης Rac1, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, το δυναμικό μετανάστευσης των κυττάρων του προστάτη DU-145 και των κυττάρων του παχέος εντέρου HCT-116, τη ρύθμιση της ενεργότητας του σηματοδοτικού μονοπατιού FAK/PI3K, τη ρύθμιση των γονιδίων Orai1 και Stim1,

και τέλος την ομοιόσταση του ασβεστίου. Τα παρόντα ευρήματά μας που συνοψίζονται στο σχέδιο του παραπάνω διαγράμματος, παρέχουν τώρα νέες μηχανιστικές γνώσεις για την επαγόμενη από την KDM2B ρύθμιση της κινητικότητας των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με τις ήδη δημοσιευμένες παρατηρήσεις. Τα ευρήματά μας υποδηλώνουν ότι σε καρκινικά κύτταρα όγκου, οι ρυθμιστές της χρωματίνης μπορούν να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του όγκου με τον έλεγχο της έκφρασης και της λειτουργίας των γονιδίων του κυτταροσκελετού και της προσκόλλησης των κυττάρων μεταξύ τους, της διεισδυτικότητας και της μετανάστευσης και την καθιέρωση μιας σαφούς μηχανιστικής σχέσης, του πώς οι μεταβολές των επιγενετικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσουν σε απορρυθμισμένες κυτταροσκελετικές λειτουργίες. Συγκεντρωτικά, όλα αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο αυτού του επιγενετικού παράγοντα στο μεταστατικό δυναμικό των καρκινικών κυττάρων μέσω της απορρύθμισης της φυσιολογικής οργάνωσης και λειτουργίας του κυτταροσκελετού, αποδεικνύοντας ότι η KDM2B έχει σημαντικό ογκογόνο ρόλο στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών σε διάφορους όγκους.

Καθώς ο ρόλος της επιγενετικής στον καρκίνο γίνεται σαφέστερος και οι αλληλεξαρτήσεις και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων της χρωματίνης γίνονται ολοένα και πιο κατανοητοί, οι ερευνητές βρίσκονται πλέον σε καλό σημείο για να επαναξιολογήσουν τις προσεγγίσεις στην πρόληψη, ανίχνευση και θεραπεία του καρκίνου. Είναι σαφές ότι τα καρκινικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από μεταβολές στη σύνθεση της χρωματίνης κατά μήκος όλου του γονιδιώματος που εμπλέκουν ολόκληρο το επι-γονιδίωμα και ότι ολόκληρες σηματοδοτικές οδοί σχετικές με την ανανέωση των κυττάρων υποβάλλονται σε επιγενετική δυσλειτουργία. Το πώς συνδέεται η επιγενετική με τη συμπεριφορά των βλαστικών κυττάρων αρχίζει τα τελευταία μόλις χρόνια να μελετάται, οι δεσμοί μεταξύ τους ωστόσο είναι ήδη εμφανείς και εμπλέκονται στα πολύ πρώιμα στάδια της εξέλιξης της ογκογένεσης. Αυτό δίνει ένα σημαντικό πλεονέκτημα για τη θεραπευτική παρέμβαση μέσω στρατηγικών πρόληψης. Ίσως, καθώς συνεχίζεται να διερευνάται η μοριακή ρύθμιση της χρωματίνης, τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε νεοπλασματικά περιβάλλοντα, θα αποκαλύπτονται όλο και περισσότεροι νέοι παράγοντες προς στόχευση στα καρκινικά βλαστοκύτταρα ή ακόμα και διάφορα microRNAs, για παράδειγμα, τα οποία θα βοηθήσουν να ανοιχθούν περαιτέρω δρόμοι για την επαναρρύθμιση των επιγενετικών ανωμαλιών και την επίτευξη του ελέγχου του καρκίνου [121].

Εμείς, εστιαζόμενοι στον ρόλο της KDM2B και βασιζόμενοι στην αρχική μας υπόθεση, αναγνωρίσαμε τα βασικά γονίδια που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό και ρυθμίζονται από την KDM2B, διασαφήνισαμε το μηχανισμό με τον οποίο η συγκεκριμένη ρύθμιση λαμβάνει χώρα και εξακριβώσαμε πώς αυτοί οι μηχανισμοί συμμετέχουν στη λειτουργία και την πορεία εξέλιξης του καρκίνου. Από όλα τα παραπάνω καταλήγουμε στο ότι η συγκεκριμένη μελέτη είναι ιδιαίτερα καινοτόμος, καθώς αποτελεί την πρώτη εστιασμένη προσπάθεια για την αποσαφήνιση της διασταυρούμενης ρύθμισης μεταξύ της χρωματίνης και του κυτταροσκελετού. Χρησιμοποιώντας ως παράδειγμα το μηχανισμό ρύθμισης του κυτταροσκελετού από την KDM2B, η μελέτη αυτή αντιμετωπίζει θεμελιώδη ερωτήματα προστίθοντας έτσι σημαντικά εργαλεία και τεχνογνωσία στον τομέα αυτό.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - HIGHLIGHTS

1. Το γονίδιο KDM2B είναι λειτουργικά ενεργό στις ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη DU-145 και παχέος εντέρου HCT-116.
2. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των Polycomb πρωτεϊνών EZH2 και BMI1 στις ανθρώπινες καρκινικές σειρές προστάτη DU-145 και παχέος εντέρου HCT-116.
3. Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των δεικτών της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης (EMT markers), πρωτεϊνών κυτταρικής προσκόλλησης, E-καδερίνης, ZO-1 και N-Καδερίνης στις παραπάνω κυτταρικές σειρές.
4. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.
5. Η KDM2B ρυθμίζει την έκφραση των μικρών Rho GTPασών, RhoA, RhoB, RhoC και Rac1 και ελέγχει την ενεργότητα των μικρών Rho GTPασών, RhoA και RhoB.
6. Η KDM2B ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες FAK και PI3K.
7. Η KDM2B ρυθμίζει την κινητικότητα των καρκινικών κυττάρων του προστάτη DU-145.
8. Η KDM2B δεν διαφοροποιεί τα επίπεδα έκφρασης των κινασών προ-επιβίωσης και πολλαπλασιασμού AKT και SGK1.
9. Η KDM2B επιδρά στην ομοιόσταση του κυτοσολικού ασβεστίου.
10. Το γονίδιο KDM2B ρυθμίζει τουλάχιστον 4 κείρια σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και της EMT.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΙΔΕΕΣ - ΥΠΟΘΕΣΕΙΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στις μέρες μας, παρά τη μεγάλη πρόοδο που έχει παρατηρηθεί σχετικά με τις βιολογικές λειτουργίες της απομεθυλάσης KDM2B, πολλά ερωτήματα παραμένουν ακόμα αναπάντητα. Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον αν οι μελλοντικές μελέτες διευκρινήσουν τη μακροπρόθεσμη επίδραση των διαφοροποιημένων επιπέδων της KDM2B *in vivo*. Θα ήταν πρόκληση να εντοπιστούν δυνητικοί εξειδικευμένοι αναστολείς έναντι της KDM2B και να ελεγχθεί η *in vitro* και *in vivo* δράση τους στην πορεία εξέλιξης του καρκίνου έπειτα από τη χρήση τους. Επιπλέον, το γεγονός ότι η KDM2B εμφανίζει πολύπλευρους ρόλους στον καρκίνο και έχει διαφορετική λειτουργία σε διάφορους τύπους και στάδια ανάπτυξης του καρκίνου, υποδηλώνει την πιθανότητα ότι η ρύθμιση της μπορεί να αλλάζει κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης ενός όγκου ή ανάλογα με την κυτταρική εντόπιση μέσα στον όγκο. Για να διασαφηνιστεί αυτό, πρέπει να επιβεβαιωθούν ποια είναι τα ανοδικά σήματα που ενεργοποιούν την έκφραση της. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον επίσης παρουσιάζει η διασαφήνιση των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων της ίδιας της απομεθυλάσης. Η ανακάλυψη των κινασών και των φωσφατασών που δρουν ανοδικά θα βοηθήσει στην ενσωμάτωση των επιγενετικών μηχανισμών στα σηματοδοτικά δίκτυα που ενώνουν τις διάφορες κυτταρικές δραστηριότητες. Οι τροποποιήσεις αυτές πιθανά να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο και στη διαμόρφωση της λειτουργίας της απομεθυλάσης. Θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον επίσης να μελετηθεί πώς το διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης, ακετυλίωσης, ουβικουτινύλωσης καθώς και άλλων τροποποιήσεων της KDM2B, οδηγεί στην καρκινογένεση. Πέρα των παραπάνω, θα ήταν ενδιαφέρον να δειχθεί αν η KDM2B προσδένεται άμεσα στους υποκινητές γονιδίων, όπως γονίδια που εμπλέκονται στην ομοίωση του ασβεστίου ή γονίδια που κωδικοποιούν για διάφορους παράγοντες ενεργοποίησης των RhoGTPασών, τα λεγόμενα GEFs και GAPs. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορετικές ή ακόμη και αντίθετες σε αρκετές περιπτώσεις λειτουργίες στενά σχετιζόμενων RhoGTPασών σε διάφορες πτυχές της προόδου του καρκίνου. Επιπλέον, το κομμάτι των microRNAs δεν έχει ακόμα εκτενώς μελετηθεί. Όχι μόνο τα microRNAs διαμορφώνονται και ρυθμίζονται με επιγενετικούς μηχανισμούς, αλλά και αρκετά epi-microRNAs αυτά καθ' αυτά, μπορούν να στοχεύσουν άμεσα και να ρυθμίσουν την έκφραση συστατικών του επιγενετικού μηχανισμού δημιουργώντας έτσι ένα μηχανισμό υψηλής ελεγχόμενης ανάδρασης. Ο καθορισμός επομένως, ποια microRNAs ρυθμίζουν την έκφραση ή αντίστοιχα ρυθμίζονται από την KDM2B θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι η KDM2B μπορεί να ενεργοποιήσει διάφορες οδούς σηματοδότησης, ρυθμίζοντας και ως εκ τούτου χρησιμοποιώντας παράλληλα παράγοντες από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια προκειμένου να ελέγξει την κυτταρική μετανάστευση στους όγκους. Απαιτούνται επιπρόσθετες επομένως, μελέτες προκειμένου να διερευνηθεί ο συντονισμός όλων αυτών των παράλληλων μηχανισμών. Η παρατήρηση επίσης, ότι η KDM2B ρυθμίζει τις κινάσες FAK/PI3K μέσω φωσφορυλίωσης, χωρίς όμως να επηρεάζει την πρωτεϊνική έκφραση ή τη μεταγραφή των αντίστοιχων αυτών γονιδίων, αποτελεί ένα ενδιαφέρον εύρημα που υποδηλώνει ότι αυτή η απομεθυλάση των ιστονών μπορεί να προκαλέσει μεταγραφική ενεργοποίηση παραγόντων που προάγουν τη δραστικότητα σηματοδοτικών τελεστών, όπως για σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης ή φυσικούς αναστολείς ακετυλοτρανσφεράσης των ιστονών. Πέρα από τη χρωματίνη ως στόχο, η KDM2B μπορεί να στοχεύει πιθανά και κυτταροσκελετικά στοιχεία απομεθυλιώνοντάς τα, όπως για παράδειγμα τη μιτωτική τουμπουλίνη οδηγώντας σε μιτωτικά και κινητικά προβλήματα και γονιδιωματική αστάθεια. Αφαίρεση της KDM2B για παράδειγμα μπορεί να επηρεάζει το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων μέσω

επιδράσεων που ασκούνται στις ετεροχρωματικές περιοχές του γονιδιώματος. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η γλυκοκορτικοειδής κινάση του ορού 1 (Serum glucocorticoid kinase 1, SGK1) έχει βασικό ρόλο στην EMT στον καρκίνο του παχέος εντέρου. Επιπρόσθετα, η SGK1 ρυθμίζει την επι-γονιδιωματική ανακατάταξη (epigenomic re-alignment) και την ανοχή σε φάρμακα μέσω του ελέγχου των GTP-πρωτεϊνών RANBP1 και RAN. Συνεπώς, είναι πολύ πιθανό η KDM2B και η SGK1 να ρυθμίζονται από κοινού (co-regulation), υπόθεση που ωστόσο απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν προηγούμενες αναφορές που υποδηλώνουν ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί ρυθμίζουν τις κυτταρικές οδούς σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα που μπορεί να περιλαμβάνουν γονίδια αναδιάρθρωσης του κυτταροσκελετού ή γονίδια που εμπλέκονται με την EMT και ως εκ τούτου είναι κρίσιμοι μεσολαβητές που προσδίδουν στα καρκινικά κύτταρα μεταναστευτικά και επιθετικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, προηγούμενες μελέτες κατέδειξαν ότι πρόσθετες οδοί σηματοδότησης, όπως η σηματοδότηση μέσω των Rho/ROCK και η ανακατανομή της ακτίνης που είναι γνωστό ότι ελέγχουν την κυτταρική κίνηση είναι κρίσιμες για την επαγόμενη από την KDM2B ρύθμιση της κυτταρικής κινητικότητας. Τέλος, έχουν αναφερθεί διάφορες ισομορφές της απομεθυλάσης αυτής στον άνθρωπο και η ισομορφή με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον ονομάζεται “βραχεία”. Από την ισομορφή αυτή απουσιάζει η καταλυτική περιοχή απομεθυλάσης Jum3c ή αλλιώς Jum3oj1 περιοχή από την αλληλουχία της. Πιθανά, η ισορροπία μεταξύ της “βραχείας” ισομορφής και της ισομορφής πλήρους μήκους και λειτουργίας να προσδίδει ένα εξελικτικά λειτουργικό πλεονέκτημα στον οργανισμό: όταν προσδένεται η πλήρης μορφή της πρωτεΐνης στα γονίδια στόχους να καταστέλλεται η έκφρασή τους, ενώ στην αντίθετη περίπτωση, αν είναι προσδεσμένη η “βραχεία” ισομορφή, η μεταγραφή των γονιδίων αυτών να συνεχίζεται κανονικά, ρύθμιση που πιθανά να είναι ιδιαίτερα σημαντική κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και της ανάπτυξης.

Προφανώς, υπάρχουν πάρα πολλά ανοιχτά ερωτήματα και απαιτείται περισσότερη έρευνα και χρόνος για την αποσαφήνιση αυτών των ερωτημάτων. Μελλοντικές μελέτες σχετικά με την επιγενετική του καρκίνου και τη ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών στη νόσο αυτή θα επαναπροσδιορίσουν την κατανόησή μας για το καρκινικό κύτταρο και θα αποκαλύψουν νέους στόχους για θεραπευτική παρέμβαση.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου 1: Χρωματίνη- Ιστόνες- Επιγενετική

1. Surani, M.A., K. Hayashi, and P. Hajkova, Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 747-62.
2. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. *Cell*, 2007. **130**(2): p. 223-33.
3. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 683-92.
4. Foster, S.L. and R. Medzhitov, Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol*, 2009. **130**(1): p. 7-15.
5. Wang, S.C., B. Oelze, and A. Schumacher, Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2698.
6. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 669-81.
7. Tremethick, D.J., Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 651-4.
8. Kornberg, R.D. and J.O. Thomas, Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science*, 1974. **184**(4139): p. 865-8.
9. Luger, K., et al., Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
10. Hansen, J.C., Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002. **31**: p. 361-92.
11. Strahl, B.D. and C.D. Allis, The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
12. Berger, S.L., The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 2007. **447**(7143): p. 407-12.
13. Taverna, S.D., et al., How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(11): p. 1025-1040.
14. Klose, R.J., E.M. Kallin, and Y. Zhang, JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(9): p. 715-27.
15. Shi, Y. and J.R. Whetstone, Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Mol Cell*, 2007. **25**(1): p. 1-14.
16. Kirmizis, A., et al., Arginine methylation at histone H3R2 controls deposition of H3K4 trimethylation. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 928-32.
17. Lee, J.S., et al., Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*, 2007. **131**(6): p. 1084-96.
18. Vermeulen, M., et al., Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 2007. **131**(1): p. 58-69.
19. Sims, R.J., 3rd, et al., Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Mol Cell*, 2007. **28**(4): p. 665-76.
20. Kim, D.H., et al., Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 2006. **13**(9): p. 793-7.
21. Bres, V., S.M. Yoh, and K.A. Jones, *The multi-tasking P-TEFb complex*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(3): p. 334-40.
22. D'Alessio, A.C. and M. Szyf, Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(4): p. 463-76.
23. Carrozza, M.J., et al., Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell*, 2005. **123**(4): p. 581-92.
24. Joshi, A.A. and K. Struhl, Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol Cell*, 2005. **20**(6): p. 971-8.
25. Keogh, M.C., et al., Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell*, 2005. **123**(4): p. 593-605.
26. Vakoc, C.R., et al., Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol Cell*, 2005. **19**(3): p. 381-91.
27. Zilberman, D., et al., Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, 2007. **39**(1): p. 61-9.
28. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(11): p. 846-56.
29. Schwartz, Y.B. and V. Pirrotta, Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(1): p. 9-22.
30. Spivakov, M. and A.G. Fisher, Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(4): p. 263-71.

31. Pietersen, A.M. and M. van Lohuizen, Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 201-7.
32. Mohd-Sarip, A., et al., Pleiohomeotic can link polycomb to DNA and mediate transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(21): p. 7473-83.
33. Mohd-Sarip, A., et al., Synergistic recognition of an epigenetic DNA element by Pleiohomeotic and a Polycomb core complex. *Genes Dev*, 2005. **19**(15): p. 1755-60.
34. Mohd-Sarip, A., et al., Architecture of a polycomb nucleoprotein complex. *Mol Cell*, 2006. **24**(1): p. 91-100.
35. Mikkelsen, T.S., et al., Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 2007. **448**(7153): p. 553-60.
36. Pan, G., et al., Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(3): p. 299-312.
37. Zhao, X.D., et al., Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(3): p. 286-98.
38. Bernstein, B.E., et al., A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006. **125**(2): p. 315-26.
39. Hashimoto, H., et al., The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature*, 2008. **455**(7214): p. 826-9.
40. Trojer, P. and D. Reinberg, Histone lysine demethylases and their impact on epigenetics. *Cell*, 2006. **125**(2): p. 213-7.
41. Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 693-705.
42. Bhaumik, S.R., E. Smith, and A. Shilatifard, Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(11): p. 1008-16.
43. Bedford, M.T. and S. Richard, Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell*, 2005. **18**(3): p. 263-72.
44. Lee, D.Y., et al., Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev*, 2005. **26**(2): p. 147-70.
45. Wysocka, J., C.D. Allis, and S. Coonrod, Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 344-55.
46. Guccione, E., et al., Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 933-7.
47. Fischle, W., et al., Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, 2005. **438**(7071): p. 1116-22.
48. Hirota, T., et al., Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, 2005. **438**(7071): p. 1176-80.
49. Nelson, C.J., H. Santos-Rosa, and T. Kouzarides, Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell*, 2006. **126**(5): p. 905-16.
50. Kampranis, S.C. and P.N. Tschlis, *Histone demethylases and cancer*. *Adv Cancer Res*, 2009. **102**: p. 103-69.
51. Pedersen, M.T. and K. Helin, Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(11): p. 662-71.
52. Borun, T.W., D. Pearson, and W.K. Paik, Studies of histone methylation during the HeLa S-3 cell cycle. *J Biol Chem*, 1972. **247**(13): p. 4288-98.
53. Byvoet, P., et al., The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 1972. **148**(2): p. 558-67.
54. Duerre, J.A. and C.T. Lee, In vivo methylation and turnover of rat brain histones. *J Neurochem*, 1974. **23**(3): p. 541-7.
55. Jenuwein, T. and C.D. Allis, *Translating the histone code*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1074-80.
56. Bannister, A.J., R. Schneider, and T. Kouzarides, *Histone methylation: dynamic or static?* *Cell*, 2002. **109**(7): p. 801-6.
57. Zhang, Y. and D. Reinberg, Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*, 2001. **15**(18): p. 2343-60.
58. Annunziato, A.T., M.B. Eason, and C.A. Perry, Relationship between methylation and acetylation of arginine-rich histones in cycling and arrested HeLa cells. *Biochemistry*, 1995. **34**(9): p. 2916-24.
59. Shi, Y., et al., Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 2004. **119**(7): p. 941-53.
60. Tsukada, Y., et al., Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
61. Cloos, P.A., et al., The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*, 2006. **442**(7100): p. 307-11.

62. Fodor, B.D., et al., Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin in mammalian cells. *Genes Dev*, 2006. **20**(12): p. 1557-62.
63. Klose, R.J., et al., The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*, 2006. **442**(7100): p. 312-6.
64. Whetstine, J.R., et al., Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 467-81.
65. Huang, J., et al., p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*, 2007. **449**(7158): p. 105-8.
66. Wang, J., et al., The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*, 2009. **41**(1): p. 125-9.
67. Lu, T., et al., Regulation of NF-kappaB by NSD1/FBXL11-dependent reversible lysine methylation of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 46-51.
68. Park, I.Y., et al., Dual Chromatin and Cytoskeletal Remodeling by SETD2. *Cell*, 2016. **166**(4): p. 950-962.
69. Lan, F., A.C. Nottke, and Y. Shi, Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(3): p. 316-25.
70. Su, A.I., et al., Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4465-70.
71. Di Stefano, L., et al., Mutation of Drosophila Lsd1 disrupts H3-K4 methylation, resulting in tissue-specific defects during development. *Curr Biol*, 2007. **17**(9): p. 808-12.
72. Godmann, M., et al., Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod*, 2007. **77**(5): p. 754-64.
73. Lan, F., et al., S. pombe LSD1 homologs regulate heterochromatin propagation and euchromatic gene transcription. *Mol Cell*, 2007. **26**(1): p. 89-101.
74. Loh, Y.H., et al., Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2007. **21**(20): p. 2545-57.
75. Okada, Y., et al., Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature*, 2007. **450**(7166): p. 119-23.
76. Rudolph, T., et al., Heterochromatin formation in Drosophila is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Mol Cell*, 2007. **26**(1): p. 103-15.
77. You, A., et al., CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(4): p. 1454-8.
78. Hakimi, M.A., et al., A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7420-5.
79. Lee, M.G., et al., An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature*, 2005. **437**(7057): p. 432-5.
80. Metzger, E., et al., LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 2005. **437**(7057): p. 436-9.
81. Shi, Y.J., et al., Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell*, 2005. **19**(6): p. 857-64.
82. Huang, Y., et al., Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*, 2006. **312**(5774): p. 748-51.
83. Yamane, K., et al., JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 483-95.
84. Christensen, J., et al., RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*, 2007. **128**(6): p. 1063-76.
85. Cowger, J.J., et al., Biochemical characterization of the zinc-finger protein 217 transcriptional repressor complex: identification of a ZNF217 consensus recognition sequence. *Oncogene*, 2007. **26**(23): p. 3378-86.
86. Garcia-Bassets, I., et al., Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. *Cell*, 2007. **128**(3): p. 505-518.
87. Iwase, S., et al., The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*, 2007. **128**(6): p. 1077-88.
88. Lan, F., et al., Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. *Nature*, 2007. **448**(7154): p. 718-22.
89. Ruthenburg, A.J., C.D. Allis, and J. Wysocka, Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell*, 2007. **25**(1): p. 15-30.
90. Secombe, J., et al., The Trithorax group protein Lid is a trimethyl histone H3K4 demethylase required for dMyc-induced cell growth. *Genes Dev*, 2007. **21**(5): p. 537-51.

91. Tahiliani, M., et al., The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature*, 2007. **447**(7144): p. 601-5.
92. Wang, J., et al., Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. *Nature*, 2007. **446**(7138): p. 882-7.
93. Wissmann, M., et al., Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(3): p. 347-53.
94. Xiang, Y., et al., JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(49): p. 19226-31.
95. Yamane, K., et al., PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell*, 2007. **25**(6): p. 801-12.
96. Plath, K., et al., Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, 2003. **300**(5616): p. 131-5.
97. Ballif, B.A., et al., Phosphoproteomic analysis of the developing mouse brain. *Mol Cell Proteomics*, 2004. **3**(11): p. 1093-101.
98. Beausoleil, S.A., et al., Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(33): p. 12130-5.
99. Wysocka, J., et al., WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell*, 2005. **121**(6): p. 859-72.
100. Olsen, J.V., et al., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 635-48.
101. Agger, K., et al., UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature*, 2007. **449**(7163): p. 731-4.
102. Frescas, D., et al., JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature*, 2007. **450**(7167): p. 309-13.
103. Lan, F., et al., A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature*, 2007. **449**(7163): p. 689-94.
104. Lee, M.G., et al., Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science*, 2007. **318**(5849): p. 447-50.
105. Rinn, J.L., et al., Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1311-23.
106. Kubicek, S. and T. Jenuwein, A crack in histone lysine methylation. *Cell*, 2004. **119**(7): p. 903-6.
107. Treweek, S.C., P.J. McLaughlin, and R.C. Allshire, *Methylation: lost in hydroxylation?* *EMBO Rep*, 2005. **6**(4): p. 315-20.
108. Yang, Z.Q., et al., Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines. *Cancer Res*, 2000. **60**(17): p. 4735-9.
109. Yang, Z.Q., et al., A novel amplicon at 9p23 - 24 in squamous cell carcinoma of the esophagus that lies proximal to GASC1 and harbors NFIB. *Jpn J Cancer Res*, 2001. **92**(4): p. 423-8.
110. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. *Nature*, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
111. Agger, K., et al., The emerging functions of histone demethylases. *Curr Opin Genet Dev*, 2008. **18**(2): p. 159-68.
112. Ozer, A. and R.K. Bruick, Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat Chem Biol*, 2007. **3**(3): p. 144-53.
113. Trojer, P., et al., Dynamic Histone H1 Isoform 4 Methylation and Demethylation by Histone Lysine Methyltransferase G9a/KMT1C and the Jumonji Domain-containing JMJD2/KDM4 Proteins. *J Biol Chem*, 2009. **284**(13): p. 8395-405.
114. Tzatsos, A., et al., Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(8): p. 2641-6.
115. Klose, R.J., et al., The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell*, 2007. **128**(5): p. 889-900.
116. Baxter, E., et al., Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell Biosci*, 2014. **4**: p. 45.
117. Bracken, A.P., et al., EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*, 2003. **22**(20): p. 5323-35.
118. Varambally, S., et al., Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science*, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
119. Varambally, S., et al., The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
120. Kleer, C.G., et al., EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11606-11.

121. Croonquist, P.A. and B. Van Ness, The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype. *Oncogene*, 2005. **24**(41): p. 6269-80.
122. Varier, R.A. and H.T. Timmers, Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1815**(1): p. 75-89.
123. Agger, K., et al., The H3K27me3 demethylase JMJD3 contributes to the activation of the INK4A-ARF locus in response to oncogene- and stress-induced senescence. *Genes Dev*, 2009. **23**(10): p. 1171-6.
124. Chen, M.W., et al., H3K9 histone methyltransferase G9a promotes lung cancer invasion and metastasis by silencing the cell adhesion molecule Ep-CAM. *Cancer Res*, 2010. **70**(20): p. 7830-40.
125. Dong, C., et al., G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. *J Clin Invest*, 2012. **122**(4): p. 1469-86.
126. Rowley, J.D., Rearrangements involving chromosome band 11Q23 in acute leukaemia. *Semin Cancer Biol*, 1993. **4**(6): p. 377-85.
127. Borges, M., et al., An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature*, 1997. **386**(6627): p. 852-5.
128. Huntsman, D.G., et al., MLL2, the second human homolog of the Drosophila trithorax gene, maps to 19q13.1 and is amplified in solid tumor cell lines. *Oncogene*, 1999. **18**(56): p. 7975-84.
129. Linnoila, R.I., et al., Constitutive achaete-scute homologue-1 promotes airway dysplasia and lung neuroendocrine tumors in transgenic mice. *Cancer Res*, 2000. **60**(15): p. 4005-9.
130. Steele-Perkins, G., et al., Tumor formation and inactivation of RIZ1, an Rb-binding member of a nuclear protein-methyltransferase superfamily. *Genes Dev*, 2001. **15**(17): p. 2250-62.
131. Rosati, R., et al., NUP98 is fused to the NSD3 gene in acute myeloid leukemia associated with t(8;11)(p11.2;p15). *Blood*, 2002. **99**(10): p. 3857-60.
132. Sellers, W.R. and M. Loda, The EZH2 polycomb transcriptional repressor--a marker or mover of metastatic prostate cancer? *Cancer Cell*, 2002. **2**(5): p. 349-50.
133. Kim, K.C., L. Geng, and S. Huang, Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. *Cancer Res*, 2003. **63**(22): p. 7619-23.
134. Carling, T., et al., A histone methyltransferase is required for maximal response to female sex hormones. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(16): p. 7032-42.
135. Daser, A. and T.H. Rabbits, Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev*, 2004. **18**(9): p. 965-74.
136. La Starza, R., et al., Cryptic insertion producing two NUP98/NSD1 chimeric transcripts in adult refractory anemia with an excess of blasts. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004. **41**(4): p. 395-9.
137. Bachmann, N., et al., Mutation screen and association study of EZH2 as a susceptibility gene for aggressive prostate cancer. *Prostate*, 2005. **65**(3): p. 252-9.
138. Okada, Y., et al., hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell*, 2005. **121**(2): p. 167-78.
139. Raman, J.D., et al., Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8570-6.
140. Tatton-Brown, K., et al., Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet*, 2005. **77**(2): p. 193-204.
141. Bachmann, I.M., et al., EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(2): p. 268-73.
142. El Messaoudi, S., et al., Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1) is a positive regulator of the Cyclin E1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(36): p. 13351-6.
143. Huang, J., et al., Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature*, 2006. **444**(7119): p. 629-32.
144. Lal, G., et al., RIZ1 is epigenetically inactivated by promoter hypermethylation in thyroid carcinoma. *Cancer*, 2006. **107**(12): p. 2752-9.
145. Majumder, S., et al., Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. *Prostate*, 2006. **66**(12): p. 1292-301.
146. Saramaki, O.R., et al., The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006. **45**(7): p. 639-45.
147. Akahira, J., et al., Decreased expression of RIZ1 and its clinicopathological significance in epithelial ovarian carcinoma: correlation with epigenetic inactivation by aberrant DNA methylation. *Pathol Int*, 2007. **57**(11): p. 725-33.
148. Balakrishnan, A., et al., Novel somatic and germline mutations in cancer candidate genes in glioblastoma, melanoma, and pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 2007. **67**(8): p. 3545-50.

149. Bryant, R.J., et al., EZH2 promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells. *Prostate*, 2007. **67**(5): p. 547-56.
150. Chen, L.B., et al., Silencing SMYD3 in hepatoma demethylates RIZ1 promoter induces apoptosis and inhibits cell proliferation and migration. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(43): p. 5718-24.
151. Cheung, N., et al., Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(10): p. 1208-15.
152. Hasegawa, Y., et al., DNA methylation of the RIZ1 gene is associated with nuclear accumulation of p53 in prostate cancer. *Cancer Sci*, 2007. **98**(1): p. 32-6.
153. Pal, S., et al., Low levels of miR-92b/96 induce PRMT5 translation and H3R8/H4R3 methylation in mantle cell lymphoma. *EMBO J*, 2007. **26**(15): p. 3558-69.
154. Wang, G.G., et al., NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(7): p. 804-12.
155. Yoon, K.A., et al., Genetic polymorphisms in the Rb-binding zinc finger gene RIZ and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(9): p. 1971-7.
156. Frietze, S., et al., CARM1 regulates estrogen-stimulated breast cancer growth through up-regulation of E2F1. *Cancer Res*, 2008. **68**(1): p. 301-6.
157. Harper, D.P. and P.D. Aplan, Chromosomal rearrangements leading to MLL gene fusions: clinical and biological aspects. *Cancer Res*, 2008. **68**(24): p. 10024-7.
158. Kondo, Y., et al., Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One*, 2008. **3**(4): p. e2037.
159. Kurash, J.K., et al., Methylation of p53 by Set7/9 mediates p53 acetylation and activity in vivo. *Mol Cell*, 2008. **29**(3): p. 392-400.
160. Lakshmikuttyamma, A., et al., Bcr-Abl induces autocrine IGF-1 signaling. *Oncogene*, 2008. **27**(27): p. 3831-44.
161. Mulligan, P., et al., CDYL bridges REST and histone methyltransferases for gene repression and suppression of cellular transformation. *Mol Cell*, 2008. **32**(5): p. 718-26.
162. Piao, G.H., et al., Hyper-methylation of RIZ1 tumor suppressor gene is involved in the early tumorigenesis of hepatocellular carcinoma. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(10): p. 1171-5.
163. Simon, J.A. and C.A. Lange, Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*, 2008. **647**(1-2): p. 21-9.
164. Subramanian, K., et al., Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. *Mol Cell*, 2008. **30**(3): p. 336-47.
165. Wang, L., S. Pal, and S. Sif, Protein arginine methyltransferase 5 suppresses the transcription of the RB family of tumor suppressors in leukemia and lymphoma cells. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(20): p. 6262-77.
166. Chen, Y.T. and L.J. Old, Cancer-testis antigens: targets for cancer immunotherapy. *Cancer J Sci Am*, 1999. **5**(1): p. 16-7.
167. Lu, P.J., et al., A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *J Biol Chem*, 1999. **274**(22): p. 15633-45.
168. Barrett, A., et al., PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer*, 2002. **101**(6): p. 581-8.
169. Ehrbrecht, A., et al., Comprehensive genomic analysis of desmoplastic medulloblastomas: identification of novel amplified genes and separate evaluation of the different histological components. *J Pathol*, 2006. **208**(4): p. 554-63.
170. Italiano, A., et al., Molecular cytogenetic characterization of a metastatic lung sarcomatoid carcinoma: 9p23 neocentromere and 9p23-p24 amplification including JAK2 and JMJD2C. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006. **167**(2): p. 122-30.
171. Kahl, P., et al., Androgen receptor coactivators lysine-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res*, 2006. **66**(23): p. 11341-7.
172. Suzuki, T., et al., Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Bln-deficient mice. *EMBO J*, 2006. **25**(14): p. 3422-31.
173. Vinatzer, U., et al., Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: novel translocations including rearrangements of ODZ2, JMJD2C, and CNN3. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(20): p. 6426-31.
174. Schulte, J.H., et al., Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 2065-71.
175. van Haafden, G., et al., Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. *Nat Genet*, 2009. **41**(5): p. 521-3.
176. Dalgliesh, G.L., et al., Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*, 2010. **463**(7279): p. 360-3.
177. Lim, S., et al., Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(3): p. 512-20.

178. Magerl, C., et al., H3K4 dimethylation in hepatocellular carcinoma is rare compared with other hepatobiliary and gastrointestinal carcinomas and correlates with expression of the methylase Ash2 and the demethylase LSD1. *Hum Pathol*, 2010. **41**(2): p. 181-9.
179. Zeng, J., et al., The histone demethylase RBP2 Is overexpressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells. *Gastroenterology*, 2010. **138**(3): p. 981-92.
180. Constantinides, P.G., P.A. Jones, and W. Gevers, Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature*, 1977. **267**(5609): p. 364-6.
181. Santi, D.V., C.E. Garrett, and P.J. Barr, On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. *Cell*, 1983. **33**(1): p. 9-10.
182. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(9): p. 769-84.
183. Minucci, S. and P.G. Pelicci, Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(1): p. 38-51.
184. Rotili, D. and A. Mai, Targeting Histone Demethylases: A New Avenue for the Fight against Cancer. *Genes Cancer*, 2011. **2**(6): p. 663-79.
185. Tsuneoka, M., et al., A novel myc target gene, mina53, that is involved in cell proliferation. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35450-9.
186. Lee, M.G., et al., Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem Biol*, 2006. **13**(6): p. 563-7.
187. Huang, Y., et al., Inhibition of lysine-specific demethylase 1 by polyamine analogues results in reexpression of aberrantly silenced genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(19): p. 8023-8.
188. Schmidt, D.M. and D.G. McCafferty, trans-2-Phenylcyclopropylamine is a mechanism-based inactivator of the histone demethylase LSD1. *Biochemistry*, 2007. **46**(14): p. 4408-16.
189. Suzuki, C., et al., Identification of Myc-associated protein with JmjC domain as a novel therapeutic target oncogene for lung cancer. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(2): p. 542-51.
190. Pfau, R., et al., Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(6): p. 1907-12.
191. Rose, N.R., et al., Inhibitor scaffolds for 2-oxoglutarate-dependent histone lysine demethylases. *J Med Chem*, 2008. **51**(22): p. 7053-6.
192. Rose, N.R., et al., Selective inhibitors of the JMJD2 histone demethylases: combined nondenaturing mass spectrometric screening and crystallographic approaches. *J Med Chem*, 2010. **53**(4): p. 1810-8.
193. Thalhammer, A., et al., Inhibition of the histone demethylase JMJD2E by 3-substituted pyridine 2,4-dicarboxylates. *Org Biomol Chem*, 2011. **9**(1): p. 127-35.
194. Spannhoff, A., et al., The emerging therapeutic potential of histone methyltransferase and demethylase inhibitors. *ChemMedChem*, 2009. **4**(10): p. 1568-82.
195. Chen, Z., et al., Structural basis of the recognition of a methylated histone tail by JMJD2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(26): p. 10818-23.
196. Sekirnik, R., et al., Inhibition of the histone lysine demethylase JMJD2A by ejection of structural Zn(II). *Chem Commun (Camb)*, 2009(42): p. 6376-8.
197. Sakurai, M., et al., A miniaturized screen for inhibitors of Jumonji histone demethylases. *Mol Biosyst*, 2010. **6**(2): p. 357-64.
198. King, O.N., et al., Quantitative high-throughput screening identifies 8-hydroxyquinolines as cell-active histone demethylase inhibitors. *PLoS One*, 2010. **5**(11): p. e15535.
199. Hamada, S., et al., Design, synthesis, enzyme-inhibitory activity, and effect on human cancer cells of a novel series of jumonji domain-containing protein 2 histone demethylase inhibitors. *J Med Chem*, 2010. **53**(15): p. 5629-38.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: Ο κώδικας των ιστονών και η επιγενετική ρύθμιση από τις πρωτεΐνες Polycomb

1. Chittock, E.C., et al., Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem Soc Trans*, 2017. **45**(1): p. 193-205.
2. Martin-Perez, D., M.A. Piris, and M. Sanchez-Beato, *Polycomb proteins in hematologic malignancies*. *Blood*, 2010. **116**(25): p. 5465-75.
3. Lewis, E.B., A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 1978. **276**(5688): p. 565-70.
4. Duncan, I.M., Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 1982. **102**(1): p. 49-70.
5. Simon, J., Locking in stable states of gene expression: transcriptional control during *Drosophila* development. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(3): p. 376-85.
6. Gaytan de Ayala Alonso, A., et al., A genetic screen identifies novel polycomb group genes in *Drosophila*. *Genetics*, 2007. **176**(4): p. 2099-108.
7. Entrevan, M., B. Schuettengruber, and G. Cavalli, Regulation of Genome Architecture and Function by Polycomb Proteins. *Trends Cell Biol*, 2016. **26**(7): p. 511-525.
8. Piunti, A. and A. Shilatifard, Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families. *Science*, 2016. **352**(6290): p. aad9780.
9. Reynolds, N., A. O'Shaughnessy, and B. Hendrich, Transcriptional repressors: multifaceted regulators of gene expression. *Development*, 2013. **140**(3): p. 505-12.
10. Zhu, J., et al., Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell*, 2013. **152**(3): p. 642-54.
11. Scheuermann, J.C., et al., Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*, 2010. **465**(7295): p. 243-7.
12. Aranda, S., G. Mas, and L. Di Croce, Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci Adv*, 2015. **1**(11): p. e1500737.
13. Ciferri, C., et al., Molecular architecture of human polycomb repressive complex 2. *Elife*, 2012. **1**: p. e00005.
14. McGinty, R.K., R.C. Henrici, and S. Tan, Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature*, 2014. **514**(7524): p. 591-6.
15. Jiao, L. and X. Liu, Structural basis of histone H3K27 trimethylation by an active polycomb repressive complex 2. *Science*, 2015. **350**(6258): p. aac4383.
16. Brooun, A., et al., Polycomb repressive complex 2 structure with inhibitor reveals a mechanism of activation and drug resistance. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11384.
17. Justin, N., et al., Structural basis of oncogenic histone H3K27M inhibition of human polycomb repressive complex 2. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11316.
18. Sahtoe, D.D., et al., Mechanism of UCH-L5 activation and inhibition by DEUBAD domains in RPN13 and INO80G. *Mol Cell*, 2015. **57**(5): p. 887-900.
19. Vander Linden, R.T., et al., Structural basis for the activation and inhibition of the UCH37 deubiquitylase. *Mol Cell*, 2015. **57**(5): p. 901-911.
20. Gao, Z., et al., PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*, 2012. **45**(3): p. 344-56.
21. Hauri, S., et al., A High-Density Map for Navigating the Human Polycomb Complexome. *Cell Rep*, 2016. **17**(2): p. 583-595.
22. Kloet, S.L., et al., The dynamic interactome and genomic targets of Polycomb complexes during stem-cell differentiation. *Nat Struct Mol Biol*, 2016. **23**(7): p. 682-690.
23. Shao, Z., et al., Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*, 1999. **98**(1): p. 37-46.
24. Saurin, A.J., et al., A *Drosophila* Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature*, 2001. **412**(6847): p. 655-60.
25. Levine, S.S., et al., The core of the polycomb repressive complex is compositionally and functionally conserved in flies and humans. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(17): p. 6070-8.
26. Francis, N.J., R.E. Kingston, and C.L. Woodcock, Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*, 2004. **306**(5701): p. 1574-7.
27. Wang, H., et al., Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature*, 2004. **431**(7010): p. 873-8.
28. Stock, J.K., et al., Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(12): p. 1428-35.
29. Min, I.M., et al., Regulating RNA polymerase pausing and transcription elongation in embryonic stem cells. *Genes Dev*, 2011. **25**(7): p. 742-54.

30. Satijn, D.P. and A.P. Otte, RING1 interacts with multiple Polycomb-group proteins and displays tumorigenic activity. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 57-68.
31. Sanchez-Pulido, L., et al., RAWUL: a new ubiquitin-like domain in PRC1 ring finger proteins that unveils putative plant and worm PRC1 orthologs. *BMC Genomics*, 2008. **9**: p. 308.
32. Bezsonova, I., et al., Ring1B contains a ubiquitin-like docking module for interaction with Cbx proteins. *Biochemistry*, 2009. **48**(44): p. 10542-8.
33. Garcia, E., et al., RYBP, a new repressor protein that interacts with components of the mammalian Polycomb complex, and with the transcription factor YY1. *EMBO J*, 1999. **18**(12): p. 3404-18.
34. Wang, R., et al., Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C-terminal domain. *Structure*, 2010. **18**(8): p. 966-75.
35. Junco, S.E., et al., Structure of the polycomb group protein PCGF1 in complex with BCOR reveals basis for binding selectivity of PCGF homologs. *Structure*, 2013. **21**(4): p. 665-71.
36. Wong, S.J., et al., KDM2B Recruitment of the Polycomb Group Complex, PRC1.1, Requires Cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure*, 2016. **24**(10): p. 1795-1801.
37. Buchwald, G., et al., Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J*, 2006. **25**(11): p. 2465-74.
38. Li, Z., et al., Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex. *J Biol Chem*, 2006. **281**(29): p. 20643-9.
39. Barbera, A.J., et al., The nucleosomal surface as a docking station for Kaposi's sarcoma herpesvirus LANA. *Science*, 2006. **311**(5762): p. 856-61.
40. Makde, R.D., et al., Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. *Nature*, 2010. **467**(7315): p. 562-6.
41. Bentley, M.L., et al., Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex. *EMBO J*, 2011. **30**(16): p. 3285-97.
42. Kato, H., et al., A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C. *Science*, 2013. **340**(6136): p. 1110-3.
43. Leung, J.W., et al., Nucleosome acidic patch promotes RNF168- and RING1B/BMI1-dependent H2AX and H2A ubiquitination and DNA damage signaling. *PLoS Genet*, 2014. **10**(3): p. e1004178.
44. Morgan, M.T., et al., Structural basis for histone H2B deubiquitination by the SAGA DUB module. *Science*, 2016. **351**(6274): p. 725-8.
45. Taherbhoy, A.M., O.W. Huang, and A.G. Cochran, BMI1-RING1B is an autoinhibited RING E3 ubiquitin ligase. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 7621.
46. Blackledge, N.P., et al., Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell*, 2014. **157**(6): p. 1445-59.
47. Krumlauf, R., Hox genes in vertebrate development. *Cell*, 1994. **78**(2): p. 191-201.
48. Heard, E., Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. *Curr Opin Genet Dev*, 2005. **15**(5): p. 482-9.
49. Martinez, A.M. and G. Cavalli, The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle*, 2006. **5**(11): p. 1189-97.
50. Sparmann, A. and M. van Lohuizen, Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(11): p. 846-56.
51. Laible, G., et al., Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *EMBO J*, 1997. **16**(11): p. 3219-32.
52. Dillon, S.C., et al., The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biol*, 2005. **6**(8): p. 227.
53. O'Carroll, D., et al., The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(13): p. 4330-6.
54. Margueron, R., et al., *Ezh1* and *Ezh2* maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*, 2008. **32**(4): p. 503-18.
55. Schwartzenuber, J., et al., Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature*, 2012. **482**(7384): p. 226-31.
56. Lewis, P.W., et al., Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science*, 2013. **340**(6134): p. 857-61.
57. Schmitges, F.W., et al., Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell*, 2011. **42**(3): p. 330-41.
58. Cai, L., et al., An H3K36 methylation-engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting. *Mol Cell*, 2013. **49**(3): p. 571-82.
59. Koppens, M. and M. van Lohuizen, Context-dependent actions of Polycomb repressors in cancer. *Oncogene*, 2016. **35**(11): p. 1341-52.

60. Sauvageau, M. and G. Sauvageau, Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(3): p. 299-313.
61. Molofsky, A.V., et al., Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*, 2003. **425**(6961): p. 962-7.
62. Lee, T.J., et al., Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 2006. **125**(2): p. 301-13.
63. Jiang, L., J. Li, and L. Song, *Bmi-1, stem cells and cancer*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2009. **41**(7): p. 527-34.
64. Ohm, J.E., et al., A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*, 2007. **39**(2): p. 237-42.
65. Haupt, Y., et al., Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell*, 1991. **65**(5): p. 753-63.
66. Jacobs, J.J., et al., Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev*, 1999. **13**(20): p. 2678-90.
67. Zhang, F.B., L.H. Sui, and T. Xin, Correlation of Bmi-1 expression and telomerase activity in human ovarian cancer. *Br J Biomed Sci*, 2008. **65**(4): p. 172-7.
68. Qin, Z.K., et al., Expression of Bmi-1 is a prognostic marker in bladder cancer. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 61.
69. Cao, R. and Y. Zhang, The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. **14**(2): p. 155-64.
70. Vire, E., et al., The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 871-4.
71. Ezponda, T. and J.D. Licht, Molecular pathways: deregulation of histone h3 lysine 27 methylation in cancer-different paths, same destination. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(19): p. 5001-8.
72. Morin, R.D., et al., Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet*, 2010. **42**(2): p. 181-5.
73. Majer, C.R., et al., A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Lett*, 2012. **586**(19): p. 3448-51.
74. McCabe, M.T., et al., Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(8): p. 2989-94.
75. Ernst, T., et al., Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 722-6.
76. Nikoloski, G., et al., Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 665-7.
77. Grossmann, V., et al., Molecular profiling of chronic myelomonocytic leukemia reveals diverse mutations in >80% of patients with TET2 and EZH2 being of high prognostic relevance. *Leukemia*, 2011. **25**(5): p. 877-9.
78. Guglielmelli, P., et al., EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*, 2011. **118**(19): p. 5227-34.
79. Ntziachristos, P., et al., Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*, 2012. **18**(2): p. 298-301.
80. Varambally, S., et al., The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
81. Bachmann, I.M., et al., EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(2): p. 268-73.
82. Kleer, C.G., et al., EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11606-11.
83. Jene-Sanz, A., et al., Expression of polycomb targets predicts breast cancer prognosis. *Mol Cell Biol*, 2013. **33**(19): p. 3951-61.
84. Chen, Y., et al., RNAi targeting EZH2 inhibits tumor growth and liver metastasis of pancreatic cancer in vivo. *Cancer Lett*, 2010. **297**(1): p. 109-16.
85. Zingg, D., et al., The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 6051.
86. Bracken, A.P., et al., EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*, 2003. **22**(20): p. 5323-35.
87. Tang, X., et al., Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene*, 2004. **23**(34): p. 5759-69.

88. Kotake, Y., et al., pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev*, 2007. **21**(1): p. 49-54.
89. Shi, B., et al., Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(14): p. 5105-19.
90. Bohrer, L.R., et al., Androgens suppress EZH2 expression via retinoblastoma (RB) and p130-dependent pathways: a potential mechanism of androgen-refractory progression of prostate cancer. *Endocrinology*, 2010. **151**(11): p. 5136-45.
91. Bryant, R.J., et al., EZH2 promotes proliferation and invasiveness of prostate cancer cells. *Prostate*, 2007. **67**(5): p. 547-56.
92. Cao, Q., et al., Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene*, 2008. **27**(58): p. 7274-84.
93. Fujii, S. and A. Ochiai, Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci*, 2008. **99**(4): p. 738-46.
94. Lu, C., et al., Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell*, 2010. **18**(2): p. 185-97.
95. Zeidler, M., et al., The Polycomb group protein EZH2 impairs DNA repair in breast epithelial cells. *Neoplasia*, 2005. **7**(11): p. 1011-9.
96. Zeidler, M. and C.G. Kleer, The Polycomb group protein Enhancer of Zeste 2: its links to DNA repair and breast cancer. *J Mol Histol*, 2006. **37**(5-7): p. 219-23.
97. Tonini, T., et al., Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A. *Oncogene*, 2004. **23**(28): p. 4930-7.
98. Tonini, T., et al., Importance of Ezh2 polycomb protein in tumorigenesis process interfering with the pathway of growth suppressive key elements. *J Cell Physiol*, 2008. **214**(2): p. 295-300.
99. Wee, Z.N., et al., EZH2-mediated inactivation of IFN-gamma-JAK-STAT1 signaling is an effective therapeutic target in MYC-driven prostate cancer. *Cell Rep*, 2014. **8**(1): p. 204-16.
100. Sneeringer, C.J., et al., Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(49): p. 20980-5.
101. Cao, Q., et al., Coordinated regulation of polycomb group complexes through microRNAs in cancer. *Cancer Cell*, 2011. **20**(2): p. 187-99.
102. Koh, C.M., et al., Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget*, 2011. **2**(9): p. 669-83.
103. Saramaki, O.R., et al., The gene for polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is amplified in late-stage prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 2006. **45**(7): p. 639-45.
104. Varambally, S., et al., Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. *Science*, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
105. Cao, P., et al., MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1alpha/HIF-1beta. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 108.
106. Jain, P. and L. Di Croce, Mutations and deletions of PRC2 in prostate cancer. *Bioessays*, 2016. **38**(5): p. 446-54.
107. Chen, H., S.W. Tu, and J.T. Hsieh, Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J Biol Chem*, 2005. **280**(23): p. 22437-44.
108. Ren, G., et al., Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer. *Cancer Res*, 2012. **72**(12): p. 3091-104.
109. Shin, Y.J. and J.H. Kim, The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30393.
110. Pellakuru, L.G., et al., Global levels of H3K27me3 track with differentiation in vivo and are deregulated by MYC in prostate cancer. *Am J Pathol*, 2012. **181**(2): p. 560-9.
111. Alabert, C., et al., Two distinct modes for propagation of histone PTMs across the cell cycle. *Genes Dev*, 2015. **29**(6): p. 585-90.
112. Zhang, Q., et al., Polycomb protein EZH2 suppresses apoptosis by silencing the proapoptotic miR-31. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1486.
113. Friedman, J.M., P.A. Jones, and G. Liang, The tumor suppressor microRNA-101 becomes an epigenetic player by targeting the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Cell Cycle*, 2009. **8**(15): p. 2313-4.
114. Friedman, J.M., et al., The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2623-9.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: Διαφορετική έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν για απομεθυλάσες ιστονών κατά την ογκογένεση - Το γονίδιο KDM2B

1. Tsichlis, P.N. and P.A. Lazo, Virus-host interactions and the pathogenesis of murine and human oncogenic retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991. **171**: p. 95-171.
2. Pfau, R., et al., Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(6): p. 1907-12.
3. Suzuki, T., et al., Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Blm-deficient mice. *EMBO J*, 2006. **25**(14): p. 3422-31.
4. Uren, A.G., et al., Large-scale mutagenesis in p19(ARF)- and p53-deficient mice identifies cancer genes and their collaborative networks. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 727-41.
5. Bushman, F., et al., Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol*, 2005. **3**(11): p. 848-58.
6. Kelsey, G., Keeping methylation at bay. *Nat Genet*, 2015. **47**(5): p. 427-8.
7. Klose, R.J., et al., Chromatin sampling--an emerging perspective on targeting polycomb repressor proteins. *PLoS Genet*, 2013. **9**(8): p. e1003717.
8. Voigt, P., W.W. Tee, and D. Reinberg, *A double take on bivalent promoters*. *Genes Dev*, 2013. **27**(12): p. 1318-38.
9. <2012 KDM1 is a novel therapeutic target for the treatment of gliomas.pdf>.
10. Farcas, A.M., et al., KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. *Elife*, 2012. **1**: p. e00205.
11. Wu, X., J.V. Johansen, and K. Helin, Fbxl10/Kdm2b recruits polycomb repressive complex 1 to CpG islands and regulates H2A ubiquitylation. *Mol Cell*, 2013. **49**(6): p. 1134-46.
12. Blackledge, N.P., et al., Variant PRC1 complex-dependent H2A ubiquitylation drives PRC2 recruitment and polycomb domain formation. *Cell*, 2014. **157**(6): p. 1445-59.
13. Riising, E.M., et al., Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Mol Cell*, 2014. **55**(3): p. 347-60.
14. Tsukada, Y., et al., Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
15. Suzuki, T., et al., New genes involved in cancer identified by retroviral tagging. *Nat Genet*, 2002. **32**(1): p. 166-74.
16. Koyama-Nasu, R., G. David, and N. Tanese, The F-box protein Fbl10 is a novel transcriptional repressor of c-Jun. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(9): p. 1074-80.
17. Yamagishi, T., S. Hirose, and T. Kondo, Secondary DNA structure formation for Hoxb9 promoter and identification of its specific binding protein. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(6): p. 1965-75.
18. Wysocka, J., et al., A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*, 2006. **442**(7098): p. 86-90.
19. Iwase, S., et al., The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*, 2007. **128**(6): p. 1077-88.
20. Shi, Y., Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet*, 2007. **8**(11): p. 829-33.
21. Taverna, S.D., et al., How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(11): p. 1025-1040.
22. Vermeulen, M., et al., Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 2007. **131**(1): p. 58-69.
23. Barrett, A., et al., Breast cancer associated transcriptional repressor PLU-1/JARID1B interacts directly with histone deacetylases. *Int J Cancer*, 2007. **121**(2): p. 265-75.
24. Kipreos, E.T. and M. Pagano, *The F-box protein family*. *Genome Biol*, 2000. **1**(5): p. REVIEWS3002.
25. Kampranis, S.C. and P.N. Tsichlis, *Histone demethylases and cancer*. *Adv Cancer Res*, 2009. **102**: p. 103-69.
26. Boulard, M., J.R. Edwards, and T.H. Bestor, FBXL10 protects Polycomb-bound genes from hypermethylation. *Nat Genet*, 2015. **47**(5): p. 479-85.
27. Rose, N.R., et al., Selective inhibitors of the JMJD2 histone demethylases: combined nondenaturing mass spectrometric screening and crystallographic approaches. *J Med Chem*, 2010. **53**(4): p. 1810-8.

28. He, J., et al., The H3K36 demethylase Jhdm1b/Kdm2b regulates cell proliferation and senescence through p15(Ink4b). *Nat Struct Mol Biol*, 2008. **15**(11): p. 1169-75.
29. Lagarou, A., et al., dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev*, 2008. **22**(20): p. 2799-810.
30. Tzatsos, A., et al., Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(8): p. 2641-6.
31. Frescas, D., et al., JHDM1B/FBXL10 is a nucleolar protein that represses transcription of ribosomal RNA genes. *Nature*, 2007. **450**(7167): p. 309-13.
32. Rozovskaia, T., et al., Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(9): p. 6441-7.
33. Gearhart, M.D., et al., Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(18): p. 6880-9.
34. Sanchez, C., et al., Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbx10/Jhdm1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. *Mol Cell Proteomics*, 2007. **6**(5): p. 820-34.
35. Pedersen, M.T. and K. Helin, Histone demethylases in development and disease. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(11): p. 662-71.
36. Fan, Z., et al., BCOR regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(8): p. 1002-9.
37. Lu, T., et al., Regulation of NF-kappaB by NSD1/FBXL11-dependent reversible lysine methylation of p65. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(1): p. 46-51.
38. Frescas, D., et al., KDM2A represses transcription of centromeric satellite repeats and maintains the heterochromatic state. *Cell Cycle*, 2008. **7**(22): p. 3539-47.
39. Polytarchou, C., et al., The JmjC domain histone demethylase Ndy1 regulates redox homeostasis and protects cells from oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(24): p. 7451-64.
40. Blackledge, N.P., et al., CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol Cell*, 2010. **38**(2): p. 179-90.
41. Yan, M., et al., The critical role of histone lysine demethylase KDM2B in cancer. *Am J Transl Res*, 2018. **10**(8): p. 2222-2233.
42. Chiu, W.T., et al., FOXM1 confers to epithelial-mesenchymal transition, stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*, 2015. **6**(4): p. 2349-65.
43. McNeil, E.A. and P.N. Tsihchlis, Analyses of publicly available genomics resources define FGF-2-expressing bladder carcinomas as EMT-prone, proliferative tumors with low mutation rates and high expression of CTLA-4, PD-1 and PD-L1. *Signal Transduct Target Ther*, 2017. **2**.
44. Rohde, M., et al., Overexpression of histone demethylase Fbx10 leads to enhanced migration in mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res*, 2016. **348**(2): p. 123-131.
45. Pothof, J., et al., Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev*, 2003. **17**(4): p. 443-8.
46. Bodnar, A.G., et al., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
47. Blackburn, E.H., Telomere states and cell fates. *Nature*, 2000. **408**(6808): p. 53-6.
48. Kamijo, T., et al., Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 1997. **91**(5): p. 649-59.
49. Latres, E., et al., Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J*, 2000. **19**(13): p. 3496-506.
50. Sharpless, N.E., et al., Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature*, 2001. **413**(6851): p. 86-91.
51. Krimpenfort, P., et al., p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. *Nature*, 2007. **448**(7156): p. 943-6.
52. Kuzmichev, A., et al., Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(6): p. 1859-64.
53. Nekrasov, M., et al., Pcl-PRC2 is needed to generate high levels of H3-K27 trimethylation at Polycomb target genes. *EMBO J*, 2007. **26**(18): p. 4078-88.
54. Sarma, K., et al., Ezh2 requires PHF1 to efficiently catalyze H3 lysine 27 trimethylation in vivo. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(8): p. 2718-31.

55. Tzatsos, A., et al., Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells. *J Biol Chem*, 2011. **286**(38): p. 33061-9.
56. Lee, S.M., et al., Intragenic CpG islands play important roles in bivalent chromatin assembly of developmental genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(10): p. E1885-E1894.
57. Yu, F., H. Shen, and H.W. Deng, Systemic analysis of osteoblast-specific DNA methylation marks reveals novel epigenetic basis of osteoblast differentiation. *Bone Rep*, 2017. **6**: p. 109-119.
58. He, J., et al., Kdm2b maintains murine embryonic stem cell status by recruiting PRC1 complex to CpG islands of developmental genes. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(4): p. 373-84.
59. Konuma, T., et al., Forced expression of the histone demethylase Fbxl10 maintains self-renewing hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*, 2011. **39**(6): p. 697-709 e5.
60. Wang, J.J., et al., Histone demethylase KDM2B inhibits the chondrogenic differentiation potentials of stem cells from apical papilla. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(2): p. 2165-73.
61. Inagaki, T., et al., The FBXL10/KDM2B scaffolding protein associates with novel polycomb repressive complex-1 to regulate adipogenesis. *J Biol Chem*, 2015. **290**(7): p. 4163-77.
62. Yun, Y., et al., Sulfate Aerosols Promote Lung Cancer Metastasis by Epigenetically Regulating the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT). *Environ Sci Technol*, 2017. **51**(19): p. 11401-11411.
63. Ayob, A.Z. and T.S. Ramasamy, Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci*, 2018. **25**(1): p. 20.
64. Gao, Z., et al., PCGF homologs, CBX proteins, and RYBP define functionally distinct PRC1 family complexes. *Mol Cell*, 2012. **45**(3): p. 344-56.
65. Wong, S.J., et al., KDM2B Recruitment of the Polycomb Group Complex, PRC1.1, Requires Cooperation between PCGF1 and BCORL1. *Structure*, 2016. **24**(10): p. 1795-1801.
66. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
67. Zhao, W., et al., Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination. *Cell*, 2013. **152**(5): p. 1037-50.
68. Wang, T., et al., The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell Stem Cell*, 2011. **9**(6): p. 575-87.
69. Zhou, Z., et al., Kdm2b Regulates Somatic Reprogramming through Variant PRC1 Complex-Dependent Function. *Cell Rep*, 2017. **21**(8): p. 2160-2170.
70. Almozayan, S., et al., PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int J Cancer*, 2017. **141**(7): p. 1402-1412.
71. Chen, Y.P., et al., [Clinicopathologic features and expression of OCT4 protein in testicular diffuse large B cell lymphoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2017. **46**(6): p. 383-387.
72. Jen, J., et al., Oct4 transcriptionally regulates the expression of long non-coding RNAs NEAT1 and MALAT1 to promote lung cancer progression. *Mol Cancer*, 2017. **16**(1): p. 104.
73. Li, C., et al., Transcriptional factor OCT4 promotes esophageal cancer metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition through VEGF-C/VEGFR-3 signaling pathway. *Oncotarget*, 2017. **8**(42): p. 71933-71945.
74. Rotili, D. and A. Mai, Targeting Histone Demethylases: A New Avenue for the Fight against Cancer. *Genes Cancer*, 2011. **2**(6): p. 663-79.
75. Tzatsos, A., et al., KDM2B promotes pancreatic cancer via Polycomb-dependent and -independent transcriptional programs. *J Clin Invest*, 2013. **123**(2): p. 727-39.
76. Kottakis, F., et al., NDY1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells. *Cancer Res*, 2014. **74**(14): p. 3935-46.
77. Hong, X., et al., MiR-448 promotes glycolytic metabolism of gastric cancer by downregulating KDM2B. *Oncotarget*, 2016. **7**(16): p. 22092-102.
78. Goyama, S. and T. Kitamura, Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis: An overview and update 2017. *Cancer Sci*, 2017. **108**(4): p. 553-562.
79. Andersson, A., et al., Microarray-based classification of a consecutive series of 121 childhood acute leukemias: prediction of leukemic and genetic subtype as well as of minimal residual disease status. *Leukemia*, 2007. **21**(6): p. 1198-203.
80. van Agthoven, T., et al., Selective recruitment of breast cancer anti-estrogen resistance genes and relevance for breast cancer progression and tamoxifen therapy response. *Endocr Relat Cancer*, 2010. **17**(1): p. 215-30.

81. Ge, R., et al., F-box protein 10, an NF-kappaB-dependent anti-apoptotic protein, regulates TRAIL-induced apoptosis through modulating c-Fos/c-FLIP pathway. *Cell Death Differ*, 2011. **18**(7): p. 1184-95.
82. He, J., A.T. Nguyen, and Y. Zhang, KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood*, 2011. **117**(14): p. 3869-80.
83. Kottakis, F., et al., FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol Cell*, 2011. **43**(2): p. 285-98.
84. Ren, Y., et al., FBXL10 contributes to the progression of nasopharyngeal carcinoma via involving in PI3K/mTOR pathway. *Neoplasma*, 2015. **62**(6): p. 925-31.
85. Ueda, T., et al., Fbxl10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. *Blood*, 2015. **125**(22): p. 3437-46.
86. Yu, X., et al., A systematic study of the cellular metabolic regulation of Jhdm1b in tumor cells. *Mol Biosyst*, 2015. **11**(7): p. 1867-75.
87. Andricovich, J., et al., Histone demethylase KDM2B regulates lineage commitment in normal and malignant hematopoiesis. *J Clin Invest*, 2016. **126**(3): p. 905-20.
88. Han, X.R., et al., KDM2B/FBXL10 targets c-Fos for ubiquitylation and degradation in response to mitogenic stimulation. *Oncogene*, 2016. **35**(32): p. 4179-90.
89. van den Boom, V., et al., Non-canonical PRC1.1 Targets Active Genes Independent of H3K27me3 and Is Essential for Leukemogenesis. *Cell Rep*, 2016. **14**(2): p. 332-46.
90. Galbiati, A., et al., Epigenetic up-regulation of ribosome biogenesis and more aggressive phenotype triggered by the lack of the histone demethylase JHDM1B in mammary epithelial cells. *Oncotarget*, 2017. **8**(23): p. 37091-37103.
91. Kuang, Y., et al., Histone demethylase KDM2B upregulates histone methyltransferase EZH2 expression and contributes to the progression of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Oncotargets Ther*, 2017. **10**: p. 3131-3144.
92. Kurt, I.C., et al., KDM2B, an H3K36-specific demethylase, regulates apoptotic response of GBM cells to TRAIL. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(6): p. e2897.
93. Zhao, E., et al., Inhibition of cell proliferation and induction of autophagy by KDM2B/FBXL10 knockdown in gastric cancer cells. *Cell Signal*, 2017. **36**: p. 222-229.
94. Nakatsuka, T., et al., Impact of histone demethylase KDM3A-dependent AP-1 transactivity on hepatotumorigenesis induced by PI3K activation. *Oncogene*, 2017. **36**(45): p. 6262-6271.
95. Pang, J.S., et al., Gallic Acid Inhibited Matrix Invasion and AP-1/ETS-1-Mediated MMP-1 Transcription in Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
96. Satterfield, L., et al., miR-130b directly targets ARHGAP1 to drive activation of a metastatic CDC42-PAK1-AP1 positive feedback loop in Ewing sarcoma. *Int J Cancer*, 2017. **141**(10): p. 2062-2075.
97. Tyagi, A., et al., Cervical cancer stem cells manifest radioresistance: Association with upregulated AP-1 activity. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 4781.
98. Zhang, X., et al., c-Fos as a proapoptotic agent in TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*, 2007. **67**(19): p. 9425-34.
99. Cadigan, K.M. and M. Peifer, Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(2): p. a002881.
100. Lu, L., et al., Kdm2a/b Lysine Demethylases Regulate Canonical Wnt Signaling by Modulating the Stability of Nuclear beta-Catenin. *Dev Cell*, 2015. **33**(6): p. 660-74.
101. Feng, S., et al., Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Inhibitor S2101 Induces Autophagy via the AKT/mTOR Pathway in SKOV3 Ovarian Cancer Cells. *Med Sci Monit*, 2016. **22**: p. 4742-4748.
102. Lee, H.J., et al., Novel inhibitors of lysine (K)-specific Demethylase 4A with anticancer activity. *Invest New Drugs*, 2017. **35**(6): p. 733-741.
103. Trifiro, P., et al., Novel potent inhibitors of the histone demethylase KDM1A (LSD1), orally active in a murine promyelocytic leukemia model. *Future Med Chem*, 2017. **9**(11): p. 1161-1174.
104. Stein, J., et al., KDM5C is overexpressed in prostate cancer and is a prognostic marker for prostate-specific antigen-relapse following radical prostatectomy. *Am J Pathol*, 2014. **184**(9): p. 2430-7.
105. Maes, T., et al., Advances in the development of histone lysine demethylase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 2015. **23**: p. 52-60.

106. Hancock, R.L., et al., Epigenetic regulation by histone demethylases in hypoxia. *Epigenomics*, 2015. **7**(5): p. 791-811.
107. D'Oto, A., et al., Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *J Med Oncol Ther*, 2016. **1**(2): p. 34-40.
108. Kristensen, L.H., et al., Studies of H3K4me3 demethylation by KDM5B/Jarid1B/PLU1 reveals strong substrate recognition in vitro and identifies 2,4-pyridine-dicarboxylic acid as an in vitro and in cell inhibitor. *FEBS J*, 2012. **279**(11): p. 1905-14.
109. Kruidenier, L., et al., A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature*, 2012. **488**(7411): p. 404-8.
110. Vinogradova, M., et al., An inhibitor of KDM5 demethylases reduces survival of drug-tolerant cancer cells. *Nat Chem Biol*, 2016. **12**(7): p. 531-8.
111. Morera, L., M. Lubbert, and M. Jung, Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. *Clin Epigenetics*, 2016. **8**: p. 57.
112. Labadie, S.S., et al., Design and evaluation of 1,7-naphthyridones as novel KDM5 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016. **26**(18): p. 4492-4496.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: Κυτταροσκελετός

1. Needham, J., New Advances in the Chemistry and Biology of Organized Growth: (Section of Pathology). Proc R Soc Med, 1936. **29**(12): p. 1577-626.
2. Papakonstanti, E.A. and C. Stournaras, Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. FEBS Lett, 2008. **582**(14): p. 2120-7.
3. Charpentier, M. and S. Martin, Interplay of Stem Cell Characteristics, EMT, and Microtentacles in Circulating Breast Tumor Cells. Cancers (Basel), 2013. **5**(4): p. 1545-65.
4. Oakley, C.E. and B.R. Oakley, Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. Nature, 1989. **338**(6217): p. 662-4.
5. Dustin, P., *Microtubules*. Sci Am, 1980. **243**(2): p. 66-76.
6. Davis, A., et al., Microtubule dynamics modulated by guanosine triphosphate hydrolysis activity of beta-tubulin. Science, 1994. **264**(5160): p. 839-42.
7. Downing, K.H. and E. Nogales, Tubulin and microtubule structure. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(1): p. 16-22.
8. Bergen, L.G., R. Kuriyama, and G.G. Borisy, Polarity of microtubules nucleated by centrosomes and chromosomes of Chinese hamster ovary cells in vitro. J Cell Biol, 1980. **84**(1): p. 151-9.
9. Bloom, G.S., Motor proteins for cytoplasmic microtubules. Curr Opin Cell Biol, 1992. **4**(1): p. 66-73.
10. Skoufias, D.A. and J.M. Scholey, Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(1): p. 95-104.
11. Vallee, R.B., et al., Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. Nature, 1988. **332**(6164): p. 561-3.
12. Ray, S., et al., Kinesin follows the microtubule's protofilament axis. J Cell Biol, 1993. **121**(5): p. 1083-93.
13. Oyanagi, J., et al., Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e53209.
14. Braun, A., et al., Rac1 and Aurora A regulate MCAK to polarize microtubule growth in migrating endothelial cells. J Cell Biol, 2014. **206**(1): p. 97-112.
15. Kamal, A., et al., Synthesis and biological evaluation of imidazo[1,5-a]pyridine-benzimidazole hybrids as inhibitors of both tubulin polymerization and PI3K/Akt pathway. Org Biomol Chem, 2014. **12**(48): p. 9864-80.
16. Nicholl, I.D. and R.A. Quinlan, Chaperone activity of alpha-crystallins modulates intermediate filament assembly. EMBO J, 1994. **13**(4): p. 945-53.
17. Sutoh Yoneyama, M., et al., Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(4): p. 157-69.
18. Wettstein, G., et al., Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity? Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(10): p. 1680-6.
19. Johnen, N., et al., Evidence for a partial epithelial-mesenchymal transition in postnatal stages of rat auditory organ morphogenesis. Histochem Cell Biol, 2012. **138**(3): p. 477-88.
20. Nieminen, M., et al., Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. Nat Cell Biol, 2006. **8**(2): p. 156-62.
21. Kim, S. and P.A. Coulombe, Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. Genes Dev, 2007. **21**(13): p. 1581-97.
22. Kim, S., et al., Interaction between the keratin cytoskeleton and eEF1Bgamma affects protein synthesis in epithelial cells. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(10): p. 982-3.
23. Vandekerckhove, J. and K. Weber, At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. J Mol Biol, 1978. **126**(4): p. 783-802.
24. Ponte, P., et al., Human actin genes are single copy for alpha-skeletal and alpha-cardiac actin but multicopy for beta- and gamma-cytoskeletal genes: 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. Mol Cell Biol, 1983. **3**(10): p. 1783-91.
25. Herman, I.M., *Actin isoforms*. Curr Opin Cell Biol, 1993. **5**(1): p. 48-55.
26. Shagieva, G.S., et al., Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells. Biochemistry (Mosc), 2012. **77**(11): p. 1266-76.
27. Hennessey, E.S., D.R. Drummond, and J.C. Sparrow, *Molecular genetics of actin function*. Biochem J, 1993. **291** (Pt 3): p. 657-71.
28. Khaitlina, S.Y., Functional specificity of actin isoforms. Int Rev Cytol, 2001. **202**: p. 35-98.

29. Otey, C.A., M.H. Kalnoski, and J.C. Bulinski, Identification and quantification of actin isoforms in vertebrate cells and tissues. *J Cell Biochem*, 1987. **34**(2): p. 113-24.
30. Erba, H.P., et al., Structure, chromosome location, and expression of the human gamma-actin gene: differential evolution, location, and expression of the cytoskeletal beta- and gamma-actin genes. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(4): p. 1775-89.
31. Gershman, L.C., L.A. Selden, and J.E. Estes, High affinity binding of divalent cation to actin monomer is much stronger than previously reported. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **135**(2): p. 607-14.
32. Pollard, T.D., *Actin*. *Curr Opin Cell Biol*, 1990. **2**(1): p. 33-40.
33. Estes, J.E., et al., Tightly-bound divalent cation of actin. *J Muscle Res Cell Motil*, 1992. **13**(3): p. 272-84.
34. Frieden, C. and K. Patane, Mechanism for nucleotide exchange in monomeric actin. *Biochemistry*, 1988. **27**(10): p. 3812-20.
35. Blanchoin, L. and T.D. Pollard, Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, 2002. **41**(2): p. 597-602.
36. Korn, E.D., Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev*, 1982. **62**(2): p. 672-737.
37. Carlier, M.F., Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem*, 1991. **266**(1): p. 1-4.
38. Visegrady, B., et al., A simple model for the cooperative stabilisation of actin filaments by phalloidin and jasplakinolide. *FEBS Lett*, 2005. **579**(1): p. 6-10.
39. Zimmerle, C.T. and C. Frieden, Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry*, 1986. **25**(21): p. 6432-8.
40. Pollard, T.D. and J.A. Cooper, Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, 1986. **55**: p. 987-1035.
41. Korn, E.D., M.F. Carlier, and D. Pantaloni, *Actin polymerization and ATP hydrolysis*. *Science*, 1987. **238**(4827): p. 638-44.
42. Carlier, M.F., Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int Rev Cytol*, 1989. **115**: p. 139-70.
43. Bonder, E.M., D.J. Fishkind, and M.S. Mooseker, Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell*, 1983. **34**(2): p. 491-501.
44. Bonder, E.M. and M.S. Mooseker, Direct electron microscopic visualization of barbed end capping and filament cutting by intestinal microvillar 95-kdalton protein (villin): a new actin assembly assay using the *Limulus* acrosomal process. *J Cell Biol*, 1983. **96**(4): p. 1097-107.
45. Stournaras, C., I. Merkler, and H. Faulstich, Thiol group reactivity and polymerization of actin in the presence of ATP analogs. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. **155**(2): p. 962-70.
46. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 453-65.
47. Condeelis, J., How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(7): p. 288-93.
48. Small, J.V., et al., Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1404**(3): p. 271-81.
49. Bretscher, A., Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 1991. **7**: p. 337-74.
50. Stossel, T.P., Contribution of actin to the structure of the cytoplasmic matrix. *J Cell Biol*, 1984. **99**(1 Pt 2): p. 15s-21s.
51. Small, J.V., Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks. *J Cell Biol*, 1981. **91**(3 Pt 1): p. 695-705.
52. Symons, M.H. and T.J. Mitchison, Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J Cell Biol*, 1991. **114**(3): p. 503-13.
53. Theriot, J.A. and T.J. Mitchison, Comparison of actin and cell surface dynamics in motile fibroblasts. *J Cell Biol*, 1992. **119**(2): p. 367-77.
54. Begg, D.A., R. Rodewald, and L.I. Rebhun, The visualization of actin filament polarity in thin sections. Evidence for the uniform polarity of membrane-associated filaments. *J Cell Biol*, 1978. **79**(3): p. 846-52.
55. Small, J.V., G. Isenberg, and J.E. Celis, Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*, 1978. **272**(5654): p. 638-9.
56. Connolly, J.A., V.I. Kalnins, and B.H. Barber, Microtubules and microfilaments during cell spreading and colony formation in PK 15 epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(11): p. 6922-6.
57. Hartwig, J.H. and D.J. Kwiatkowski, *Actin-binding proteins*. *Curr Opin Cell Biol*, 1991. **3**(1): p. 87-97.

58. Sanger, J.W., J.M. Sanger, and B.M. Jockusch, Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol*, 1983. **96**(4): p. 961-9.
59. del Toro, F., et al., Potato virus Y HCPro localization at distinct, dynamically related and environment-influenced structures in the cell cytoplasm. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014. **27**(12): p. 1331-43.
60. Yilmaz, M. and G. Christofori, EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 15-33.
61. Shankar, J., et al., Pseudopodial actin dynamics control epithelial-mesenchymal transition in metastatic cancer cells. *Cancer Res*, 2010. **70**(9): p. 3780-90.
62. Lin, Y.C., et al., Impact of flavonoids on matrix metalloproteinase secretion and invadopodia formation in highly invasive A431-III cancer cells. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71903.
63. Taylor, M.A., et al., Upregulated WAVE3 expression is essential for TGF-beta-mediated EMT and metastasis of triple-negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **142**(2): p. 341-53.
64. Lee, C., et al., The cytoplasmic extension of the integrin beta6 subunit regulates epithelial-to-mesenchymal transition. *Anticancer Res*, 2014. **34**(2): p. 659-64.
65. Whipple, R.A., et al., Parthenolide and costunolide reduce microtentacles and tumor cell attachment by selectively targeting detyrosinated tubulin independent from NF-kappaB inhibition. *Breast Cancer Res*, 2013. **15**(5): p. R83.
66. Kaneko, T., T.J. Itoh, and H. Hotani, Morphological transformation of liposomes caused by assembly of encapsulated tubulin and determination of shape by microtubule-associated proteins (MAPs). *J Mol Biol*, 1998. **284**(5): p. 1671-81.
67. Herrmann, H., et al., Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest*, 2009. **119**(7): p. 1772-83.
68. Toivola, D.M., et al., Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(2): p. 79-91.
69. Yamasaki, T., et al., Tumor suppressive microRNA138 contributes to cell migration and invasion through its targeting of vimentin in renal cell carcinoma. *Int J Oncol*, 2012. **41**(3): p. 805-17.
70. Sun, B.O., et al., Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Rep*, 2015. **3**(5): p. 603-610.
71. Yang, Z., et al., Withania somnifera root extract inhibits mammary cancer metastasis and epithelial to mesenchymal transition. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e75069.
72. Anderson, T.W., A.N. Vaughan, and L.P. Cramer, Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(11): p. 5006-18.
73. Henry, W.I., J. Dubois, and Q.A. Quick, The microtubule inhibiting agent epothilone B antagonizes glioma cell motility associated with reorganization of the actin-binding protein alpha-actinin 4. *Oncol Rep*, 2011. **25**(3): p. 887-93.
74. Chan, E., et al., The acetylenic tricyclic bis(cyano enone), TBE-31 inhibits non-small cell lung cancer cell migration through direct binding with actin. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014. **7**(7): p. 727-37.
75. Svitkina, T.M., et al., Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 2003. **160**(3): p. 409-21.
76. Bamburg, J.R., Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999. **15**: p. 185-230.
77. Carlier, M.F., *Control of actin dynamics*. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(1): p. 45-51.
78. Maciver, S.K., How ADF/cofilin depolymerizes actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(1): p. 140-4.
79. Giuliano, K.A., et al., Properties of purified actin depolymerizing factor from chick brain. *Biochemistry*, 1988. **27**(25): p. 8931-8.
80. Vlecken, D.H. and C.P. Bagowski, LIMK1 and LIMK2 are important for metastatic behavior and tumor cell-induced angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Zebrafish*, 2009. **6**(4): p. 433-9.
81. Guarino, M., Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol*, 2010. **223**(1): p. 14-26.
82. Shibue, T., et al., The outgrowth of micrometastases is enabled by the formation of filopodium-like protrusions. *Cancer Discov*, 2012. **2**(8): p. 706-21.
83. Hotulainen, P., et al., Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*, 2009. **185**(2): p. 323-39.
84. Gervasi, M., et al., JunB contributes to Id2 repression and the epithelial-mesenchymal transition in response to transforming growth factor-beta. *J Cell Biol*, 2012. **196**(5): p. 589-603.
85. Safina, A.F., et al., Ras alters epithelial-mesenchymal transition in response to TGFbeta by reducing actin fibers and cell-matrix adhesion. *Cell Cycle*, 2009. **8**(2): p. 284-98.

86. Iwaya, K., et al., Correlation between liver metastasis of the colocalization of actin-related protein 2 and 3 complex and WAVE2 in colorectal carcinoma. *Cancer Sci*, 2007. **98**(7): p. 992-9.
87. Spence, H.J., et al., Scar/WAVE3 contributes to motility and plasticity of lamellipodial dynamics but not invasion in three dimensions. *Biochem J*, 2012. **448**(1): p. 35-42.
88. Monteiro, P., et al., Endosomal WASH and exocyst complexes control exocytosis of MT1-MMP at invadopodia. *J Cell Biol*, 2013. **203**(6): p. 1063-79.
89. Higgs, H.N. and T.D. Pollard, Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 32531-4.
90. Han, S.P., et al., Cortactin scaffolds Arp2/3 and WAVE2 at the epithelial zonula adherens. *J Biol Chem*, 2014. **289**(11): p. 7764-75.
91. Helgeson, L.A., et al., Interactions with actin monomers, actin filaments, and Arp2/3 complex define the roles of WASP family proteins and cortactin in coordinately regulating branched actin networks. *J Biol Chem*, 2014. **289**(42): p. 28856-69.
92. Adams, J.C., Fascin-1 as a biomarker and prospective therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2015. **15**(1): p. 41-8.
93. Beland, M.J., et al., Noninvasive transcutaneous cardiac pacing in children. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1987. **10**(6): p. 1262-70.
94. Gay, O., et al., RefilinB (FAM101B) targets filamin A to organize perinuclear actin networks and regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(28): p. 11464-9.
95. Gay, O., et al., Refilins: A link between perinuclear actin bundle dynamics and mechanosensing signaling. *Bioarchitecture*, 2011. **1**(5): p. 245-249.
96. Nachmias, V.T., Small actin-binding proteins: the beta-thymosin family. *Curr Opin Cell Biol*, 1993. **5**(1): p. 56-62.
97. Sun, H.Q., K. Kwiatkowska, and H.L. Yin, *Actin monomer binding proteins*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(1): p. 102-10.
98. Schluter, K., B.M. Jockusch, and M. Rothkegel, *Profilins as regulators of actin dynamics*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. **1359**(2): p. 97-109.
99. Vindin, H. and P. Gunning, Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity. *J Muscle Res Cell Motil*, 2013. **34**(3-4): p. 261-74.
100. Bach, C.T., et al., Tropomyosin isoform expression regulates the transition of adhesions to determine cell speed and direction. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(6): p. 1506-14.
101. O'Neill, G.M., J. Stehn, and P.W. Gunning, Tropomyosins as interpreters of the signalling environment to regulate the local cytoskeleton. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(1): p. 35-44.
102. Bach, C.T., et al., Tropomyosin Tm5NM1 spatially restricts src kinase activity through perturbation of Rab11 vesicle trafficking. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**(24): p. 4436-46.
103. Pawlak, G. and D.M. Helfman, Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(1): p. 41-7.
104. Walsh, T.P., et al., Effect of villin on the kinetics of actin polymerization. *Biochemistry*, 1984. **23**(12): p. 2613-21.
105. Sun, H.Q., et al., Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem*, 1999. **274**(47): p. 33179-82.
106. Sossey-Alaoui, K., et al., WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. *Int J Cancer*, 2011. **129**(6): p. 1331-43.
107. Boczkowska, M., et al., Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-bound WCAs. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 3308.
108. Sadhukhan, S., et al., Nuclear role of WASp in gene transcription is uncoupled from its ARP2/3-dependent cytoplasmic role in actin polymerization. *J Immunol*, 2014. **193**(1): p. 150-60.
109. Lai, F.P., et al., Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to Rho-GTPases. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(14): p. 3209-23.
110. Holmes, W.R., A.E. Carlsson, and L. Edelstein-Keshet, Regimes of wave type patterning driven by refractory actin feedback: transition from static polarization to dynamic wave behaviour. *Phys Biol*, 2012. **9**(4): p. 046005.
111. Ridley, A.J., et al., Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
112. Oh, S.Y., et al., The type III TGFbeta receptor regulates filopodia formation via a Cdc42-mediated IRSp53-N-WASP interaction in epithelial cells. *Biochem J*, 2013. **454**(1): p. 79-89.
113. El-Sibai, M., et al., RhoA/ROCK-mediated switching between Cdc42- and Rac1-dependent protrusion in MTLn3 carcinoma cells. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(7): p. 1540-52.

114. Zhang, Z., et al., IBP regulates epithelial-to-mesenchymal transition and the motility of breast cancer cells via Rac1, RhoA and Cdc42 signaling pathways. *Oncogene*, 2014. **33**(26): p. 3374-82.
115. Gardberg, M., et al., FHOD1, a formin upregulated in epithelial-mesenchymal transition, participates in cancer cell migration and invasion. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74923.
116. Jaiswal, R., et al., The formin Daam1 and fascin directly collaborate to promote filopodia formation. *Curr Biol*, 2013. **23**(14): p. 1373-9.
117. Pettee, K.M., et al., An mDia2/ROCK signaling axis regulates invasive egress from epithelial ovarian cancer spheroids. *PLoS One*, 2014. **9**(2): p. e90371.
118. Takeya, R. and H. Sumimoto, Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via a region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 22): p. 4567-75.
119. Jurmeister, S., et al., MicroRNA-200c represses migration and invasion of breast cancer cells by targeting actin-regulatory proteins FHOD1 and PPM1F. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(3): p. 633-51.
120. Yao, Y., et al., Metadherin regulates proliferation and metastasis via actin cytoskeletal remodelling in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2014. **111**(2): p. 355-64.
121. Ray, A., H. Schatten, and B.K. Ray, Activation of Sp1 and its functional co-operation with serum amyloid A-activating sequence binding factor in synoviocyte cells trigger synergistic action of interleukin-1 and interleukin-6 in serum amyloid A gene expression. *J Biol Chem*, 1999. **274**(7): p. 4300-8.
122. Basquin, C. and N. Sauvonnnet, Phosphoinositide 3-kinase at the crossroad between endocytosis and signaling of cytokine receptors. *Commun Integr Biol*, 2013. **6**(4): p. e24243.
123. Bendris, N., et al., Cyclin A2, a novel regulator of EMT. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(24): p. 4881-94.
124. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 178-96.
125. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
126. Lim, J. and J.P. Thiery, Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development*, 2012. **139**(19): p. 3471-86.
127. Zeisberg, M. and R. Kalluri, Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. **304**(3): p. C216-25.
128. Scheel, C. and R.A. Weinberg, Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(5-6): p. 396-403.
129. Chaffer, C.L., E.W. Thompson, and E.D. Williams, Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*, 2007. **185**(1-3): p. 7-19.
130. Brabletz, T., et al., Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(9): p. 744-9.
131. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
132. Thiery, J.P., et al., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, i) Οι πρωτεΐνες Rho

1. Ridley, A.J. and A. Hall, The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 389-99.
2. Ridley, A.J., et al., The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 1992. **70**(3): p. 401-10.
3. Ridley, A.J., Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(12): p. 471-7.
4. Ridley, A.J., Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, 2001. **114**(Pt 15): p. 2713-22.
5. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. *Nature*, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
6. Raftopoulou, M. and A. Hall, Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, 2004. **265**(1): p. 23-32.
7. Barber, M.A. and H.C. Welch, PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration. *Bull Cancer*, 2006. **93**(5): p. E44-52.
8. Charest, P.G. and R.A. Firtel, Feedback signaling controls leading-edge formation during chemotaxis. *Curr Opin Genet Dev*, 2006. **16**(4): p. 339-47.
9. Madaule, P. and R. Axel, A novel ras-related gene family. *Cell*, 1985. **41**(1): p. 31-40.
10. Bar-Sagi, D. and A. Hall, Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 227-38.
11. Mitin, N., K.L. Rossman, and C.J. Der, Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol*, 2005. **15**(14): p. R563-74.
12. Fransson, S., A. Ruusala, and P. Aspenstrom, The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **344**(2): p. 500-10.
13. Aspenstrom, P., A. Ruusala, and D. Pacholsky, Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res*, 2007. **313**(17): p. 3673-9.
14. Wennerberg, K. and C.J. Der, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.
15. Ridley, A.J., RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc*, 2013. **251**(3): p. 242-9.
16. Nobes, C.D. and A. Hall, Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 1995. **81**(1): p. 53-62.
17. Nobes, C.D. and A. Hall, Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochem Soc Trans*, 1995. **23**(3): p. 456-9.
18. Machesky, L.M. and A. Hall, Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 1996. **6**(8): p. 304-10.
19. Hall, A., Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
20. Kozma, R., et al., The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(4): p. 1942-52.
21. Jaffe, A.B. and A. Hall, Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 247-69.
22. Burridge, K. and K. Wennerberg, *Rho and Rac take center stage*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 167-79.
23. Schmidt, A. and A. Hall, Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*, 2002. **16**(13): p. 1587-609.
24. Mertens, A.E., R.C. Roovers, and J.G. Collard, *Regulation of Tiam1-Rac signalling*. *FEBS Lett*, 2003. **546**(1): p. 11-6.
25. Meller, N., S. Merlot, and C. Guda, *CZH proteins: a new family of Rho-GEFs*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 21): p. 4937-46.
26. Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek, GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(2): p. 167-80.
27. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 865-77.
28. Cote, J.F. and K. Vuori, GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(8): p. 383-93.
29. Bernards, A., GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1603**(2): p. 47-82.
30. Moon, S.Y. and Y. Zheng, Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(1): p. 13-22.
31. Tcherkezian, J. and N. Lamarche-Vane, Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*, 2007. **99**(2): p. 67-86.

32. Takahashi, K., et al., Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem*, 1997. **272**(37): p. 23371-5.
33. Olofsson, B., Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*, 1999. **11**(8): p. 545-54.
34. Sahai, E. and C.J. Marshall, *RHO-GTPases and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(2): p. 133-42.
35. Yamashita, T. and M. Tohyama, The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci*, 2003. **6**(5): p. 461-7.
36. Dovas, A. and J.R. Couchman, RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J*, 2005. **390**(Pt 1): p. 1-9.
37. Zheng, Y., Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci*, 2001. **26**(12): p. 724-32.
38. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(7): p. 356-63.
39. Ridley, A.J., Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*, 2006. **16**(10): p. 522-9.
40. Vega, F.M. and A.J. Ridley, Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett*, 2008. **582**(14): p. 2093-101.
41. Bishop, A.L. and A. Hall, Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
42. Eden, S., et al., Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*, 2002. **418**(6899): p. 790-3.
43. Ho, H.Y., et al., Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*, 2004. **118**(2): p. 203-16.
44. Haga, R.B. and A.J. Ridley, Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*, 2016. **7**(4): p. 207-221.
45. Thumkeo, D., S. Watanabe, and S. Narumiya, Physiological roles of Rho and Rho effectors in mammals. *Eur J Cell Biol*, 2013. **92**(10-11): p. 303-15.
46. Wheeler, A.P. and A.J. Ridley, Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*, 2004. **301**(1): p. 43-9.
47. Vega, F.M. and A.J. Ridley, The RhoB small GTPase in physiology and disease. *Small GTPases*, 2018. **9**(5): p. 384-393.
48. Kersey, P.J., et al., Ensembl Genomes 2016: more genomes, more complexity. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(D1): p. D574-80.
49. Stelzer, G., et al., The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016. **54**: p. 1 30 1-1 30 33.
50. Adamson, P., H.F. Paterson, and A. Hall, Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*, 1992. **119**(3): p. 617-27.
51. Zalcman, G., et al., Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene*, 1995. **10**(10): p. 1935-45.
52. Mellor, H., et al., PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB. *J Biol Chem*, 1998. **273**(9): p. 4811-4.
53. Gampel, A., P.J. Parker, and H. Mellor, Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB. *Curr Biol*, 1999. **9**(17): p. 955-8.
54. Sandilands, E., et al., RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell*, 2004. **7**(6): p. 855-69.
55. Wherlock, M., et al., Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 15): p. 3221-31.
56. Fernandez-Borja, M., et al., RhoB regulates endosome transport by promoting actin assembly on endosomal membranes through Dia1. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 12): p. 2661-70.
57. Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman, The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 1995. **81**(7): p. 1159-70.
58. Prendergast, G.C., et al., Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene*, 1995. **10**(12): p. 2289-96.
59. Qiu, R.G., et al., A role for Rho in Ras transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(25): p. 11781-5.
60. Yamamoto, M., et al., ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene*, 1993. **8**(6): p. 1449-55.
61. Olson, M.F., A. Ashworth, and A. Hall, An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, 1995. **269**(5228): p. 1270-2.

62. Stasia, M.J., et al., ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum* and effect on the cell motility. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **180**(2): p. 615-22.
63. Fukata, M., M. Nakagawa, and K. Kaibuchi, Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(5): p. 590-7.
64. Braga, V.M. and A.S. Yap, The challenges of abundance: epithelial junctions and small GTPase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 466-74.
65. Braga, V.M., et al., The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 1997. **137**(6): p. 1421-31.
66. Takaishi, K., et al., Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*, 1997. **139**(4): p. 1047-59.
67. Prendergast, G.C., Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(2): p. 162-8.
68. Yoon, Y.S., et al., RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(1): p. 164-9.
69. Ho, T.T., et al., RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem*, 2008. **283**(31): p. 21588-98.
70. Vega, F.M., et al., RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol*, 2011. **193**(4): p. 655-65.
71. Marcos-Ramiro, B., et al., RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. *J Cell Biol*, 2016. **213**(3): p. 385-402.
72. Nomikou, E., C. Stournaras, and D. Kardassis, Functional analysis of the promoters of the small GTPases RhoA and RhoB in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **491**(3): p. 754-759.
73. Fritz, G. and B. Kaina, rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30637-44.
74. Heasman, S.J. and A.J. Ridley, Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(9): p. 690-701.
75. Nomikou, E., et al., Transcriptional and post-transcriptional regulation of the genes encoding the small GTPases RhoA, RhoB, and RhoC: implications for the pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(12): p. 2111-2124.
76. Ridley, A.J., et al., Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
77. Fife, C.M., J.A. McCarroll, and M. Kavallaris, Movers and shakers: cell cytoskeleton in cancer metastasis. *Br J Pharmacol*, 2014. **171**(24): p. 5507-23.
78. Campellone, K.G. and M.D. Welch, A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(4): p. 237-51.
79. Firat-Karalar, E.N. and M.D. Welch, New mechanisms and functions of actin nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(1): p. 4-13.
80. Dominguez, R., Actin filament nucleation and elongation factors--structure-function relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009. **44**(6): p. 351-66.
81. Schonichen, A. and M. Geyer, Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1803**(2): p. 152-63.
82. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 2003. **112**(4): p. 453-65.
83. dos Remedios, C.G., et al., Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 2003. **83**(2): p. 433-73.
84. Bamburg, J.R. and B.W. Bernstein, Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 Biol Rep*, 2010. **2**: p. 62.
85. Hanna, S. and M. El-Sibai, Signaling networks of Rho GTPases in cell motility. *Cell Signal*, 2013. **25**(10): p. 1955-61.
86. Huang, M. and G.C. Prendergast, *RhoB in cancer suppression*. *Histol Histopathol*, 2006. **21**(2): p. 213-8.
87. Sanz-Moreno, V. and C.J. Marshall, The plasticity of cytoskeletal dynamics underlying neoplastic cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(5): p. 690-6.
88. Ridley, A.J., Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. **36**: p. 103-12.
89. Paluch, E.K. and E. Raz, The role and regulation of blebs in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2013. **25**(5): p. 582-90.
90. Paterson, E.K. and S.A. Courtneidge, Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J*, 2018. **285**(1): p. 8-27.

91. Friedl, P. and K. Wolf, Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(5): p. 362-74.
92. Pankova, K., et al., The molecular mechanisms of transition between mesenchymal and amoeboid invasiveness in tumor cells. *Cell Mol Life Sci*, 2010. **67**(1): p. 63-71.
93. Ridley, A.J., Life at the leading edge. *Cell*, 2011. **145**(7): p. 1012-22.
94. Wang, H.R., et al., Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1775-9.
95. Zhang, Y., H.R. Wang, and J.L. Wrana, Smurf1: a link between cell polarity and ubiquitination. *Cell Cycle*, 2004. **3**(4): p. 391-2.
96. Pertz, O., Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 11): p. 1841-50.
97. Hall, A., Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 5): p. 891-5.
98. Riento, K. and A.J. Ridley, Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(6): p. 446-56.
99. Hotulainen, P. and P. Lappalainen, Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*, 2006. **173**(3): p. 383-94.
100. Gupton, S.L., et al., mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 19): p. 3475-87.
101. Worthylake, R.A. and K. Burridge, RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem*, 2003. **278**(15): p. 13578-84.
102. Itoh, R.E., et al., Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(18): p. 6582-91.
103. Merlot, S. and R.A. Firtel, Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 17): p. 3471-8.
104. Ten Klooster, J.P., et al., Interaction between Tiam1 and the Arp2/3 complex links activation of Rac to actin polymerization. *Biochem J*, 2006. **397**(1): p. 39-45.
105. Riento, K., et al., RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(12): p. 4219-29.
106. Yamana, N., et al., The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(18): p. 6844-58.
107. Watanabe, T., et al., Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell*, 2004. **7**(6): p. 871-83.
108. Etienne-Manneville, S., Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1291-300.
109. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
110. Ridley, A., Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J Cell Biol*, 2000. **150**(4): p. F107-9.
111. Linder, S. and M. Aepfelbacher, Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*, 2003. **13**(7): p. 376-85.
112. Ehrlich, J.S., M.D. Hansen, and W.J. Nelson, Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell*, 2002. **3**(2): p. 259-70.
113. Wallace, S.W., et al., Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(17): p. 2996-3006.
114. Baum, B. and M. Georgiou, Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*, 2011. **192**(6): p. 907-17.
115. Takaishi, K., et al., Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene*, 1994. **9**(1): p. 273-9.
116. Bhowmick, N.A., et al., Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, 2001. **12**(1): p. 27-36.
117. Sahai, E. and C.J. Marshall, ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(6): p. 408-15.
118. Sahai, E. and C.J. Marshall, Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(8): p. 711-9.
119. Lawson, C.D. and A.J. Ridley, Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol*, 2018. **217**(2): p. 447-457.
120. Gachet, Y., et al., A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature*, 2001. **412**(6844): p. 352-5.
121. Karlsson, R., et al., Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1796**(2): p. 91-8.

122. Jansen, S., et al., Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond. *Pharmacol Ther*, 2018. **183**: p. 1-21.
123. Benitah, S.A., et al., Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1705**(2): p. 121-32.
124. Aronheim, A., et al., Chp, a homologue of the GTPase Cdc42Hs, activates the JNK pathway and is implicated in reorganizing the actin cytoskeleton. *Curr Biol*, 1998. **8**(20): p. 1125-8.
125. Gomez del Pulgar, T., et al., Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *Bioessays*, 2005. **27**(6): p. 602-13.
126. Gouw, L.G., et al., Expression of the Rho-family GTPase gene RHOF in lymphocyte subsets and malignant lymphomas. *Br J Haematol*, 2005. **129**(4): p. 531-3.
127. Merajver, S.D. and S.Z. Usmani, Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2005. **10**(4): p. 291-8.
128. Fukui, K., et al., Expression and prognostic role of RhoA GTPases in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2006. **132**(10): p. 627-33.
129. Li, X.R., et al., Overexpression of RhoA is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 2006. **32**(10): p. 1130-4.
130. Ridley, A.J., *Rho proteins and cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **84**(1): p. 13-9.
131. Abraham, M.T., et al., Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *Laryngoscope*, 2001. **111**(7): p. 1285-9.
132. Fritz, G., I. Just, and B. Kaina, Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 682-7.
133. Horiuchi, A., et al., Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest*, 2003. **83**(6): p. 861-70.
134. Pan, Y., et al., Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **315**(3): p. 686-91.
135. Faried, A., et al., Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 2007. **14**(12): p. 3593-601.
136. Kamai, T., et al., Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(7): p. 2632-41.
137. Kamai, T., et al., Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(14): p. 4799-805.
138. Fritz, G., et al., Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*, 2002. **87**(6): p. 635-44.
139. Jiang, K., et al., Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(12): p. 5565-76.
140. Allal, C., et al., Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle*, 2002. **1**(6): p. 430-7.
141. Kleer, C.G., et al., RhoC GTPase expression as a potential marker of lymph node metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(15): p. 4485-90.
142. Mokady, D. and D. Meiri, RhoGTPases - A novel link between cytoskeleton organization and cisplatin resistance. *Drug Resist Updat*, 2015. **19**: p. 22-32.
143. Guan, X., S. Chen, and Y. Zhao, The role of RhoC in malignant tumor invasion, metastasis and targeted therapy. *Histol Histopathol*, 2018. **33**(3): p. 255-260.
144. Suwa, H., et al., Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer*, 1998. **77**(1): p. 147-52.
145. van Golen, K.L., et al., A novel putative low-affinity insulin-like growth factor-binding protein, LIBC (lost in inflammatory breast cancer), and RhoC GTPase correlate with the inflammatory breast cancer phenotype. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(9): p. 2511-9.
146. Kleer, C.G., et al., RhoC-GTPase is a novel tissue biomarker associated with biologically aggressive carcinomas of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, 2005. **93**(2): p. 101-10.
147. Lang, S., et al., Specific role of RhoC in tumor invasion and metastasis. *Oncotarget*, 2017. **8**(50): p. 87364-87378.
148. Xu, X.D., et al., Anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of breast cancer cells via modulating the KAI1, MMP9, and CXCR4 expression. *Onco Targets Ther*, 2017. **10**: p. 1827-1834.
149. Marionnet, C., et al., Differential molecular profiling between skin carcinomas reveals four newly reported genes potentially implicated in squamous cell carcinoma development. *Oncogene*, 2003. **22**(22): p. 3500-5.
150. Iizumi, M., et al., RhoC promotes metastasis via activation of the Pyk2 pathway in prostate cancer. *Cancer Res*, 2008. **68**(18): p. 7613-20.

151. Wang, W., et al., Genomic analysis reveals RhoC as a potential marker in hepatocellular carcinoma with poor prognosis. *Br J Cancer*, 2004. **90**(12): p. 2349-55.
152. Kondo, T., et al., Expression of RHOC is associated with metastasis of gastric carcinomas. *Pathobiology*, 2004. **71**(1): p. 19-25.
153. Shikada, Y., et al., Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(14): p. 5282-6.
154. Wu, M., et al., RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **84**(1): p. 3-12.
155. Hakem, A., et al., RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev*, 2005. **19**(17): p. 1974-9.
156. Bellovin, D.I., et al., Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene*, 2006. **25**(52): p. 6959-67.
157. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 2007. **449**(7163): p. 682-8.
158. Jordan, P., et al., Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors. *Oncogene*, 1999. **18**(48): p. 6835-9.
159. Malliri, A., et al., Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature*, 2002. **417**(6891): p. 867-71.
160. Hwang, S.L., et al., Rac1 gene mutations in human brain tumours. *Eur J Surg Oncol*, 2004. **30**(1): p. 68-72.
161. Kissil, J.L., et al., Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8089-94.
162. Sander, E.E., et al., Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*, 1999. **147**(5): p. 1009-22.
163. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 6): p. 727-35.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίου: Σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό και ελέγχονται από τον επιγενετικό παράγοντα KDM2B, ii) Το Σηματοδοτικό Μονοπάτι FAK/PI3K/Rac1/AKT/SGK1

1. Rao, J., Targeting actin remodeling profiles for the detection and management of urothelial cancers-- a perspective for bladder cancer research. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. e1-8.
2. Vandekerckhove, J., et al., Coexpression of a mutant beta-actin and the two normal beta- and gamma-cytoplasmic actins in a stably transformed human cell line. *Cell*, 1980. **22**(3): p. 893-9.
3. Sadano, H., et al., cDNA cloning and sequence of a new type of actin in mouse B16 melanoma. *J Biol Chem*, 1988. **263**(31): p. 15868-71.
4. Shieh, D.B., et al., Cell motility as a prognostic factor in Stage I nonsmall cell lung carcinoma: the role of gelsolin expression. *Cancer*, 1999. **85**(1): p. 47-57.
5. Adam, L., et al., Regulation of microfilament reorganization and invasiveness of breast cancer cells by kinase dead p21-activated kinase-1. *J Biol Chem*, 2000. **275**(16): p. 12041-50.
6. Janke, J., et al., Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med*, 2000. **191**(10): p. 1675-86.
7. Martoglio, A.M., et al., Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays. *Mol Med*, 2000. **6**(9): p. 750-65.
8. Somlyo, A.V., et al., Rho-kinase inhibitor retards migration and in vivo dissemination of human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(3): p. 652-9.
9. Winston, J.S., et al., Downregulation of gelsolin correlates with the progression to breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*, 2001. **65**(1): p. 11-21.
10. Kaneda, A., et al., Reduced expression of the insulin-induced protein 1 and p41 Arp2/3 complex genes in human gastric cancers. *Int J Cancer*, 2002. **100**(1): p. 57-62.
11. Visapaa, H., et al., Correlation of Ki-67 and gelsolin expression to clinical outcome in renal clear cell carcinoma. *Urology*, 2003. **61**(4): p. 845-50.
12. Yoshioka, K., et al., A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(12): p. 7247-52.
13. Ridley, A.J., *Rho proteins and cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **84**(1): p. 13-9.
14. Hanks, S.K., et al., Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(18): p. 8487-91.
15. Lipfert, L., et al., Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets. *J Cell Biol*, 1992. **119**(4): p. 905-12.
16. Zachary, I., J. Sinnett-Smith, and E. Rozengurt, Bombesin, vasopressin, and endothelin stimulation of tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Identification of a novel tyrosine kinase as a major substrate. *J Biol Chem*, 1992. **267**(27): p. 19031-4.
17. Kanner, S.B., et al., Monoclonal antibodies to individual tyrosine-phosphorylated protein substrates of oncogene-encoded tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(9): p. 3328-32.
18. Zachary, I., *Focal adhesion kinase*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1997. **29**(7): p. 929-34.
19. Burridge, K., C.E. Turner, and L.H. Romer, Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol*, 1992. **119**(4): p. 893-903.
20. Guan, J.L. and D. Shalloway, Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature*, 1992. **358**(6388): p. 690-2.
21. Kornberg, L., et al., Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 1992. **267**(33): p. 23439-42.
22. Schaller, M.D., et al., pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(11): p. 5192-6.
23. Cukierman, E., et al., Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001. **294**(5547): p. 1708-12.
24. Cary, L.A. and J.L. Guan, Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci*, 1999. **4**: p. D102-13.
25. Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg, *Signaling through focal adhesion kinase*. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999. **71**(3-4): p. 435-78.
26. Schlaepfer, D.D., et al., Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, 1994. **372**(6508): p. 786-91.
27. Schlaepfer, D.D., S.K. Mitra, and D. Ilic, Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1692**(2-3): p. 77-102.

28. Guan, J.L., J.E. Trevithick, and R.O. Hynes, Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul*, 1991. **2**(11): p. 951-64.
29. Akiyama, S.K., et al., Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. *J Biol Chem*, 1994. **269**(23): p. 15961-4.
30. Lukashev, M.E., D. Sheppard, and R. Pytela, Disruption of integrin function and induction of tyrosine phosphorylation by the autonomously expressed beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 1994. **269**(28): p. 18311-4.
31. Tanaka, C. and Y. Nishizuka, The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci*, 1994. **17**: p. 551-67.
32. Siciliano, J.C., et al., Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase beta (PYK2/CAKbeta) and pp125(FAK) by glutamate and depolarization in rat hippocampus. *J Biol Chem*, 1996. **271**(46): p. 28942-6.
33. Millan, A., et al., Glutamate activates PP125(FAK) through AMPA/kainate receptors in Bergmann glia. *J Neurosci Res*, 2001. **66**(4): p. 723-9.
34. Li, R., et al., CD44-initiated cell spreading induces Pyk2 phosphorylation, is mediated by Src family kinases, and is negatively regulated by CD45. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 28767-73.
35. Kohno, M., et al., CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *Int J Cancer*, 2002. **97**(3): p. 336-43.
36. Budagian, V., et al., Reverse signaling through membrane-bound interleukin-15. *J Biol Chem*, 2004. **279**(40): p. 42192-201.
37. Papakonstanti, E.A., et al., A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(5): p. 870-81.
38. Mizutani, T., et al., Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor in MA-10 cells leads to the tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase by a pathway that involves Src family kinases. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(3): p. 619-30.
39. Planas-Silva, M.D., et al., Role of c-Src and focal adhesion kinase in progression and metastasis of estrogen receptor-positive breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **341**(1): p. 73-81.
40. Brunton, V.G., et al., A role for epidermal growth factor receptor, c-Src and focal adhesion kinase in an in vitro model for the progression of colon cancer. *Oncogene*, 1997. **14**(3): p. 283-93.
41. Meierjohann, S., et al., The oncogenic epidermal growth factor receptor variant Xiphophorus melanoma receptor kinase induces motility in melanocytes by modulation of focal adhesions. *Cancer Res*, 2006. **66**(6): p. 3145-52.
42. Matsumoto, K., et al., Hepatocyte growth factor/scatter factor induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase (p125FAK) and promotes migration and invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem*, 1994. **269**(50): p. 31807-13.
43. Chevalier, S., et al., Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. **189**(1-2): p. 169-79.
44. Rankin, S. and E. Rozengurt, Platelet-derived growth factor modulation of focal adhesion kinase (p125FAK) and paxillin tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. Bell-shaped dose response and cross-talk with bombesin. *J Biol Chem*, 1994. **269**(1): p. 704-10.
45. Abedi, H. and I. Zachary, Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997. **272**(24): p. 15442-51.
46. Korah, R., et al., Expression of FGF-2 alters focal adhesion dynamics in migration-restricted MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **88**(1): p. 17-28.
47. Rodriguez-Fernandez, J.L., Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK? *Bioessays*, 1999. **21**(12): p. 1069-75.
48. Schaller, M.D., Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1540**(1): p. 1-21.
49. Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(1): p. 56-68.
50. McLean, G.W., et al., The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(7): p. 505-15.
51. Sieg, D.J., C.R. Hauck, and D.D. Schlaepfer, Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 16): p. 2677-91.
52. Mitra, S.K., et al., Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors. *Oncogene*, 2006. **25**(44): p. 5969-84.
53. Skuli, N., et al., Alpha5beta3/alpha5beta5 integrins-FAK-RhoB: a novel pathway for hypoxia regulation in glioblastoma. *Cancer Res*, 2009. **69**(8): p. 3308-16.

54. Frisch, S.M., et al., Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol*, 1996. **134**(3): p. 793-9.
55. Sonoda, Y., et al., Anti-apoptotic role of focal adhesion kinase (FAK). Induction of inhibitor-of-apoptosis proteins and apoptosis suppression by the overexpression of FAK in a human leukemic cell line, HL-60. *J Biol Chem*, 2000. **275**(21): p. 16309-15.
56. Hauck, C.R., et al., FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J*, 2002. **21**(23): p. 6289-302.
57. Schwock, J., N. Dhani, and D.W. Hedley, Targeting focal adhesion kinase signaling in tumor growth and metastasis. *Expert Opin Ther Targets*, 2010. **14**(1): p. 77-94.
58. Golubovskaya, V.M., F.A. Kweh, and W.G. Cance, *Focal adhesion kinase and cancer*. *Histol Histopathol*, 2009. **24**(4): p. 503-10.
59. Westhoff, M.A., et al., SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(18): p. 8113-33.
60. Weiner, T.M., et al., Expression of focal adhesion kinase gene and invasive cancer. *Lancet*, 1993. **342**(8878): p. 1024-5.
61. Owens, L.V., et al., Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in the vascular smooth muscle cells of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg*, 2001. **34**(2): p. 344-9.
62. Okamoto, H., et al., PTK2 and EIF3S3 genes may be amplification targets at 8q23-q24 and are associated with large hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 2003. **38**(5): p. 1242-9.
63. Park, J.H., et al., Focal adhesion kinase (FAK) gene amplification and its clinical implications in gastric cancer. *Hum Pathol*, 2010. **41**(12): p. 1664-73.
64. Hess, A.R., et al., Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype. *Cancer Res*, 2005. **65**(21): p. 9851-60.
65. Pylayeva, Y., et al., Ras- and PI3K-dependent breast tumorigenesis in mice and humans requires focal adhesion kinase signaling. *J Clin Invest*, 2009. **119**(2): p. 252-66.
66. Jones, G., et al., PTEN-independent induction of caspase-mediated cell death and reduced invasion by the focal adhesion targeting domain (FAT) in human astrocytic brain tumors which highly express focal adhesion kinase (FAK). *Cancer Res*, 2001. **61**(15): p. 5688-91.
67. Cance, W.G., et al., Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(6): p. 2417-23.
68. Garcia, S., et al., Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int J Oncol*, 2007. **31**(1): p. 49-58.
69. Judson, P.L., et al., Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer*, 1999. **86**(8): p. 1551-6.
70. Gabriel, B., et al., Weak expression of focal adhesion kinase (pp125FAK) in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(8): p. 2476-83.
71. Owens, L.V., et al., Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*, 1995. **55**(13): p. 2752-5.
72. Livasy, C.A., et al., Focal adhesion kinase overexpression in endometrial neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2004. **12**(4): p. 342-5.
73. Miyazaki, T., et al., FAK overexpression is correlated with tumour invasiveness and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2003. **89**(1): p. 140-5.
74. Su, J.M., et al., Expression of focal adhesion kinase and alpha5 and beta1 integrins in carcinomas and its clinical significance. *World J Gastroenterol*, 2002. **8**(4): p. 613-8.
75. Canel, M., et al., Overexpression of focal adhesion kinase in head and neck squamous cell carcinoma is independent of fak gene copy number. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(11 Pt 1): p. 3272-9.
76. Fujii, T., et al., Focal adhesion kinase is overexpressed in hepatocellular carcinoma and can be served as an independent prognostic factor. *J Hepatol*, 2004. **41**(1): p. 104-11.
77. Rodrigo, J.P., et al., Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with laryngeal premalignancy. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011. **4**(8): p. 1333-41.
78. Carelli, S., et al., Up-regulation of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2006. **53**(3): p. 263-71.
79. Hsu, N.Y., et al., Prognostic significance of expression of nm23-H1 and focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 2007. **18**(1): p. 81-5.
80. Furuyama, K., et al., Clinical significance of focal adhesion kinase in resectable pancreatic cancer. *World J Surg*, 2006. **30**(2): p. 219-26.
81. Tremblay, L., et al., Focal adhesion kinase (pp125FAK) expression, activation and association with paxillin and p50CSK in human metastatic prostate carcinoma. *Int J Cancer*, 1996. **68**(2): p. 164-71.

82. Kim, S.J., et al., Increased expression of focal adhesion kinase in thyroid cancer: immunohistochemical study. *J Korean Med Sci*, 2004. **19**(5): p. 710-5.
83. Zhang, X., et al., Focal adhesion kinase promotes phospholipase C-gamma1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9021-6.
84. Schlaepfer, D.D., K.C. Jones, and T. Hunter, Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(5): p. 2571-85.
85. Han, D.C. and J.L. Guan, Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*, 1999. **274**(34): p. 24425-30.
86. Goicoechea, S.M., et al., Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(7): p. 791-805.
87. Chen, H.C., et al., Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 1996. **271**(42): p. 26329-34.
88. Sieg, D.J., et al., FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(5): p. 249-56.
89. Chen, H.C. and J.L. Guan, Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(21): p. 10148-52.
90. Akagi, T., et al., v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(20): p. 7015-23.
91. Hanks, S.K., et al., Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. d982-96.
92. Gu, S., et al., Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 114.
93. Schaller, M.D., Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
94. Lu, Q. and S. Rounds, Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis. *Microvasc Res*, 2012. **83**(1): p. 56-63.
95. Kratimenos, P., et al., Multi-targeted molecular therapeutic approach in aggressive neuroblastoma: the effect of Focal Adhesion Kinase-Src-Paxillin system. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. **18**(12): p. 1395-406.
96. Vanhaesebroeck, B., et al., Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem*, 2001. **70**: p. 535-602.
97. Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley, *Phosphoinositide kinases*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 481-507.
98. Vanhaesebroeck, B. and M.D. Waterfield, Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*, 1999. **253**(1): p. 239-54.
99. Cantley, L.C., The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
100. Vanhaesebroeck, B., et al., The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(5): p. 329-41.
101. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1784**(1): p. 150-8.
102. Park, S., et al., Role of the PI3K/AKT and mTOR signaling pathways in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 2010. **95**(5): p. 819-28.
103. Geering, B., et al., Class IA phosphoinositide 3-kinases are obligate p85-p110 heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(19): p. 7809-14.
104. Beitz, L.O., et al., SYK is upstream of phosphoinositide 3-kinase in B cell receptor signaling. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 32662-6.
105. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
106. Gunzl, P. and G. Schabbauer, Recent advances in the genetic analysis of PTEN and PI3K innate immune properties. *Immunobiology*, 2008. **213**(9-10): p. 759-65.
107. Wymann, M.P. and L. Pirola, Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1436**(1-2): p. 127-50.
108. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(7): p. 489-501.
109. Paez, J. and W.R. Sellers, PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res*, 2003. **115**: p. 145-67.
110. Liu, Z. and T.M. Roberts, Human tumor mutants in the p110alpha subunit of PI3K. *Cell Cycle*, 2006. **5**(7): p. 675-7.

111. Horn, S., et al., Mutations in the catalytic subunit of class IA PI3K confer leukemogenic potential to hematopoietic cells. *Oncogene*, 2008. **27**(29): p. 4096-106.
112. Ligresti, G., et al., PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches. *Cell Cycle*, 2009. **8**(9): p. 1352-8.
113. Samuels, Y. and T. Waldman, Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010. **347**: p. 21-41.
114. Lee, J.W., et al., PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene*, 2005. **24**(8): p. 1477-80.
115. Philp, A.J., et al., The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res*, 2001. **61**(20): p. 7426-9.
116. Mizoguchi, M., et al., Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol*, 2004. **14**(4): p. 372-7.
117. Osaki, M., M. Oshimura, and H. Ito, PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*, 2004. **9**(6): p. 667-76.
118. Manning, B.D. and L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
119. Staal, S.P., Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(14): p. 5034-7.
120. Bellacosa, A., et al., A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, 1991. **254**(5029): p. 274-7.
121. Coffey, P.J. and J.R. Woodgett, Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, 1991. **201**(2): p. 475-81.
122. Jones, P.F., et al., Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(10): p. 4171-5.
123. Downward, J., Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. **10**(2): p. 262-7.
124. Kim, C.S., et al., AKT activation promotes metastasis in a mouse model of follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology*, 2005. **146**(10): p. 4456-63.
125. Mandal, M., et al., The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br J Cancer*, 2005. **92**(10): p. 1899-905.
126. Carpten, J.D., et al., A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 439-44.
127. Liu, Z., et al., Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. **93**(8): p. 3106-16.
128. Testa, J.R. and A. Bellacosa, AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(20): p. 10983-5.
129. Hill, M.M. and B.A. Hemmings, Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 2002. **93**(2-3): p. 243-51.
130. Fresno Vara, J.A., et al., PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 2004. **30**(2): p. 193-204.
131. Mitsiades, C.S., N. Mitsiades, and M. Koutsilieris, The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets*, 2004. **4**(3): p. 235-56.
132. Chakravarti, A., et al., The prognostic significance of phosphatidylinositol 3-kinase pathway activation in human gliomas. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(10): p. 1926-33.
133. Wang, H., et al., Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest*, 2004. **84**(8): p. 941-51.
134. Mizoguchi, M., et al., Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. **65**(12): p. 1181-8.
135. LoPiccolo, J., et al., Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat*, 2008. **11**(1-2): p. 32-50.
136. Matsutani, T., et al., Akt/protein kinase B overexpression as an accurate prognostic marker in adult diffuse astrocytoma. *Acta Neurochir (Wien)*, 2009. **151**(3): p. 263-8; discussion 268.
137. Fayard, E., et al., Protein kinase B/Akt at a glance. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 24): p. 5675-8.
138. Sabatini, D.M., mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(9): p. 729-34.
139. Skeen, J.E., et al., Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell*, 2006. **10**(4): p. 269-80.

140. Arencibia, J.M., et al., AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1834**(7): p. 1302-21.
141. Lang, F. and P. Cohen, Regulation and physiological roles of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase isoforms. *Sci STKE*, 2001. **2001**(108): p. re17.
142. Webster, M.K., et al., Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(4): p. 2031-40.
143. Waldegger, S., et al., h-sgk serine-threonine protein kinase gene as transcriptional target of transforming growth factor beta in human intestine. *Gastroenterology*, 1999. **116**(5): p. 1081-8.
144. Mizuno, H. and E. Nishida, The ERK MAP kinase pathway mediates induction of SGK (serum- and glucocorticoid-inducible kinase) by growth factors. *Genes Cells*, 2001. **6**(3): p. 261-8.
145. Naray-Fejes-Toth, A., et al., sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial na⁺ channels. *J Biol Chem*, 1999. **274**(24): p. 16973-8.
146. Fagerli, U.M., et al., Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) is a prominent target gene of the transcriptional response to cytokines in multiple myeloma and supports the growth of myeloma cells. *Oncogene*, 2011. **30**(28): p. 3198-206.
147. Waldegger, S., et al., Cloning and characterization of a putative human serine/threonine protein kinase transcriptionally modified during anisotonic and isotonic alterations of cell volume. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(9): p. 4440-5.
148. Leong, M.L., et al., Expression of the serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase, Sgk, is a cell survival response to multiple types of environmental stress stimuli in mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5871-82.
149. Kobayashi, T. and P. Cohen, Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J*, 1999. **339** (Pt 2): p. 319-28.
150. Park, J., et al., Serum and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) is a target of the PI 3-kinase-stimulated signaling pathway. *EMBO J*, 1999. **18**(11): p. 3024-33.
151. Nasir, O., et al., Relative resistance of SGK1 knockout mice against chemical carcinogenesis. *IUBMB Life*, 2009. **61**(7): p. 768-76.
152. Wang, K., et al., SGK1-dependent intestinal tumor growth in APC-deficient mice. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **25**(2-3): p. 271-8.
153. Busjahn, A., et al., Serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK1) gene and blood pressure. *Hypertension*, 2002. **40**(3): p. 256-60.
154. Busjahn, A. and F.C. Luft, Twin studies in the analysis of minor physiological differences between individuals. *Cell Physiol Biochem*, 2003. **13**(1): p. 51-8.
155. Lang, F. and C. Stournaras, Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)*, 2013. **12**(2): p. 160-71.
156. Rao, A.D., et al., Polymorphisms in the serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 gene are associated with blood pressure and renin response to dietary salt intake. *J Hum Hypertens*, 2013. **27**(3): p. 176-80.
157. Dieter, M., et al., Regulation of glucose transporter SGLT1 by ubiquitin ligase Nedd4-2 and kinases SGK1, SGK3, and PKB. *Obes Res*, 2004. **12**(5): p. 862-70.
158. Dahlberg, J., et al., Genetic variants in serum and glucocorticoid regulated kinase 1, a regulator of the epithelial sodium channel, are associated with ischaemic stroke. *J Hypertens*, 2011. **29**(5): p. 884-9.
159. Schwab, M., et al., Association of SGK1 gene polymorphisms with type 2 diabetes. *Cell Physiol Biochem*, 2008. **21**(1-3): p. 151-60.
160. Lang, F., et al., (Patho)physiological significance of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase isoforms. *Physiol Rev*, 2006. **86**(4): p. 1151-78.
161. Lang, F., F. Artunc, and V. Vallon, The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. **18**(5): p. 439-48.
162. Sahoo, S., et al., Coordinate expression of the PI3-kinase downstream effectors serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK-1) and Akt-1 in human breast cancer. *Eur J Cancer*, 2005. **41**(17): p. 2754-9.
163. Eirew, P., et al., Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution. *Nature*, 2015. **518**(7539): p. 422-6.
164. Lang, F., N. Perrotti, and C. Stournaras, Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(10): p. 1571-5.
165. Szmulewitz, R.Z., et al., Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 expression in primary human prostate cancers. *Prostate*, 2012. **72**(2): p. 157-64.

166. Melhem, A., et al., Administration of glucocorticoids to ovarian cancer patients is associated with expression of the anti-apoptotic genes SGK1 and MKP1/DUSP1 in ovarian tissues. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(9): p. 3196-204.
167. Abbruzzese, C., et al., Determination of SGK1 mRNA in non-small cell lung cancer samples underlines high expression in squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012. **31**: p. 4.
168. Yoon, J.W., et al., Defining a role for Sonic hedgehog pathway activation in desmoplastic medulloblastoma by identifying GLI1 target genes. *Int J Cancer*, 2009. **124**(1): p. 109-19.
169. Zhang, L., et al., Antiapoptotic effect of serum and glucocorticoid-inducible protein kinase is mediated by novel mechanism activating I{kappa}B kinase. *Cancer Res*, 2005. **65**(2): p. 457-64.
170. Amato, R., et al., IL-2 signals through Sgk1 and inhibits proliferation and apoptosis in kidney cancer cells. *J Mol Med (Berl)*, 2007. **85**(7): p. 707-21.
171. Amato, R., et al., Sgk1 activates MDM2-dependent p53 degradation and affects cell proliferation, survival, and differentiation. *J Mol Med (Berl)*, 2009. **87**(12): p. 1221-39.
172. Lang, F., A. Gorlach, and V. Vallon, *Targeting SGK1 in diabetes*. *Expert Opin Ther Targets*, 2009. **13**(11): p. 1303-11.
173. Eylenestein, A., et al., Stimulation of Ca²⁺-channel Orai1/STIM1 by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1). *FASEB J*, 2011. **25**(6): p. 2012-21.
174. Borst, O., et al., The serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) influences platelet calcium signaling and function by regulation of Orai1 expression in megakaryocytes. *Blood*, 2012. **119**(1): p. 251-61.
175. Eylenestein, A., et al., Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. *J Biol Chem*, 2012. **287**(4): p. 2719-30.
176. Notch, E.G., et al., Mitogen activated protein kinase 14-1 regulates serum glucocorticoid kinase 1 during seawater acclimation in Atlantic killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2012. **162**(4): p. 443-8.
177. Lang, F. and E. Shumilina, Regulation of ion channels by the serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *FASEB J*, 2013. **27**(1): p. 3-12.
178. Parekh, A.B. and R. Penner, Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, 1997. **77**(4): p. 901-30.
179. Putney, J.W., Jr., Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J Cell Biol*, 2005. **169**(3): p. 381-2.
180. Yeromin, A.V., et al., Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*, 2006. **443**(7108): p. 226-9.
181. Hewavitharana, T., et al., Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium*, 2007. **42**(2): p. 173-82.
182. Ji, W., et al., Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(36): p. 13668-73.
183. Mignen, O., J.L. Thompson, and T.J. Shuttleworth, Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore. *J Physiol*, 2008. **586**(2): p. 419-25.
184. Vig, M., et al., Defective mast cell effector functions in mice lacking the CRACM1 pore subunit of store-operated calcium release-activated calcium channels. *Nat Immunol*, 2008. **9**(1): p. 89-96.
185. Smyth, J.T., et al., Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med*, 2010. **14**(10): p. 2337-49.
186. Roos, J., et al., STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol*, 2005. **169**(3): p. 435-45.
187. Luik, R.M., et al., The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol*, 2006. **174**(6): p. 815-25.
188. Peinelt, C., et al., Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(7): p. 771-3.
189. Wu, M.M., et al., Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol*, 2006. **174**(6): p. 803-13.
190. Penna, A., et al., The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature*, 2008. **456**(7218): p. 116-20.
191. Fahrner, M., et al., Mechanistic view on domains mediating STIM1-Orai coupling. *Immunol Rev*, 2009. **231**(1): p. 99-112.
192. Schindl, R., et al., Recent progress on STIM1 domains controlling Orai activation. *Cell Calcium*, 2009. **46**(4): p. 227-32.
193. Dolmetsch, R.E., K. Xu, and R.S. Lewis, Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, 1998. **392**(6679): p. 933-6.

194. Xie, J., et al., SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives. *Int J Cancer*, 2016. **138**(9): p. 2067-77.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίων: Επιθηλιακά και Μεσεγχοματικά κύτταρα, Επιθηλιο-μεσεγχοματική μετατροπή (EMT) και Μόρια Διακυτταρικής Προσκόλλησης

1. Lillie, F.R., et al., Cooperation in Biological Research. *Science*, 1908. **27**(688): p. 369-86.
2. Shook, D. and R. Keller, Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev*, 2003. **120**(11): p. 1351-83.
3. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(2): p. 131-42.
4. Hay, E.D., The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn*, 2005. **233**(3): p. 706-20.
5. Greenburg, G. and E.D. Hay, Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*, 1982. **95**(1): p. 333-9.
6. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 442-54.
7. Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(6): p. 740-6.
8. Nieto, M.A., Epithelial plasticity: a common theme in embryonic and cancer cells. *Science*, 2013. **342**(6159): p. 1234850.
9. Thiery, J.P., et al., Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 2009. **139**(5): p. 871-90.
10. Huber, M.A., N. Kraut, and H. Beug, Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 548-58.
11. Sumi, T., et al., Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, 2008. **135**(17): p. 2969-79.
12. Grunert, S., M. Jechlinger, and H. Beug, Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(8): p. 657-65.
13. Derynck, R. and R.J. Akhurst, Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(9): p. 1000-4.
14. Tarin, D., E.W. Thompson, and D.F. Newgreen, The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 5996-6000; discussion 6000-1.
15. Cardiff, R.D., Epithelial to Mesenchymal Transition Tumors: Fallacious or Snail's Pace? *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8534-7.
16. Thompson, E.W., D.F. Newgreen, and D. Tarin, Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 5991-5; discussion 5995.
17. Yeung, K.T. and J. Yang, Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol*, 2017. **11**(1): p. 28-39.
18. Stern, C.D., *Vertebrate gastrulation*. *Curr Opin Genet Dev*, 1992. **2**(4): p. 556-61.
19. Stern, C.D., et al., Relationships between mesoderm induction and the embryonic axes in chick and frog embryos. *Dev Suppl*, 1992: p. 151-6.
20. Diepenbruck, M. and G. Christofori, Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe? *Curr Opin Cell Biol*, 2016. **43**: p. 7-13.
21. Gavert, N. and A. Ben-Ze'ev, Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends Mol Med*, 2008. **14**(5): p. 199-209.
22. Acloque, H., et al., Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1438-49.
23. Wu, Y., et al., Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell*, 2009. **15**(5): p. 416-28.
24. Lo, H.W., et al., Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res*, 2007. **67**(19): p. 9066-76.
25. Yang, M.H., et al., Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(3): p. 295-305.
26. Katsuno, Y., S. Lamouille, and R. Derynck, TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*, 2013. **25**(1): p. 76-84.
27. Zhou, B.P., et al., Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(10): p. 931-40.
28. Yook, J.I., et al., Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem*, 2005. **280**(12): p. 11740-8.
29. Clevers, H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 469-80.

30. Cho, R.W., et al., Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem Cells*, 2008. **26**(2): p. 364-71.
31. Dennler, S., et al., Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J*, 1998. **17**(11): p. 3091-100.
32. Hua, X., et al., Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev*, 1998. **12**(19): p. 3084-95.
33. Romano, L.A. and R.B. Runyan, Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol*, 2000. **223**(1): p. 91-102.
34. Comijn, J., et al., The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*, 2001. **7**(6): p. 1267-78.
35. Peinado, H., M. Quintanilla, and A. Cano, Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem*, 2003. **278**(23): p. 21113-23.
36. Peinado, H., F. Portillo, and A. Cano, Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 365-75.
37. Zavadil, J., et al., Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J*, 2004. **23**(5): p. 1155-65.
38. Valcourt, U., et al., TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(4): p. 1987-2002.
39. Vandewalle, C., et al., SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(20): p. 6566-78.
40. Zavadil, J. and E.P. Bottinger, TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, 2005. **24**(37): p. 5764-74.
41. Gotzmann, J., et al., A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene*, 2006. **25**(22): p. 3170-85.
42. Jechlinger, M., et al., Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1561-70.
43. Thuault, S., et al., Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 2006. **174**(2): p. 175-83.
44. Buijs, J.T., et al., TGF-beta and BMP7 interactions in tumour progression and bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*, 2007. **24**(8): p. 609-17.
45. Derynck, R., B.P. Muthusamy, and K.Y. Saetern, Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*, 2014. **31**: p. 56-66.
46. Hooper, J.E. and M.P. Scott, *Communicating with Hedgehogs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(4): p. 306-17.
47. Li, X., et al., Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene*, 2006. **25**(4): p. 609-21.
48. Feldmann, G., et al., Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res*, 2007. **67**(5): p. 2187-96.
49. Jacob, L. and L. Lum, Deconstructing the hedgehog pathway in development and disease. *Science*, 2007. **318**(5847): p. 66-8.
50. Li, X., et al., Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene*, 2007. **26**(31): p. 4489-98.
51. Li, Y., W.P. Hively, and H.E. Varmus, Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene*, 2000. **19**(8): p. 1002-9.
52. Grego-Bessa, J., et al., Notch and epithelial-mesenchyme transition in development and tumor progression: another turn of the screw. *Cell Cycle*, 2004. **3**(6): p. 718-21.
53. Timmerman, L.A., et al., Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*, 2004. **18**(1): p. 99-115.
54. Leong, K.G., et al., Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 2935-48.
55. Sahlgren, C., et al., Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(17): p. 6392-7.
56. Huber, M.A., et al., NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest*, 2004. **114**(4): p. 569-81.
57. Bachelder, R.E., et al., Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 2005. **168**(1): p. 29-33.
58. Julien, S., et al., Activation of NF-kappaB by Akt upregulates Snail expression and induces epithelium mesenchyme transition. *Oncogene*, 2007. **26**(53): p. 7445-56.

59. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 178-96.
60. Gupta, G.P. and J. Massague, Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, 2006. **127**(4): p. 679-95.
61. Tiwari, N., et al., EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(3): p. 194-207.
62. Puisieux, A., T. Brabletz, and J. Caramel, Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nat Cell Biol*, 2014. **16**(6): p. 488-94.
63. Ye, X. and R.A. Weinberg, Epithelial-Mesenchymal Plasticity: A Central Regulator of Cancer Progression. *Trends Cell Biol*, 2015. **25**(11): p. 675-686.
64. Hirano, S., S.T. Suzuki, and C. Redies, The cadherin superfamily in neural development: diversity, function and interaction with other molecules. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. d306-55.
65. Maeda, M., K.R. Johnson, and M.J. Wheelock, Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 5): p. 873-87.
66. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 6): p. 727-35.
67. Tam, W.L. and R.A. Weinberg, The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*, 2013. **19**(11): p. 1438-49.
68. Wang, H.R., et al., Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1775-9.
69. Guaita, S., et al., Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39209-16.
70. Maschler, S., et al., Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene*, 2005. **24**(12): p. 2032-41.
71. Massague, J. and A.C. Obenauf, Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, 2016. **529**(7586): p. 298-306.
72. Klein, C.A., Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(4): p. 302-12.
73. Sosa, M.S., P. Bragado, and J.A. Aguirre-Ghiso, Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer*, 2014. **14**(9): p. 611-22.
74. Chaffer, C.L. and R.A. Weinberg, A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1559-64.
75. Brabletz, T., et al., Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10356-61.
76. Brabletz, T., et al., Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(9): p. 744-9.
77. Rosivatz, E., et al., Expression and nuclear localization of Snail, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch*, 2006. **448**(3): p. 277-87.
78. Tsai, J.H., et al., Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, 2012. **22**(6): p. 725-36.
79. Nieto, M.A., et al., *Emt: 2016*. *Cell*, 2016. **166**(1): p. 21-45.
80. Shaw, T.J. and P. Martin, Wound repair: a showcase for cell plasticity and migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2016. **42**: p. 29-37.
81. Arnoux, V., et al., Erk5 controls Slug expression and keratinocyte activation during wound healing. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(11): p. 4738-49.
82. Hudson, L.G., et al., Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *J Dermatol Sci*, 2009. **56**(1): p. 19-26.
83. Terao, M., et al., Enhanced epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in N-acetylglucosaminyltransferase V transgenic mouse skin promotes wound healing. *J Biol Chem*, 2011. **286**(32): p. 28303-11.
84. Nunan, R., et al., Ephrin-Bs Drive Junctional Downregulation and Actin Stress Fiber Disassembly to Enable Wound Re-epithelialization. *Cell Rep*, 2015. **13**(7): p. 1380-1395.
85. Manhire-Heath, R., et al., Netrin-dependent downregulation of Frazzled/DCC is required for the dissociation of the peripodial epithelium in *Drosophila*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2790.
86. Qi, Q., et al., Netrin-1 exerts oncogenic activities through enhancing Yes-associated protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(23): p. 7255-60.
87. Vaughan, A.E. and H.A. Chapman, Regenerative activity of the lung after epithelial injury. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(7): p. 922-30.

88. Bahri, S., et al., The leading edge during dorsal closure as a model for epithelial plasticity: Pak is required for recruitment of the Scribble complex and septate junction formation. *Development*, 2010. **137**(12): p. 2023-32.
89. Narasimha, M., et al., Grainy head promotes expression of septate junction proteins and influences epithelial morphogenesis. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 6): p. 747-52.
90. Ting, S.B., et al., A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science*, 2005. **308**(5720): p. 411-3.
91. Darido, C. and S.M. Jane, Grhl3 and GEF19 in the front rho. *Small GTPases*, 2010. **1**(2): p. 104-107.
92. Boglev, Y., et al., The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity. *Dev Biol*, 2011. **349**(2): p. 512-22.
93. Leopold, P.L., J. Vincent, and H. Wang, A comparison of epithelial-to-mesenchymal transition and re-epithelialization. *Semin Cancer Biol*, 2012. **22**(5-6): p. 471-83.
94. Xiao, W., et al., Quantitative analysis of injury-induced anterior subcapsular cataract in the mouse: a model of lens epithelial cells proliferation and epithelial-mesenchymal transition. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8362.
95. Qian, L.W., et al., Exacerbated and prolonged inflammation impairs wound healing and increases scarring. *Wound Repair Regen*, 2016. **24**(1): p. 26-34.
96. Halbleib, J.M. and W.J. Nelson, Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*, 2006. **20**(23): p. 3199-214.
97. Hyafil, F., et al., A cell surface glycoprotein involved in the compaction of embryonal carcinoma cells and cleavage stage embryos. *Cell*, 1980. **21**(3): p. 927-34.
98. Hyafil, F., C. Babinet, and F. Jacob, Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell*, 1981. **26**(3 Pt 1): p. 447-54.
99. van Roy, F. and G. Berx, The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(23): p. 3756-88.
100. Blaschuk, O.W., et al., Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol*, 1990. **139**(1): p. 227-9.
101. Shan, W.S., et al., Functional cis-heterodimers of N- and R-cadherins. *J Cell Biol*, 2000. **148**(3): p. 579-90.
102. Shapiro, L., et al., Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*, 1995. **374**(6520): p. 327-37.
103. Patel, S.D., et al., Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell*, 2006. **124**(6): p. 1255-68.
104. Shan, W., et al., The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. *J Biol Chem*, 2004. **279**(53): p. 55914-23.
105. Kim, J.B., et al., N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. *J Cell Biol*, 2000. **151**(6): p. 1193-206.
106. Suyama, K., et al., A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*, 2002. **2**(4): p. 301-14.
107. Parks, A.L. and D. Curtis, Presenilin diversifies its portfolio. *Trends Genet*, 2007. **23**(3): p. 140-50.
108. Ratheesh, A. and A.S. Yap, A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(10): p. 673-9.
109. Berx, G., et al., Cloning and characterization of the human invasion suppressor gene E-cadherin (CDH1). *Genomics*, 1995. **26**(2): p. 281-9.
110. Bussemakers, M.J., et al., The genes for the calcium-dependent cell adhesion molecules P- and E-cadherin are tandemly arranged in the human genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **203**(2): p. 1291-4.
111. Kaupmann, K., et al., The gene for the cell adhesion molecule M-cadherin maps to mouse chromosome 8 and human chromosome 16q24.1-qter and is near the E-cadherin (uvomorulin) locus in both species. *Genomics*, 1992. **14**(2): p. 488-90.
112. Pecina-Slaus, N., Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int*, 2003. **3**(1): p. 17.
113. Larue, L., et al., E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(17): p. 8263-7.
114. Riethmacher, D., V. Brinkmann, and C. Birchmeier, A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(3): p. 855-9.
115. Fleming, T.P., Q. Javed, and M. Hay, Epithelial differentiation and intercellular junction formation in the mouse early embryo. *Dev Suppl*, 1992: p. 105-12.
116. Vestweber, D. and R. Kemler, Rabbit antiserum against a purified surface glycoprotein decompacts mouse preimplantation embryos and reacts with specific adult tissues. *Exp Cell Res*, 1984. **152**(1): p. 169-78.

117. Sefton, M., M.H. Johnson, and L. Clayton, Synthesis and phosphorylation of uvomorulin during mouse early development. *Development*, 1992. **115**(1): p. 313-8.
118. Hulsken, J., W. Birchmeier, and J. Behrens, E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *J Cell Biol*, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2061-9.
119. Barth, A.I., I.S. Nathke, and W.J. Nelson, Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(5): p. 683-90.
120. Morin, P.J., et al., Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
121. Kourtidis, A., et al., A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res*, 2017. **358**(1): p. 78-85.
122. Efstathiou, J.A., et al., Mutated epithelial cadherin is associated with increased tumorigenicity and loss of adhesion and of responsiveness to the motogenic trefoil factor 2 in colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(5): p. 2316-21.
123. Berx, G., et al., Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat*, 1998. **12**(4): p. 226-37.
124. Machado, J.C., et al., E-cadherin gene mutations provide a genetic basis for the phenotypic divergence of mixed gastric carcinomas. *Lab Invest*, 1999. **79**(4): p. 459-65.
125. Birchmeier, W. and J. Behrens, Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1198**(1): p. 11-26.
126. Hirohashi, S., Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol*, 1998. **153**(2): p. 333-9.
127. Guilford, P., E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today*, 1999. **5**(4): p. 172-7.
128. Huiping, C., et al., Chromosome alterations and E-cadherin gene mutations in human lobular breast cancer. *Br J Cancer*, 1999. **81**(7): p. 1103-10.
129. Bukholm, I.K., J.M. Nesland, and A.L. Borresen-Dale, Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [see comments]. *J Pathol*, 2000. **190**(1): p. 15-9.
130. Le Bras, G.F., K.J. Taubenslag, and C.D. Andl, The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal transition, motility and tumor progression. *Cell Adh Migr*, 2012. **6**(4): p. 365-73.
131. Vleminckx, K., et al., Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, 1991. **66**(1): p. 107-19.
132. Frixen, U.H., et al., E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, 1991. **113**(1): p. 173-85.
133. Mareel, M., M. Bracke, and F. Van Roy, Invasion promoter versus invasion suppressor molecules: the paradigm of E-cadherin. *Mol Biol Rep*, 1994. **19**(1): p. 45-67.
134. Perl, A.K., et al., A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*, 1998. **392**(6672): p. 190-3.
135. Strumane, K., G. Berx, and F. Van Roy, *Cadherins in cancer*. *Handb Exp Pharmacol*, 2004(165): p. 69-103.
136. Margineanu, E., C.E. Cotrutz, and C. Cotrutz, Correlation between E-cadherin abnormal expressions in different types of cancer and the process of metastasis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2008. **112**(2): p. 432-6.
137. Berx, G., et al., E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*, 1996. **13**(9): p. 1919-25.
138. Becker, K.F., et al., E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res*, 1994. **54**(14): p. 3845-52.
139. Becker, K.F., et al., Exon skipping in the E-cadherin gene transcript in metastatic human gastric carcinomas. *Hum Mol Genet*, 1993. **2**(6): p. 803-4.
140. Wijnhoven, B.P., et al., E-cadherin gene mutations are rare in adenocarcinomas of the oesophagus. *Br J Cancer*, 1999. **80**(10): p. 1652-7.
141. Taddei, I., et al., Molecular alterations of E-cadherin gene: possible role in human bladder carcinogenesis. *Int J Mol Med*, 2000. **6**(2): p. 201-8.
142. Endo, K., et al., E-cadherin gene mutations in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Pathol*, 2001. **193**(3): p. 310-7.
143. Vecsey-Semjen, B., et al., Novel colon cancer cell lines leading to better understanding of the diversity of respective primary cancers. *Oncogene*, 2002. **21**(30): p. 4646-62.
144. Strathdee, G., Epigenetic versus genetic alterations in the inactivation of E-cadherin. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(5): p. 373-9.

145. Graff, J.R., et al., E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res*, 1995. **55**(22): p. 5195-9.
146. Yoshiura, K., et al., Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7416-9.
147. Chang, H.W., et al., Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer*, 2002. **94**(2): p. 386-92.
148. Kanazawa, T., et al., Poorly differentiated adenocarcinoma and mucinous carcinoma of the colon and rectum show higher rates of loss of heterozygosity and loss of E-cadherin expression due to methylation of promoter region. *Int J Cancer*, 2002. **102**(3): p. 225-9.
149. Fuks, F., et al., DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet*, 2000. **24**(1): p. 88-91.
150. Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin, DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, 2000. **25**(3): p. 269-77.
151. Rahnema, F., et al., Epigenetic regulation of human trophoblastic cell migration and invasion. *Endocrinology*, 2006. **147**(11): p. 5275-83.
152. Rahnema, F., et al., Epigenetic regulation of E-cadherin controls endometrial receptivity. *Endocrinology*, 2009. **150**(3): p. 1466-72.
153. Kautiainen, T.L. and P.A. Jones, DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem*, 1986. **261**(4): p. 1594-8.
154. De Marzo, A.M., et al., Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res*, 1999. **59**(16): p. 3855-60.
155. Eads, C.A., et al., CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res*, 1999. **59**(10): p. 2302-6.
156. Robertson, K.D., et al., The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(11): p. 2291-8.
157. Etoh, T., et al., Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol*, 2004. **164**(2): p. 689-99.
158. Shieh, Y.S., et al., DNA methyltransferase 1 expression and promoter methylation of E-cadherin in mucoepidermoid carcinoma. *Cancer*, 2005. **104**(5): p. 1013-21.
159. Ehrlich, M., et al., Quantitative analysis of associations between DNA hypermethylation, hypomethylation, and DNMT RNA levels in ovarian tumors. *Oncogene*, 2006. **25**(18): p. 2636-45.
160. Oh, B.K., et al., DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med*, 2007. **20**(1): p. 65-73.
161. Arora, P., et al., Hepatitis C virus core protein downregulates E-cadherin expression via activation of DNA methyltransferase 1 and 3b. *Cancer Lett*, 2008. **261**(2): p. 244-52.
162. Graff, J.R., et al., Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, Hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 1998. **58**(10): p. 2063-6.
163. Graff, J.R., et al., Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2727-32.
164. Nieto, M.A., The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(3): p. 155-66.
165. Eger, A., et al., DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 2005. **24**(14): p. 2375-85.
166. Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano, Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(6): p. 415-28.
167. Cheng, C.W., et al., Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene. *Oncogene*, 2001. **20**(29): p. 3814-23.
168. Yang, J., et al., Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 2004. **117**(7): p. 927-39.
169. Blanco, M.J., et al., Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene*, 2002. **21**(20): p. 3241-6.
170. Elloul, S., et al., Snail, Slug, and Smad-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer*, 2005. **103**(8): p. 1631-43.
171. Martin, T.A., et al., Expression of the transcription factors snail, slug, and twist and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 2005. **12**(6): p. 488-96.
172. Fujita, Y., et al., Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(3): p. 222-31.

173. Shen, Y., et al., Cdc42 regulates E-cadherin ubiquitination and degradation through an epidermal growth factor receptor to Src-mediated pathway. *J Biol Chem*, 2008. **283**(8): p. 5127-37.
174. Yang, J.Y., et al., MDM2 promotes cell motility and invasiveness by regulating E-cadherin degradation. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(19): p. 7269-82.
175. Steinhilber, U., et al., Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4972-80.
176. Rios-Doria, J., et al., The role of calpain in the proteolytic cleavage of E-cadherin in prostate and mammary epithelial cells. *J Biol Chem*, 2003. **278**(2): p. 1372-9.
177. Maretzky, T., et al., ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(26): p. 9182-7.
178. Lochter, A., et al., Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells. *J Cell Biol*, 1997. **139**(7): p. 1861-72.
179. Cano, A., et al., The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(2): p. 76-83.
180. Hazan, R.B., et al., Cadherin switch in tumor progression. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1014**: p. 155-63.
181. Ridley, A., Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J Cell Biol*, 2000. **150**(4): p. F107-9.
182. Lozano, E., M. Betson, and V.M. Braga, Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays*, 2003. **25**(5): p. 452-63.
183. Menke, A. and K. Giehl, Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin. *Arch Biochem Biophys*, 2012. **524**(1): p. 48-55.
184. Ehrlich, J.S., M.D. Hansen, and W.J. Nelson, Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell*, 2002. **3**(2): p. 259-70.
185. Braga, V.M., et al., The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol*, 1997. **137**(6): p. 1421-31.
186. Braga, V.M., et al., Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(1): p. 9-22.
187. Sahai, E. and C.J. Marshall, ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(6): p. 408-15.
188. Arthur, W.T., N.K. Noren, and K. Burridge, Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res*, 2002. **35**(2): p. 239-46.
189. Friedl, P. and D. Gilmour, Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(7): p. 445-57.
190. Rorth, P., *Collective cell migration*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **25**: p. 407-29.
191. Theveneau, E. and R. Mayor, Cadherins in collective cell migration of mesenchymal cells. *Curr Opin Cell Biol*, 2012. **24**(5): p. 677-84.
192. Derycke, L.D. and M.E. Bracke, N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 463-76.
193. Hatta, K. and M. Takeichi, Expression of N-cadherin adhesion molecules associated with early morphogenetic events in chick development. *Nature*, 1986. **320**(6061): p. 447-9.
194. Grunwald, G.B., R.S. Pratt, and J. Liliens, Enzymic dissection of embryonic cell adhesive mechanisms. III. Immunological identification of a component of the calcium-dependent adhesive system of embryonic chick neural retina cells. *J Cell Sci*, 1982. **55**: p. 69-83.
195. Volk, T. and B. Geiger, A 135-kd membrane protein of intercellular adherens junctions. *EMBO J*, 1984. **3**(10): p. 2249-60.
196. Wallis, J., M.F. Fox, and F.S. Walsh, Structure of the human N-cadherin gene: YAC analysis and fine chromosomal mapping to 18q11.2. *Genomics*, 1994. **22**(1): p. 172-9.
197. Li, B., N.E. Paradies, and R.W. Brackenbury, Isolation and characterization of the promoter region of the chicken N-cadherin gene. *Gene*, 1997. **191**(1): p. 7-13.
198. Doherty, P. and F.S. Walsh, CAM-FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci*, 1996. **8**(2-3): p. 99-111.
199. Wheelock, M.J. and K.R. Johnson, *Cadherin-mediated cellular signaling*. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(5): p. 509-14.
200. Fedor-Chaikin, M., et al., Two regions of cadherin cytoplasmic domains are involved in suppressing motility of a mammary carcinoma cell line. *J Biol Chem*, 2003. **278**(52): p. 52371-8.
201. Kashima, T., et al., Overexpression of cadherins suppresses pulmonary metastasis of osteosarcoma in vivo. *Int J Cancer*, 2003. **104**(2): p. 147-54.
202. Anastasiadis, P.Z. and A.B. Reynolds, *Regulation of Rho GTPases by p120-catenin*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(5): p. 604-10.

203. Magie, C.R., D. Pinto-Santini, and S.M. Parkhurst, Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development*, 2002. **129**(16): p. 3771-82.
204. Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn, N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res*, 2001. **61**(9): p. 3819-25.
205. Tran, N.L., et al., Signal transduction from N-cadherin increases Bcl-2. Regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by homophilic adhesion and actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem*, 2002. **277**(36): p. 32905-14.
206. Kamei, J., T. Toyofuku, and M. Hori, Negative regulation of p21 by beta-catenin/TCF signaling: a novel mechanism by which cell adhesion molecules regulate cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **312**(2): p. 380-7.
207. Oda, H., S. Tsukita, and M. Takeichi, Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation. *Dev Biol*, 1998. **203**(2): p. 435-50.
208. Ackland, M.L., et al., Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. *Lab Invest*, 2003. **83**(3): p. 435-48.
209. Islam, S., et al., Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, 1996. **135**(6 Pt 1): p. 1643-54.
210. Hazan, R.B., et al., N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes Commun*, 1997. **4**(6): p. 399-411.
211. Hazan, R.B., et al., Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol*, 2000. **148**(4): p. 779-90.
212. Tomita, K., et al., Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res*, 2000. **60**(13): p. 3650-4.
213. Yanagimoto, K., et al., Co-expression of N-cadherin and alpha-fetoprotein in stomach cancer. *Pathol Int*, 2001. **51**(8): p. 612-8.
214. Matsuyoshi, N., et al., Identification of novel cadherins expressed in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 1997. **108**(6): p. 908-13.
215. Sanders, D.S., et al., Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol*, 1999. **52**(3): p. 151-7.
216. Kawamura-Kodama, K., et al., N-cadherin expressed on malignant T cell lymphoma cells is functional, and promotes heterotypic adhesion between the lymphoma cells and mesenchymal cells expressing N-cadherin. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(1): p. 62-6.
217. Willott, E., et al., The tight junction protein ZO-1 is homologous to the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(16): p. 7834-8.
218. Woods, D.F. and P.J. Bryant, ZO-1, DlgA and PSD-95/SAP90: homologous proteins in tight, septate and synaptic cell junctions. *Mech Dev*, 1993. **44**(2-3): p. 85-9.
219. Itoh, M., et al., Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J Cell Biol*, 1997. **138**(1): p. 181-92.
220. Fanning, A.S. and J.M. Anderson, Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol*, 1999. **11**(4): p. 432-9.
221. Fanning, A.S. and J.M. Anderson, Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1165**: p. 113-20.
222. Islas, S., et al., Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res*, 2002. **274**(1): p. 138-48.
223. Traweger, A., et al., The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2692-700.
224. Jaramillo, B.E., et al., Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp Cell Res*, 2004. **297**(1): p. 247-58.
225. Bauer, H., et al., The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol*, 2010. **2010**: p. 402593.
226. Shen, L., Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. **1258**: p. 9-18.
227. Stevenson, B.R., et al., Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, 1986. **103**(3): p. 755-66.
228. Gumbiner, B., T. Lowenkopf, and D. Apatira, Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(8): p. 3460-4.
229. Jesaitis, L.A. and D.A. Goodenough, Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol*, 1994. **124**(6): p. 949-61.

230. Haskins, J., et al., ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*, 1998. **141**(1): p. 199-208.
231. Balda, M.S., M.D. Garrett, and K. Matter, The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*, 2003. **160**(3): p. 423-32.
232. Runkle, E.A. and D. Mu, Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis. *Cancer Lett*, 2013. **337**(1): p. 41-8.
233. Van Itallie, C.M., et al., The N and C termini of ZO-1 are surrounded by distinct proteins and functional protein networks. *J Biol Chem*, 2013. **288**(19): p. 13775-88.
234. Umeda, K., et al., Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem*, 2004. **279**(43): p. 44785-94.
235. Aijaz, S., M.S. Balda, and K. Matter, Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol*, 2006. **248**: p. 261-98.
236. McNeil, E., C.T. Capaldo, and I.G. Macara, Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(4): p. 1922-32.
237. Fanning, A.S., et al., The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(3): p. 721-31.
238. Katsuno, T., et al., Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(6): p. 2465-75.
239. Li, Y., et al., Structure of the conserved cytoplasmic C-terminal domain of occludin: identification of the ZO-1 binding surface. *J Mol Biol*, 2005. **352**(1): p. 151-64.
240. Sundstrom, J.M., et al., Identification and analysis of occludin phosphosites: a combined mass spectrometry and bioinformatics approach. *J Proteome Res*, 2009. **8**(2): p. 808-17.
241. Xu, J., et al., Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(5): p. 1669-78.
242. Balda, M.S. and K. Matter, The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J*, 2000. **19**(9): p. 2024-33.
243. Gottardi, C.J., et al., The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 10779-84.
244. Reichert, M., T. Muller, and W. Hunziker, The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem*, 2000. **275**(13): p. 9492-500.
245. Glaunsinger, B.A., et al., Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J*, 2001. **20**(20): p. 5578-86.
246. Chlenski, A., et al., Organization and expression of the human zo-2 gene (*tjp-2*) in normal and neoplastic tissues. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1493**(3): p. 319-24.
247. Hoover, K.B., S.Y. Liao, and P.J. Bryant, Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol*, 1998. **153**(6): p. 1767-73.
248. Kleeff, J., et al., Altered expression and localization of the tight junction protein ZO-1 in primary and metastatic pancreatic cancer. *Pancreas*, 2001. **23**(3): p. 259-65.
249. Miettinen, P.J., et al., TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*, 1994. **127**(6 Pt 2): p. 2021-36.
250. Masszi, A., et al., Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. **284**(5): p. F911-24.
251. Bapat, S.A., et al., Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 2005. **65**(8): p. 3025-9.
252. de Iongh, R.U., et al., Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs*, 2005. **179**(1-2): p. 43-55.

Βιβλιογραφία Κεφαλαίων: Υλικά-Μέθοδοι και Αποτελέσματα

1. Smith, C.J. and A.M. Osborn, Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009. **67**(1): p. 6-20.
2. Bernard, P.S. and C.T. Wittwer, Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*, 2002. **48**(8): p. 1178-85.
3. Winer, J., et al., Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*, 1999. **270**(1): p. 41-9.
4. Kubista, M., et al., The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
5. Bird, G.S., et al., Methods for studying store-operated calcium entry. *Methods*, 2008. **46**(3): p. 204-12.
6. Bhavsar, S.K., et al., AMPK α 1-sensitivity of Orail and Ca(2+) entry in T - lymphocytes. *Cell Physiol Biochem*, 2013. **32**(3): p. 687-98.
7. Yang, W., et al., Akt2- and ETS1-dependent IP3 receptor 2 expression in dendritic cell migration. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **33**(1): p. 222-36.
8. Kottakis, F., et al., FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. *Mol Cell*, 2011. **43**(2): p. 285-98.
9. Kampranis, S.C. and P.N. Tsiachlis, *Histone demethylases and cancer*. *Adv Cancer Res*, 2009. **102**: p. 103-69.
10. Tzatsos, A., et al., Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(8): p. 2641-6.
11. Cao, Q., et al., Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene*, 2008. **27**(58): p. 7274-84.
12. Zhang, Z., et al., Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin. *Int J Mol Med*, 2016. **38**(4): p. 1199-207.
13. Carvalho, J., et al., Lack of microRNA-101 causes E-cadherin functional deregulation through EZH2 up-regulation in intestinal gastric cancer. *J Pathol*, 2012. **228**(1): p. 31-44.
14. Canel, M., et al., E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 2): p. 393-401.
15. Michael, M. and A.S. Yap, The regulation and functional impact of actin assembly at cadherin cell-cell adhesions. *Semin Cell Dev Biol*, 2013. **24**(4): p. 298-307.
16. Schnittler, H., et al., Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion. *Cell Tissue Res*, 2014. **355**(3): p. 529-43.
17. Braga, V., Spatial integration of E-cadherin adhesion, signalling and the epithelial cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 2016. **42**: p. 138-145.
18. Gu, L., et al., The Histone Demethylase PHF8 Is Essential for Endothelial Cell Migration. *PLoS One*, 2016. **11**(1): p. e0146645.
19. Sahai, E. and C.J. Marshall, *RHO-GTPases and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(2): p. 133-42.
20. Benitah, S.A., et al., Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1705**(2): p. 121-32.
21. Karlsson, R., et al., Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1796**(2): p. 91-8.
22. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 865-77.
23. Parri, M. and P. Chiarugi, Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 2010. **8**: p. 23.
24. Burridge, K. and C. Guilluy, Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res*, 2016. **343**(1): p. 14-20.
25. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small, Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(7): p. 746-61.
26. Fukata, M., M. Nakagawa, and K. Kaibuchi, Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(5): p. 590-7.
27. Ridley, A.J., Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. **36**: p. 103-12.
28. Papakonstanti, E.A. and C. Stournaras, Tumor necrosis factor-alpha promotes survival of opossum kidney cells via Cdc42-induced phospholipase C-gamma1 activation and actin filament redistribution. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(3): p. 1273-86.
29. Linseman, D.A. and F.A. Loucks, Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 657-76.

30. Lang, F., K. Alevizopoulos, and C. Stournaras, *Targeting membrane androgen receptors in tumors*. *Expert Opin Ther Targets*, 2013. **17**(8): p. 951-63.
31. Kottakis, F., et al., NDY1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells. *Cancer Res*, 2014. **74**(14): p. 3935-46.
32. Burridge, K., et al., Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*, 1988. **4**: p. 487-525.
33. Craig, S.W. and R.P. Johnson, Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. **8**(1): p. 74-85.
34. Vignjevic, D. and G. Montagnac, Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(1): p. 12-22.
35. Stournaras, C., et al., The actin cytoskeleton in rapid steroid hormone actions. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2014. **71**(5): p. 285-93.
36. Tseliou, M., et al., The Role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in Cell Morphology, Proliferation and Migration in Human Cytomegalovirus (HCMV) Infected Glioblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **38**(1): p. 94-109.
37. Lang, F., N. Perrotti, and C. Stournaras, Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(10): p. 1571-5.
38. Gu, S., et al., Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the prosurvival signals Akt/bad in vitro and in vivo and blocks migration via vinculin/actin signaling. *Mol Med*, 2011. **17**(1-2): p. 48-58.
39. Honisch, S., et al., Chorein addiction in VPS13A overexpressing rhabdomyosarcoma cells. *Oncotarget*, 2015. **6**(12): p. 10309-19.
40. Wang, P., et al., PFDN1, an indicator for colorectal cancer prognosis, enhances tumor cell proliferation and motility through cytoskeletal reorganization. *Med Oncol*, 2015. **32**(12): p. 264.
41. Gari, H.H., et al., PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion properties critical for cell migration and invasion. *Cancer Lett*, 2016. **380**(2): p. 505-12.
42. Papadimitriou, E., et al., Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF-beta and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, 2012. **31**(23): p. 2862-75.
43. Schneider, D. and A. Janshoff, Inhibition of actin dynamics during epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **419**(2): p. 221-5.
44. Zhang, L., et al., Dimethylxalylglycine Promotes Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis via Rho/ROCK Signaling. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **39**(4): p. 1391-403.

Βιβλιογραφία Συζήτησης

1. Kampranis, S.C. and P.N. Tschlis, *Histone demethylases and cancer*. Adv Cancer Res, 2009. **102**: p. 103-69.
2. Constantinides, P.G., P.A. Jones, and W. Gevers, Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. Nature, 1977. **267**(5609): p. 364-6.
3. Santi, D.V., C.E. Garrett, and P.J. Barr, On the mechanism of inhibition of DNA-cytosine methyltransferases by cytosine analogs. Cell, 1983. **33**(1): p. 9-10.
4. Yamane, K., et al., PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. Mol Cell, 2007. **25**(6): p. 801-12.
5. Tsukada, Y., et al., Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. Nature, 2006. **439**(7078): p. 811-6.
6. Pfau, R., et al., Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(6): p. 1907-12.
7. Tzatsos, A., et al., Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2641-6.
8. Su, I.H., et al., Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. Cell, 2005. **121**(3): p. 425-36.
9. Kottakis, F., et al., FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway. Mol Cell, 2011. **43**(2): p. 285-98.
10. Asensio-Juan, E., C. Gallego, and M.A. Martinez-Balbas, The histone demethylase PHF8 is essential for cytoskeleton dynamics. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(19): p. 9429-40.
11. Albrecht-Buehler, G., Phagokinetic tracks of 3T3 cells: parallels between the orientation of track segments and of cellular structures which contain actin or tubulin. Cell, 1977. **12**(2): p. 333-9.
12. Albrecht-Buehler, G., Daughter 3T3 cells. Are they mirror images of each other? J Cell Biol, 1977. **72**(3): p. 595-603.
13. Sonneborn, T.M., The Determinants and Evolution of Life. the Differentiation of Cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1964. **51**: p. 915-29.
14. Beisson, J. and T.M. Sonneborn, Cytoplasmic Inheritance of the Organization of the Cell Cortex in Paramecium Aurelia. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **53**: p. 275-82.
15. Cao, Q., et al., Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. Oncogene, 2008. **27**(58): p. 7274-84.
16. Zhang, Z., et al., Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin. Int J Mol Med, 2016. **38**(4): p. 1199-207.
17. Tong, Z.T., et al., EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. Oncogene, 2012. **31**(5): p. 583-94.
18. Cao, Q., et al., Coordinated regulation of polycomb group complexes through microRNAs in cancer. Cancer Cell, 2011. **20**(2): p. 187-99.
19. Shimono, Y., et al., Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. Cell, 2009. **138**(3): p. 592-603.
20. Wellner, U., et al., The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1487-95.
21. Lovat, F., N. Valeri, and C.M. Croce, *MicroRNAs in the pathogenesis of cancer*. Semin Oncol, 2011. **38**(6): p. 724-33.
22. Zhang, B., et al., Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. Carcinogenesis, 2011. **32**(1): p. 2-9.
23. Kong, D., et al., Loss of let-7 up-regulates EZH2 in prostate cancer consistent with the acquisition of cancer stem cell signatures that are attenuated by BR-DIM. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33729.
24. Varambally, S., et al., Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. Science, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
25. Wang, H.J., et al., MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. Eur J Cancer, 2010. **46**(12): p. 2295-303.
26. Pecina-Slaus, N., Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. Cancer Cell Int, 2003. **3**(1): p. 17.
27. Iorio, M.V., C. Piovano, and C.M. Croce, Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(10-12): p. 694-701.
28. Melo, S.A. and M. Esteller, Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. FEBS Lett, 2011. **585**(13): p. 2087-99.
29. Melo, S.A. and M. Esteller, A precursor microRNA in a cancer cell nucleus: get me out of here! Cell Cycle, 2011. **10**(6): p. 922-5.

30. Asangani, I.A., et al., MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 2008. **27**(15): p. 2128-36.
31. Qazi, A.M., et al., Restoration of E-cadherin expression in pancreatic ductal adenocarcinoma treated with microRNA-101. *Surgery*, 2012. **152**(4): p. 704-11; discussion 711-3.
32. Baum, B. and M. Georgiou, Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol*, 2011. **192**(6): p. 907-17.
33. Braga, V.M., Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(5): p. 546-56.
34. Ehrlich, J.S., M.D. Hansen, and W.J. Nelson, Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell*, 2002. **3**(2): p. 259-70.
35. Canel, M., et al., E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 2): p. 393-401.
36. Vega, F.M., et al., The Rho GTPase RhoB regulates cadherin expression and epithelial cell-cell interaction. *Cell Commun Signal*, 2015. **13**: p. 6.
37. Yonemura, S., Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 2011. **23**(5): p. 515-22.
38. Papadimitriou, E., et al., Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF-beta and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*, 2012. **31**(23): p. 2862-75.
39. Schneider, D. and A. Janshoff, Inhibition of actin dynamics during epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **419**(2): p. 221-5.
40. Fagerberg, L., et al., Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2014. **13**(2): p. 397-406.
41. Papadopoulou, N., et al., Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res*, 2008. **314**(17): p. 3162-74.
42. Gu, S., et al., Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the prosurvival signals Akt/bad in vitro and in vivo and blocks migration via vinculin/actin signaling. *Mol Med*, 2011. **17**(1-2): p. 48-58.
43. Schmidt, E.M., et al., Serum- and glucocorticoid-dependent kinase-1-induced cell migration is dependent on vinculin and regulated by the membrane androgen receptor. *FEBS J*, 2012. **279**(7): p. 1231-42.
44. Stournaras, C., et al., The actin cytoskeleton in rapid steroid hormone actions. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2014. **71**(5): p. 285-93.
45. Schenk, M., et al., Salinomycin inhibits growth of pancreatic cancer and cancer cell migration by disruption of actin stress fiber integrity. *Cancer Lett*, 2015. **358**(2): p. 161-169.
46. Fajol, A., et al., Fibroblast growth factor (Fgf) 23 gene transcription depends on actin cytoskeleton reorganization. *FEBS Lett*, 2016. **590**(6): p. 705-15.
47. Tseliou, M., et al., The Role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in Cell Morphology, Proliferation and Migration in Human Cytomegalovirus (HCMV) Infected Glioblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **38**(1): p. 94-109.
48. Stagno, M.J., et al., Istaroxime Inhibits Motility and Down-Regulates Orai1 Expression, SOCE and FAK Phosphorylation in Prostate Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **42**(4): p. 1366-1376.
49. Just, I., et al., Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium limosum*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(15): p. 10274-80.
50. Moustakas, A. and C. Stournaras, Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci*, 1999. **112 (Pt 8)**: p. 1169-79.
51. Lang, F., N. Perrotti, and C. Stournaras, Colorectal carcinoma cells--regulation of survival and growth by SGK1. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(10): p. 1571-5.
52. Niu, H., et al., Mechanisms of RhoGDI2 mediated lung cancer epithelial-mesenchymal transition suppression. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **34**(6): p. 2007-16.
53. Honisch, S., et al., Chorein addiction in VPS13A overexpressing rhabdomyosarcoma cells. *Oncotarget*, 2015. **6**(12): p. 10309-19.
54. Zhang, L., et al., Dimethylxalylglycine Promotes Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis via Rho/ROCK Signaling. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **39**(4): p. 1391-403.
55. Ju, L., et al., Autocrine VEGF and IL-8 Promote Migration via Src/Vav2/Rac1/PAK1 Signaling in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*, 2017. **41**(4): p. 1346-1359.
56. Ungefroren, H., D. Witte, and H. Lehnert, The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF-beta-induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn*, 2018. **247**(3): p. 451-461.
57. Katsantonis, J., et al., Differences in the G/total actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes. *Cell Biochem Funct*, 1994. **12**(4): p. 267-74.
58. Vardouli, L., et al., A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J*, 2008. **275**(16): p. 4074-87.

59. Vignjevic, D. and G. Montagnac, Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin Cancer Biol*, 2008. **18**(1): p. 12-22.
60. Kourtidis, A., et al., A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res*, 2017. **358**(1): p. 78-85.
61. Hanks, S.K., et al., Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. d982-96.
62. Papakonstanti, E.A., et al., A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol*, 2003. **17**(5): p. 870-81.
63. Gu, S., et al., Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses in vitro and reduce drastically tumor incidence in vivo. *Mol Cancer*, 2009. **8**: p. 114.
64. Schaller, M.D., Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 7): p. 1007-13.
65. Lu, Q. and S. Rounds, Focal adhesion kinase and endothelial cell apoptosis. *Microvasc Res*, 2012. **83**(1): p. 56-63.
66. Kratimenos, P., et al., Multi-targeted molecular therapeutic approach in aggressive neuroblastoma: the effect of Focal Adhesion Kinase-Src-Paxillin system. *Expert Opin Ther Targets*, 2014. **18**(12): p. 1395-406.
67. Kallergi, G., et al., Activation of FAK/PI3K/Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells. *Cell Physiol Biochem*, 2007. **20**(6): p. 977-86.
68. van Nimwegen, M.J. and B. van de Water, Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol*, 2007. **73**(5): p. 597-609.
69. Figel, S. and I.H. Gelman, Focal adhesion kinase controls prostate cancer progression via intrinsic kinase and scaffolding functions. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011. **11**(7): p. 607-16.
70. Chen, Y., et al., Caffeine inhibits migration in glioma cells through the ROCK-FAK pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **33**(6): p. 1888-98.
71. Alowayed, N., et al., LEFTY2 Controls Migration of Human Endometrial Cancer Cells via Focal Adhesion Kinase Activity (FAK) and miRNA-200a. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **39**(3): p. 815-26.
72. Anguita, E. and A. Villalobo, Ca²⁺ signaling and Src-kinases-controlled cellular functions. *Arch Biochem Biophys*, 2018. **650**: p. 59-74.
73. Papadopoulou, N., et al., Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life*, 2009. **61**(1): p. 56-61.
74. Lang, F., K. Alevizopoulos, and C. Stournaras, *Targeting membrane androgen receptors in tumors*. *Expert Opin Ther Targets*, 2013. **17**(8): p. 951-63.
75. Gu, S., et al., Membrane androgen receptor down-regulates c-src-activity and beta-catenin transcription and triggers GSK-3beta-phosphorylation in colon tumor cells. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **34**(4): p. 1402-12.
76. Nomikou, E., et al., Transcriptional and post-transcriptional regulation of the genes encoding the small GTPases RhoA, RhoB, and RhoC: implications for the pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci*, 2018. **75**(12): p. 2111-2124.
77. Tomar, A. and D.D. Schlaepfer, Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(5): p. 676-83.
78. Worthylake, R.A. and K. Burridge, RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem*, 2003. **278**(15): p. 13578-84.
79. Raftopoulou, M. and A. Hall, Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*, 2004. **265**(1): p. 23-32.
80. Jaffe, A.B. and A. Hall, Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 247-69.
81. Wang, H.R., et al., Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1775-9.
82. Sethuraman, A., et al., SMARCE1 regulates metastatic potential of breast cancer cells through the HIF1A/PTK2 pathway. *Breast Cancer Res*, 2016. **18**(1): p. 81.
83. Koukouritaki, S.B., et al., Dexamethasone induces rapid actin assembly in human endometrial cells without affecting its synthesis. *J Cell Biochem*, 1997. **65**(4): p. 492-500.
84. Haga, R.B. and A.J. Ridley, Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*, 2016. **7**(4): p. 207-221.
85. Devreotes, P.N., et al., Excitable Signal Transduction Networks in Directed Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2017. **33**: p. 103-125.
86. Lang, F. and C. Stournaras, Serum and glucocorticoid inducible kinase, metabolic syndrome, inflammation, and tumor growth. *Hormones (Athens)*, 2013. **12**(2): p. 160-71.

87. Insall, R.H. and L.M. Machesky, Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell*, 2009. **17**(3): p. 310-22.
88. Papakonstanti, E.A. and C. Stournaras, Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, 2008. **582**(14): p. 2120-7.
89. O'Connor, K. and M. Chen, Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases*, 2013. **4**(3): p. 141-7.
90. Zandvakili, I., et al., Rho GTPases: Anti- or pro-neoplastic targets? *Oncogene*, 2017. **36**(23): p. 3213-3222.
91. Vega, F.M. and A.J. Ridley, The RhoB small GTPase in physiology and disease. *Small GTPases*, 2018. **9**(5): p. 384-393.
92. Koukouritaki, S.B., A. Gravanis, and C. Stournaras, Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin regulates the signaling mechanism of the rapid nongenomic action of dexamethasone on actin cytoskeleton. *Mol Med*, 1999. **5**(11): p. 731-42.
93. Papakonstanti, E.A., E.A. Vardaki, and C. Stournaras, Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem*, 2000. **10**(5-6): p. 257-64.
94. Kardassis, D., et al., Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J*, 2009. **276**(11): p. 2947-65.
95. Gu, S., et al., Rapid activation of FAK/mTOR/p70S6K/PAK1-signaling controls the early testosterone-induced actin reorganization in colon cancer cells. *Cell Signal*, 2013. **25**(1): p. 66-73.
96. Schmid, E., et al., Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 regulates reorganization of actin cytoskeleton in mast cells upon degranulation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. **304**(1): p. C49-55.
97. Liu, D., et al., The glucocorticoid dexamethasone inhibits U937 cell adhesion and neutrophil release via RhoA/ROCK1-dependent and independent pathways. *Cell Physiol Biochem*, 2014. **33**(6): p. 1654-62.
98. Nomikou, E., C. Stournaras, and D. Kardassis, Functional analysis of the promoters of the small GTPases RhoA and RhoB in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **491**(3): p. 754-759.
99. Ridley, A.J., Life at the leading edge. *Cell*, 2011. **145**(7): p. 1012-22.
100. Zou, W., et al., Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) plays a role in the polarization of neutrophil-like HL-60 cells by regulating the activation of Akt, Src, and Rho family GTPases. *Cell Physiol Biochem*, 2012. **30**(1): p. 221-37.
101. Alesutan, I., et al., Chordin sensitivity of actin polymerization, cell shape and mechanical stiffness of vascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2013. **32**(3): p. 728-42.
102. Zeng, N., et al., 1alpha,25(OH)₂D₃ Induces Actin Depolymerization in Endometrial Carcinoma Cells by Targeting RAC1 and PAK1. *Cell Physiol Biochem*, 2016. **40**(6): p. 1455-1464.
103. Croft, D.R. and M.F. Olson, Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription*, 2011. **2**(5): p. 211-5.
104. Parri, M. and P. Chiarugi, Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal*, 2010. **8**: p. 23.
105. Burridge, K. and C. Guilluy, Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res*, 2016. **343**(1): p. 14-20.
106. Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small, Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. **34**(7): p. 746-61.
107. Fukata, M., M. Nakagawa, and K. Kaibuchi, Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. **15**(5): p. 590-7.
108. Ridley, A.J., Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. **36**: p. 103-12.
109. Papakonstanti, E.A. and C. Stournaras, Tumor necrosis factor-alpha promotes survival of opossum kidney cells via Cdc42-induced phospholipase C-gamma1 activation and actin filament redistribution. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(3): p. 1273-86.
110. Linseman, D.A. and F.A. Loucks, Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 657-76.
111. Lambert, M., D. Choquet, and R.M. Mege, Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, 2002. **157**(3): p. 469-79.
112. Derycke, L.D. and M.E. Bracke, N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 463-76.
113. Gavard, J., et al., Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 2): p. 257-70.
114. Gavard, J., et al., [Regulation of cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain]. *J Soc Biol*, 2004. **198**(4): p. 365-74.
115. Sander, E.E., et al., Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol*, 1999. **147**(5): p. 1009-22.

116. Yap, A.S. and E.M. Kovacs, Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J Cell Biol*, 2003. **160**(1): p. 11-6.
117. Zondag, G.C., et al., Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 2000. **149**(4): p. 775-82.
118. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(7): p. 356-63.
119. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 2007. **129**(5): p. 865-77.
120. Ridley, A.J., RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc*, 2013. **251**(3): p. 242-9.
121. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 683-92.



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamcr

The epigenetic factor KDM2B regulates cell adhesion, small rho GTPases, actin cytoskeleton and migration in prostate cancer cells

Nefeli Zacharopoulou^a, Anna Tsapara^a, Galatea Kallergi^a, Evi Schmid^b, Philip N. Tsiachlis^c, Sotirios C. Kampranis^{a,1}, Christos Stournaras^{a,*,1}

^a Department of Biochemistry, University of Crete Medical School, Voutes, Heraklion, 71110, Greece

^b Department of Pediatric Surgery & Pediatric Urology, Children's Hospital, Eberhard-Karls-University Tuebingen, Tuebingen, Germany

^c Molecular Oncology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, MA 02111, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

KDM2B
Rho-GTPases
Zo-1
Actin
Migration
Prostate cancer

ABSTRACT

The histone demethylase KDM2B is an epigenetic factor with oncogenic properties that is regulated by the basic fibroblasts growth factor (FGF-2). It has recently been shown that KDM2B co-operates with Polycomb Group proteins to promote cell migration and angiogenesis in tumors. In the present study we addressed the role of KDM2B in regulating actin cytoskeleton signaling, cell-cell adhesion and migration of prostate tumor cells. We report here that KDM2B is functionally expressed in DU-145 prostate cancer cells, activated by FGF-2 and regulates EZH2. KDM2B knockdown induced potent up-regulation of gene expression and protein expression of the epithelial markers E-cadherin and ZO-1, while KDM2B overexpression down-regulated the levels of both markers, suggesting control of cell adhesion by KDM2B. RhoA and RhoB protein expression and activity were diminished upon KDM2B-knockdown and upregulated in KDM2B-overexpressing cell clones. In accordance, actin reorganization of stress fibers became increased in KDM2B-overexpressing cells and abolished in the presence of the Rho inhibitor C3 transferase. DU-145 cell migration was significantly enhanced in KDM2B overexpressing cells and abolished in C3-pretreated cells. Conversely, the retardation of cell migration observed in KDM2B knockdown cells was enhanced in C3-pretreated cells. These results establish a clear functional link between the epigenetic factor KDM2B and the regulation of cell adhesion and Rho-GTPases signaling that controls actin reorganization and cell migration.

1. Introduction

The histone demethylase KDM2B is an epigenetic factor that was isolated in a screen for novel oncogenes by using retroviral insertion mutagenesis in rodents [1–4]. This gene codes for a lysine-specific protein that demethylates H3K4me3 and H3K36me2 leading to transcriptional repression [5–7]. The function of KDM2B depends on its CxxC-ZF domain, which mediates its genome-wide binding to unmethylated CpG islands [7–11]. Ectopic expression of KDM2B enables MEFs to undergo immortalization and bypasses replicative senescence, by co-operating with Polycomb Repressor Complex-2 (PRC-2) [7]. PRC-2-complexes include EZH2, which is over expressed in solid tumors [1,7]. In human cancers KDM2B is regulated by the basic fibroblast growth factor (bFGF) that promotes tumor cell proliferation, migration, and invasiveness, as well as angiogenesis and the cycling of cancer stem cells [10,12]. In addition, regulation of FGF transcription involves actin cytoskeleton reorganization [13]. Previous studies established an

important role of KDM2B in cell migration and angiogenesis. Indeed, KDM2B is essential for FGF-2-induced angiogenesis, as its knockdown abrogates in vitro tube formation in HUVECs [12]. These findings suggested that growth factor signals may drive the upregulation of KDM2B, which, in co-operation with Polycomb Group proteins, promotes motility and invasion in tumor cell lines and primary tumors.

Several lines of evidence suggest that epigenetic mechanisms may regulate actin cytoskeleton [14,15], which plays a central role in conferring cancer cells with migratory and invasive characteristics [16–22]. In this process, epithelial cells lose their polarity and cell-cell adhesion, and gain migratory and invasive properties, in a process termed epithelial-mesenchymal transition (EMT). EMT involves a dramatic reorganization of the cytoskeleton accompanied by the formation of membrane protrusions required for invasive growth [23–27]. Alterations in chromatin regulators have been recently linked to deregulated cytoskeletal functions [12,28] however, the detailed mechanisms behind these processes are only beginning to emerge. In the

* Corresponding author.

E-mail address: stournac@uoc.gr (C. Stournaras).

¹ Both authors contributed equally and thus share last authorship.

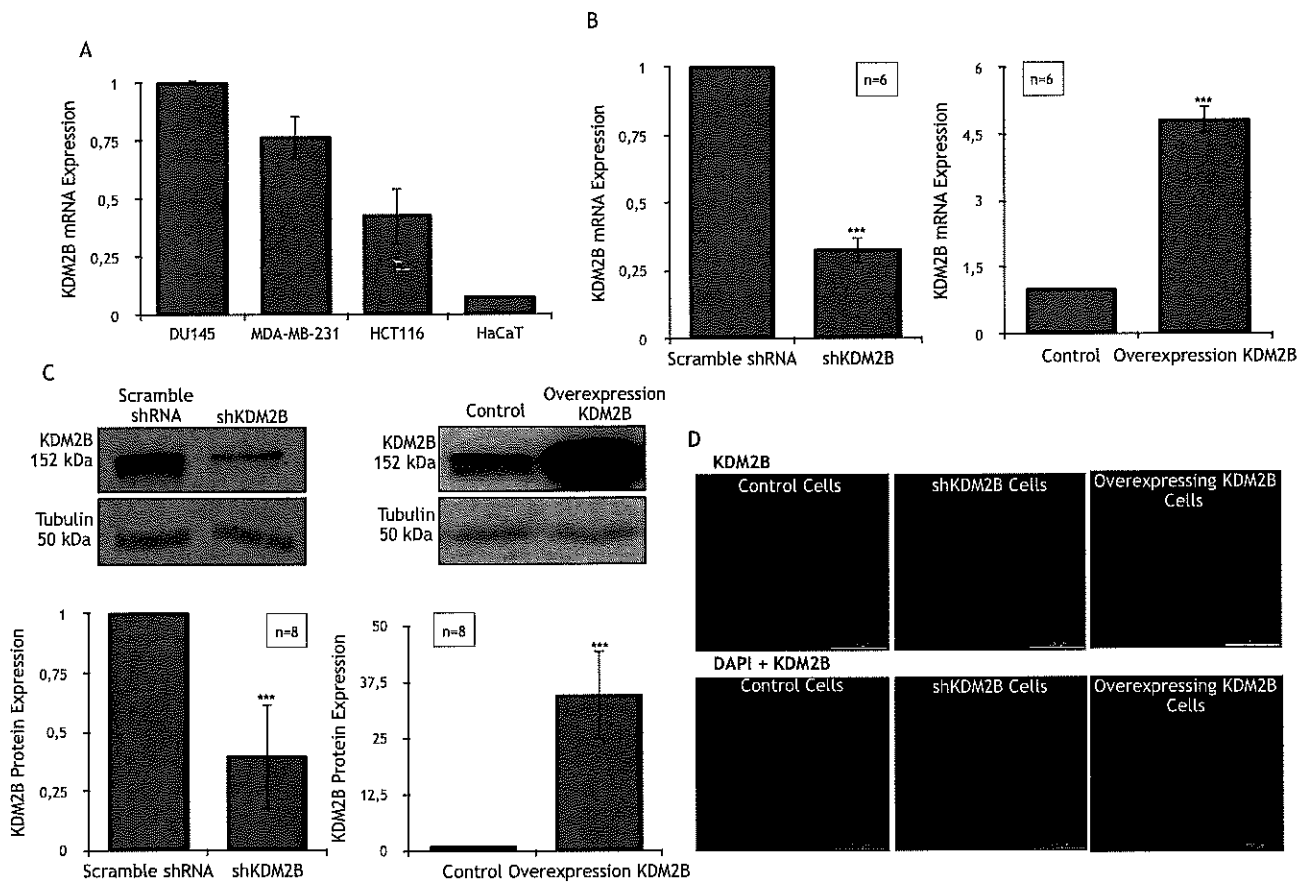


Figure 1. Expression of KDM2B in tumor cells.

(A) Transcriptional expression of KDM2B in various tumor cells. RT-PCR analysis established differential basic KDM2B expression levels in various tumor cells. (B) Transcriptional expression of KDM2B in DU-145 cells upon knockdown and overexpression of the gene. KDM2B mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with β-actin as the internal control in scramble shRNA, shKDM2B (left panel), and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. The data are presented as mean ± standard deviation (SD) from n = 6 independent experiments, while y axis represents the ratio between KDM2B and actin genes; ***p < 0.001 indicates statistical significance. (C) Protein expression of KDM2B in DU-145 cells upon knockdown and overexpression of the gene. Original Western blot and quantification of the expression of KDM2B and tubulin (control) protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of KDM2B relative to control from n = 8 independent experiments; ***p < 0.001 indicates statistical significance. (D) Immunofluorescence of KDM2B (red) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) DU-145 cells. Scale bar represents 100 μm.

present study we addressed whether epigenetic alterations result in the deregulation of the normal cytoskeleton organization and function that in turn promotes motility and invasiveness and we studied the underlying mechanism. To this end, we focused on KDM2B and analyzed its role in regulating Rho small GTPases, cell adhesion and migration potential in prostate cancer cells. Our findings provide strong evidence that in tumor cells, epigenetic mechanisms control the expression and function of cytoskeletal genes, invasiveness and migration.

2. Material and methods

RPMI 1640 medium, penicillin/streptomycin for cell culture, Trypsin, puromycin, SuperScript II Reverse Transcriptase, Trizol reagent for RNA extraction, dNTPs, ProLong Gold Antifade reagent with Dapi, Rhodamin-Phalloidin, Anti-Zo1 (339100) and primers rt-PCR for E-Cadherin, RhoA, RhoB and Zo-1 were purchased from Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Bioline (Bioline Reagents Limited, London, UK). Primers rt-PCR for KDM2B was purchased from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). FITC-IgG antibody were from Molecular probes Inc. (Eugene OR USA). Fibroblast growth factor 2 (FGF-2), Anti-Ezh2 (D2C9), anti-Bmi1 (D20B7), anti-pFAK (#3283) and anti-AKT (#9272) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA).

Anti-RhoA (sc-418), anti-RhoB (sc-480), FAK (sc-557) and PI-3 K (sc-423) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). KAPA SYBR Green/ROX qPCR Master Mix was purchased from Fermentas (Maryland, USA). Anti-KDM2B antibody, Goat anti-rabbit IgG Peroxidase Conjugated, Goat anti-mouse IgG Peroxidase Conjugated and ECL Immobilon western-Chemiluminescent HRP Substrate were purchased from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Dc Protein Assay was purchased from BioRad Laboratories (California, USA). Albumin Fraction V (BSA) was purchased from PanReac Applichem, ITW Reagents (Gatersleben, Germany). All other chemicals were obtained from usual commercial sources at the purest grade available.

2.1. Cell lines and culture conditions

The cell lines DU-145 and HCT116 were cultured in RPMI 1640, supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37 °C.

2.2. Lentiviral and retroviral packaging and transduction

HEK293T cells were transiently co-transfected with retroviral

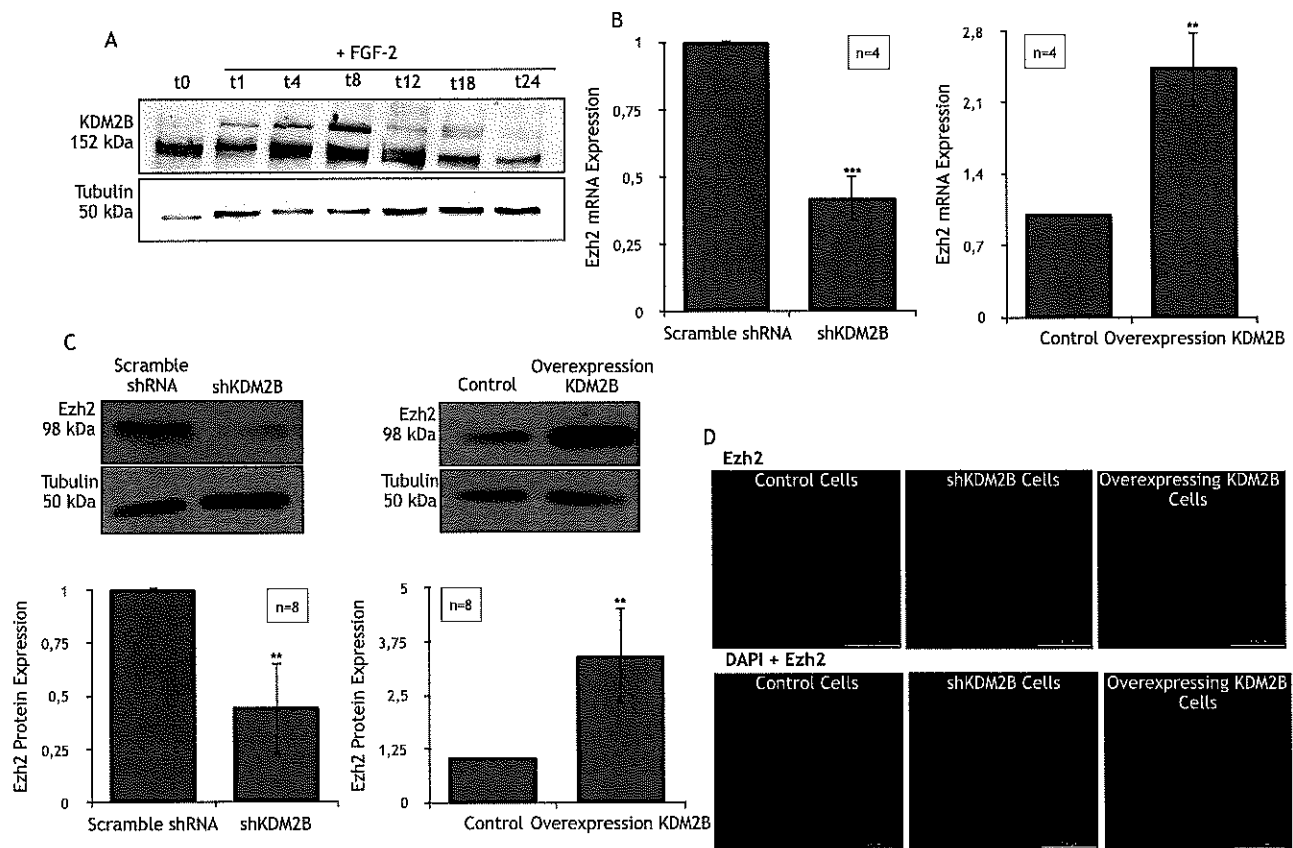


Figure 2. KDM2B is functionally expressed in DU-145 prostate cancer cells.

(A) Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) upregulates KDM2B in DU-145 cells. Original Western blot of the expression of KDM2B and tubulin protein in DU-145 cells treated with 20 ng/ml FGF-2 for the indicated time points.

(B) Transcriptional expression of EZH2 in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. EZH2 mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with β -actin as the internal control in scramble shRNA, shKDM2B (left panel), and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from $n = 4$ independent experiments, while y axis represents the ratio between EZH2 and actin genes; **($p < 0.01$); ***($p < 0.001$) indicates statistical significance.

(C) Protein Levels of EZH2 in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. Original Western blot and quantification of the expression of EZH2 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of EZH2 relative to control from $n = 8$ independent experiments; **($p < 0.01$) indicates statistical significance.

(D) Immunofluorescence of EZH2 (red) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) DU-145 cells. Scale bar represents 100 μ m.

constructs and the amphotropic packaging construct (Ampho-pac), or with lentiviral constructs and pVSV-G, using Fugene 6 (Roche Applied Science). To transduce DU-145s with the packaged viruses, early passage cells were incubated with viral supernatants in the presence of 5 mg/ml polybrene for 24 h. Forty-eight hours later, cells were selected with puromycin (2 μ g/ml). Cells infected with retrovirus (pBABEpuro-KDM2B (for overexpression KDM2B) or control empty vector pBABEpuro (control for overexpressing KDM2B cells) or lentivirus (pLKO.1KDM2BshRNA (expressing either shKDM2B (pLKO.1-KDM2B-sh) or scramble shRNA (pLKO.1-scrambled-sh)) constructs. Lentiviral-based shRNAs for human KDM2B were purchased from Open Biosystems (cat no. RH54533-NM_001005366). Out of the 5 clones, the most effective in knocking down KDM2B was TRCN0000118437. Target Sequence: CGGCCITTTACAAGAAGACATT; Hairpin Sequence: 5'-CGGG-CGGCCTTTACAAGAAGACATT-CTCGAG-AATGTCTTCTGTAAA GCGG-TTTTTG-3'. The lentiviral pLKO.1 vector, expressing a scrambled shRNA and the pLKO.1 retroviral empty vector (pBABEpuro) served as negative controls.

2.3. Protein extraction and western blotting

For Western blotting, lentiviral or retroviral transduced cells (with

or without treatment with FGF-2 (20 ng/ml)) were washed with ice cold phosphate-buffered saline (PBS $1 \times$), and total cell lysates were generated using a Triton X-100 lysis buffer. Lysis buffer solution contains Protease Inhibitor Cocktail of NaF 1 M, Leupeptin 1 M, β -glycerophosphate 1 M, Na₃NO₄ 1 M, Aprotinin 80 μ M, Pepstatin A 1 mM, E-64 1.5 mM, Bestatin 5 mM, AEBBSF 100 mM in Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM pH 7.5, Triton X-100 1%, SDS 0.2% and sodium deoxycholate 0.1%. The cells were disrupted by sonication (3 times, for 30 s each and 10% pulse). The extracts were centrifuged at 13,000 rpm for 20 min at 4 $^{\circ}$ C, the protein concentration of the supernatant was determined with Lowry Assay and the samples were prepared in sodium dodecyl sulfate loading buffer, separated on sodium dodecyl sulfate-containing 8–15% polyacrylamide gels. 60 μ g protein per lane were separated by 8–15% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were processed according to standard Western blotting procedures: Nonspecific binding was blocked by incubation with 5% nonfat dry milk in phosphate-buffered saline containing 0.1% Tween-20, overnight incubation of primary Abs, 2hs incubation with HRP-conjugated secondary Abs, visualization with ECL system using a ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad), and quantitation of protein by band intensity using Image Lab Software (Bio-Rad). The images were exported as TIFF images. Abs used were anti-tubulin (1:20, clone 1A2;

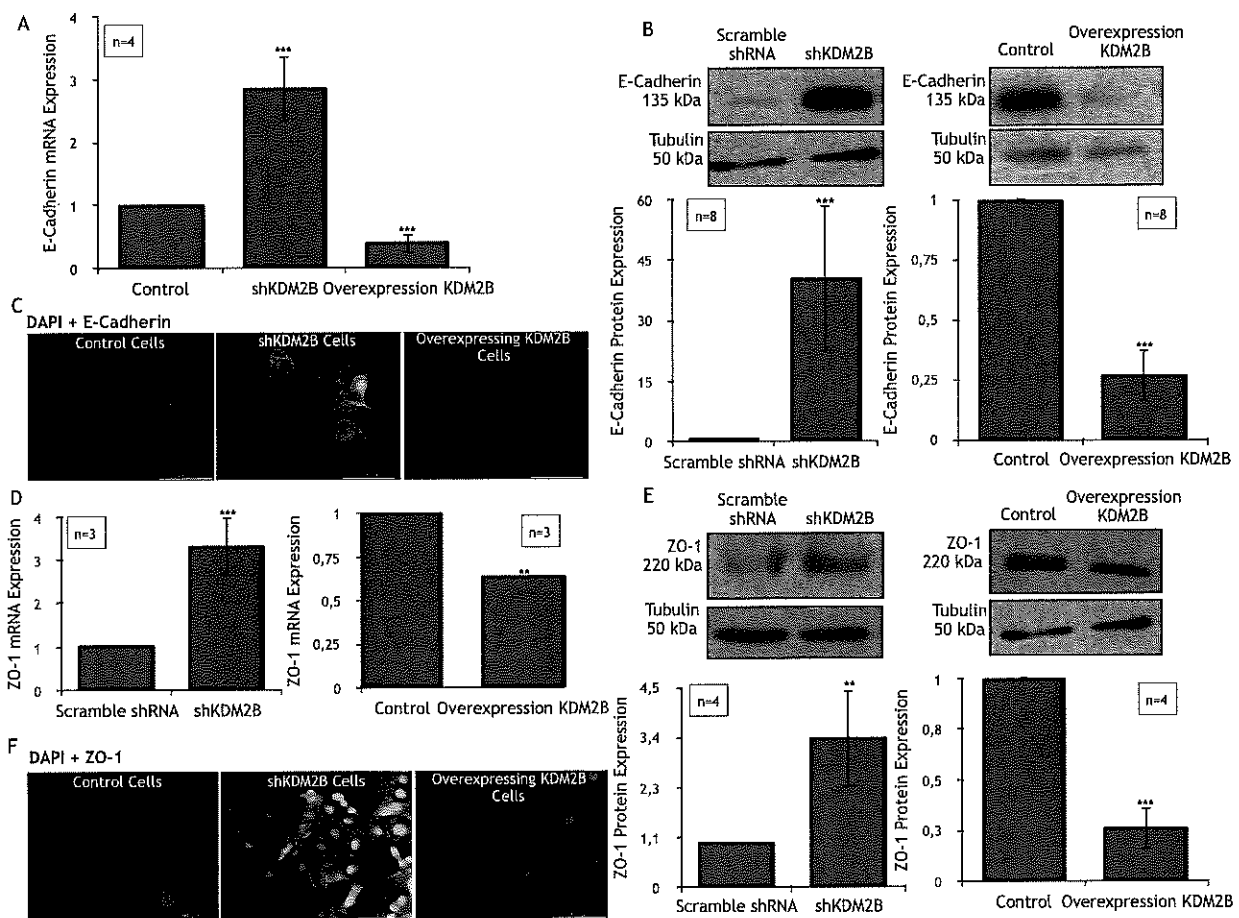


Figure 3. KDM2B controls the expression of the adhesion markers E-Cadherin and ZO-1. (A) Transcriptional expression of E-Cadherin in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. E-Cadherin mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with b-actin as the internal control in shRNA, overexpression of KDM2B and control DU-145 cell lysates. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from $n = 4$ independent experiments, while y axis represents the ratio between E-Cadherin and actin genes; ***($p < 0.001$) indicates statistical significance. (B) Protein Levels of E-Cadherin in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. Original Western blot and quantification of the expression of E-Cadherin and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of E-Cadherin relative to control from $n = 8$ independent experiments; ***($p < 0.001$) indicates statistical significance. (C) Immunofluorescence of E-Cadherin (green) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) DU-145 cells. Scale bar represents 100 μ m. (D) Transcriptional expression of ZO-1 in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. ZO-1 mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with b-actin as the internal control in scramble shRNA, shKDM2B (left panel), and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from $n = 3$ independent experiments, while y axis represents the ratio between ZO-1 and actin genes; **($p < 0.01$); ***($p < 0.001$) indicates statistical significance. (E) Protein Levels of ZO-1 in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. Original Western blot and quantification of the expression of ZO-1 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of ZO-1 relative to control from $n = 4$ independent experiments; **($p < 0.01$); ***($p < 0.001$) indicates statistical significance. (F) Immunofluorescence of ZO-1 (green) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) DU-145 cells. Scale bar represents 100 μ m.

Sigma-Aldrich), anti-JHDM1B (KDM2B) (1:1000, 09–864, Millipore), anti-RhoA (1:100, sc-418, Santa Cruz Biotechnology) anti-RhoB (1:100, sc-180, Santa Cruz Biotechnology), anti-ZO-1 (1:1000, 339,100, Invitrogen), anti-EZH2 (1:1000, D2C9, Cell Signaling Technology), anti-E-Cadherin (1:1000, 610,187, TransductionLab BD Biosciences), anti-BMI1 (1:1000, D20B7, Cell Signaling Technology). Anti-mouse, as well as anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were obtained from Millipore Corporation (1:10,000, Billerica, MA, USA).

2.4. RNA isolation, cDNA synthesis and real time PCR

Total cell RNA was extracted using Trizol, according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1.0 μ g of total RNA, using oligo-dT priming and the SuperScript II, Reverse Transcriptase kit

(Invitrogen, Life Technologies). Real-time PCR was performed in triplicate using KAPA SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) and a 7500 Real-Time System (Applied Biosystems). The β -actin housekeeping gene was used as an internal control for mRNA normalization. All experiments were done in triplicates. Relative quantification of gene expression was achieved using the Δ ct method. For the amplification the following primers were used (5'-3' orientation):

- Actin, forward CGGCATCGTCACCAACTG;
- Actin, reverse GGCACACGCAGCTCATTG;
- Kdm2b, forward TCTACGAGATCGAGGACAGGA;
- Kdm2b, reverse ACCAGCACATCTCATAGTAGAAGG;
- E-cadherin, forward TACAATGCCGCATCGCTTA;
- E-cadherin, reverse CGTAGGGAAACTCTCTCGGT;
- Ezh2, forward ACGGGGATAGAGAATGTGGGTTA;

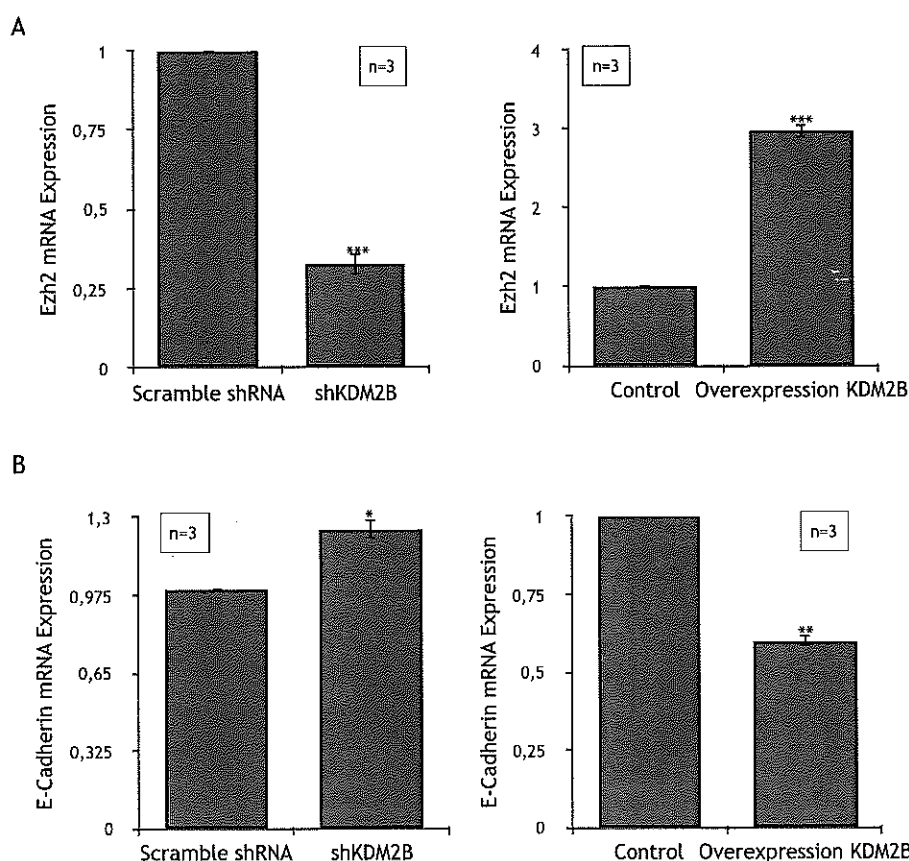


Figure 4. KDM2B controls the expression of EZH2 and E-Cadherin in HCT116 colon cancer cells.

(A) Transcriptional expression of Ezh2 in knockdown and overexpression of KDM2B in HCT116 cells. EZH2 mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with b-actin as the internal control in shRNA, overexpression of KDM2B and control HCT116 cell lysates. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from $n = 3$ independent experiments, while y axis represents the ratio between Ezh2 and actin genes; ***($p < 0.001$) indicates statistical significance.

(B) Transcriptional Expression of E-Cadherin in knockdown and overexpression of KDM2B in HCT116 cells. E-Cadherin mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with b-actin as the internal control in shRNA, overexpression of KDM2B and control HCT116 cell lysates. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from $n = 3$ independent experiments, while y axis represents the ratio between E-Cadherin and actin genes; *($p < 0.05$); **($p < 0.01$) indicates statistical significance.

Ezh2, reverse AGGTGGGGCGGCTTTCTTTATCATC;
 Zo-1, forward GAGCGGGGACAAGATGAAGT;
 Zo-1, reverse GAGGATGGCCGTTACCCACAG;
 RhoA, forward CTCGTTAGTCCACGGTCTGG;
 RhoA, reverse CAGCCATTGCTCAGGCAAC;
 RhoB, forward TGCAACTGACTTGGGGAGG;
 RhoB, reverse GACAGGCACAAAGTTCGCTT.

2.5. Immunofluorescence

DU-145 cells were grown using chamber slides (VWR, Microscope cover glasses 12 mm, Germany) onto 24-well dishes. The slides were fixed with 3% paraformaldehyde for 20mins at ambient temperature. Following an additional PBS wash the cells were blocked with blocking buffer (0,3% BSA, 0,3% Triton X-100 in PBS) for 10mins and with a glycine buffer for 15mins (20 mM Glycine, 0,1% Na₃N, 1% BSA in PBS) and incubated with primary (anti-JHDM1B(KDM2B) (1:100, 09–864, Millipore), anti-RhoA (1:50, sc-418, Santa Cruz Biotechnology), anti-RhoB (1:50, sc-180, Santa Cruz Biotechnology), anti-ZO-1 (1:100, 339,100, Invitrogen), anti-EZH2 (1:100, D2C9, Cell Signaling Technology), anti-E-Cadherin (1:100, 610,187, TransductionLab BD Biosciences) and secondary Abs Alexa 555-conjugated goat (1:600, anti-rabbit, Invitrogen) and FITC 488 (1:500, anti-mouse, Invitrogen) in the dark for 1 h each, at room temperature. Cells were washed with PBS buffer (1% BSA, 0,1% Na₃N) between each step. After washing, the slides were mounted using the ProLong Gold Antifade reagent with Dapi. Photomicrographs were obtained with a LEICA microscope (LEICA DM LB) and were photographed with a LEICA DC 300F digital camera, using the Zeiss Plan-neofluar 40 \times /0.75 objective lens. The images were analyzed with the instrument's software.

2.6. Determination of GTP-loaded Rho levels - GST-RBD Rhotectin assay

Scramble shRNA, shKDM2B, control and overexpressing KDM2B DU-145 cells were plated onto 100-well dishes and confluent cultures were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS 1 \times). Total cell lysates were generated using a MgCl₂ buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 300 mM, MgCl₂ 10 mM, NP-40 2%) supplemented with protease inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail of NaF 1 M, Leupeptin 1 M, β -glycerophosphate 1 M, Na₃NO₄ 1 M, Aprotinin 80 μ M, Pepstatin A 1 mM, E-64 1,5 mM, Bestatin 5 mM, AEBSF 100 mM). The extracts were centrifuged at 14,000 rpm for 15 min at 4 $^{\circ}$ C and part of the supernatant was kept to determine the protein concentration with Lowry Assay. Equal amounts of cleared cell lysates were incubated with 20 μ l of GST-RBD attached to glutathione-Sepharose at 4 $^{\circ}$ C for 60 min. The cell lysates were centrifuged at 5000 rpm for 1 min at 4 $^{\circ}$ C and the Rho-Beads were washed twice with wash buffer (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 40 mM, MgCl₂ 30 mM). The samples were prepared in sodium dodecyl sulfate loading buffer, separated on sodium dodecyl sulfate-containing 15% polyacrylamide gels. GTP-bound Rho was detected by immunoblotting using the appropriate antibody, anti-RHOA (1:100, sc-418, Santa Cruz Biotechnology) and anti-RHOB (1:100, sc-180, Santa Cruz Biotechnology). Protein band intensity was quantified using Image Lab Software (Bio-Rad) and the data were normalized using the ration of active / total RhoA or /RhoB protein in each sample. The images were exported as TIFF images.

2.7. Nondirectional migration: Wound-healing assay

DU-145 cells were plated onto 12-well dishes and confluent cultures were serum-starved for 24 h. At time point zero (area of time point zero is set to 100%) cell monolayers were wounded with a sterile pipette tip and medium was exchanged. The cells were cultured in the presence or

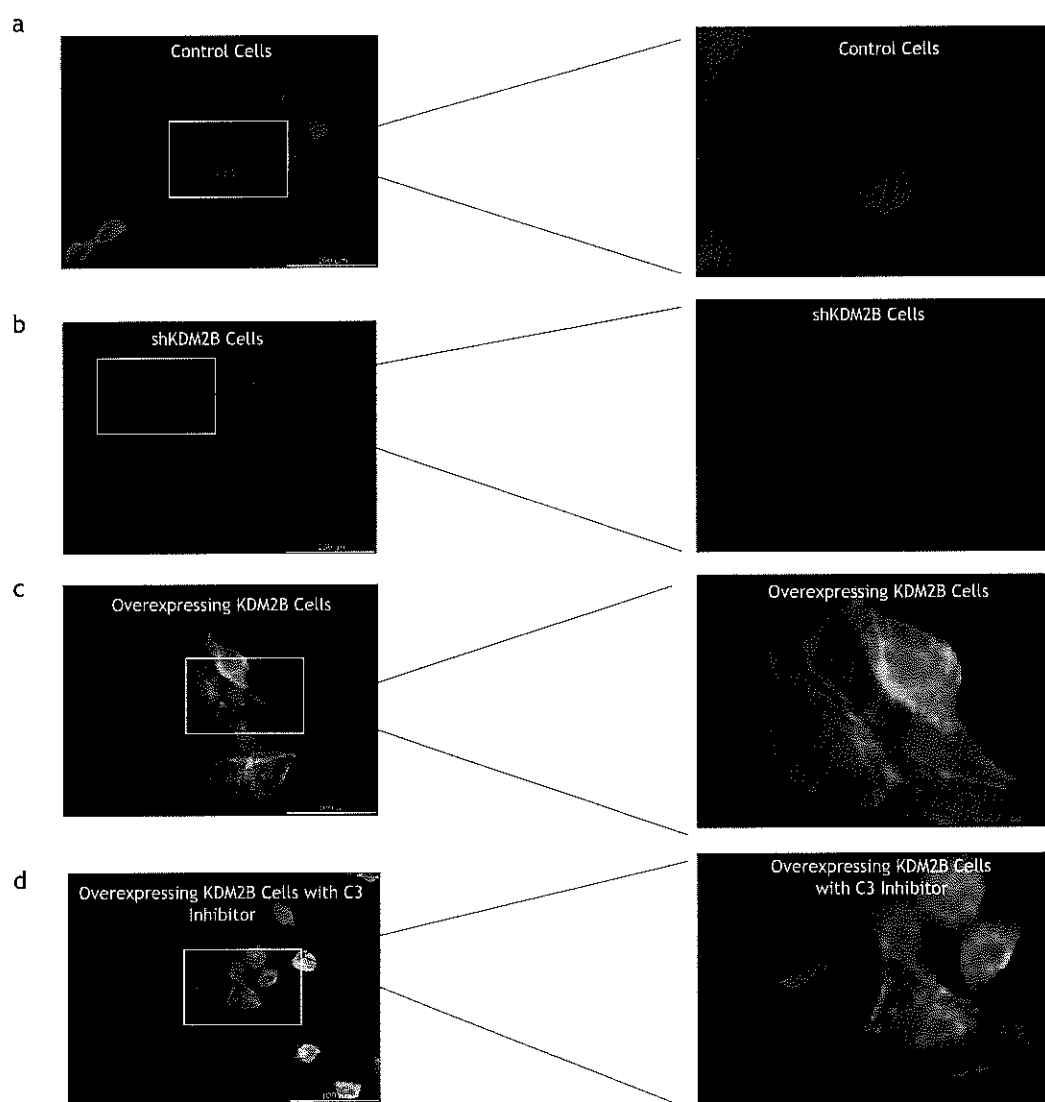


Figure 5. KDM2B regulates actin cytoskeleton organization.

Reorganization of actin filaments in DU-145 cells (a), after knockdown (b), or KDM2B overexpression (c). DU-145 control cells, knockdown KDM2B and overexpression of KDM2B DU-145 cells were stained with Rhodamine-phalloidin and dapi. Pretreatment of cell clones overexpressing KDM2B with the Rho GTPase inhibitor C3 transferase (d) blocked the extensive actin filament reorganization. Scale bar represents 100 μ m.

absence of Rho Inhibitor I (C3). The wounded area was photographed in specific time points using a LEICA inverted microscope (LEICA DMIRE2) with a 10 \times objective lens and was photographed with a LEICA DC 300F digital camera. Wound width was measured using Image J Analysis Software and expressed as percentage of the initial wound width.

2.8. Replicates and statistical analysis

All experiments were performed in at least 3 independent replications and the data are presented as means \pm standard deviation (SD). All data were tested for significance using unpaired Student *t*-test. Only results with *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant (* (*p* < 0.05), ** (*p* < 0.01), *** (*p* < 0.001)).

3. Results

3.1. KDM2B is functionally expressed in DU-145 prostate cancer cells

RT-PCR analysis established differential basic KDM2B expression levels in various tumor cells (Fig. 1A). DU-145 prostate cancer cells that showed the most dominant KDM2B expression were used for the further analysis of its function. Knockdown of KDM2B by shRNA revealed potent downregulation of gene transcripts (Fig. 1B, left panel) and reduction in protein levels (Fig. 1C, left panel), compared to scramble shRNA. On the other hand, overexpression of KDM2B was manifested by up-regulation of gene transcription (Fig. 1B, right panel) and protein levels (Fig. 1C, right panels). IF microscopic analysis further supported these findings (Fig. 1D). The functionality of KDM2B was further documented by a) its up-regulation upon FGF-2 treatment of the cells (Fig. 2A) and b) by the regulation of EZH2 expression profile (Fig. 2B, C). Indeed, in KDM2B-knockdown cell clones, both EZH2 gene transcription and protein expression were significantly reduced (Fig. 2B, C, left panels), while in KDM2B overexpressing cell clones EZH2 gene

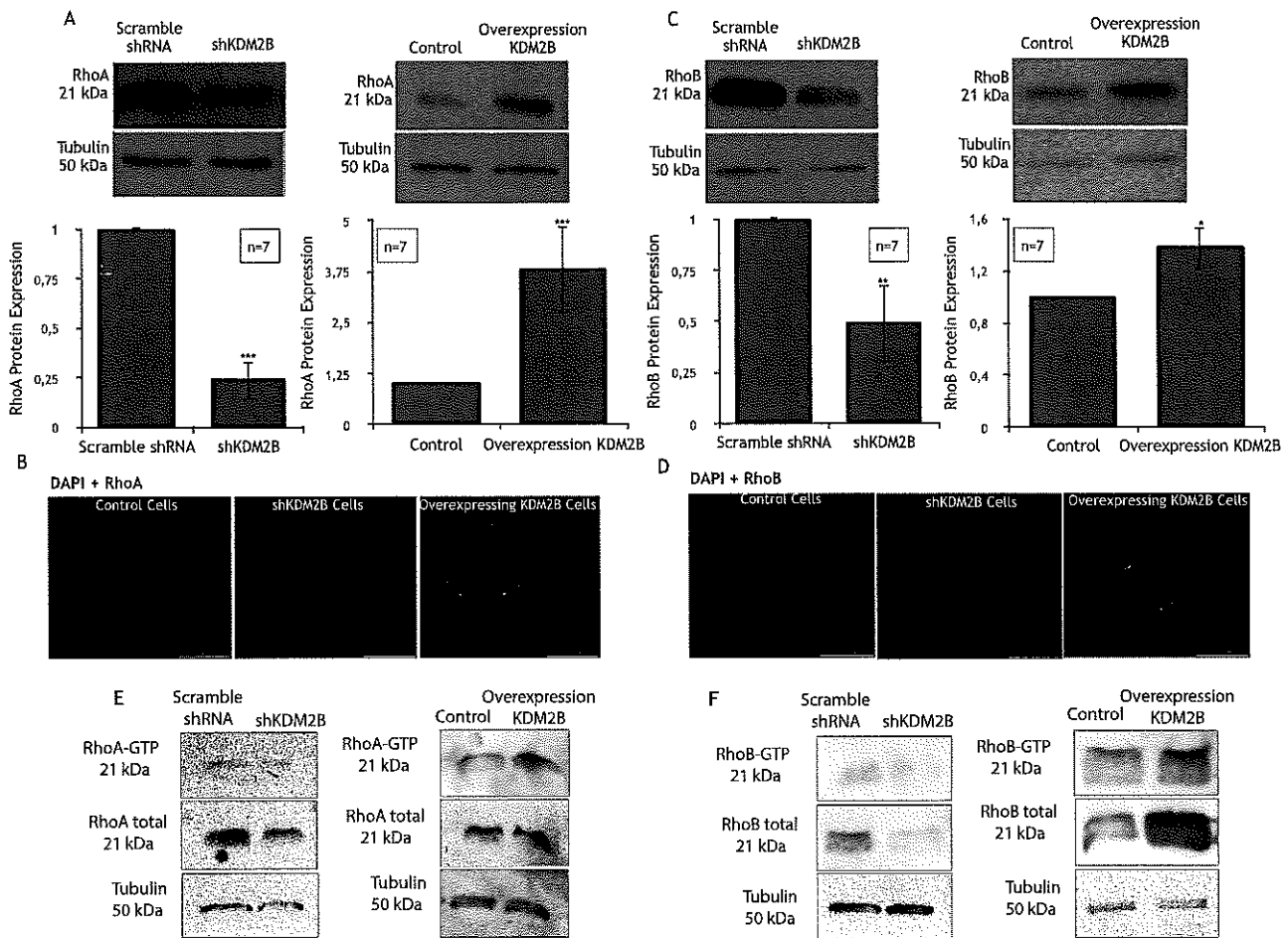


Figure 6. KDM2B regulates small Rho GTPases. (A) Protein Levels of RhoA in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. Original Western blot and quantification of the expression of RhoA and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of RhoA relative to control from $n = 7$ independent experiments; ***($p < 0.001$) indicates statistical significance. (B) Immunofluorescence of RhoA (green) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) DU-145 cells. Scale bar represents 100 μm . (C) Protein Levels of RhoB in knockdown and overexpression of KDM2B in DU-145 cells. Original Western blot and quantification of the expression of RhoB and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of RhoB relative to control from $n = 7$ independent experiments; *($p < 0.05$); **($p < 0.01$) indicates statistical significance. (D) Immunofluorescence of RhoB (red) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) DU-145 cells. Scale bar represents 100 μm . (E) Analysis of RhoA activation levels by GST-RBD Rho GTPase assay in scramble shRNA, knockdown KDM2B (left panel), control and overexpression (right panel) of KDM2B DU-145 cells. Tubulin serves as immunoblot loading control. (F) Analysis of RhoB activation levels by GST-RBD Rho GTPase assay in scramble shRNA, knockdown KDM2B (left panel), control and overexpression (right panel) of KDM2B DU-145 cells. Tubulin serves as immunoblot loading control.

transcription and protein expression were clearly up-regulated (Fig. 2B, C right panels). Once again, IF microscopic observations (Fig. 2D) strengthened this conclusion. Interestingly, very similar results were also observed in an additional tumor cell line, namely HCT116 colon tumor cells. Indeed, KDM2B-knockdown induced significant reduction of EZH2 gene transcription (Fig. 4A left panel), while overexpression of this epigenetic factor resulted in up-regulated EZH2 gene expression (Fig. 4A, right panel).

3.2. KDM2B controls the expression of the adhesion markers E-cadherin and ZO-1

To further analyze the role of KDM2B in cell-cell adhesion, the expression profiles of the epithelial EMT markers E-Cadherin and ZO-1

were analyzed. Fig. 3A, B demonstrates a clear upregulation of E-Cadherin gene transcription (Fig. 3A) and protein levels (Fig. 3B, left panel) in DU-145 cell clones upon knockdown by shKDM2B. In line with this, cell clones overexpressing KDM2B showed significantly reduced E-Cadherin gene transcripts (Fig. 3A) and protein levels (Fig. 3B, right panel). These findings were further supported by IF microscopic analysis, showing enhanced E-Cadherin staining in KDM2B-knockdown cell clones (Fig. 3C, middle panel) and diminished E-Cadherin staining in KDM2B-overexpressing cell clones (Fig. 3C right panel). Similar results were also obtained for ZO-1. Indeed, KDM2B knockdown provoked potent upregulation of ZO-1 gene transcription (Fig. 3D, left panel), protein expression, as documented by Western blotting (Fig. 3E, left panel) and IF-staining (Fig. 3F, middle panel), while cells overexpressing KDM2B demonstrated diminished ZO-1 expression levels

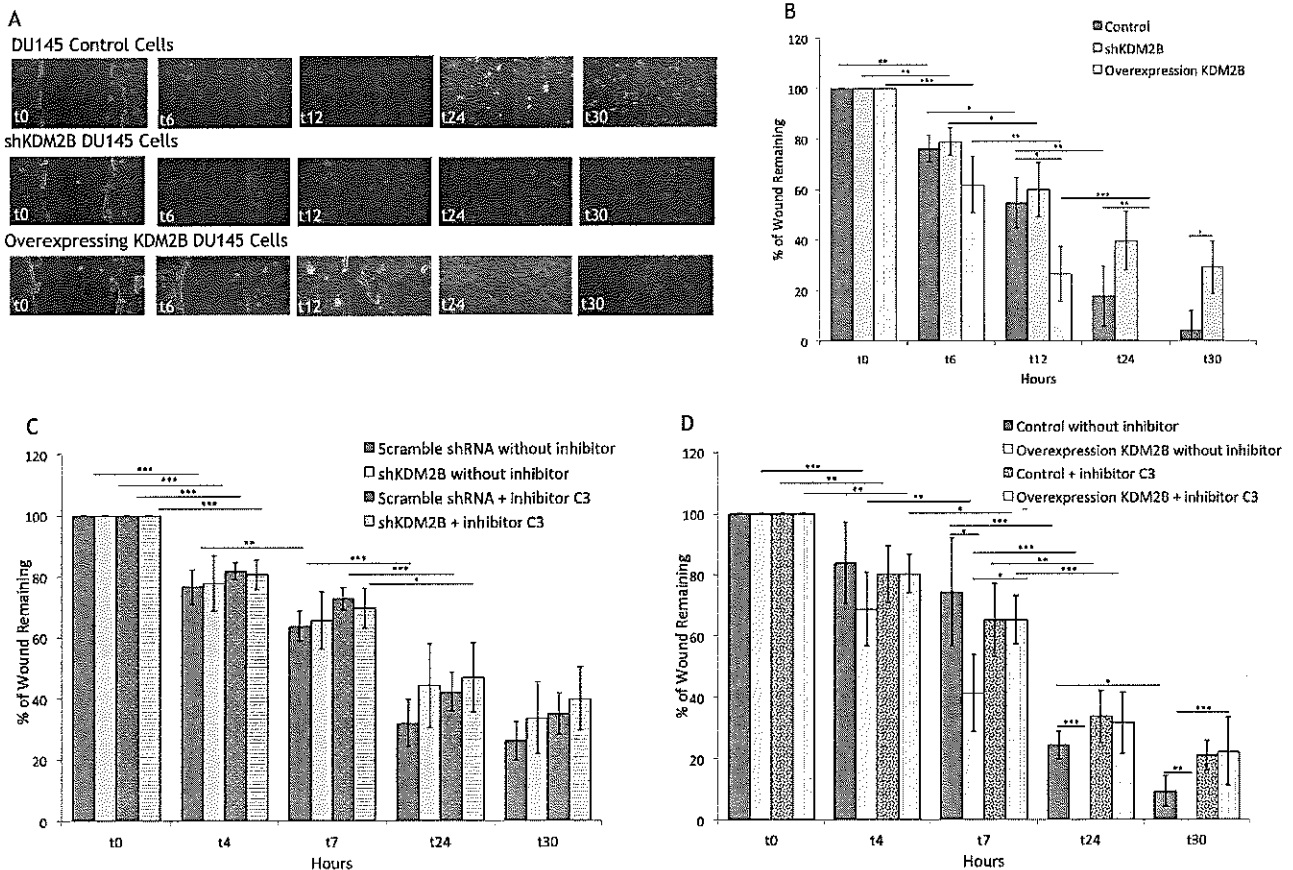


Figure 7. KDM2B regulates motility of DU-145 prostate cancer cells. (A) A uniform scratch was made in each confluent monolayer culture. Wound closure was monitored by microscope at the indicated times. KDM2B-knockdown induced a clear inhibition of the migration potential of DU-145 prostate cancer cells, while cells overexpressing KDM2B showed enhanced motility, compared to wild type DU-145 cells. Representative micrographs from $n = 6$ independent wound healing experiments. (B) Wound area, at the indicated time points, was expressed as a percentage of the initial wound area (% Wound width) from $n = 6$ independent experiments; * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) indicates statistical significance. (C, D) Rho GTPase inhibitor C3 transferase inhibits cell motility in DU-145 cells. A uniform scratch was made in each confluent monolayer culture in the absence or presence of Rho GTPase inhibitor C3 transferase. Wound area, at the indicated time points, was expressed as a percentage of the initial wound area. (C) The retardation of cell migration, shown in KDM2B knockdown cells was even enhanced in C3-pretreated cells. (D) Pretreatment of the cell clones overexpressing KDM2B with the Rho GTPase inhibitor C3 transferase markedly reduced the migration potential. Arithmetic means \pm SD, from $n = 3$ independent experiments, of the percentage migrated DU-145 cells in the absence and presence of Rho GTPase inhibitor C3 transferase; * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$) indicates statistical significance.

(Fig. 3D, right panel, 3E, right panel and 3F, right panel). These results imply a significant role of KDM2B in regulating expression of EMT markers that control cell-cell adhesion. Once again, in HCT116 colon tumor cells significant increase of E-Cadherin gene transcription became evident upon KDM2B knockdown (Fig. 4B, left panel), while it was down-regulated in KDM2B overexpressing cells (Fig. 4B, right panel).

3.3. KDM2B regulates actin cytoskeleton and small rho GTPases

Since previous studies established functional integration of cadherin cell-cell adhesions with epithelial cytoskeleton [28–32] the actin microfilament organization and signaling was further studied in DU-145 cells. IF microscopy manifested an extensive reorganization of actin filaments (Fig. 5 a-c), with formation of stress fibers in KDM2B-overexpressing cell clones (Fig. 5c and corresponding right panel), while actin staining was significantly reduced in KDM2B-knockdown cells (Fig. 5b and corresponding right panel). Interestingly, pretreatment of

cell clones overexpressing KDM2B with the RhoA/B GTPase inhibitor C3 transferase blocked the extensive actin filament reorganization (Fig. 5d, and corresponding right panel), indicating that activation of the Rho GTPases is involved in the regulation of actin architecture by KDM2B. In line with this assumption, knockdown of KDM2B induced a significant downregulation of RhoA and RhoB protein levels as manifested by Western blotting (Fig. 6A, C, left panels) and IF microscopy (Fig. 6B, D, middle panels). Overexpression of KDM2B resulted in strong increase in the protein levels of both small GTPases as demonstrated by Western blotting (Fig. 6A, C, right panels) and IF microscopy (Fig. 6B, D, right panels). Interestingly and in line with the C3 transferase results, KDM2B knockdown or overexpression induced a clear inhibition (Fig. 6E, left panel) or activation (Fig. 6E, right panel) of RhoA GTPase respectively, as manifested by the GST-RBD rhotectin assay. Very similar results were also obtained for RhoB activation profile upon KDM2B knockdown (Fig. 6F, left panel) or overexpression (Fig. 6F, right panel). It should be noted that KDM2B did not influence gene transcription of both small GTPases (Fig. S1). This observation

that was also reported by others [33,34], implies rather functional control of those signaling molecules by KDM2B and needs further detailed analysis that is now in progress in our laboratory.

3.4. KDM2B regulates motility of DU-145 prostate cancer cells

Previous studies established an important role of this histone demethylase in cell migration [12]. In line with this report, KDM2B-knockdown induced a clear inhibition of the migration potential of DU-145 prostate cancer cells, as documented by significant retardation of wound healing after 12 to 30 h, while cells overexpressing KDM2B showed enhanced motility, compared to wild type DU-145 cells (Fig. 7A). Quantification of these findings is shown in Fig. 7B. Further experiments revealed that this effect was correlated with the observed KDM2B-based regulation of RhoA/B signaling; indeed, pretreatment of the cell clones overexpressing KDM2B with the Rho GTPase inhibitor C3 transferase markedly reduced the migration potential (Fig. 7D). On the other hand, the retardation of cell migration, shown in KDM2B knockdown cells was even enhanced in C3-pretreated cells (Fig. 7C). These findings establish a significant role of RhoA/B-GTPases-governed actin cytoskeleton reorganization in the regulation of cell motility by KDM2B in DU-145 prostate cancer cells. Interestingly, in other cell model with lower KDM2B basal expression (i.e. HCT116 colon tumor cells, Fig. 1A), the migration assay failed to establish a clear relationship between KDM2B expression and motility (data not shown). This observation indicates that basal KDM2B expression levels differentially regulate migration behavior of tumor cell and needs further investigation.

4. Discussion

The present study establish for the first time a functional link between the epigenetic factor KDM2B and actin cytoskeleton organization and Rho signaling that in turn may control cell adhesion and migration of DU-145 prostate tumor cells. Our results demonstrated that KDM2B overexpression or silencing is regulating a) gene transcription and protein expression of the epithelial markers *E-Cadherin* and *ZO-1*, b) expression and activity of RhoA and RhoB small GTPases, c) actin cytoskeleton reorganization and finally, d) the migration potential of DU-145 cells. These results imply a significant role of this epigenetic factor in governing migration of prostate cancer cells via deregulation of the normal cytoskeleton organization and function. Moreover, since similar results on *EZH2* and *E-Cadherin* expression profiles became evident as well in HCT116 colon tumor cells (Fig. 4) we assume that KDM2B plays a significant role in regulating cancer cells function.

Previous studies showed that growth factor signals may drive the upregulation of KDM2B, which in co-operation with Polycomb Group proteins, promotes motility and invasion in tumor cell lines and primary tumors [12]. Our present findings summarized in the cartoon of Fig. 8, provide now novel mechanistic insights for the KDM2B-induced regulation of motility in prostate tumor cells and are in line with these observations. FGF-2 regulates KDM2B expression, which controls expression and activity of both, RhoA/B GTPases and epithelial EMT markers *E-Cadherin* and *ZO-1* that may govern actin cytoskeleton reorganization and cell-cell adhesion respectively. These signals are in turn involved in the regulation of cell motility.

Besides Rho GTPases signaling, KDM2B may as well control additional signaling effectors that regulate actin reorganization, cell growth and motility. Indeed, preliminary results from our group indicated that KDM2B is involved in the regulation of the expression profiles of Focal Adhesion Kinase (FAK), Phosphoinositide-3 Kinase (PI-3 K) and AKT (Fig. S2). Since the FAK/PI-3 K signaling pathway is regulating actin cytoskeleton organization via *Rac1/Cdc42* GTPases, as well as cell

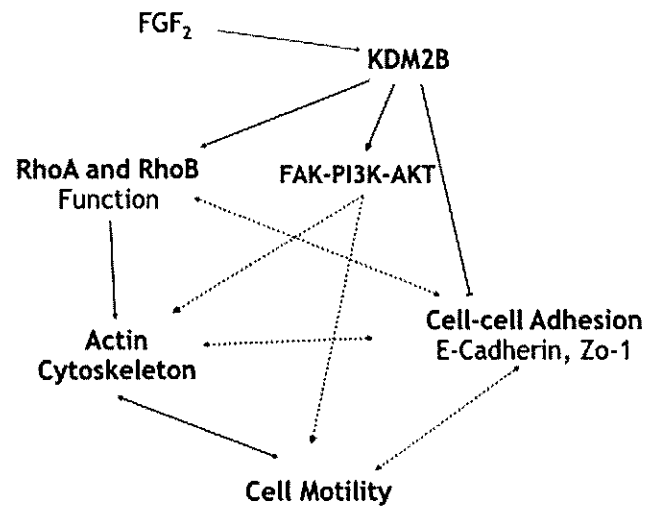


Figure 8. Graphical Abstract. KDM2B controls cell motility via different ways. Schematic representation of the proposed KDM2B mechanism regulating actin cytoskeleton reorganization and migration in DU-145 prostate cancer cells following FGF-2 stimulation. Solid arrows indicate findings of the present study. Dashed arrows indicate findings from previous studies. See text for further details.

growth and motility [35–37] further detailed studies are now needed to establish a clear involvement of the FAK/PI-3 K pathway in the control of tumor cell growth and motility by KDM2B.

Recent studies established that substantial cytoskeleton restructuring regulated by Rho/ROCK signaling is correlated with EMT [23,24,38,39]. Whether KDM2B may as well control EMT in DU-145 cells remains however still elusive, since attempts to estimate the expression profile of mesenchymal markers, including *N-Cadherin*, *fibronectin* or *vimentin* failed, most probably due to the very low expression levels of those proteins in DU-145 cells, as previously reported [40,41] (data not shown). Accordingly, we assume that the observed substantial regulation of cell migration is mainly controlled by the Rho-GTPases-induced actin cytoskeleton rearrangement, as described earlier for various tumors [13,21,42–48]. This assumption is further supported by our findings showing control of the observed KDM2B-induced migration effects by C3 transferase, a classical RhoA/B/C GTPases inhibitor that blocks Rho GTPases activity and actin redistribution [49,50].

On the other hand the impact of the observed regulation of cell-cell adhesion on the migration of DU-145 cells through the transcriptional control of epithelial markers remains to be elucidated. Indeed, cell-cell adhesion may govern the invasive potential of tumor cells [32,51]. In addition, recent findings showed that RhoB and *E-Cadherin* are co-localized to cell-cell adhesions in DU-145 prostate cancer cells [18]. In this study it was reported that RhoB depletion by siRNA reduced cell-cell adhesion by downregulation of *E-Cadherin*, an effect accompanied by increased migration of DU-145 cells. Our results showing significantly increased migration in DU-145 cell clones overexpressing KDM2B that in turn downregulated *E-Cadherin* support this conclusion. On the other hand since KDM2B did not influence RhoA/B GTPases gene transcription (Fig. S1), it remains still unclear whether the observed downregulation of RhoB protein expression is directly involved in regulation of migration. Further experiments are now needed to address this possibility.

To conclude, in this study we report for the first time that the chromatin factor KDM2B regulates cell-cell adhesion, actin cytoskeleton organization and Rho signaling that in turn control the migration potential of prostate cancer cells. Our findings imply that in tumor cells,

chromatin regulators may contribute to tumor growth by controlling expression and function of cytoskeletal and cell-cell adhesion genes, invasiveness and migration and establish a clear mechanistic link, how alterations in epigenetic factors may lead to deregulated cytoskeletal functions.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found in online version.

Acknowledgements

Authors would like to thank Maria G. Daskalaki and other members of the Department of Biochemistry University of Crete Medical School, for technical assistance and useful suggestions.

Funding

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Mercator program), the University of Crete Research Committee.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.01.009>.

References

- [1] R. Pfau, A. Tzatsos, S.C. Kampranis, O.B. Serebrennikova, S.E. Bear, P.N. Tschlis, Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (6) (2008) 1907–1912, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0711865105>.
- [2] T. Suzuki, H. Shen, K. Akagi, et al., New genes involved in cancer identified by retroviral tagging, *Nat. Genet.* 32 (1) (2002) 166–174, <http://dx.doi.org/10.1038/ng949>.
- [3] T. Suzuki, K. Minehata, K. Akagi, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, Tumor suppressor gene identification using retroviral insertional mutagenesis in Bln-deficient mice, *EMBO J.* 25 (14) (2006) 3422–3431, <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601215>.
- [4] A.G. Uren, J. Kool, K. Matentzoglou, et al., Large-scale mutagenesis in p19ARF- and p53-deficient mice identifies cancer genes and their collaborative networks, *Cell* 133 (4) (2008) 727–741, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.021>.
- [5] J. He, A.T. Nguyen, Y. Zhang, KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia, *Blood* 117 (14) (2011) 3869–3880, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-10-312736>.
- [6] A. Tzatsos, P. Paskaleva, S. Lympieri, et al., Lysine-specific demethylase 2b (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells, *J. Biol. Chem.* 286 (38) (2011) 33061–33069, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.257667>.
- [7] A. Tzatsos, R. Pfau, S.C. Kampranis, P.N. Tschlis, Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (8) (2009) 2641–2646, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0813139106>.
- [8] S.C. Kampranis, P.N. Tschlis, Chapter 4 histone demethylases and cancer, *Adv. Cancer Res.* 102 (9) (2009) 103–169, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)02004-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-230X(09)02004-1).
- [9] A.M. Farcas, N.P. Blackledge, I. Sudbery, et al., KDM2B links the polycomb repressive complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands, *elife* 2012 (1) (2012) 1–26, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.00205>.
- [10] F. Kottakis, P. Foltopoulou, I. Sanidas, et al., NDI1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells, *Cancer Res.* 74 (14) (2014) 3935–3946, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2733>.
- [11] M. Rohde, E. Sievers, A. Janzer, et al., Overexpression of histone demethylase Fbx10 leads to enhanced migration in mouse embryonic fibroblasts, *Exp. Cell Res.* 348 (2) (2016) 123–131, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.026>.
- [12] F. Kottakis, C. Polytarchou, P. Foltopoulou, I. Sanidas, S.C. Kampranis, P.N. Tschlis, FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis through an NDI1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway, *Mol. Cell* 43 (2) (2011) 285–298, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.020>.
- [13] A. Fajol, S. Honisch, B. Zhang, et al., Fibroblast growth factor (Fgf) 23 gene transcription depends on actin cytoskeleton reorganization, *FEBS Lett.* 590 (6) (2016) 705–715, <http://dx.doi.org/10.1002/1873-3468.12096>.
- [14] H.H. Gari, G.D. DeGala, R. Ray, M.S. Lucia, J.R. Lambert, PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion properties critical for cell migration and invasion, *Cancer Lett.* 380 (2) (2016) 505–512, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.017>.
- [15] P. Wang, J. Zhao, X. Yang, et al., PFDN1, an indicator for colorectal cancer prognosis, enhances tumor cell proliferation and motility through cytoskeletal reorganization, *Med. Oncol.* 32 (12) (2015) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-015-0710-z>.
- [16] F.M. Vega, A.J. Ridley, The RhoB small GTPase in physiology and disease, *Small GTPases.* 0 (0) (2016) 1–10, <http://dx.doi.org/10.1080/21541248.2016.1253528>.
- [17] A.C. Callan-Jones, R. Voituriez, Actin flows in cell migration: from locomotion and polarity to trajectories, *Curr. Opin. Cell Biol.* 38 (2016) 12–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2016.01.003>.
- [18] F.M. Vega, M. Thomas, N. Reymond, A.J. Ridley, The rho GTPase RhoB regulates cadherin expression and epithelial cell-cell interaction, *Cell Commun. Signal.* 13 (2015) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1186/s12964-015-0085-y>.
- [19] R.H. Insall, L.M. Machesky, Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks, *Dev. Cell* 17 (3) (2009) 310–322, <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.08.012>.
- [20] E.A. Papakonstanti, C. Stourmaras, Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton, *FEBS Lett.* 582 (14) (2008) 2120–2127, <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.064>.
- [21] C. Stourmaras, A. Gravanis, A.N. Margioris, F. Lang, The actin cytoskeleton in rapid steroid hormone actions, *Cytoskeleton* 71 (5) (2014) 285–293, <http://dx.doi.org/10.1002/cm.21172>.
- [22] D. Vignjevic, G. Montagnac, Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion, *Semin. Cancer Biol.* 18 (1) (2008) 12–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2007.08.001>.
- [23] E. Papadimitriou, E. Vasilaki, C. Vorvis, et al., Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF- β and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition, *Oncogene* 31 (23) (2011) 18–21, <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.457>.
- [24] D. Schneider, A. Janshoff, Inhibition of actin dynamics during epithelial-to-mesenchymal transition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 419 (2) (2012) 221–225, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.151>.
- [25] G.F. Le Bras, K.J. Taubenslag, C.D. Andl, The regulation of cell-cell adhesion during epithelial-mesenchymal-transition, motility and tumor progression, *Cell Adhes. Migr.* 6 (4) (2012) 1, <http://dx.doi.org/10.4161/cam.21326>.
- [26] P.M. Järvinen, M. Laiho, LIM-domain proteins in transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition and myofibroblast differentiation, *Cell. Signal.* 24 (4) (2012) 819–825, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.12.004>.
- [27] B. Sun, Y. Fang, Z. Li, Z. Chen, J. Xiang, Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression, (Review), *Biomed Reports* (2015) 603–610, <http://dx.doi.org/10.3892/br.2015.494>.
- [28] E. Asensio-Juan, C.M.-B. Gallego, The histone demethylase PHF8 is essential for endothelial cell migration, *PLoS One* 11 (1) (2016) 1–15, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146645>.
- [29] V. Braga, Spatial integration of E-cadherin adhesion, signalling and the epithelial cytoskeleton, *Curr. Opin. Cell Biol.* 42 (2016) 138–145, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2016.07.006>.
- [30] H. Schnittler, M. Taha, M.O. Schnittler, A.A. Taha, N. Lindemann, J. Seebach, Actin filament dynamics and endothelial cell junctions: the Ying and Yang between stabilization and motion, *Cell Tissue Res.* 355 (3) (2014) 529–543, <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-014-1856-2>.
- [31] M. Michael, A.S. Yap, The regulation and functional impact of actin assembly at cadherin cell-cell adhesions, *Semin. Cell Dev. Biol.* 24 (4) (2013) 298–307, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semedb.2012.12.004>.
- [32] M. Canel, A. Serrels, M.C. Frame, V.G. Brunton, E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis, *J. Cell Sci.* 126 (Pt 2) (2013) 393–401, <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.100115>.
- [33] S.A. Benitah, P.F. Valer??n, L. Van Aelst, C.J. Marshall, J.C. Lacal, Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation, *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 1705 (2) (2004) 121–132, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.10.002>.
- [34] R. Karlsson, E.D. Pedersen, Z. Wang, C. Brakebusch, Rho GTPase function in tumorigenesis, *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 1796 (2) (2009) 91–98, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.003>.
- [35] G. Kallergi, S. Agelaki, H. Markomanolaki, C. Stourmaras, Activation of FAK / PI3K / Rac1 signaling controls actin reorganization and inhibits cell motility in human cancer cells, *Cell. Physiol. Biochem.* (2007) 977–986.
- [36] E.A. Papakonstanti, M. Kampa, E. Castanas, C. Stourmaras, A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors, *Mol. Endocrinol.* 17 (5) (2003) 870–881, <http://dx.doi.org/10.1210/me.2002-0253>.
- [37] N. Papadopoulou, E.A. Papakonstanti, G. Kallergi, K. Alevizopoulos, C. Stourmaras, Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact, *IUBMB Life* 61 (1) (2009) 56–61, <http://dx.doi.org/10.1002/iub.150>.
- [38] B. Baum, M. Georgiou, Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling, *J. Cell Biol.* 192 (6) (2011) 907–917, <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201009141>.
- [39] S. Yonemura, Cadherin-actin interactions at adherens junctions, *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 (5) (2011) 515–522, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2011.07.001>.

- [40] L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, P. Oksvold, et al., Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics, *Mol. Cell. Proteomics* 13 (2) (2014) 397–406, <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>.
- [41] NCBI. Transcriptome of Gene Expression, CDH2. Pubmed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1000>. Published 2014. Accessed July 30, 2017.
- [42] N. Papadopoulou, I. Charalampopoulos, K. Alevizopoulos, A. Gravanis, C. Stournaras, Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells, *Exp. Cell Res.* 314 (17) (2008) 3162–3174, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.07.012>.
- [43] M.J. Stagno, N. Zacharopoulou, J. Bochem, et al., Istaroxime inhibits motility and down-regulates Orai1 expression, SOCE and FAK phosphorylation in prostate cancer cells, *Cell. Physiol. Biochem.* (2017) 1366–1376, <http://dx.doi.org/10.1159/000479200>.
- [44] J. Luo, B. Dingyun Li, B. Dan Wei, B. Xiaoguang Wang, B. Lan Wang, X. Zeng, RhoA and RhoC are involved in stromal cell-derived factor-1- induced cell migration by regulating F-actin redistribution and assembly, *Mol. Cell. Biochem.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-017-3072-3>.
- [45] M. Tseliou, A. Al-Qahtani, S. Alarifi, S.H. Alkahtani, C. Stournaras, G. Sourvinos, The role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in cell morphology, proliferation and migration in human cytomegalovirus (HCMV) infected glioblastoma cells, *Cell. Physiol. Biochem.* 38 (1) (2016) 94–109, <http://dx.doi.org/10.1159/000438612>.
- [46] M. Schenk, B. Aykut, C. Teske, N.A. Giese, J. Weitz, T. Welsch, Salinomycin inhibits growth of pancreatic cancer and cancer cell migration by disruption of actin stress fiber integrity, *Cancer Lett.* 358 (2) (2015) 161–169, <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.037>.
- [47] E.M. Schmidt, S. Gu, V. Anagnostopoulou, et al., Serum- and glucocorticoid-dependent kinase-1-induced cell migration is dependent on vinculin and regulated by the membrane androgen receptor, *FEBS J.* 279 (7) (2012) 1231–1242, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08515.x>.
- [48] S. Gu, N. Papadopoulou, Activation of membrane androgen receptors in colon cancer inhibits the Prosurvival signals Akt/bad in vitro and in vivo and blocks migration via vinculin/actin signaling, *Mol. Med.* 17 (1–2) (2011) 1–11, <http://dx.doi.org/10.2119/molmed.2010.00120>.
- [49] I. Just, C. Mohr, G. Schallehn, et al., Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by *Clostridium Limosum*, *J. Biol. Chem.* 267 (15) (1992) 10274–10280.
- [50] A. Moustakas, C. Stournaras, Regulation Of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts, *J. Cell Sci.* 1179 (8) (1999) 1169–1179, [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(99\)80199-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(99)80199-8).
- [51] A. Buda, M. Pignatelli, E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis, *Cell Commun. Adhes.* 18 (6) (2011) 133–143, <http://dx.doi.org/10.3109/15419061.2011.636465>.

Original Paper

The Epigenetic Factor KDM2B Regulates EMT and Small GTPases in Colon Tumor Cells

Nefeli Zacharopoulou^a Anna Tsapara^a Galatea Kallergi^a Evi Schmid^b
Saad Alkahtani^{a,c} Saud Alarifi^c Philip N. Tsiichlis^d Sotirios C. Kampranis^a
Christos Stournaras^a

^aDepartment of Biochemistry, University of Crete Medical School, Voutes, Heraklion, Greece,

^bDepartment of Pediatric Surgery & Pediatric Urology, Children's Hospital, Eberhard-Karls-University

Tuebingen, Tuebingen, Germany, ^cDepartment of Zoology, Science College, King Saud University,

Riyadh, Saudi Arabia, ^dMolecular Oncology Research Institute, Tufts Medical Center, Boston, USA

Keywords

KDM2B • Small-GTPases • EMT • Colon cancer

Abstract

Background/Aims: The epigenetic factor KDM2B is a histone demethylase expressed in various tumors. Recently, we have shown that KDM2B regulates actin cytoskeleton organization, small Rho GTPases signaling, cell-cell adhesion and migration of prostate tumor cells. In the present study, we addressed its role in regulating EMT and small GTPases expression in colon tumor cells. **Methods:** We used RT-PCR for the transcriptional analysis of various genes, Western blotting for the assessment of protein expression and immunofluorescence microscopy for visualization of fluorescently labeled proteins. **Results:** We report here that KDM2B regulates EZH2 and BMI1 in HCT116 colon tumor cells. Knockdown of this epigenetic factor induced potent up-regulation of the protein levels of the epithelial markers E-cadherin and ZO-1, while the mesenchymal marker N-cadherin was downregulated. On the other hand, KDM2B overexpression downregulated the levels of both epithelial markers and upregulated the mesenchymal marker, suggesting control of EMT by KDM2B. In addition, RhoA, RhoB and RhoC protein levels diminished upon KDM2B-knockdown, while all three small GTPases became upregulated in KDM2B-overexpressing HCT116 cell clones. Interestingly, Rac1 GTPase level increased upon KDM2B-knockdown and diminished in KDM2B-overexpressing HCT116 colon tumor- and DU-145 prostate cancer cells. **Conclusions:** These results establish a clear functional role of the epigenetic factor KDM2B in the regulation of EMT and small-GTPases expression in colon tumor cells and further support the recently postulated oncogenic role of this histone demethylase in various tumors.

© 2018 The Author(s)
Published by S. Karger AG, Basel

S. C. Kampranis and C. Stournaras contributed equally to this work.

Prof. Dr. Christos Stournaras

Department of Biochemistry,
University of Crete Medical School, 71110 Heraklion (Greece)
E-Mail: stournac@uoc.gr

Introduction

The epigenetic factor KDM2B is a novel oncogene, coding for a lysine-specific demethylase that removes H3K4me3 and H3K36me2 histone marks from the histones leading to transcriptional repression [1–4]. The function of KDM2B depends on the co-operation with Polycomb Repressor Complex-2 (PRC-2) that enables MEFs to undergo immortalization [4]. KDM2B is regulated by the basic fibroblast growth factor (bFGF) in human tumors that in turn governs various tumor characteristics including cell growth, migration, invasiveness, angiogenesis and actin cytoskeleton organization [5–7]. A previous study reported control of cell migration and angiogenesis by KDM2B in HUVECs [6]. In line with this report, recent studies from our group in DU-145 prostate cancer cells established a significant role of this epigenetic factor in regulating cell migration [8]. Analysis of the underlying mechanism revealed the involvement of actin cytoskeleton reorganization, Rho GTPase signaling and cell-cell adhesion molecules E-cadherin and ZO-1 [8]. These findings supported previous reports suggesting that epigenetic mechanisms regulate actin cytoskeleton architecture [8–10] that in turn is a crucial mediator conferring cancer cells with migratory and invasive characteristics [11–21]. In addition, these studies established a clear link between KDM2B function, actin architecture and migration in prostate cancer cells [8]. However, it remained unclear whether the control of actin cytoskeleton signaling mechanisms, including activity of Rho GTPases, by this epigenetic factor is a general regulatory phenomenon, relevant for other tumor cells and whether KDM2B-induced cell-cell adhesion alterations may as well influence epithelial to mesenchymal transition (EMT). To this end, in the present study we addressed whether epigenetic alterations result in the deregulation of small GTPases function and may influence EMT in colon tumor cells. For this, we analyzed whether KDM2B governs the expression of small GTPases genes, including RhoA/RhoB/RhoC and Rac1, and addressed its role in regulating the EMT markers E-cadherin, N-cadherin and ZO-1 in HCT116 colon cancer cells. Our findings fully support the notion that in tumor cells, epigenetic mechanisms control the expression and function of EMT and cytoskeletal genes.

Materials and Methods

RPMI 1640 medium, penicillin/streptomycin, trypsin, puromycin, SuperScript II Reverse Transcriptase, Trizol reagent for RNA extraction, dNTPs, ProLong Gold Antifade reagent with Dapi and Anti-Zo1 (339100) were purchased from Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Fetal Bovine Serum (FBS) was purchased from Biochrom (Berlin, Germany), RT-PCR primers from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). FITC-IgG antibody was from Molecular probes Inc (Eugene OR USA). Anti-Ezh2 (D2C9), anti-Bmi1 (D20B7), anti-N-Cadherin (13A9) and anti-RhoC (D40E4) antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-RhoA (sc-418), anti-RhoB (sc-180) and anti-Rac1 (sc-95) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA) and KAPA SYBR Green/ROX qPCR Master Mix from Fermentas (Maryland, USA). Anti-JHDM1B (KDM2B) (09-864) antibody, Goat anti-rabbit and anti-mouse IgG Peroxidase Conjugated antibodies and ECL Immobilon western-Chemiluminescent HRP Substrate were purchased from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Albumin Fraction V (BSA) was from PanReac AppliChem, ITW Reagents (Gatersleben, Germany). All other chemicals were from usual commercial sources at the purest grade available.

Cell cultures, Lentiviral and Retroviral packaging and transduction

HCT116 and DU-145 cell lines were cultured in RPMI 1640, supplemented with 1% penicillin/streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. Lentiviral and retroviral packaging and transduction in HCT116 cells were performed as described previously [8]. Cells infected with retrovirus ((pBABEpuro-KDM2B (for overexpression KDM2B) or control empty vector pBABEpuro (control for overexpressing KDM2B cells)) or lentivirus (pLKO.1KDM2BshRNA (expressing either shKDM2B (pLKO.1-KDM2B-sh) or scramble shRNA (pLKO.1-scrambled-sh)) constructs. Lentiviral-based shRNAs for human KDM2B were purchased from Open Biosystems (cat no. RH54533-

NM_001005366). Out of the 5 clones, the most effective in knocking down KDM2B was TRCN0000118437. Target Sequence: CGGCCTTTACAAGAAGACATT; Hairpin Sequence: 5'-CCGG-CGGCCTTTACAAGAAGACATT-CTCGAG AATGCTTCTTGTAAAGGCCG-TTTTGG-3'. The lentiviral pLKO.1 vector, expressing a scrambled shRNA and the pLKO.1 retroviral empty vector (pBABEpuro) served as negative controls.

Protein extraction and Western Blotting

For Western blotting, lentiviral or retroviral transduced cells were lysed in lysis buffer: (Tris-HCl 50mM pH7.5, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, SDS 0, 2% and sodium deoxycholate 0, 1%, Protease/Phosphatase inhibitor cocktail of NaF 1M, Leupeptin 1M, β -glycerophosphate 10mM, Na₃VO₄ 10mM, Aprotinin 80 μ M, Pepstatin A 1mM, E-64 1, 5mM, Bestatin 5mM, AEBSF 100mM). Total protein extracts were analyzed by Western blotting followed by nitrocellulose membrane blotting with specific antibodies, as previously described [8]. Protein band intensity was quantified by using Image Lab Software (Bio-Rad).

RNA isolation, cDNA synthesis and Real time PCR

The cell lysates were processed for total RNA extraction using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and real time PCR were performed as described previously [8]. For the amplification the following primers were used (5'-3' orientation):

Actin, forward CGGCATCGTCACCAACTG;

Actin, reverse GGCACACGCAGCTCATTG;

Kdm2b, forward TCTACGAGATCGAGGACAGGA;

Kdm2b, reverse ACCAGCACATCTCATAGTAGAAGG.

Immunofluorescence

Immunofluorescence microscopy experiments in HCT116 cells were performed as described previously [8]. Primary antibodies used were anti-JHDM1B (KDM2B) (1:100, 09-864, Millipore), anti-EZH2 (1:100, D2C9, Cell Signaling Technology) and anti-BMI 1 (1:100, D20B7, Cell Signaling Technology), and secondary antibodies Alexa 555-conjugated goat (1:600, anti-rabbit, Invitrogen) and FITC 488 (1:500, anti-mouse, Invitrogen). The slides were mounted using the ProLong Gold Antifade reagent with Dapi. Photomicrographs were obtained with a LEICA microscope (LEICA DM LB) and were photographed with a LEICA DC 300F digital camera, using the Zeiss Plan-neofluar 40 \times /0.75 objective lens. The images were analyzed with the instrument's software.

Replicates and Statistical Analysis

All experiments were performed in 3 independent replications and data are presented as means \pm standard deviation (SD). All data were tested for significance using unpaired Student t-test, with P values of 0.05 or less being considered statistically significant (* (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001)).

Results

In line with previous reports [8], expression of KDM2B protein was evident in HCT116 colon tumor cells (Fig. 1A). Compared to scramble shRNA, knockdown of KDM2B revealed downregulation of both, gene transcripts (Fig. 1B, left panel) and protein levels (Fig. 1C, left panels). On the other hand, overexpression of KDM2B bare up-regulation of gene transcripts (Fig. 1B, right panel) and protein levels (Fig. 1C, right panels). These findings were fully supported by IF microscopic analysis (Fig. 1D).

KDM2B gene was functional in HCT116 cells, since knockdown resulted in clear reduction of EZH2 protein levels (Fig. 2A, left panels), whereas overexpression induced enhanced EZH2 protein levels (Fig. 2A, right panel). In addition to EZH2, KDM2B regulated as well BMI1 protein levels in HCT116 cells (Fig. 2B). IF microscopic observations (Fig. 2C and D) strengthened these findings.

We further analyzed the role of KDM2B in controlling EMT in tumor cells by assessing the expression profiles of the EMT markers E-Cadherin, ZO-1 and N-Cadherin. Knockdown of KDM2B gene in HCT116 cell clones revealed elevated protein expression of the epithelial

Fig. 1. Expression of KDM2B in tumor cells. (A) Protein expression of KDM2B and tubulin (control) in HCT116 and DU-145 cell lysates. Western blot analysis established differential basic KDM2B expression levels. (B) KDM2B mRNA levels were measured by quantitative real time RT-PCR, with β -actin as the internal control in scramble shRNA, shKDM2B (left panel), and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. The data are presented as mean \pm standard deviation (SD) from n=3 independent experiments, while y axis represents the ratio between KDM2B and actin genes; ***p<0.001 indicates statistical significance. (C) Original Western blot and quantification of the expression of KDM2B and tubulin (control) protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of KDM2B relative to control from n=3 independent experiments; ***p<0.001 indicates statistical significance. (D) Immunofluorescence of KDM2B (red) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) HCT116 cells. Scale bar represents 100 μ m.

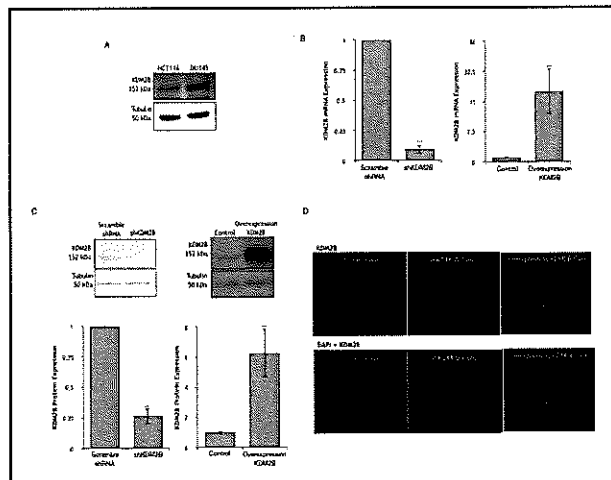


Fig. 2. KDM2B controls the expression of EZH2 and BMI1 in HCT116 colon cancer cells. (A) Original Western blot and quantification of the expression of EZH2 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of EZH2 relative to control from n=3 independent experiments; ***p<0.001 indicates statistical significance. (B) Original Western blot and quantification of the expression of BMI 1 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of BMI 1 relative to control from n=3 independent experiments; *(p<0.05);**(p<0.01) indicates statistical significance. (C) Immunofluorescence of EZH2 (red) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) HCT116 cells. Scale bar represents 100 μ m. (D) Immunofluorescence of BMI1 (red) staining and nuclei (blue) in control (left), shKDM2B (middle) and overexpression of KDM2B (right) HCT116 cells. Scale bar represents 100 μ m.

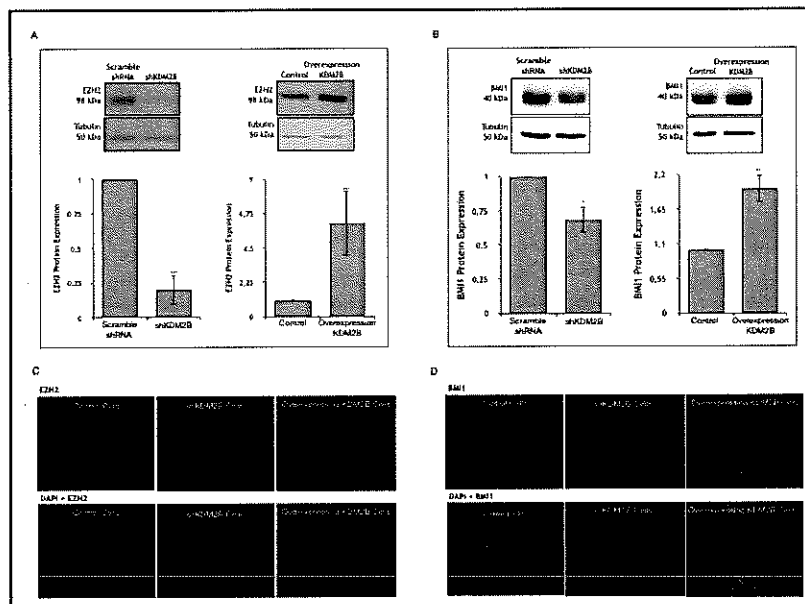


Fig. 3. KDM2B controls the expression of E-Cadherin, ZO-1 and N-Cadherin. (A) Original Western blot and quantification of the expression of E-Cadherin and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of E-Cadherin relative to control from n=3 independent experiments; *(p<0.05) indicates statistical significance. (B) Original Western blot and quantification of the expression of ZO-1 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of ZO-1 relative to control from n=3 independent experiments; *(p<0.05) indicates statistical significance. (C) Original Western blot and quantification of the expression of N-Cadherin and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of N-Cadherin relative to control from n=3 independent experiments; ** (p<0.01) indicates statistical significance.

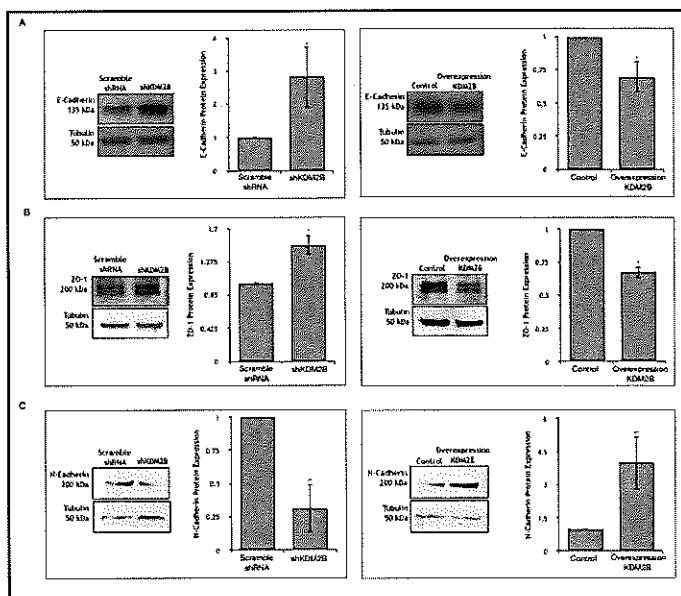


Fig. 4. KDM2B regulates expression of small Rho GTPases. (A) Original Western blot and quantification of the expression of RhoA and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of RhoA relative to control from n=3 independent experiments; *(p<0.05) indicates statistical significance. (B) Original Western blot and quantification of the expression of RhoB and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of RhoB relative to control from n=3 independent experiments; *(p<0.05) indicates statistical significance. (C) Original Western blot and quantification of the expression of RhoC and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates. Graph shows mean expression of RhoC relative to control from n=3 independent experiments; *(p<0.05) indicates statistical significance.

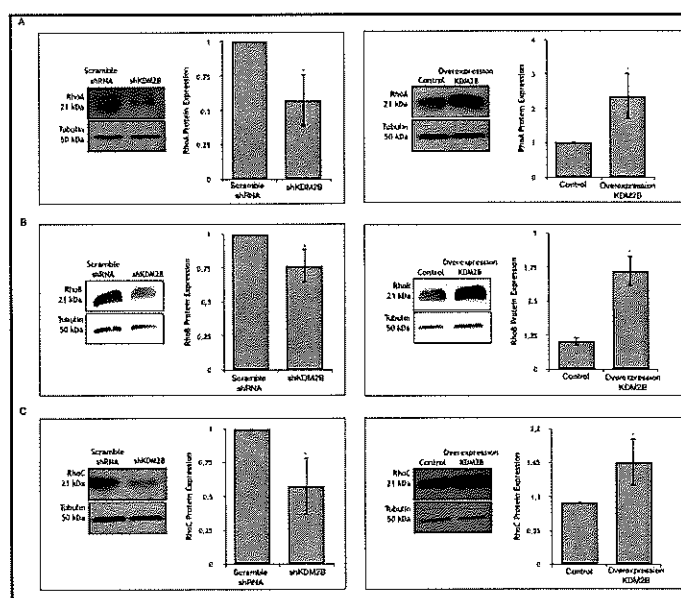
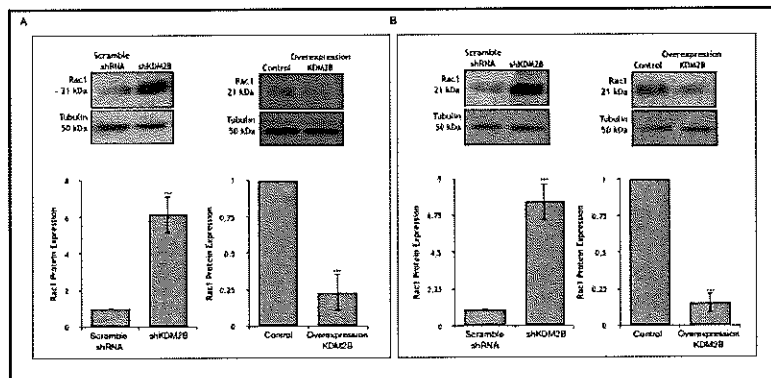


Fig. 5. KDM2B regulates expression of Rac1 small GTPase in HCT116 colon tumor- and DU-145 prostate cancer- cells. (A) Original Western blot and quantification of the expression of Rac1 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) HCT116 cell lysates.



Graph shows mean expression of Rac1 relative to control from n=3 independent experiments; ***p<0.001 indicates statistical significance. (B) Original Western blot and quantification of the expression of Rac1 and tubulin protein in scramble shRNA, shKDM2B (left panel) and control overexpression, overexpression of KDM2B (right panel) DU-145 cell lysates. Graph shows mean expression of Rac1 relative to control from n=3 independent experiments; ***p<0.001 indicates statistical significance.

marker E-Cadherin (Fig. 3A, left panels), while cell clones overexpressing KDM2B showed reduced E-Cadherin protein levels (Fig. 3A, right panels). These findings are in line with recently reported regulation of E-Cadherin gene transcription by KDM2B in DU-145 cells [8]. Very similar results were obtained for an additional epithelial marker, namely ZO-1 (Fig. 3B). Finally, we assessed the expression profile of the mesenchymal marker N-Cadherin. Interestingly, shRNA-mediated knockdown of KDM2B in HCT116 cell clones revealed potent downregulation of protein expression (Fig. 3C, left panels), while cell clones overexpressing KDM2B showed enhanced N-Cadherin protein levels (Fig. 3C, right panels). These results suggest that the epigenetic factor KDM2B regulates EMT in HCT116 colon tumor cells.

In our recent study [8], we demonstrated a clear correlation between KDM2B function, actin organization and small GTPases signaling in prostate cancer cells. Moreover, previous reports established a functional link between EMT, actin cytoskeleton reorganization and small GTPases signaling [20–27]. Accordingly, we further analyzed the functional link of the KDM2B gene with various small GTPase family proteins, namely RhoA/B/C and Rac1 in colon tumor cells. Knockdown of KDM2B in HCT116 cell clones revealed a clear decrease of RhoA, RhoB and RhoC protein levels as manifested by Western blotting (Fig. 4A, B, C, left panels), while overexpression of KDM2B exhibited enhanced protein levels of all tested small GTPases (Fig. 4A, B, C, right panels). Interestingly, the opposite effect was evident for Rac1. As shown in Fig. 5A, clear upregulation of the Rac1 small GTPase protein expression became evident upon knockdown of KDM2B in HCT116 cell clones (Fig. 5A, left panels), while KDM2B overexpression induced downregulation of Rac1 protein level (Fig. 5A, right panels). We further investigated whether this finding was evident as well in other tumor cells upon KDM2B knockdown or overexpression. We observed very similar results in DU-145 prostate cancer cells, since knockdown or overexpression respectively of KDM2B in these cells revealed clear enhanced (Fig. 5B left panel) or diminished (Fig. 5B right panel) Rac1 protein expression.

Discussion

In this study, we addressed the regulatory role of the epigenetic factor KDM2B by analyzing EMT and Rho GTPases in HCT116 colon tumor cells. Our results established that KDM2B overexpression or knockdown regulates: a) the expression profiles of EZH2 and

BMI1, b) the expression levels of the epithelial markers E-Cadherin and ZO-1, as well as the mesenchymal marker N-Cadherin, c) the protein levels of RhoA, RhoB and RhoC small GTPases and finally, d) the protein levels of Rac1 small GTPase. These results imply that this epigenetic factor controls EMT and small Rho GTPase expression in HCT116 colon cancer cells and is in line with previously reported findings in prostate cancer cells [8]. Taking together, these results argue that KDM2B has a significant oncogenic role in regulating cell functions in various tumors.

Previous work showed that the upregulation of KDM2B in co-operation with Polycomb group proteins promotes motility and invasion in tumor cell lines and primary tumors [5, 6]. In line with these reports, in a recent study from our group we elucidated a novel signaling pathway that is regulating KDM2B-induced migration in prostate tumor cells [8]. This mechanism involved the small GTPases RhoA and RhoB, the epithelial markers E-Cadherin and ZO-1 as well as deregulation of actin cytoskeleton organization, which in turn controlled the migration of prostate tumor cells [8]. Interestingly, as previously reported, a migration assay failed to establish a clear relationship between KDM2B expression and motility in HCT116 colon tumor cells [8]. Since KDM2B protein levels in HCT116 cells are significantly lower compared to DU-145 prostate cancer cells ([8], and Fig. 1A), this observation suggests that variable basal KDM2B expression levels may differentially regulate the migratory behavior of tumor cells and needs further investigation.

Our data establish also a clear involvement of epigenetic factors in controlling EMT. This became evident from the opposite effects on the expression of the epithelial markers E-Cadherin and ZO-1 versus the mesenchymal marker N-Cadherin, shown upon knockdown or overexpression of the KDM2B gene. This observation implies a significant role of KDM2B in tumorigenesis and suggests the implication of actin cytoskeleton and small GTPases signaling in this phenomenon. Indeed, this assumption was postulated previously in various tumor cell models by analyzing the correlation of EMT with actin signaling and migration [13, 19–27]. Moreover, previous studies showed that the Serum glucocorticoid kinase 1 (Sgk1) plays a key role in EMT in colon carcinoma [28]. Furthermore, Sgk1 regulates epigenomic re-alignment and drug-resistance through the control of GTP-proteins RANBP1 and RAN [29]. Accordingly, co-regulation between KDM2B and Sgk1 seems possible and needs further investigation.

Regulation of Rho small GTPases function is a crucial step in the oncogenic behavior of various tumor cells, including growth, migration and apoptosis [11, 15, 16, 18, 30, 31]. Rho signaling governs actin redistribution [32–41] and is implicated in various cellular responses including cell-cell adhesion and EMT [13, 22, 25, 42–45]. In the present work, we reported opposite effects of the KDM2B gene in the expression of RhoA/RhoB/RhoC- and Rac1-GTPases. This is an interesting observation that needs further analysis. However, since Rho GTPases are implicated in the formation of actin stress fibers [46, 47], while Rac1 promotes restructuring of actin cytoskeleton towards lamellipodia [47–50] our findings may indicate that the epigenetic factor KDM2B plays a differential role in actin reorganization. This may include promotion of lamellipodia formation with concomitant inhibition of stress fibers and vice versa. Such a mechanism may be crucial for controlling simultaneously both, growth and motility of tumor cells [48, 51–53]. In addition, since KDM2B governed Rac1 regulation was as well evident in DU-145 prostate cancer cells (Fig. 5B), we assume that this regulatory step may as well contribute to the reported control of cell migration of prostate cancer cells [8], as previously described in breast cancer cells [54]. On the other hand, regulation of Rac1 GTPase expression in HCT116 cell may be correlated with the control of tumor cells invasion from the intestine epithelium into the endothelium of blood vessels through the formation of lamellipodia, rather than controlling the migration in wound healing experiments in a flat substrate such as cell culture flask. Additional work is now needed to address these interesting issues.

To conclude, in the present work we demonstrate that the histone demethylase KDM2B is regulating the expression of EMT markers E-Cadherin, ZO-1 and N-Cadherin and the small GTPases RhoA/B/C and Rac1 in colon tumor cells. Taking into consideration the recently

shown effects of KDM2B in prostate cancer cells [8], these interactions imply a direct involvement of this epigenetic factor in EMT and deregulation of cytoskeletal genes that may govern oncogenic behavior of tumor cells.

Acknowledgements

Authors appreciate the funding of this work by the International Scientific Partnership Program ISPP at the King Saud University through ISPP#009, the University of Crete Research Committee. We acknowledge support by Deutsche Forschungsgemeinschaft and Open Access Publishing Fund of University of Tübingen

Disclosure Statement

The authors declare that they do not have any conflict of interests.

References

- 1 He J, Nguyen AT, Zhang Y: KDM2b/JHDM1b, an H3K36me2-specific demethylase, is required for initiation and maintenance of acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;117:3869–3880.
- 2 Tzatsos A, Paskaleva P, Lymperi S, Contino G, Stoykova S, Chen Z, Wong KK, Bardeesy N: Lysine-specific demethylase 2b (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells. *J Biol Chem* 2011;286:33061–33069.
- 3 Kampranis SC, Tsiachlis PN: Chapter 4 Histone Demethylases and Cancer. *Adv Cancer Res* 2009;102:103–169.
- 4 Tzatsos A, Pfau R, Kampranis SC, Tsiachlis PN: Ndy1/KDM2B immortalizes mouse embryonic fibroblasts by repressing the Ink4a/Arf locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:2641–2646.
- 5 Kottakis F, Foltopoulou P, Sanidas I, Keller P, Wronski A, Dake BT, Ezell SA, Shen Z, Naber SP, Hinds PW, McNeil E, Kuperwasser C, Tsiachlis PN: NDY1/KDM2B functions as a master regulator of polycomb complexes and controls self-renewal of breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2014;74:3935–3946.
- 6 Kottakis F, Polytarchou C, Foltopoulou P, Sanidas I, Kampranis SC, Tsiachlis PN: FGF-2 Regulates Cell Proliferation, Migration, and Angiogenesis through an NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 Pathway. *Mol Cell* 2011;43:285–298.
- 7 Fajol A, Honisch S, Zhang B, Schmidt S, Alkahtani S, Alarifi S, Lang F, Stournaras C, Föllner M: Fibroblast growth factor (Fgf) 23 gene transcription depends on actin cytoskeleton reorganization. *FEBS Lett* 2016;590:705–715.
- 8 Zacharopoulou N, Tsapara A, Kallergi G, Schmid E, Tsiachlis PN, Kampranis SC, Stournaras C: The epigenetic factor KDM2B regulates cell adhesion, small rho GTPases, actin cytoskeleton and migration in prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2018;1865:587–597.
- 9 Gari HH, DeGala GD, Ray R, Lucia MS, Lambert JR: PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion properties critical for cell migration and invasion. *Cancer Lett* 2016;380:505–512.
- 10 Wang P, Zhao J, Yang X, Guan S, Feng H, Han D, Lu J, Ou B, Jin R, Sun J, Zong Y, Feng B, Ma J, Lu A, Zheng M: PFDN1, an indicator for colorectal cancer prognosis, enhances tumor cell proliferation and motility through cytoskeletal reorganization. *Med Oncol* 2015;32:1–13.
- 11 Vega FM, Ridley AJ: The RhoB small GTPase in physiology and disease. *Small GTPases* 2016;0:1–10.
- 12 Callan-Jones AC, Voituriez R: Actin flows in cell migration: From locomotion and polarity to trajectories. *Curr Opin Cell Biol* 2016;38:12–17.
- 13 Vega FM, Thomas M, Reymond N, Ridley AJ: The Rho GTPase RhoB regulates cadherin expression and epithelial cell-cell interaction. *Cell Commun Signal* 2015;13:1–9.
- 14 Insall RH, Machesky LM: Actin Dynamics at the Leading Edge: From Simple Machinery to Complex Networks. *Dev Cell* 2009;17:310–322.

- 15 Papakonstanti EA, Stournaras C: Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2008;582:2120–2127.
- 16 Stournaras C, Gravanis A, Margioris AN, Lang F: The actin cytoskeleton in rapid steroid hormone actions. *Cytoskeleton* 2014;71:285–293.
- 17 Vignjevic D, Montagnac G: Reorganisation of the dendritic actin network during cancer cell migration and invasion. *Semin Cancer Biol* 2008;18:12–22.
- 18 Tseliou M, Al-Qahtani A, Alarifi S, Alkahtani SH, Stournaras C, Sourvinos G: The Role of RhoA, RhoB and RhoC GTPases in Cell Morphology, Proliferation and Migration in Human Cytomegalovirus (HCMV) Infected Glioblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 2016;38:94–109.
- 19 Lang F, Perrotti N, Stournaras C: Colorectal carcinoma cells-Regulation of survival and growth by SGK1. *Int J Biochem Cell Biol* 2010;42:1571–1575.
- 20 Honisch S, Yu W, Liu G, Alesutan I, Towhid ST, Tsapara A, Schleicher S, Handgretinger R, Stournaras C, Lang F: Chorein addiction in VPS13A overexpressing rhabdomyosarcoma cells. *Oncotarget* 2015;6:10309–10319.
- 21 Gu S, Papadopoulou N, Nasir O, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C: Activation of Membrane Androgen Receptors in Colon Cancer Inhibits the Prosurvival Signals Akt/Bad *In vitro* and *In vivo* and Blocks Migration via Vinculin/Actin Signaling. *Mol Med* 2011;17:48–58.
- 22 Papadimitriou E, Vasilaki E, Vorvis C, Iliopoulos D, Moustakas a, Kardassis D, Stournaras C: Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF- β and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 2011;31:18–21.
- 23 Schneider D, Janshoff A: Inhibition of actin dynamics during epithelial-to-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;419:221–225.
- 24 Zhang L, Jiang G, Zhao X, Gong Y: Dimethylxalylglycine Promotes Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis via Rho/ROCK Signaling. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:1391–1403.
- 25 Niu H, Wu B, Jiang H, Li H, Zhang Y, Peng Y, He P: Mechanisms of RhoGDI2 mediated lung cancer epithelial-mesenchymal transition suppression. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:2007–2016.
- 26 Ju L, Zhou Z, Jiang B, Lou Y, Guo X: Autocrine VEGF and IL-8 promote migration via Src/Vav2/Rac1/PAK1 signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:1346–1359.
- 27 Ungefroren H, Witte D, Lehnert H: The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn* 2017;doi: 10.1002/dvdy.24505 [Epub ahead of print]. *Rev*.
- 28 Talarico C, Dattilo V, D'Antona L, Menniti M, Bianco C, Ortuso F, Alcaro S, Schenone S, Perrotti N, Amato R: SGK1, the New Player in the Game of Resistance: Chemo-Radio Molecular Target and Strategy for Inhibition. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:1863–1876.
- 29 Dattilo V, D'Antona L, Talarico C, Capula M, Catalogna G, Iuliano R, Schenone S, Roperto S, Cataldo B, Perrotti N, Amato R: SGK1 affects RAN/RANBP1/RANGAP1 via SP1 to play a critical role in pre-miRNA nuclear export: A new route of epigenomic regulation. *Sci Rep* 2017;7:1–14.
- 30 Zandvakili I, Lin Y, Morris JC, Zheng Y: Rho GTPases: Anti- or pro-neoplastic targets? *Oncogene* 2017;36:3213–3222.
- 31 O'Connor KL, Chen M: Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* 2013;4:141–147.
- 32 Koukouritaki SB, Gravanis A, Stournaras C: Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin regulates the signaling mechanism of the rapid nongenomic action of dexamethasone on actin cytoskeleton. *Mol Med* 1999;5:731–42.
- 33 Liu D, Xiong R, Chen X, Li P, Ning Y, Peng Y, Zhao Y, Yang N, Zhou Y: The glucocorticoid dexamethasone inhibits U937 cell adhesion and neutrophil release via RhoA/ROCK1-dependent and independent pathways. *Cell Physiol Biochem* 2014;33:1654–1662.
- 34 Koukouritaki SB, Margioris AN, Gravanis A, Hartig R, Stournaras C: Dexamethasone Induces Rapid Actin Assembly in Human Endometrial Cells Without Affecting Its Synthesis. *J Cell Biochem* 1997;65:492–500.
- 35 Gu S, Papadopoulou N, Gehring EM, Nasir O, Dimas K, Bhavsar SK, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C: Functional membrane androgen receptors in colon tumors trigger pro-apoptotic responses *in vitro* and reduce drastically tumor incidence *in vivo*. *Mol Cancer* 2009;8:1–14.
- 36 Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C: A novel mechanism of TGF β -induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* 2008;275:4074–4087.

- 37 Nomikou E, Stournaras C, Kardassis D: Functional analysis of the promoters of the small GTPases RhoA and RhoB in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;491:754–759.
- 38 Schmid E, Gu S, Yang W, Münzer P, Schaller M, Lang F, Stournaras C, Shumilina E: Serum- and glucocorticoid-inducible kinase SGK1 regulates reorganization of actin cytoskeleton in mast cells upon degranulation. *AJP Cell Physiol* 2013;304:C49-55.
- 39 Gu S, Kounenidakis M, Schmidt EM, Deshpande D, Alkahtani S, Alarifi S, Föller M, Alevizopoulos K, Lang F, Stournaras C: Rapid activation of FAK/mTOR/p70S6K/PAK1-signaling controls the early testosterone-induced actin reorganization in colon cancer cells. *Cell Signal* 2013;25:66–73.
- 40 Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A, Stournaras C: Control of transforming growth factor signal transduction by small GTPases. *FEBS J* 2009;276:2947–2965.
- 41 Papakonstanti EA, Vardaki EA, Stournaras C: Actin cytoskeleton: a signaling sensor in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 2000;10:257–64 Review.
- 42 Zeng N, Salker MS, Zhang S, Singh Y, Shi B, Stournaras C, Lang F: 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ Induces Actin Depolymerization in Endometrial Carcinoma Cells by Targeting RAC1 and PAK1 *Cell Physiol Biochem* 2016;40:1455–1464.
- 43 Gu S, Honisch S, Kounenidakis M, Alkahtani S, Alarif S, Alevizopoulos K, Stournaras C, Lang F: Membrane androgen receptor down-regulates c-Src-activity and beta-catenin transcription and triggers GSK-3beta-phosphorylation in colon tumor cells. *Cell Physiol Biochem* 2014;34:1402–1412.
- 44 Alesutan I, Seifert J, Pakladok T, Rheinlaender J, Lebedeva A, Towhid ST, Stournaras C, Voelkl J, Schäffer TE, Lang F: Choren sensitivity of actin polymerization, cell shape and mechanical stiffness of vascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2013;32:728–742.
- 45 Zou W, Meng X, Cai C, Zou M, Tang S, Chu X, Wang X, Zou F: Store-operated Ca $^{2+}$ entry (SOCE) plays a role in the polarization of neutrophil-like HL-60 cells by regulating the activation of Akt, Src, and Rho family GTPases. *Cell Physiol Biochem* 2012;30:221–37.
- 46 Burridge K, Guilluy C: Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp Cell Res* 2016;343:14–20.
- 47 Parri M, Chiarugi P: Rac and Rho GTPases in cancer cell motility control. *Cell Commun Signal* 2010;8:1–14.
- 48 Fukata M, Nakagawa M, Kaibuchi K: Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15:590–597.
- 49 Kaverina I, Krylyshkina O, Small JV: Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:746–761.
- 50 Ridley AJ: Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 2015;36:103–112.
- 51 Lang F, Alevizopoulos K, Stournaras C: Targeting membrane androgen receptors in tumors. *Expert Opin Ther Targets* 2013;17:951–963.
- 52 Linseman DA, Loucks FA: Diverse roles of Rho family GTPases in neuronal development, survival, and death. *Front Biosci* 2008;1:657–76.
- 53 Papakonstanti EA, Stournaras C: Tumor necrosis factor-alpha promotes survival of opossum kidney cells via Cdc42-induced phospholipase C-gamma1 activation and actin filament redistribution. *Mol Biol Cell* 2004;15:1273–86.
- 54 Kallergi G, Agelaki S, Markomanolaki H, Georgoulas V, Stournaras C: Activation of FAK / PI3K / Rac1 Signaling Controls Actin Reorganization and Inhibits Cell Motility in Human Cancer Cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;977–986.