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

Διδακτορική Διατριβή

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΜΙΚΡΗΣ GTPAΣΗΣ RHOB ΑΠΟ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΖΟΝΤΑ ΑΥΞΗΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ β (TGFβ-1) ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΙΣ TGFβ-1-ΕΠΑΓΩΜΕΝΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Ελευθερία Βασιλάκη

Επιβλέπων Καθηγητής : Δ.Καρδάσης

Νοέμβριος 2009

Δεν είναι η δόξα Δεν είναι τα λεφτά Είναι του δρόμου η χαρά

Ν.Πορτοκάλογλου

Καθ'όλη τη διάρκεια του διδακτορικού, ένα από τα κυρίαρχα θέματα στις συζητήσεις μας, άλλοτε από αγανάκτηση για το παρόν, άλλοτε από ανυπομονησία για το μέλλον ή άλλοτε απλά από συνήθεια είναι το πότε "επιτέλους" θα ολοκληρώσουμε τη διατριβή μας. Το τέλος είναι κάτι που μοιάζει συνέχεια μακρινό όσο βιώνουμε τη πορεία του διδακτορικού και μαζί του μακρινά και τα συναισθήματα ανακούφισης και υπέρμετρης χαρά που φανταζόμαστε να το συνοδεύουν. Περίμενα λοιπόν τώρα που έφτασα στο πολυπόθητο τέλος της διατριβής ότι θα ένιωθα όλα αυτά για τα οποία ανυπομονούσα κάθε φορά που σκεφτόμουν αυτή τη στιγμή. Το κυρίαρχο όμως συναίσθημα μου είναι η συγκίνηση και η νοσταλγία για όλα αυτά που πέρασαν. Συμφωνώ απόλυτα με όσους μιλούν για το ταξίδι και τη σημασία του, απλά θέλω να προσθέσω ότι ευχαρίστως θα τα έκανα όλα ξανά από την αρχή. Πάμε πάλι; Πάμε πάλι αλλά με τους ίδιους ανθρώπους που μοιράστηκα όλες αυτές τις στιγμές και μακάρι λίγες γραμμές να ήταν αρκετές για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και την εκτίμηση για όλα αυτά που έκαναν για μένα, άθελα τους ή ηθελημένα, και με τη παρουσία τους έκαναν το ταξίδι μου να μη θέλω να τελειώσει.

Ευχαριστώ το Δημήτρη Καρδάση, για όλα εκείνα τα χρόνια συνεργασίας, συμπαράστασης, ενθάρρυνσης και πίστης σε μένα ακόμη και όταν εγώ η ίδια έχανα τη πίστη στον εαυτό μου. Τον ευχαριστώ γιατί ως μέντορας μου, είναι αυτός που με έμαθε να αγαπώ αυτό που κάνω και να αγωνίζομαι για αυτό. Τον ευχαριστώ γιατί αν κάποιος μου ζητούσε να συμπληρώσω τα στοιχεία που έλειπαν από τη συνεργασία μας για να είναι ιδανική απλά δε θα έβρισκα τίποτα να συμπληρώσω και γιατί η παρουσία του στη ζωή μου με κάνει καλύτερο άνθρωπο.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς μου επιτροπής και ιδιαίτερα τον κ.Χ.Στουρνάρα για την καθοδήγηση και στήριξη τους καθόλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Ευχαριστώ την Anne Ridley για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη βοήθεια της όπως επίσης και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου της. Fransisco και Virginia σας ευχαριστώ πολύ. Ευχαριστώ τον Α.Μουστάκα για τις συμβουλές, τη βοήθεια του και τη συνεργασία μας και τον Α.Ηλιόπουλο για τη βοήθεια και τις συζητήσεις μας.

Ευχαριστώ τη Βέτα για τη βοήθεια και στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια και γιατί απλά δε μπορώ να φανταστώ το εργαστήριο χωρίς αυτήν. Ευχαριστώ την

Έφη, για την ιδανική συνεργασία μας, για όλες τις καμμένες ώρες που μου συμπαραστάθηκε, για το γέλιο και τις ανησυχίες που μοιραστήκαμε, για τη φιλία μας. Ευχαριστώ τη Σόφη και τη Βαρβάρα για τη στήριξη τους και τη συνεργασία μας. Ευχαριστώ τη Βίκυ και το Γιώργο για τη συμβολή και ανοχή τους στα πρώτα εργαστηριακά μου βήματα και γιατί η συνεισφορά τους στην εξέλιξη μου ήταν καθοριστική και θα με συνοδεύει πάντα. Ευχαριστώ τον Παναγιώτη, τη Ναντίνα, και όλα τα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο για τις στιγμές που περάσαμε μαζί. Ευχαριστώ πολύ το Μάνο και τη Κάλλια που η γνωριμία μας στο εργαστήριο ήταν η αρχή για μια πολύτιμη φιλία. Ευχαριστώ τη χαρά του εργαστηρίου η οποία ακούει στο όνομα Ιωάννα, άξιο διάδοχο μου στις πλάκες και στη αισιόδοξη στάση απέναντι στη ζωή, και της εύχομαι να είναι τόσο τυχερή ώστε να βρει συνεργάτες και φίλους στο δρόμο της τόσο σημαντικούς όσο για μένα εκείνη. Τι έγινε Γιαννιώ μου, φοβάσαι ότι σε ξέχασα; Επίτηδες το έκανα για να ανησυχήσεις. Εσένα δε σε ευχαριστώ από τώρα, αφού θα σε πάρω μαζί μου δεν είπαμε; Έχουμε όλη της ζωή μπροστά μας για να σε ευχαριστώ.

Ευχαριστώ την Λίνα, το Ελσάκι, τη Ναταλία και το Γιώργο όπως και όλα τα παιδιά των εργαστηρίων του τμήματος Ιατρικής και του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας για τη βοήθεια τους. Ευχαριστώ την οικογένεια Μανασσάκη και την επιτροπή FEBS για τη στήριξη τους υπό μορφή υποτροφίας. Η διατριβή χρηματοδοτήθηκε από Πρόγραμμα Ενίσχυσης του Ερευνητικού (ΠΕΝΕΔ)-2003.

Ευχαριστώ τους φίλους και ειδικότερα την Helen, για την αμέριστη αγάπη βοήθεια και κατανόηση της. Ευχαριστώ την οικογένεια μου και το Γιώργο μου, γιατί η αγάπη και η στήριξη τους είναι τα πολυτιμότερα εφόδια μου. Με βοηθούν όχι απλά να ονειρεύομαι αλλά να κάνω τα όνειρα μου πραγματικότητα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	8
ПЕРІЛНΨН	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
Οικογένεια των μικρών GTPασών Rho	12
Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μικρών Rho GTΡασών	13
RhoGTΡάσες και καρκίνος	17
Το σηματοδοτικό μονοπάτι των RhoGTPασών ως σημείο ελέγχου (checkpoint) του κυτταρικού κύκλου βασισμένο στο κυτταροσκελετό	19
Υποομάδες της οικογένειας των Rho GTΡασών	21
RhoΑ-υποοικογένεια	22
Ρύθμιση της έκφρασης των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών	23
Δομή και ρύθμιση των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών	24
Αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες	25
Ο ρόλος των RhoGTPασών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τη κυτταρική	
μετακίνηση	27
Ο ρόλος των RhoGTPασών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης	29
Ο ρόλος των Rho GTΡασών στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων	30
RhoA,RhoB,RhoC και καρκίνος	30
Μοναδικά χαρακτηριστικά της RhoB	32
Μεταγραφική ρύθμιση της RhoB πρωτεΐνης	35
Πρώτες ενδείξεις για μεταγραφική ρύθμιση του γογιδίου της RhoB από μέλη της οικογεγείας το	ου
ΤGFβ-1	36
Ο βιολογικός ρόλος του TGFβ	37
Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Μετασχηματίζοντα Αυξητικού Παράγοντα β (TGFβ-1)	38
Κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών	40
Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών	41
Smad-ανεξάρτητη σηματοδότηση του TGFβ-1	42
Προυποθέσεις για την επιτυχημένη διεξαγωγή του σήματος του TGFβ-1	46
Πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση των Smads και ενδοκύτωση των υποδοχέων του TGFβ·	-1
	46
Ο ρόλος των RhoGTPασών στην ενδοκύτωση των υποδοχέων του TGFβ-1 και στη μεταφορά τω	v
Smad πρωτεϊνών μέσω των πυρηνικών πόρων	47
Οι πρωτεΐνες Rho ως διαμεσολαβητές στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης	
από τον TGFβ-1	48
Ο ρόλος των RhoGTPασών στην TGFβ-1-επαγώμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά την διαδικασία της Επιθηλιο-Μεσεγχυματικής Μετατροπής (EMT) των κυττάρων Η ενεργοποίηση των RhoGTPασών από τον TGFβ-1 μέσω Smad-εξαρτώμενων και Smad-	49
ανεξάρτητων μονοπατιών	51
Επικοινωνία (Cross-talk) μεταξύ των μονοπατιών των Rho GTPασών και του TGFβ-1	52

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	55
Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών	56
Αδενοιοί	57
Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών	57
Απομόνωση RNA & RT-PCR	57
Δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal assay) και μέτρηση της δραστικότητας λουσιφεράσηα	
(Luciferase assay)	59
Πειράματα επούλωσης πληγής (Oris [™] Cell Migration Assay)	59
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)	59
Απομόνωση τμημάτων DNA	60
Αποφωσφορυλίωση DNA	60
Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη	61
Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)	61
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B, DH5a, BL21 της <i>E.coli</i> (transformation)	61
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep	
procedure - micro screening)	62
Αλκαλική λύση των βακτηρίων	63
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale	
preparation)	64
Κατασκευές πλασμιδίων και ανασυνδυασμένων αδενοϊών	65
Πλασμίδια αναφοράς	65
Πλασμίδια έκφρασης	68
Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών	71
Κυτταροκαλλιέργειες	76
Μόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς	77
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)	77
Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal	78
Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)	79
Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων	79
Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford-Lowry	80
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης-Ανοσοαποτύπωση	80
(Western Blot)	80
Καθαρισμός πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST, από κύτταρα E.coli.	82
Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie	83
<i>In vitro</i> αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down)	83
Συν-ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Co-IP)	84
Το σύστημα της <i>in vivo</i> βιοτινιλίωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμνιση αλληλεπιδρώντων	
πρωτεϊνών (<i>in vivo</i> biotinylation)	85
Μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (DNAP, DNA affin	ty
precipitation)	87
Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)	88
Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών	94
Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence) 97
Χρώση ροδαμίνης-φαλλοιδίνης	98
Ανίχνευση ΕΜΤ (επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής) (ΕΜΤ assay)	99

Μέτρηση κυτταρικής ανάπτυξης (cell growth) /MTT assay	100
Κλασματοποίηση Triton-x-100	101
Πειράματα επούλωσης πληγής	102
(Wound healing assay/Oris [™] Cell Migration Assay)	102
Μελέτη τυχαίας μετακίνησης κυττάρων (Random Migration Assay)	104

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1

Αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από τον TGFβ-1 σε κύτταρα Swiss3T3, HepG2 , DU145, PC3 και HaCaT 106 Το γονίδιο της RhoB αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του μονοπατιού του TGFβ-1 110 Η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 χρειάζεται τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Smad αλλά και των ΜΕΚ/ERK πρωτεϊνών 113 Ο TGFβ-1 επάγει τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB 125 Η κοντινή περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της 130 RhoB μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85/-54 είναι απαραίτητη και επαρκής για τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad 130 Η αλληλουχία CCAAT δεν είναι επαρκής για τη πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB 133 Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad3 και NF-Y ενεργοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου της RhoB με μη συνεργατικό τρόπο 138 Η δράση του μονοπατιού των ΜΕΚ/ΕRΚ κινασών στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB είναι ανεξάρτητη της πυρηνικής μετατόπισης των NF-Y και Smad παραγόντων 140 Η ΤGFβ-1-επαγώμενη στρατολόγηση της πρωτεΐνη Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB GTPάσης εξαρτάται από το μονοπάτι των ΜΕΚ/ΕRΚ κινασών και την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 144

Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 στις TGFβ-1-επαγώμενες κυτταρικές λειτουργίες 147

	Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μετακίνηση των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1	147
	Μέτρηση της επίδρασης των πρωτεϊνών Rho και του TGFβ-1 στη τυχαία μετακίνηση (random	
	migration) κυττάρων DU145 και PC3	154
	Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 στην TGFβ-1-επαγώμενη Επιθη	λιο-
	Μεσεγχυματική Μετατροπή (ΕΜΤ) κυττάρων HaCaT	157
	Ο ρόλος της RhoB πρωτεΐνης στο σταμάτημα του πολλαπλασιασμού (growth arrest) κυττάρω	ν
	HaCaT που επάγεται από τον TGFβ-1	163
	Συμμετοχή της πρωτεΐνης RhoB σε θηλειά αυτοκαταστολής (autoinhibitory loop)	167
Σ	ΥΖΗΤΗΣΗ	180
M	εταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1	181
0	ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 στις	
TG	Fβ-1-επαγώμενες κυτταρικές λειτουργίες	194
	Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μετακίνηση των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1	194

Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 στην TGFβ-1-επαγώμενη Επιθηλιο-Μεσεγχυματική Μετατροπή (ΕΜΤ) κυττάρων HaCaT 198

105

Ο ρόλος της RhoB πρωτεΐνης στο σταμάτημα του πολλαπλασιασμού (growth arrest) κυττάρων	
ΗaCaT που επάγεται από τον TGFβ-1	200
Συμμετοχή της πρωτεΐνης RhoB σε θηλειά αυτοκαταστολής (autoinhibitory loop) του	
σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ-1	203

Βιβλιογραφία

ABSTRACT

Rho proteins are characterized as molecular switches that control many cellular processes including actin and microtubule cytoskeleton organization, cell division, motility, cell adhesion, vesicular trafficking, phagocytosis and transcriptional regulation. Whereas the classical Rho GTPases are regulated by GDP/GTP cycling, in some cases transcriptional regulation, which determines the expression levels of the proteins in the cell, plays also a crucial role in their function. RhoB is the only member of the RhoA-related subfamily that is transcriptionally regulated and this regulation seems to be of high importance for its function due to the short half-life of this protein in the cell.

The purpose of the present study was to investigate the mechanism of transcriptional induction of the small GTPase RhoB gene by the Transforming Growth Factor β (TGF β -1) signaling pathway and the role of this regulation in TGF β -1-induced cell responses such as cell migration, epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cell growth.

We found that TGF β -1 induces a rapid and sustained increase in the mRNA and protein levels of the RhoB gene in various cell lines including human HaCaT keratinocytes, human hepatoblastoma HepG2 cells, human prostate cancer DU145 and PC3 cells and in mouse Swiss3T3 fibroblasts. We showed that the RhoB gene is a direct transcriptional target of TGF β -1 in HaCaT cells. We found that this regulation is specific for the RhoB gene and is facilitated by the simultaneous activation of cytoplasmic Smad and MEK/ERK pathways.The early activation of the MEK/ERK pathway is required for the recruitment of Smad3 to a novel, non-classical, Smad binding element in the proximal RhoB promoter, in a p53-dependent manner. This element is overlapping with a CCAAT box that constitutively binds Nuclear Factor Y. Mutagenesis of this site abolished the Smad and NF-Y mediated transactivation of the RhoB promoter.

Using siRNA-mediated silencing, inhibition of GTPase activity by dominant negative forms and adenovirus-mediated gene transfer we established that RhoB plays an important role in TGF β -1-induced cell migration of HaCaT, DU145 and PC3 cells. Finally, we revealed a novel mechanism of cross-talk between the classical TGF β -1 /Smad pathway and Rho GTPases in which RhoB participates in an autoinhibitory loop of the TGF β -1/Smad pathway. This mechanism explains the negative role of RhoB in the TGF β -1-induced epithelial to mesenchymal transition and cell growth arrest. In conclusion, the specific induction of RhoB by TGF- β and its

positive or negative role in TGF- β -induced cell responses indicate that RhoB could be a target for therapeutic intervention in malignant invasive tumors.

<u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u>

Οι Rho GTPάσες χαρακτηρίζονται ως υψηλά συντηρημένοι μοριακοί διακόπτες οι οποίοι εμπλέκονται σε πολλές από τις θεμελιώδεις διαδικασίες της βιολογίας του κυττάρου συμπεριλαμβανομένων της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της μετανάστευσης των κυττάρων, της ενδοκύτωσης, της φαγοκύτωσης και της μεταγραφικής ρύθμισης. Παράλληλα με τη ρύθμιση των Rho πρωτεϊνών μέσω εναλλαγής μεταξύ των GTP-ενεργών και GDP-ανενεργών μορφών τους, σημαντικό ρόλο για την όλη συμμετοχή τους στις αποκρίσεις των κυττάρων παίζει και η ρύθμιση στο επίπεδο της μεταγραφής, η οποία καθορίζει και τα επίπεδα έκφρασής τους στο κύτταρο. Η RhoB είναι το μόνο μέλος της RhoA υποοικογένειας το οποίο υφίσταται μεταγραφική ρύθμιση η οποία φαίνεται να είναι κεφαλαιώδους σημασίας για τη λειτουργία της λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της μέσα στο κύτταρο.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση και κατανόηση του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από το μονοπάτι του TGFβ-1 και του ρόλου της ρύθμισης αυτής σε TGFβ-1επαγώμενες αποκρίσεις του κυττάρου όπως η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός αλλά και η διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) των κυττάρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής, ο TGFβ-1 επάγει τη γρήγορη αλλά και μακροπρόθεσμη αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης της RhoB σε διάφορες κυτταρικές σειρές συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT, των ανθρώπινων κυττάρων ηπατοβλαστώματος HepG2, των καρκινικών κυττάρων προστάτη DU145 και PC3 και των ινοβλαστών ποντικού Swiss3T3. Διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο της RhoB αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του TGFβ-1 σε κύτταρα HaCaT. Η TGFβ-1-επαγώμενη μεταγραφική ρύθμιση αυτή αφορά αποκλειστικά το γονίδιο της RhoB και μεσολαβείται από την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των Smad και MEK/ERK πρωτεϊνών. Η γρήγορη επαγωγή του MEK/ERK μονοπατιού αλλά και η επακόλουθη φωσφορυλίωση της Smad3 σε μια νέα, μη κλασική, αλληλουχία πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad στη

κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Η αλληλουχία του RhoB υποκινητή στην οποία προσδένεται η πρωτεΐνη Smad3 αλληλοεπικαλύπτεται με ένα ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT στο οποίο προσδένεται συστασιακά ο μεταγραφικός παράγοντας Nuclear Factor Y. Η μεταλλαξιγένεση της αλληλουχίας αυτής κατέστειλε την ενεργοποίηση του RhoB υποκινητή από τους παράγοντες Smad3 και NF-Y.

Μέσω αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεϊνης RhoB με τη χρησιμοποιήση ειδικού siRNA και καταστολής της δράσης της μέσω υπερέκφρασης της επικρατούσας ανενεργής μορφής της διαπιστώθηκε ο σημαντικός ρόλος της πρωτεϊνης RhoB στην μετανάστευση των κυττάρων HaCaT, DU145 και PC3 ως απόκριση στον TGFβ-1. Τελικά, διαλευκάνθηκε ένας επιπλέον μηχανισμός συνεργατικής δράσης μεταξύ του TGFβ-1/Smad μονοπατιού και των Rho GTPασών ο οποίος βασίζεται στη συμμετοχή της πρωτεϊνης RhoB σε μηχανισμό αυτοαναστολής του TGFβ-1/Smad μονοπατιού. Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί την ανασταλτική δράση της RhoB στην TGFβ-1-επαγώμενη επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) των κυττάρων και στο σταμάτημα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον TGFβ-1.

Συμπερασματικά, ο θετικός ρόλος της στην επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων από τον TGFβ-1, ο αρνητικός ρόλος της σε TGFβ-1-επαγώμενες κυτταρικές λειτουργίες όπως το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού και η επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή και φυσικά η συμμετοχή της στο μηχανισμό αρνητικής αυτορύθμισης του TGFβ-1 μονοπατιού καθιστούν την πρωτεΐνη RhoB πολύπλοκο αλλά πολλά υποσχόμενο στόχο για την επίτευξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων στον καρκίνο και ενδεχομένως και σε άλλες ασθένειες.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οικογένεια των μικρών GTPασών Rho

Οι μικρές Rho πρωτεΐνες συνιστούν μια διακριτή ομάδα της υπεροικογένειας των Ras GTPασών, η οποία επίσης περιλαμβάνει τις Raf, Ran και Arf υποοικογένειες. Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν τουλάχιστον μια Rho GTPάση. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ο αριθμός των Rho GTPασών αυξήθηκε φθάνοντας σήμερα τις 20 Rho πρωτεΐνες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Εικόνα 1), τις 7 στη *Drosophila melanogaster* και τις 5 στο *Caenorhabditis elegans*. Όπως σε πολλές άλλες οικογένειες πρωτεϊνών, η οικογένεια των Rho φαίνεται να έχει επεκταθεί κατα τη διάρκεια της εξέλιξης ότουργίες στους ανώτερους οργανισμούς (1).



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας των Ras GTΡασών των θηλαστικών. Οι 20 Rho GTΡάσες έχουν ομαδοποιηθεί σε 8 υποοικογένειες. Οι Miro και RhoBTB3 πρωτεΐνες σχηματίζουν διαφορετικές ομάδες, ανεξάρτητες από αυτή των Rho πρωτεϊνών (από αναφορά (1).

Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μικρών Rho GTPασών

Οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες είναι μικρές (190-250 αμινοξέα) και αποτελούνται μόνο από τη περιοχή GTPάσης και μικρές αμινο- και καρβοξυτερματικές προεξοχές. Ωστόσο, μερικά από τα μη «τυπικά» μέλη της οικογένειας περιλαμβάνουν επιπρόσθετες περιοχές που υπερβαίνουν σε μήκος τα 700 αμινοξέα. Μέσα στις περιοχές GTPάσης, τα μέλη της οικογένειας εμφανίζουν ομολογία από 40-95%. Το δομικό εκείνο χαρακτηριστικό το οποίο διαχωρίζει τις Rho πρωτεΐνες από τις υπόλοιπες μικρές GTPάσες είναι η επονομαζόμενη Rho ένθεμα «insert» περιοχή η οποία τοποθετείται μεταξύ του πέμπτου β πτυχωτού φύλλου και της τέταρτης α έλικας στην περιοχή της GTPάσης (2), (3) (Εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Δομική οργάνωση των μικρών Rho GTΡασών. Οι RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, RhoG, RhoD, RhoF, Cdc42, TCL και TC10 πρωτεΐνες έχουν παρόμοιο βασικό πρότυπο δομής ενώ οι Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE και RhoH θεωρούνται μη τυπικά μέλη της οικογένειας των Rho GTΡασών καθώς περιέχουν τροποποιήσεις στη περιοχή πρόσδεσης του GTP/GDP οι οποίες τις καθιστούν μη λειτουργικές ως GTPάσες (από αναφορά (1)).

Όλες οι Rho πρωτεΐνες περιέχουν τα μοτίβα αλληλουχίας τα οποία χαρακτηρίζουν τις πρωτεΐνες που προσδένουν GTP, προσδένονται στο GDP και στο GTP με μεγάλη συγγένεια και εναλλάσονται συνεχώς μεταξύ μια ενεργής, GTP-προσδεδεμένης, και μιας ανενεργής GDP-προσδεδεμένης μορφής. Η πρόσδεση στο GTP επάγεται από πρωτεΐνες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Rho (Rho guanine nucleotide exchange factors, RHO–GEFs) ενώ η υδρόλυση του GTP καταλύεται από πρωτεΐνες ενεργοποίησης των Rho GTPασών (Rho–GTPase-activating proteins, RHO–GAPs) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3 : Βασικός κύκλος ενεργοποίησης των Rho GTPασών. Η πρόσδεση του GTP και η επακόλουθη ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών καταλύεται από τους GEFs. Όταν βρίσκονται στην ενεργή τους μορφή, οι Rho πρωτεϊνες μπορούν και αλληλεπιδρούν με διαφορετικές πρωτεΐνες (effectors) συμμετέχοντας με τον τρόπο αυτό σε ποικίλες βιολογικές λειτουργίες. Η υδρόλυση του GTP και η μετέπειτα απενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών καταλύεται από τους GAPs, ενώ οι RhoGDI πρωτεΐνες αναστέλουν την αποδέσμευση του GDP και οδηγούν τις Rho-GDP πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντας τη ροή του κύκλου GDP–GTP (από αναφορά(1)).

Οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες έχουν μια ενδογενή ικανότητα να υδρολύουν το GTP σε GDP και ανόργανο φώσφωρο (P), η ικανότητα αυτή όμως ενισχύεται σημαντικά από συγκεκριμένους παράγοντες (RHO–GAPs). Οι πρωτεΐνες RND1, RND2, RND3/RHOE, RHOH, RhoBTB1 και RhoBTB2 λόγω αντικατάστασης καίριων αμινοξέων δεν μπορούν να υδρολύσουν το GTP και να προσδέσουν το GDP με αποτέλεσμα να βρίσκονται μόνιμα προσδεδεμένες με GTP. Η ρύθμιση των πρωτεΐνών αυτών φαίνεται να συμβαίνει στο επίπεδο της έκφρασής τους, της φωσφορυλίωσης τους και των πρωτεΐνικών αλληλεπιδράσεων μέσω ειδικών δομικών περιοχών. Η φωσφορυλίωση ρυθμίζει επίσης τη δράση και την υποκυτταρική τοποθέτηση των RhoA και Rnd3/RhoE πρωτεΐνών οι οποίες φωσφορυλιώνονται μέσω της

κινάσης PKA που εξαρτάται από cAMP (cAMP-dependent Protein Kinase A) και ROCK (Rho-associated,coiled-coil containing protein kinase) αντίστοιχα (1).

Επιπλέον, η πλειοψηφία των Rho πρωτεϊνών υφίσταται καρβοξυτερματικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από λιπιδικές ομάδες, (εικόνες 4 κα 5) ισοπρενοειδείς ομάδες (farnesylation ή geranylgeranylation) ή/και παλμιτικό οξύ (palmitoylation) ενισχύοντας με τον τρόπο αυτό την αλληλεπίδραση με τις μεμβράνες.



Εικόνα 4 : Λιπιδικές ομάδες οι οποίες προστίθενται μετα-μεταφραστικά στις περισσότερες Rho πρωτεΐνες και ενισχύουν την αλληλεπίδραση με τις μεμβράνες (από αναφορά (*4*)).

Ένα επιπρόσθετο επίπεδο ρύθμισης προέρχεται από αναστολείς αποδιάταξης νουκλεοτιδίων γουανίνης τους (guanine-nucleotide-dissociation inhibitors, RHO–GDIs), οι οποίοι προσδένονται στο καρβοξυτερματικό πρενυλιωμένο άκρο εμποδίζοντας τη δέσμευση στη μεμβράνη με αποτέλεσμα οι Rho πρωτεΐνες να οδηγούνται στο κυτταρόπλασμα και να μη μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις άλλες πρωτεΐνες. Οι RhoGDIs μπορούν να προσδεθούν στις Rho GTΡάσες είτε αυτές είναι προσδεδεμένες με GTP είτε με GDP.



Εικόνα 5 : Παρουσίαση των διαφορετικών καρβοξυτερματικών άκρων και των μεταμεταφραστικών λιπιδικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν στις θέσεις αυτές σε διάφορα μέλη της οικογενείας των Rho πρωτεϊνών (από αναφορά(2)).

Μέχρι σήμερα περισσότερες από 70 RhoGEFs, 60 RhoGAPs και 3 RhoGDIs έχουν ταυτοποιηθεί στα θηλαστικά, αντανακλώντας τη πολυπλοκότητα της ρύθμισης των Rho πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, μια πρόσφατη ανάλυση έδειξε ότι το 1% περίπου του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες είτε ρυθμίζουν είτε ρυθμίζονται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με μέλη της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho (*5*).

Μετά από την ενεργοποίηση τους, οι Rho GTΡάσες προσδένονται σε διαφορετικές πρωτεΐνες στόχους (effectors) και ξεκινούν σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία εμπλέκονται σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες. Είναι αξιοσημείωτη η ταυτοποίηση μιας μεγάλης ομάδας τέτοιων πρωτεϊνών στόχων (~100) των Rho GTΡασών. Οι Rho πρωτεΐνες χαρακτηρίζονται ως υψηλά συντηρημένοι μοριακοί διακόπτες που ελέγχουν μέσω μιας σειράς πολύπλοκων βιοχημικών δικτύων, πολλές από τις θεμελιώδεις διαδικασίες της βιολογίας του κυττάρου όπως αυτών της μεταγραφικής ρύθμισης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της φαγοκυττάρωσης της

αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων και της μετανάστευσης των κυττάρων (1).

Οι RhoGTPάσες εκτός από τη συμμετοχή τους σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες, έχουν επίσης βρεθεί να εμπλέκονται σε παθολογικές διεργασίες συμπεριλαμβανομένων της μετακίνησης των καρκινικών κυττάρων, της φλεγμονής και της μετάστασης (1, 5). Παρόλο που οι τρεις ισομορφές της Ras πρωτεΐνης βρίσκονται μεταλλαγμένες στο 15% των ανθρώπινων όγκων, οι Rho πρωτεΐνες δε φαίνεται να φέρουν μεταλλάξεις στα καρκινικά κύτταρα. Ωστόσο, η έκφρασή τους και η δράση τους είναι τροποποποιημένη στις περισσότερες περιπτώσεις, υποδεικνύοντας ότι η ενδεχόμενη απορύθμιση τους ενισχύει τους ογκογονικούς φαινοτύπους. Για παράδειγμα η έκφραση αρκετών Rho πρωτεΐνών όπως της RhoA, RhoC, Rac1, RhoF και Cdc42 είναι αυξημένη σε αρκετούς τύπους καρκίνου (*6*).

RhoGTPάσες και καρκίνος

Οι RhoGTPάσες έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στα περισσότερα στάδια του καρκίνου από τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην επιβίωση τους και την απόπτωση μέχρι τη μετάστασή τους σε διαφορετικούς ιστούς.

Η ικανότητα μερικών Rho GTΡασών να επάγουν τη συνέχιση του κυτταρικού κύκλου και να ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων μπορεί να εξηγήσει εν μέρει τις προ-ογκογονικές ιδιότητες τους όπως για παράδειγμα την επαγωγή του μετασχηματισμού των κυττάρων που οφείλεται στο μονοπάτι του ογκογονιδίου Ras (1), (7). Οι Rho πρωτεΐνες εμπλέκονται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω ρύθμισης των επιπέδων της κυκλίνης D1 (cyclin D1) όπως επίσης και των p21^{WAF1} και p27^{KIP1} πρωτεΐνών οι οποίες προσδένονται και τροποποιούν τη δράση των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (CDKs) (Εικόνα 6) (1) ,(8). Η RhoA πρωτεΐνη καταστέλει την έκφραση του γονιδίου p21^{WAF1} και η Rac πρωτεΐνη προκαλεί αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης D1 (9), (10),(11) . Η αύξηση των επιπέδων έκφρασης της κυκλίνης D απαιτεί συστασιακά ενεργή ERK κινάση γεγονός το οποίο προϋποθέτει επιπρόσθετα σήματα μέσω ιντεγκρινών. Η ομαδοποίηση

των ιντεγκρινών και η συσσώρευση των συμπλόκων προσκόλλησης η οποία χρειάζεται το κυτταροσκελετό της ακτίνη εξαρτώνται από τις RhoGTPάσες. Επιπλέον, οι ομαδοποιημένες ιντεγκρίνες μπορούν να στρατολογήσουν Rho GEFs προκειμένου να ενεργοποιήσουν περαιτέρω τις RhoGTPάσες. Συμπερασματικά, οι Rho πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάβαση στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου ως διαμεσολαβητές σημάτων τα οποία προέρχονται από την εξωκυττάρια μάζα και δρώντας μέσω των ιντεγκρινών και του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Επίσης, συμμετέχουν και στη φάση της μίτωσης μέσω επίδρασης στα νημάτια της ακτίνης και στην οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης(Εικόνα 6) (8).

Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις για συμμετοχή των Rho πρωτεϊνών στη προστασία των κυττάρων έναντι της απόπτωσης (11).



Εικόνα 6 : Συμμετοχή των μελών της οικογένειας των RhoGTPασών στο κυτταρικό κύκλο (από αναφορά(*8*)).

<u>Το σηματοδοτικό μονοπάτι των RhoGTΡασών ως σημείο ελέγχου</u> (checkpoint) του κυτταρικού κύκλου βασισμένο στο κυτταροσκελετό

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 προυποθέσεις αυτές διασφαλίζουν το πολλαπλασιασμό των κυττάρων μόνο παρουσία κατάλληλου φυσικού περιβάλλοντος και των απαιτούμενων αυξητικών παραγόντων (*11*).

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 (12). 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 στο 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 (12).



Εικόνα 7 : Ο ρόλος των φυσικών ερεθισμάτων και των RhoGTPασών στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Α) Τα φυσιολογικά κύτταρα χρειάζονται αυξητικούς παράγοντες και κατάλληλα φυσικά ερεθίσματα για να πολλαπλασιαστούν. Όταν υπάρχουν μόνο αυξητικοί παράγοντες δεν πολλαπλασιάζονται. Β) Στα καρκινικά κύτταρα η απορυθμισμένη δράση των RhoGTPασών οδηγεί σε ανεξέλεγκτη σηματοδότηση απουσία των κατάλληλων φυσικών ερεθισμάτων και σε ανάπτυξη των κυττάρων μόνο παρουσία των αυξητικών παραγόντων (από αναφορά(11)).

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 (1).

Ένα επόμενο στάδιο στην εξέλιξη του καρκίνου είναι η καταστροφή του επιθηλίου και η είσοδος των καρκινικών κυττάρων στο στρώμα, γεγονός το οποίο προϋποθέτει τη χαλάρωση των διακυτταρικών συνδέσμων των επιθηλιακών κυττάρων και της απόκτησης ενός περισσότερου δυναμικού φαινοτύπου μέσω μιας διαδικασίας η οποία αναφέρεται συχνά ως επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EMT). Στη συνέχεια, 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 GTPaσών να ρυθμίζουν το κυτταροσκελετό της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, τη προσκόλληση αλλά και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω της διακοπής των κυτταρικών συνδέσμων, αύξησης της εξωκυττάριας μάζας υποδεικνύει ότι ενδεχόμενη τροποποίηση της δράσης των Rho πρωτεϊνών παίζει κεντρικό ρόλο στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 8) (1).



Εικόνα 8 : Σχηματική απεικόνιση των δυνητικών ρόλων των διαφορετικών RhoGTPασών στα διάφορα στάδια εξέλιξης του καρκίνου (από αναφορά (1)).

Οι RhoGTPάσες εμπλέκονται σε διάφορα στάδια κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Παρόλη την αρχική τους ανακάλυψη ως ρυθμιστές του κυτταροσκελετού και κατ'επέκταση της μετακίνησης των καρκινικών

κυττάρων, είναι πλέον ξεκάθαρο ότι η λειτουργία των Rho πρωτεϊνών δεν περιορίζεται μόνο σε αυτό αλλά παίζουν σημαντικό ρόλο και στη μεταγραφική ρύθμιση, τη κυτταρική διαίρεση και επιβίωση, την ενδοκυττάρια μεταφορά σηματοδοτικών μορίων και τη τροποποίηση των αλληλεπιδράσεων των καρκινικών κυττάρων με τα γειτονικά κύτταρα του στρώματος. Η πολύπλευρη δράση των RhoGTPασών καθιστά τη λεπτομερή ανάλυση της λειτουργίας τους μέσα στα κύτταρα και του ρόλου τους στον καρκίνο πολύπλοκη αλλά παράλληλα πολλαπλά υποσχόμενη για μελλοντική δυνητική χρησιμοποίηση τους ως θεραπευτικούς στόχους. Κάποιες από τις μεθόδους που αποσκοπούν στη τροποποίηση της λειτουργία των Rho GTPασών περιλαμβάνουν την αναστολή τοποθέτησης τους στη μεμβράνη και αλληλεπίδρασης τους με άλλες πρωτεΐνες (effectors) και την καταστολή της λειτουργίας των Rho GEFs αλλά και των Rho effectors (*1*).

Υποομάδες της οικογένειας των Rho GTΡασών

Με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων, τα δομικά μοτίβα και τη βιολογική τους λειτουργία, η οικογένεια των Rho GTPασών μπορεί να διακριθεί σε οκτώ κύριες υποοικογένειες οι οποίες εμφανίζουν παρόμοιες αλλά όχι πανομοιότυπες ιδιότητες (Εικόνες 1& 9). Οι υποοικόγενειες στις οποίες διαιρείται η οικογένεια των Rho πρωτεϊνών είναι οι εξής (Εικόνα 9): RhoA-related (RhoA, RhoB & RhoC) , Rac1-related (Rac1,Rac2,Rac3 & RhoG). Cdc42-related (Cdc42, TC10(RhoQ), TCL(RhoJ)) Rnd υποοικογένεια (Rnd1,Rnd2,Rnd3 (RhoE)), και τις υποοικογένειες RhoH, RhoBTB (RhoBTB1 & RhoBTB2), CHP (CHP (RhoV) & WRCH1 (RhoU) Kai RhoD (RIF(RhoF) & RhoD) οι οποίες ταυτοποιήθηκαν πρόσφατα (11), (13). Τα 3 πιο αντιπροσωπευτικά και καλύτερα μελετημένα μέλη είναι οι πρωτεΐνες RhoA, Rac και Cdc42 (Εικόνα 9). Ορισμένες από τις Rho πρωτεϊνες όπως οι RhoA, Rac1 και Cdc42 φαίνονται να εκφράζονται κατά έναν συστασιακό τρόπο σε όλους τους ιστούς ενώ άλλες πρωτεϊνες της ίδιας οικογένειας εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, στους οποίους εμφανίζουν και την δραστικότητά τους, υπόκεινται δηλ σε ιστο-ειδική ρύθμιση (2). Η Rac2 για παράδειγμα, μαζί με την Rac1, εκφράζεται μόνο σε αιμοποιητικά κύτταρα (ουδετερόφιλα) και παίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία των κυττάτων αυτών (14). Η RhoG κλωνοποιήθηκε με βάση την ιδιότητά της να επάγεται μεταγραφικά από μιτογόνους παράγοντες που υπάρχουν στον ορό του αίματος (15).

Εικόνα 9: Η οικογένεια των Rho GTΡασών. Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο στη σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των 20 Rho GTΡασών. Η υψηλότερη ομολογία εμφανίζεται μεταξύ των πρωτεϊνών των Rac και Rho υποικογενειών(από αναφορά(13)).



<u> RhoA-υποοικογένεια</u>

Η υποοικογένεια της RhoA περιλαμβάνει τις RhoA, RhoB και RhoC πρωτεΐνες, η αμινοξική αλληλουχία των οποίων εμφανίζει ομολογία η οποία προσεγγίζει το 85% (Εικόνα 10). Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και αλληλεπιδρούν με κοινούς παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης Rho–GEFs. Παρόλη όμως την ομοιότητα τους, έχουν διακριτούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διεργασίες πιθανόν λόγω διαφορών στο καρβοξυτερματικό τους άκρο οι οποίες και καθορίζουν τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους (Εικόνα 10) (*16*). Η πρωτεΐνη RhoA είναι κυτταροπλασματική με ένα μικρό ποσοστό της να βρίσκεται στη πλασματική μεμβράνη ενώ η RhoB παρατηρείται κυρίως σε ενδοκυττάρια κυστίδια όπου και συμμετέχει στη μεταφορά των ώριμων ενδοσωμάτων. Τέλος η RhoC είναι κυτταροπλασματική ενώ επιπλέον εντοπίζεται σε μη ταυτοποιημένες προς το παρόν περιπυρηνικές δομές (*2*, *16-17*).

		Activation Dominant Negative	Fast Cycling Toxin B
		(G-V) (T-N)	(F-L)
		14 19	
RhoA	MAAIRKKLVI	VGD <mark>G</mark> ACGK <mark>T</mark> CLLIV F	SKDO <mark>F</mark> PEVYVP T VFE
RhoB	MAAIRKKLVV	VGD <mark>G</mark> ACGK <mark>T</mark> CLLIV <mark>F</mark>	SKDEFPEVYVPTVFE
RhoC	MAAIRKKLVI	VGD <mark>G</mark> ACGK <mark>T</mark> CLLIV	SKDOFPEVYVPTVFE
	C3 Transferase	Activation +	ONF-1
		(Q-L)	
	41	63	9witch 2
RhoA	NYVADIEVDG	; K Q V E L A L W D T A G 💆 E D	YDRLRPLSYPDTDVI
RhoB	N YVADIEVDG	KQVELALWDTAG <mark>Q</mark> ED	YDRLRPL\$YPDTDVI
RhoC	NYIADIEVDG	; K Q V E L A L W D T A G <mark>Q</mark> E D	YDRLRPLSYPDTDVI
RhoA	LMCFSIDSPD	SLENIPEKWTPEVKH	FCPNVPIILVGNKKD
RhoB	LMCFSVDSPD	SLENIPEKWVPEVKH	FCPNVPIILVANKKD
RhoC	LMCFSIDSPD	SLENIPEKWTPEVKH	FCPNVPIILVGNKKD
	Insert Do	<u>mein</u>	
RhoA	LRNDEHTRRE	LAKMKQEPVKPEEGR	DMANRIGAFGYMECS
RhoB	LRSDEHVRTE	LARMKQEPVRTDDGR	A M A V R I Q A Y D Y L E C S
RhoC	LRQDEHTRRE	E L A K M K Q E P V <mark>R S</mark> E E G R	DMANRISAFGYLECS
			Prenylation
			190
RhoA	AKTKDGVREV	FEMATRAALQARRGKK	KSG <mark>C</mark> LVL
RhoB	AKTKEGVREV	FETATRAALQ KRYGSQ	NGCINCCKVL
RhoC	AKTKEGVREV	FEMATRAGLQ VRKN K R	RRG <mark>C</mark> PIL

Εικόνα 10 : Οι αμινοξικές αλληλουχίες των RhoA, RhoB και RhoC. Τα αμινοξέα των RhoB και RhoC τα οποία διαφέρουν από τα αντίστοιχα της RhoA απεικονίζονται με κόκκινο ενώ εκείνα οι μεταλλαγές των οποίων επηρεάζουν τη δράση τους ως GTPάσες απεικονίζονται με ροζ. Τα αμινοξέα τα οποία αποτελούν στόχους για τοξίνες όπως η Γλουταμίνη 63 και η Κυστείνη 190 απεικονίζονται με μπλε ενώ αυτά που είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση με Rho effectors απεικονίζονται με πράσινο (από αναφορά(18)).

<u>Ρύθμιση της έκφρασης των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών</u>

Τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες RhoA, RhoB και RhoC στον άνθρωπο και στον ποντικό βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το γονίδιο της RhoA είναι μεγαλύτερο και περιέχει περισσότερα εξόνια και ιντρόνια από αυτό της RhoC. Για το λόγο αυτό έχει προταθεί ότι το γονίδιο της RhoC μπορεί να δημιουργήθηκε από ημιτελή διπλασιασμό της γονιδίου της RhoA. Το γονίδιο της RhoB είναι αρκετά μικρότερο , περιέχει μόνο ένα εξόνιο και θεωρείται ότι προέκυψε μέσω αντίστροφης μεταγραφής (*18*). Οι RhoA, RhoB και RhoC GTPάσες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς παρόλα αυτά τα επίπεδα έκφρασης τους ποικίλουν σημαντικά ανάλογα με τον τύπο του ιστού.

Η έκφραση του γονιδίου της RhoB αλλά όχι αυτών της RhoA και RhoC επάγεται από διαφορετικούς παράγοντες όπως η ακτινοβολία UV, κυτοκίνες ή αυξητικοί παράγοντες. Επιπρόσθετα τα επίπεδα της πρωτεΐνης RhoB διαφοροποιούνται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και τα μετάγραφα της έχουν πολύ μικρότερο χρόνο ημίσειας ζωής από αυτό των RhoA και RhoC. Οι αξιοσημείωτες διαφορές στη γονιδιακή ρύθμιση των τριών ισομορφών της υποοικογένειας της RhoA αντανακλούν ενδεχομένως και διαφορετικές λειτουργίες των πρωτεϊνών αυτών (18).

Δομή και ρύθμιση των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών

Οι περισσότερες διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο. Τα αμινοτελικό τους άκρο περιλαμβάνει τη πλειοψηφία των αμινοξέων που εμπλέκονται στη πρόσδεση και υδρόλυση του GTP καθώς και τις περιοχές Switch 1 και 2 οι οποίες αλλάζουν διαμόρφωση μεταξύ των GTP και GDP-προσδεδεμένων μορφών (Εικόνα 10) (*19*).

Τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για τη καταλυτική λειτουργία είναι συντηρημένα και στις τρεις Rho ισομορφές όπως επίσης και τα αμινοξέα που εμπλέκονται στη πρόσδεση, σταθεροποίηση ή ρύθμιση της υδρόλυσης του GTP. Οι Rho πρωτεΐνες αποτελούν στόχους για αρκετές βακτηριακές τοξίνες οι οποίες τροποποιούν βασικά συντηρημένα αμινοξέα που συμμετέχουν στη ρύθμιση της λειτουργίας τους. Δυο από τις τοξίνες αυτές είναι η Clostridium botulinum exoenzyme C3 transferase η οποία τροποποιοί 37 (*18*).

Η έλικα στη περιοχή "insert loop" μεταξύ των αμινοξέων 123 και 137 η οποία βρίσκεται στα περισσότερα μέλη της οικογενείας των Rho GTΡασών αλλά σε κανένα άλλο μέλος της υπεροικογένειας των Ras GTΡασών εμφανίζει κάποιες διαφορές μεταξύ των RhoA, RhoB και RhoC αμινοξικών αλληλουχιών. Οι αμινοξικές διαφορές της περιοχής αυτής πιθανόν να οφείλονται για τις αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες effectors οι οποίες είναι εξειδικευμένες για καθεμία από τις πρωτεΐνες της RhoA υποοικογένειας (18).

Οι RhoA, RhoB και RhoC τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά μέσω πρενυλίωσης μια συντηρημένης κυστείνης η οποία βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Η πρενυλίωση αυτή ακολουθείται από μεθυλίωση και πρωτεολυτική αποικοδόμηση των τελευταίων τριών αμινοξέων (Εικόνες 4,5 και 8). Η προσθήκη της λιπιδικής ομάδας αγκυροβολεί τις Rho GTPάσες στη μεμβράνη και είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό και μετασχηματισμό των κυττάρων αλλά και για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Η πρενυλίωση των Rho πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση τους και αναστολείς των ενζύμων που συνθέτουν τις πρενυλικές ομάδες προκαλούν μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της RhoA ή της RhoB και επηρεάζουν τη λειτουργία τους (18, 20-21). Το μήκος της λιπιδικής ομάδας διαφέρει μεταξύ των Rho πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, στη πρωτεΐνη RhoB μπορεί να προστεθεί είτε μια ομάδα 15-ανθράκων (farnesyl) είτε μια ομάδα 20-ανθράκων (geranylgeranyl) ενώ οι RhoA και RhoC πρωτεΐνες βρίσκονται μόνο στη -GG μορφή (geranylgeranylated). Η διαφορά στη τροποποίηση αυτή αντανακλάται στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους. Η πρωτεΐνη RhoB τοποθετείται στα ενδοσώματα και στα λυσοσώματα ενώ οι RhoA και RhoC πρωτεΐνες βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και στη πλασματική μεμβράνη. Σε περιπτώσεις όπου είτε λόγω μεταλλαγών στο καρβοξυτελικό άκρο είτε λόγω μέσω χρησιμοποίησης αναστολέων φαρνεσυλτρανσφερασών, η RhoB πρωτεΐνη υφίσταται μόνο την προσθήκη geranylgeranyl ομάδας, τότε εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη υποδεικνύοντας ότι οι διαφορετικές μορφές της πρωτείνης τοποθετούνται σε διαφορετικές ενδοκυττάριες δομές (16, 18).

Αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες

Η μικρή διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών η οποία παρατηρείται στη περιοχή πρόσδεσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Switch 1 περιοχή) (Εικόνα 10) πιθανόν να οφείλεται για τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις τους με ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως οι Rho GAPs και οι Rho GEFs. Παράλληλα με τις διαφορές στη συγγένεια για κάθε Rho πρωτεΐνη, είναι πιθανό ότι οι GAP και GEF πρωτεΐνες αποκρίνονται στα εξωκυττάρια ερεθίσματα με αλλαγές στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους, επιτυγχάνοντας με τον τρόπο αυτό εξειδικευμένη δράση έναντι των Rho πρωτεϊνών (22).

Εκτός από τους Rho GEFs και Rho GAPs, πρωτεΐνες τελεστές (effectors) των Rho GTPασών προσδένονται στη περιοχές Switch 1 και 2 αλλά τα αμινοξέα στα οποία οφείλονται οι αλληλεπιδράσεις αυτές διαφέρουν ανάλογα με τη κάθε πρωτεΐνη-στόχο (*16, 18*). Για το λόγο αυτό υπάρχουν και διαφορετικά πρωτεινικά μοτίβα αλληλεπίδρασης των Rho πρωτεϊνών με τις

πρωτεΐνες τελεστές. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες PRKs (PKNs), Rhoteckin και Rhophillin περιέχουν περιοχές πρόσδεσης στις Rho GTPάσες, οι οποίες αποτελούνται από 70 αμινοξέα κοντά στο αμινοτελικό τους άκρο (HR1 περιοχή-leucine zipper) ενώ οι πρωτεΐνες ROCK1 και ROCK2 έχουν διαφορετική περιοχή πρόσδεσης στις Rho GTPάσες η οποία εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Τόσο η πρωτεΐνη PRK όσο και η ROCK αλληλεπιδρούν και με τις τρεις ισομορφές των Rho (Εικόνα 11) (*18*).

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποηθεί 11 πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα με τη RhoA (Εικόνα 11). Μερικές από αυτές τις πρωτεΐνες συμμετέχουν σε εξειδικευμένες λειτουργίες μέσα στο κύτταρο. Μελέτες βασισμένες σε πρωτεινικές αλληλεπιδράσεις έδειξαν ότι οι ROCK και Citron πρωτεΐνες έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τη RhoC σε σύγκριση με αυτή για τις RhoA και RhoB ενώ η RhoC ενεργοποιεί ισχυρότερα τη ROCK στα επιθηλιακά κύτταρα (*18, 23-24*)

Παράλληλα, παρόλο που δεν υπάρχουν ενδείξεις *in vitro* για διαφορετική συγγένεια των PRKs με κάποια από τις Rho ισομορφές, ο συνεντοπισμός των PRK1 και RhoB πρωτεϊνών στα ενδοσώματα υποδεικνύει ότι η PRK1 πρωτεΐνη αποτελεί εξειδικευμένο στόχο της RhoB GTPάσης. Όντως, η PRK πρωτεΐνη έχει δειχθεί να σχηματίζει σύμπλοκο με τη πρωτεΐνη RhoB με αποτέλεσμα τη καθυστέρηση μετάβασης του EGF υποδοχέα στα λυσοσσώματα μέσω του μονοπατιού ενδοκύτωσης (*6, 18*).

Συμπερασματικά, οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των Rho GTPασών με τις πρωτεΐνες τελεστές αντανακλώνται στις διαφορετικές λειτουργίες των Rho πρωτεΐνών μέσα στο κύτταρο. Για παράδειγμα οι RhoA και RhoC πρωτεΐνες μέσω αλληλεπιδράσεων με τη κινάση ROCK εμπλέκονται στις λειτουργίες αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού και μετακίνησης των κυττάρων ενώ η αλληλεπίδραση της RhoB GTPάσης με τη PRK πρωτεΐνη της προσδίδει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της ενδοκύτωσης του EGF υποδοχέα (*18*).

Effector	RhoA	RhoB	RhoC
Rock 1+2	++	+	+++
mDia	++	+	++
PRK1/2 PKN	++	++	++
Rhoteckin	+++	+	+++
Rhophillin	+++	+	++
Kinectin	+++	?	?
Citron Kinase	++	+	+++
MBS	+++	?	?
p76RBE	+	++	?
PKC epsilon	++	++	+++
DBl transcription factor	+	++	?
Interaction with Rho isoform + = mild interaction. ++ = moderate interaction. +++ = strong interaction. ? = unknown	by yeast 2 hybr	id or pull down.	

Εικόνα 11 : Πρωτεΐνες τελεστές των RhoA, RhoB και RhoC GTΡασών και η αλληλεπίδραση τους με κάθε ισομορφή (από αναφορά (*18*))

Ο ρόλος των RhoGTΡασών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τη κυτταρική μετακίνηση

Οι πρωτεΐνες RhoA, RhoB και RhoC παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του σχήματος και της πολικότητας των κυττάρων μέσω της δράσης τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων και στη προσκόλληση των κυττάρων (Εικόνα 12) (*18, 25*).



Εικόνα 12 : Μοντέλο της κατανομής των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών στόχων τους σε ένα κύτταρο σε διαδικασία μετακίνησης. Οι πρωτεΐνες mDia (aDRF) και ROCK έχουν δειχθεί να σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους και για το λόγο αυτό βρίσκονται στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου (leading edge). Οι RhoA και ROCK πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για το μάζεμα της ουράς του κυττάρου (tail retraction) και την αποσυσσώρευση των προσφύσεων στο πίσω μέρος του κυττάρου. Η πρωτεΐνη RhoB συνεντοπίζεται με τη PRK1 πρωτεΐνη στα ενδοσώματα και η RhoC παρουσιάζει μια διάχυτη κατανομή στο κυτταρόπλασμα (από αναφορά (*18*)).

Δεν είναι ξεκάθαρο ακόμη αν το κύτταρο διακρίνεται σε δυο περιοχές, τη Rac ζώνη (front) και τη Rho ζώνη (rear) ανάλογα με τη περιοχή κατανομής των αντίστοιχων πρωτεϊνών. Μια πρόσφατη μελέτη όμως έχει δείξει ότι οι RhoA,RhoB και RhoC πρωτεΐνες αποικοδομούνται επιλεκτικά στο μπροστινό τμήμα του κυττάρου (*18, 26-27*). Για το λόγο όμως ότι οι περισσότερες μελέτες πάνω στη λειτουργία των Rho πρωτεϊνών βασίζονται στη χρήση του ενζύμου C3 τρανσφεράσης το οποίο καταστέλει και τις τρεις Rho πρωτεΐνες μέσω ADP ριβοζυλίωσης της συντηρημένης Ασπαραγίνης 41, δεν έχει διευκρινιστεί ακριβώς ο ρόλος καθεμίας από τις Rho GTPάσες.

Παρόλα αυτά, η χρησιμοποίηση επικρατουσών-αρνητικών μορφών (dominant negative) των RhoA και RhoB πρωτεϊνών έδειξαν ότι οι ινοβλάστες με έλλειψη της RhoB πρωτεΐνης εμφανίζουν μειωμένη κινητικότητα και δράση επούλωσης πληγής (wound healing) γεγονός το οποίο μπορεί να οφείλεται σε περιορισμένες ιδιότητες προσκόλλησης των κυττάρων (6, 18). Η πρωτεΐνη RhoA συμμετέχει άμεσα στο πολυμερισμό της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Dia (επίσης DRFs, diaphanous-related formins). Οι πρωτεΐνες Dia συντελούν στη προσθήκη μονομερούς ακτίνης στο άκρο των ινιδίων της ακτίνης και δρουν συνεργατικά με τις ROCK κινάσες στο σχηματισμό των ινιδίων του στρες (18, 25). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης LIMK από τη κινάση ROCK και η επακόλουθη καταστολή της κοφιλίνης συνεισφέρουν σημαντικά στην αύξηση των ινιδίων της ακτίνης ως απόκρισης στις πρωτεΐνες Rho. Επιπρόσθετα, οι κινάσες ROCK επάγουν τη φωσφορυλίωση αρκετών πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στη ρύθμιση της μυοσίνης και άλλων πρωτεϊνών που προσδένονται με την ακτίνη (18, 28). Καταστολή της πρωτεΐνης ROCK δημιουργεί κύτταρα με επιμήκεις ουρές.

Οι μικροσωληνίσκοι παίζουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της πολικότητας του κυττάρου αλλά και στην ενδοκυττάρια μεταφορά κυστιδίων. Η συντονισμένη δράση των πρωτεϊνών ROCK και DRFs/Dia είναι απαραίτητη για την οργάνωση των μικροσωληνίσκων (18, 28).

Η κίνηση των κυττάρων προϋποθέτει τη στροφή των προσφύσεων τόσο μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας μάζας όσο και των κυττάρων μεταξύ τους. Οι πρωτεΐνες Rho συμμετέχουν ενεργά στη ρύθμιση του συνόλου των προσφύσεων και των συνδέσμων (adherens junctions και tight junctions) (*18, 29*). Η απώλεια ή η εξασθένιση των διακυτταρικών συνδέσμων απαιτείται για τη μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων και ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες ROCK και DRFs/DIA. Η RhoC συμμετέχει στην εξασθένιση των συνδέσμων σε μεγαλύτερο βαθμό από τη RhoA πιθανόν λόγω της ισχυρότερης ενεργοποίησης της κινάσης ROCK (*18, 24*).

Οι Rho GTΡάσες επάγουν σημαντική αύξηση στον αριθμό και το μέγεθος των εστιακών προσφύσεων οι οποίες βασίζονται σε ιντεγκρίνες σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και χρειάζονται για το σχηματισμό των ποδοσωμάτων (podosomes) στα δενδριτικά και ενδοθηλιακά κύτταρα (18, 30-31). Επίσης, οι Rho πρωτεΐνες συνεισφέρουν στη συνάθροιση των εστιακών προσφύσεων και ρυθμίζουν τη δράση των ιντεγκρινών και την ενδοκύτωση (18, 25).

Ο ρόλος των RhoGTΡασών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης

Οι Rho πρωτεΐνες συμμετέχουν σε λειτουργίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης οι οποίες βασίζονται στη κυτταρική μετακίνηση όπως ο σχηματισμός των οστών, η γένεση των μυών και η ανάπτυξη των αποφύσεων των νευρικών κυττάρων (18, 32). Η σύγκριση των διαφορετικών ρόλων των RhoA, RhoB και RhoC πρωτεϊνών επιτυγχάνεται μόνο στους ανώτερους οργανισμούς καθώς ο Caenorhabditis elegans και η Drosophila melanogaster έχουν μόνο μία Rho GTPάση (18, 33). Μελέτες στις οποίες οι Rho πρωτεΐνες ήταν μη λειτουργικές λόγω της έκφρασης μια πρωτεΐνης RhoGDI, έδειξαν ότι η απώλεια ενεργότητας των Rho GTΡάσων προκαλεί εμβρυικό θάνατο στα ποντίκια μέσω προβλημάτων στο στάδιο της γαστριδίωσης και ανικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν (18, 34). Σε αντίθεση, τα ποντίκια που έχουν έλλειψη της RhoB πρωτεΐνης είναι βιώσιμα και γόνιμα υποδεικνύοντας ότι η RhoB GTPάση έχει πιο εξειδικευμένους ρόλους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (6, 18). Τα ελλειματικά σε RhoB πρωτεΐνη ποντίκια παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάπτυξη της όρασης και δεν είναι τόσο γόνιμα όσο τα αγρίου τύπου αλλά δεν είναι ακόμα γνωστό εάν οι διαφορές αυτές αντιπροσωπεύουν προβλήματα στη μετακίνηση ή στην επιβίωση των κυττάρων (*18, 35*).

Ο ρόλος των Rho GTΡασών στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων

Παράλληλα με τη άμεση δράση τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού, οι Rho πρωτεΐνες επάγουν αλλαγές στη μεταγραφή γονιδίων οι οποίες μπορούν να έχουν έμμεσο αντίκτυπο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Η RhoA ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαμέσου του συμπλόκου μεταγραφικών παραγόντων MAL/SRF μέσω μεταβολής των επιπέδων της μονομερούς ακτίνης στα κύτταρα (18, 36). Ο παράγοντας MAL προσδένεται άμεσα στη μονομερή ακτίνη και φαίνεται να λειτουργεί ως αισθητήρας-ανιχνευτής της μονομερούς ακτίνης και επάγει τη μεταγραφή μέσω του SRF παράγοντα πολλαπλών γονιδίων του κυτταροσκελετού όπως της βινκουλίνης (vincoulin) β και της γ-ακτίνης (18, 36). Δεν είναι γνωστό εάν η RhoB πρωτεΐνη επηρεάζει την δράση του MAL/SRF συμπλόκου αλλά είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι καταστέλει τη μεταγραφή του υποδοχέα τύπου ΙΙ του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (TGFβ-1) μέσω μείωσης της πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα ΑΡ1 στον υποκινητή του (18, 37). Οι διαφορετικοί μηχανισμοί που χρησιμοποιούν οι RhoA και RhoB πρωτεΐνες για τη ρύθμιση της μεταγραφής οφείλονται πιθανότατα για τις διαφορετικές μακροπρόθεσμες δράσεις τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και τη κινητικότητα των κυττάρων (18).

RhoA, RhoB, RhoC και καρκίνος

Οι μεγαλύτερες διαφορές στη λειτουργία των τριών Rho ισομορφών διακρίνονται στο ρόλο αυτών στην εξέλιξη του καρκίνου. Έχει δειχθεί ότι η μόνιμα ενεργή πρωτεΐνη RhoA έχει ογκογονικές ιδιότητες (38) και ότι αποτελεί σημαντικό συστατικό του μονοπατιού σηματοδότησης που επάγεται από το ογκογονίδιο ras και που οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό (39). Πρόσφατες μελέτες σε πρωτογενείς όγκους έχουν δείξει ότι πολλές Rho GTPάσες μεταξύ των οποίων η RhoA και η RhoC, βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του ορθού, των πνευμόνων, του πανκρέατος κ.α. (40-43). Επίσης, η RhoA έχει δειχθεί ότι προωθεί την διεισδυτικότητα κυττάρων ηπατώματος και επάγει την μεταστατικότητα των ινοβλαστών NIH3T3 (44-45). Η πρωτεΐνη RhoC βρέθηκε ότι είναι βασικός ρυθμιστής της κινητικότητας και της μεταστατικότητας κυττάρων μελανώματος (46).

Οι RhoA και RhoB πρωτεΐνες επάγουν το μετασχηματισμό ινοβλαστών ποντικού σε καλλιέργεια ενώ η RhoA πρωτεΐνη μπορεί να ενισχύσει το σχηματισμό όγκων από τους ινοβλάστες αυτούς. Επιπλέον, έχει βρεθεί αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RhoA σε ποικίλες καρκινικές σειρές κυττάρων οι οποίες είτε εμφανίζουν υψηλό βαθμό μεταστατικότητας είτε παρουσιάζουν προβλήματα στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού (18, 47). Σε αντίθεση με τις RhoA και RhoB, η πρωτεΐνη RhoC δεν επηρεάζει το μετασχηματισμό των ινοβλαστών αλλά έχει βρεθεί μέσω γονιδιωματικών αναλύσεων ότι η έκφραση της RhoC αυξάνει προοδευτικά καθώς οι όγκοι γίνονται περισσότερο μεταστατικοί γεγονός που συνδέει την έκφραση της RhoC με την επαγωγή της μετάστασης (18, 47). Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoC στη μετάσταση συνδέεται ενδεχομένως με την ισχυρότερη ενεργοποίηση της ROCK κινάσης σε σχέση με αυτή που προκαλείται από τη πρωτεΐνη RhoA καθώς η καταστολή της κινάσης ROCK μπλοκάρει τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων (18, 24, 48). Η αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης RhoC φαίνεται να επαρκεί για τη συνεισφορά της στη μετάσταση καθώς μεταλλαγές της πρωτεΐνης RhoC δεν έχουν βρεθεί ως τώρα σε καρκίνους.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB αντιθέτως, καταστέλει τη μετάσταση κυττάρων του μελανώματος και σε αρκετούς καρκίνους τα επίπεδα έκφρασής της μειώνονται κατά την εξέλιξη του καρκίνου (18, 47, 49). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η δράση της RhoB GTPάσης είναι σημαντική για την απόπτωση η οποία επάγεται από στρες και ότι η απώλεια της RhoB πρωτεΐνης επηρεάζει αρνητικά την απόκριση των εμβρυικών ινοβλαστών σε ερεθίσματα στρες. Ο ρόλος της RhoB πρωτεΐνης στις αποκρίσεις του στρες εξαρτάται από το πρότυπο πρενυλίωσης της (18, 50). Με βάση τις παραπάνω ενδείξεις φαίνεται ότι η πρωτεΐνη RhoB δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής επιβίωσης (6, 18).

Είναι ξεκάθαρο πλέον ότι οι RhoA,B και C πρωτεΐνες δεν είναι πανομοιότυπες λειτουργικά αλλά παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών αποκρίσεων και διεργασιών. ΟΙ διαφορές αυτές στη λειτουργία των τριών Rho ισομορφών πιθανόν να δημιουργούνται από ένα συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών που σχετίζονται με τη μεταγραφική ρύθμιση και τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους αλλά και με την επιλεκτική αλληλεπίδρασή τους με πρωτεΐνες ενεργοποιητές ή τελεστές. Φαίνεται λοιπόν ότι οι RhoGTPάσες όπως και οι συγγενικές τους Ras, εμφανίζουν υψηλό βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία τους αλλά διακριτές λειτουργίες (18).

<u>Μοναδικά χαρακτηριστικά της RhoB</u>

Η πρωτεΐνη RhoB παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που της προσδίδουν ξεχωριστές ιδιότητες και λειτουργίες μεταξύ των άλλων μελών της οικογένειας. Καταρχήν αποτελείται από ένα μόνο εξόνιο (590bp) το οποίο βρίσκεται στο 2° χρωμόσωμα στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Έχει μικρό χρόνο ημίσσειας ζωής και συγκεκριμένα 20 λεπτά για το mRNA και 2 ώρες για τη πρωτεΐνη (*51-52*). Ενώ οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες, όπως η RhoA και η RhoC, τροποποιούνται με την ομοιοπολική σύνδεση μιας geranylgeranyl ομάδας, η RhoB είναι μοναδική καθώς μπορεί να υπάρξει σε δυο ισομορφές μες στο κύτταρο. Εκφράζεται είτε σε geranylgeranyl (-GG) είτε σε farnesyl (-F) ισομορφή και επίσης είναι η μόνη από την υποοικογένεια που τροποποιείται περαιτέρω με τη προσθήκη παλμιτικού οξέος (*11*). Είναι αξιοσημείωτο ότι οι διαφορετικές μορφές της RhoB πρωτεΐνης τοποθετούνται σε διαφορετικές ενδοκυττάριες δομές και φαίνεται να έχουν και διαφορετικές λειτουργίες (βλέπε επίσης σελ.13). Η RhoB-GG ισομορφή εντοπίζεται στα όψιμα ενδοσώματα ενώ η RhoB-F στη πλασματική μεμβράνη (53).

Για παράδειγμα, η επίδραση της RhoB στο μονοπάτι του NFkB παράγοντα φαίνεται να εξαρτάται από τη παρουσία των διαφορετικών ισομορφών της στο κύτταρο. Παλαιότερες δημοσιεύσεις είχαν δείξει ότι η RhoB καταστέλει την σηματοδότηση μέσω NFkB με το να εμποδίζει την αποδέσμευση και διάσπαση του ΙκBα στις περιπτώσεις όπου ο NFkB επάγεται από γενοτοξικό στρες (UV & doxorubicin) και όχι από τον TNFα (tumor necrosis factor alpha) (*54*). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η ενώ RhoB-F ισομορφή αποτελεί δυνητικό ενεργοποιητή του NFkB, η RhoB-GG ισομορφή προκαλεί πολύ ασθενική ενεργοποίηση όπως και οι RhoA και RhoC ισομορφές. Η ενεργοποίηση του NFkB παράγοντα από τη RhoB πρωτεΐνη δεν σχετίζεται με αυξημένη μετατόπιση στο πυρήνα της RelA/p65 πρωτεΐνης αλλά με τροποποίηση της περιοχής ενεργοποίησης της και εξαρτάται από τη ROCK 1 κινάση και όχι από τη PRK 1. Η καταστολή της ενεργότητας της RhoB GTPάσης δεν μπλοκάρει όμως την ενεργοποίηση του NFkB η επαγωγή του οποίου εξαρτάται από τον TNFα ή το ογκογονίδιο Ras. Συμπερασματικά, φαίνεται να υπάρχει ένα ενδοσωμικό μονοπάτι ενεργοποίησης του NFkB το οποίο ρυθμίζεται επιλεκτικά από τη RhoB-F ισομορφή (55).

Επιπλέον, η RhoB συμμετέχει στο μονοπάτι ενδοκύτωσης του EGF υποδοχέα αλλά και της Src κινάσης τυροσίνης (1, 56). Συγκεκριμένα η χρήση FTI (farnesyltransferase inhibitors) φαρμάκων η οποία οδηγεί στον εντοπισμό της RhoB-GG ισομορφής στα ενδοσώματα έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη μεταγωγή του EGF υποδοχέα στα λυσοσσώματα και την αυξημένη ανακύκλωσή του στη πλασματική μεμβράνη. Επιπρόσθετες αναλύσεις έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της RhoB συντελεί στη καθυστέρηση της μεταφοράς του υποδοχέα από τα όψιμα ενδοσώματα στα λυσοσσώματα χωρίς αυτό όμως να έχει επίδραση στη μεταγωγή του σήματος από τον υποδοχέα (53).

Επιπροσθέτως, η RhoB σε αντίθεση με τις RhoA και RhoC ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η έκφραση της RhoB εμφανίζεται μειωμένη σε όγκους (57) ενώ ποντικοί με έλλειψή της αναπτύσσονται φυσιολογικά αλλά εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα καρκίνων του δέρματος που προκαλείται από καρκινογόνες ουσίες (58).

Παράλληλα έχει βρεθεί ότι μετασχηματισμένα κύτταρα με έλλειψη της RhoB δεν οδηγούνται σε απόπτωση μετά από βλάβη στο DNA ενώ η εκτοπική έκφραση της RhoB διασώζει το φαινότυπο. Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η RhoB στην απόπτωση δεν είναι ακόμα γνωστός αλλά κάποιες πρώτες ενδείξεις δείχνουν ότι αναστέλει το μονοπάτι επιβίωσης της Akt κινάσης (protein kinase B) (εικόνα 13). Αναλυτικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι το ογκογονίδιο Ras καταστέλει την έκφραση της RhoB μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος εξαρτάται από τη phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- και την Akt ενώ είναι ανεξάρτητος της MEK. Η RhoB με τη σειρά της ανταγωνίζεται τις ογκογονικές ιδιότητες του Ras/PI3K/Akt μονοπατιού και η εκτοπική έκφραση της εμποδίζει την επαγωγή διαδικασιών όπως του μετασχηματισμού και της έκφρασης της RhoB πρωτεΐνης αποτελεί μηχανισμό μέσω του οποίου το Ras/PI3K/Akt μονοπάτι επάγει την επιβίωση, το μετασχηματισμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Επιπλέον, η RhoB έχει βρεθεί να αντιστρέφει την Ras/PI3K/Akt μεσολαβούμενη ανθεκτικότητα στην απόπτωση η οποία επάγεται από χημειοθεραπευτικές ενώσεις όπως το 5-FU (5-Fluorouracil). Η αρνητική δράση της RhoB στο μονοπάτι της Akt πιθανόν να προέρχεται από καταστολή της φωσφορυλίωσης της Akt από την Pdk1 καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών Pdk1 και PRK (κινάση τελεστή της RhoB) κρίνονται απαραίτητες για την ενεργοποίηση της Akt (49). Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η RhoB καταστέλει εκτός από την Akt και τη συστασιακά ενεργή ERK2 κινάση (59).



Εικόνα 13 : Η RhoB καταστέλει τους μηχανισμούς επιβίωσης και μετάστασης των κυττάρων οι οποίοι μεσολαβούνται από το H-Ras/PI3K/Akt μονοπάτι (από αναφορά (49))

Παράλληλα, πρόσφατη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα έδειξε ότι η καταστολή της RhoB δεν προκαλεί προβλήματα στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό αλλά προωθεί την μετανάστευση των κυττάρων μέσω τροποποιήσεων στην ακτίνη και στη κυτταρική προσκόλληση. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των Akt1 και Rac1 πρωτεϊνών χρειάζεται για τη ρύθμιση της μετακίνησης των κυττάρων μέσω της RhoB GTPάσης. Φαίνεται επομένως από αυτή τη μελέτη ότι η απώλεια της RhoB κατά την εξέλιξη του καρκίνου του πνεύμονα σχετίζεται με τη μετάσταση των κυττάρων και όχι με την δημιουργία του όγκου και μεσολαβείται από τα μονοπάτια των PI3K (phosphatidylinositol) /Akt και Rac1 πρωτεϊνών (*60*). Η ύπαρξη των δύο ισομορφών (RhoB-F και RhoB-GG) και ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής της μέσα στο κύτταρο, καθιστούν τη RhoB δυνητικό στόχο των φαρμάκων FTIs (farnesyltransferase inhibitors) τα οποία εμφανίζονται να έχουν αποτελεσματική αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, το γεγονός ότι η RhoB δεν παρουσιάζει μεταλλάξεις στους διάφορους τύπους καρκίνου, δεν επάγει ανάπτυξη των όγκων και το ποσοστό της RhoB-GG ισομορφής είναι μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό της RhoB-F στο κύτταρο οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αντικαρκινική δράση των FTIs φαρμάκων δεν οφείλεται στη καταστολή της φαρνεσυλίωσης της RhoB πρωτεΐνης (*61*).

Τέλος η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα της RhoB που της προσδίδει μοναδικότητα και ιδιαίτερες προοπτικές για μελέτη είναι το γεγονός ότι είναι η μόνη από την υποοικογένεια που έχει ρυθμιζόμενη έκφραση.

Μεταγραφική ρύθμιση της RhoB πρωτεΐνης

Τα επίπεδα της RhoB πρωτεΐνης ποικίλουν ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου και τα μετάγραφά της έχουν πολύ μικρό χρόνο ημίσσειας ζωής (20-30min) ,συγκριτικά με αυτόν των RhoA και RhoC μεταγράφων, υποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της RhoB πρωτεΐνης προυποθέτει υψηλή ρύθμιση της έκφρασής της (51). Πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν δείξει ότι η έκφραση της πρωτεΐνης RhoB, η οποία όπως προαναφέρθηκε, σε αντίθεση με τις άλλες Rho πρωτεΐνες έχει αντικαρκινική δράση, ρυθμίζεται αρνητικά από ογκογονίδια όπως H-Ras, N-Ras, K-Ras, EGFR και ErbB2 σε κύτταρα ινοβλαστών ΝΙΗ3Τ3 και καρκινικών σειρών πνεύμονα, πανγκρέατος και τραχήλου (62). Η δραστικότητα του υποκινητή της RhoB επάγεται από χημειοθεραπευτικές ενώσεις όπως η 5-Fluorouracil ενώ η υπερέκφραση του ογκογονιδίου Ras αναστρέφει την ενεργοποίηση αυτή (62). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της RhoB ενάντια στην καρκινογένεση και προτείνουν ένα μηχανισμό με τον οποίο ορισμένα ογκογονίδια ξεπερνούν την προστατευτική δράση της RhoB με το να αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου της.

Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της RhoB επάγεται γρήγορα (immediate-early gene) από τους αυξητικούς παράγοντες EGF και PDGF (52). Επίσης επάγεται από UV και άλλους γενοτοξικούς παράγοντες , η επαγωγή όμως αυτή είναι ανεξάρτητη των μονοπατιών των JNK, ERK και p38
ΜΑΡΚ κινασών αλλά μεσολαβείται από ένα ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT (CCAAT box) μέσω αλληλεπίδρασης ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην αλληλουχία αυτή και του ATF-2 παράγοντα (63). Τέλος, έχει δειχθεί ότι η ίδια η RhoB πρωτεΐνη καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της (negative autoregulation) (64). Στα πολύ πρόσφατα δεδομένα έρχεται να προστεθεί και η δυνητική μεταγραφική της ρύθμιση από το σηματοδοτικό μονοπάτι του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (TGFβ-1).

Πρώτες ενδείξεις για μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από μέλη της οικογενείας του TGFβ-1

Μια σειρά από πρόσφατες γονιδιωματικές αναλύσεις της δράσης του TGFβ-1 σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση ή η επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή έφερε στο φως μια σειρά από νέους δυνητικούς μεταγραφικούς στόχους του TGFβ-1 σηματοδοτικού μονοπατιού. Έναν από αυτούς τους νέους μεταγραφικούς στόχους του TGFβ-1 αποτελεί το γονίδιο της RhoB GTPασης. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι κατά την διαδικασία της επιθηλιακο-μεσεγχυματικής μετατροπής κερατινοκυττάρων (HaCaT) ή επιθηλιακών κυττάρων καρκίνου μαστού (NMuMG), το γονίδιο της RhoB πρωτεΐνης αρχίζει να επάγεται ισχυρά μετά από μια ώρα επίδρασης με TGFβ-1 και παραμένει ενεργοποιημένο για τουλάχιστον 24 ώρες (65-66). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στα κερατινοκύτταρα HaCaT τα οποία υφίστανται επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή από τον TGFβ-1, η αύξηση των επιπέδων του mRNA του RhoB γονιδίου απαιτεί την ενεργοποίηση της ERK/MAPK κινάσης (65). Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 βρέθηκε επίσης σε αποπτωτικά κύτταρα ηπατώματος Fao (67) καθώς επίσης και σε επιδερμικούς ινοβλάστες (68). Παράλληλα έχει διαπιστωθεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB από BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) σε νευρικά κύτταρα η οποία συντελεί στην αποκόλληση των νευρικών κυττάρων από το ραχιαίο νευρικό σωλήνα και στην επακόλουθη μετανάστευσή τους στην περιφέρεια (69).

Οι γονιδιωματικές αναλύσεις οι οποίες έδειξαν αύξηση των επιπέδων του mRNA του RhoB γονιδίου στα κερατινοκύτταρα HaCaT τα οποία

36

υφίστανται ΕΜΤ από τον TGFβ-1, θέτουν το ερώτημα για ενδεχόμενο ρόλο της RhoB στη διαδικασία αυτή. Πράγματι έχει δειχθεί ότι η RhoB καταστέλει τη μεταγραφή του TGFβ-1 υποδοχέα τύπου ΙΙ μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος περιλαμβάνει τον AP1 (activator protein 1) παράγοντα (*37*) γεγονός που εξηγεί εν μέρει τη μειωμένη έκφραση των υποδοχέων και ως συνέπεια την μειωμένη απόκριση στον TGFβ-1 που παρατηρείται σε κύτταρα τα οποία υφίστανται EMT (*70-72*).

Ο βιολογικός ρόλος του TGFβ

Ο Μετασχηματίζων Αυξητικός Παράγοντας β (TGFβ-1) αποτελεί το αντιπροσωπευτικό μέλος μιας οικογένειας πολυλειτουργικών κυτταροκινών η οποία επίσης περιλαμβάνει τις ακτιβίνες (activins) , τις BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) και τους παράγοντες αύξησης και διαφοροποίησης (GDFs). Οι κυτοκίνες της οικογενείας του TGFβ-1 ρυθμίζουν πολλαπλές πλευρές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων και παίζουν σημαντικούς ρόλους σε ποικίλες αναπτυξιακές και παθολογικές διαδικασίες (73-75). Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της φυσιολογίας του κυττάρου τόσο κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης όσο και κατά την ενήλικη ζωή και η απορύθμισή του συνδέεται με πληθώρα ασθενειών του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένων της ίνωσης και του καρκίνου (76).

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες, ο ρόλος του TGFβ-1 για τη προδιάθεση, ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου έχει υποστεί πολλές αλλαγές και αναθεωρήσεις. Ο TGFβ-1 αποτελεί δυνητικό καταστολέα της αιμοποιητικής και επιθηλιακής αύξησης των κυττάρων. Ωστόσο, σε κάποιο σημείο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου, η πλειοψηφία των μετασχηματισμένων κυττάρων γίνεται εν μέρει ή ολοκληρωτικά ανθεκτική στην καταστολή της ανάπτυξης από τον TGFβ-1 (70-72). Σε όψιμα στάδια του καρκίνου, το μονοπάτι του TGFβ-1 αποκτά προ-ογκογονικές ιδιότητες ευνοώντας την αγγειογένεση, τη παραγωγή εξωκυττάριας μάζας και τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Εικόνα 14).



Εικόνα 14 : Ο διττός ρόλος του TGFβ-1 στη καρκινογένεση (από αναφορά (77))

<u>Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Μετασχηματίζοντα Αυξητικού</u> <u>Παράγοντα β (TGFβ-1)</u>

Μετά από διέγερση με τον TGFβ-1, ο προσδέτης έρχεται σε επαφή με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα τύπου ΙΙ (TβRII) , δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα υποδοχέα-προσδέτη ο οποίος παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα τύπου Ι (TβRI/ALK5). Ως αποτελέσμα, σχηματίζεται ένα τετραμερικό σύμπλοκο στο οποίο ο υποδοχέας τύπου ΙΙ (κινάση τύπου ΙΙ) φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου Ι σε μια συντηρημένη και πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες περιοχή και τον ενεργοποιεί. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη τύπου Ι κινάση αναγνωρίζει και φωσφορυλιώνει μέλη του ενδοκυττάριου μονοπατιού σηματοδότησης. Πολλαπλά διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν βρεθεί να λαμβάνουν χώρα μετά από την ενεργοποίηση των TGFβ-1 υποδοχέων αλλά το πλέον γνωστό και καλά χαρακτηρισμένο είναι το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών (Εικόνα 15) (72, 78).



Εικόνα 15 : Το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1. Απεικονίζεται ο γενικός μηχανισμός ενεργοποίησης του TGFβ-1 υποδοχέα και των Smad πρωτεϊνών (από αναφορά (79)).

Στο σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνών Smad, η τύπου Ι κινάση προσδένει και φωσφορυλιώνει ένα συντηρημένο SSXS μοτίβο που εντοπίζεται στην MH2 περιοχή των R-Smad. Συγκεκριμένα, οι R-Smad στρατολογούνται κοντά στον υποδοχέα τύπου Ι μέσω πρωτεΐνες αλληλεπίδρασής τους με τη πρωτεΐνη SARA (Smad anchor for receptor activation). Η φωσφορυλίωση των R-Smad πρωτεϊνών από τον υποδοχέα πραγματοποιείται στο C άκρο των δυο καταλοίπων σερίνης που βρίσκονται πλησιέστερα στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Η φωσφορυλίωση αυτή έχει ως άμεση συνέπεια την αποσύνδεση της R-Smad από τον υποδοχέα, τη μείωση της συγγένειάς της με τη πρωτεΐνη SARA και την απόδεσμευσή τους από αυτήν, τη διάσπαση των ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ΜΗ1 και MH2 περιοχών τους, την αύξηση της συγγένειας με τη co-Smad, Smad4, το σχηματισμό ενός ετερομερούς συμπλόκου μεταξύ των R-Smad και της co-Smad, Smad4, το οποίο και σταθεροποιείται μέσω των φωσφορυλιωμένων σερινών στις R-Smads και την αποκάλυψη ενός σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS/nuclear localization signal) στις R-Smads (80-82). Η ακριβής στοιχειομετρία των συμπλόκων αυτών δεν έχει αναλυθεί λεπτομερειακά ακόμα αλλά η πλέον προτεινόμενη εκδοχή είναι να σχηματίζονται διμερή ή τριμερή (83-85). Τα σύμπλοκα αυτά μεταβαίνουν

γρήγορα στον πυρήνα και συμμετέχουν με θετικό ή αρνητικό τρόπο στη ρύθμιση της μεταγραφής πολλών γονιδίων στόχων μέσω δύο διαφορετικών προσεγγίσεων: α) μέσω άμεσης πρόσδεσής τους στους υποκινητές των γονιδίων-στόχων β) μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στο DNA. Έτσι, οι Smad δρουν είτε ως άμεσοι μεταγραφικοί παράγοντες, είτε ρυθμίζουν τη μεταγραφή μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, δρώντας ως συνενεργοποιητές ή συνκαταστολείς (*76, 80*),(*86-87*). Επομένως, η αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας αλλά και με μέλη της πυρηνικής μεταγραφικής μηχανής συντελεί στη διατήρηση της εξειδίκευσης της απόκρισης του κυττάρου και κατ'επέκταση του οργανισμού στον TGFβ-1 (*72-74*).

Τα γονίδια-στόχοι του Smad σηματοδοτικού μονοπατιού εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης, της παραγωγής εξωκυττάριας μάζας, της μεταγραφής ,στον έλεγχο της διαφοροποίησης και σε θηλειές αυτοκαταστολής (autoinhibitory loops) (88). Το πιο καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα θηλειάς αυτοκαταστολής (negative feedback loop) περιλαμβάνει την ανασταλτική Smad, Smad7, η οποία μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση των R-Smad από τον υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 και οδηγεί τον υποδοχέα σε ουμπικουτινίωση και αποικοδόμηση μέσω των λιγασών ουμπικουιτίνης Smurf1 και Smurf2, διασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό τη παύση του μονοπατιού(*76, 80, 89-90*).

Κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες Smad εκφράζονται καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και σε όλους τους ιστούς των ενηλίκων ατόμων, ενώ αρκετές από αυτές παράγονται μέσω εναλλακτικά ματισμένων mRNAs (*91-92*). Λειτουργικά, οι Smad πρωτεΐνες διακρίνονται σε 3 υποκατηγορίες (Εικόνα 17).

α) **R-Smads**, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης από τον TGFβ-1I υποδοχέα (Receptor-activated Smads). Σε αυτές ανήκουν οι Smad1, Smad2,Smad3, Smad5 και Smad8.

β) **Co-Smads**, (Common mediator Smads) οι οποίες σχηματίζουν ολιγομερή με τις R-Smads. Σε αυτές ανήκει η Smad4.

γ) **I-Smads** (inhibitory Smads) οι οποίες δρουν ανασταλτικά μέσω ανταγωνισμού με τις R-Smads ως προς την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα

αλλά και συμμετέχοντας στην πρωτεολυτική διάσπαση των υποδοχέων μέσω ουμικουτινίωσης. Σε αυτές ανήκουν οι Smad6 και Smad7.

Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών

Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο συντηρημένες περιοχές :

-Αμινοτελική περιοχή Mad ομολογίας 1 (N-terminal Mad homology 1) MH1

-Καρβοξυτελική περιοχή Mad ομολογίας 2 (C-terminal Mad homology 2) MH2

Οι δυο περιοχές αυτές διαχωρίζονται από μια άλλη πλούσια στα αμινοξέα προλίνη/τυροσίνη η οποία ονομάζεται περιοχή σύνδεσης (linker region) (Εικόνα 16) (73-75, 89).



Εικόνα 16 : Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών. Διαγραμματική απεικόνιση των δομών των τριών υποομάδων των Smad και παράθεση των πρωτεϊνών με τις οποίες έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν (89).

Η ΜΗ1 περιοχή εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης στις R-Smads και Co-Smad, σε αντίθεση με τις I-Smads οι οποίες έχουν πολύ μικρή ομοιότητα σε αυτή τη περιοχή και ρυθμίζει την είσοδο στον πυρήνα και τη μεταγραφή μέσω πρόσδεσης στο DNA αλλά και αλληλεπίδρασής τους με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες. Οι Smad3 και Smad4 προσδένονται απευθείας αλλά με μικρή συγγένεια στα SBEs (Smad-binding elements) τα οποία περιέχουν τη στοιχειώδη αλληλουχία 5'CAGAC3'. Αντιθέτως, η Smad2 δεν μπορεί να προσδεθεί στα SBEs λόγω ενός μοναδικού εξονίου που έχει προστεθεί και αναστέλλει την πρόσδεση στο DNA. Η MH1 περιοχή σχηματίζει μια συμπαγή σφαιρική δομή που αποτελείται από 4 α-έλικες, 6 β-πτυχωτές επιφάνειες και 5 θηλειές. Η πρόσδεση στο DNA πραγματοποιείται μέσω μιας δομής που αποτελείται από μια β φουρκέτα (β hairpin) η οποία έρχεται σε επαφή με την μεγάλη αύλακα του DNA (93).

Η MH2 περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη σε όλες τις Smad πρωτεΐνες. Η δομή της περιέχει α-έλικες και θηλειές οι οποίες περιβάλλονται από βπτυχωτά φύλλα (83, 85). Ρυθμίζει τον ολιγομερισμό των Smads, την αναγνώριση από τους υποδοχείς TGFβ-1 τύπου Ι και αλληλεπιδρά με τη αρκετούς πρωτεΐνη SARA. Jμ μεταγραφικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές όπως ο p300 και ο CBP αλλά και συνκαταστολείς π.χ Ski, SnoN και TGIF (84). Η Smad4 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των Smad συμπλόκων στο πυρήνα μέσω της SAD (Smad-activation domain) περιοχής την οποία διαθέτει αποκλειστικά και η οποία επιτρέπει ισχυρότερη σύνδεση με τους συνενεργοποιητές και προσφέρει ειδική διαμόρφωση στην MH2 περιοχή της Smad4 (94-95).

Smad-ανεξάρτητη σηματοδότηση του TGFβ-1

Ο TGFβ-1, εκτός του σηματοδοτικού μονοπατιού των πρωτεϊνών Smad, ενεργοποιεί και εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια κάποια από τα οποία ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, ενώ άλλα επάγουν αποκρίσεις που δεν σχετίζονται με την μεταγραφή. Συγκεκριμένα, ο TGFβ-1 μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια των ERK, JNK και p38 MAPK κινασών (Εικόνες 17 και 18). Η ενεργοποίηση αυτή σε κάποιες περιπτώσεις αποτελεί Smad εξαρτώμενη μεταγραφική απόκριση, άλλα όταν συμβαίνει ταχύτατα υποδηλώνει μηχανισμούς ανεξάρτητους της μεταγραφής.





Τα εναλλακτικά αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια συνεισφέρουν στις φυσιολογικές αποκρίσεις στον TGFβ-1 μέσω τριών μηχανισμών:

1) τροποποιούν άμεσα (πχ φωσφορυλίωση) τις πρωτεΐνες Smad ρυθμίζοντας με το τρόπο αυτό τη δράση τους. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση της ERK κινάσης από τον EGF υποδοχέα προκαλεί φωσφορυλίωση της MH1 περιοχής της Smad2 και της περιοχής του linker στις πρωτεΐνες Smad1, Smad2 και Smad3 και η φωσφορυλίωση αυτή εμποδίζει τη μεταφορά τους στον πυρήνα και επομένως τη δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες (*91-92*). Επίσης η έκφραση της Smad7, η οποία δρα ανασταλτικά στο Smad μονοπάτι, επάγεται από διαφορετικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων των TGFβ-1 και BMP μέσω Smad πρωτεϊνών αλλά και μέσω MAPK κινασών (εικόνα 17) (*96-97*).



Εικόνα 18 : Η ενεργοποίηση των R-Smad πρωτεϊνών μπορεί να ρυθμίζεται από διαφορετικά μονοπάτια (από αναφορά (72))

2) οι Smad πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα και τροποποιούν τη δράση άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα κινασών μεταφέροντας έτσι τα σήματα σε άλλα μονοπάτια

 οι υποδοχείς του TGFβ-1 αλληλεπιδρούν άμεσα ή φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες πέρα των Smad, ξεκινώντας με τον τρόπο αυτό παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συνεργάζονται ή ανταγωνίονται τη δράση του Smad μονοπατιού. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι ο υποδοχέας τύπου Ι του TGFβ-1 φωσφωρυλιώνει την πρωτεΐνη (adaptor) ShcA σε κατάλοιπα σερίνης αλλά και τυροσίνης με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του Ras-MAPK ERK1/2 μονοπατιού (98). Επίσης, βρέθηκε πρόσφατα ότι η πρωτεΐνη Par6 (polarity complex protein) αποτελεί εναλλακτικό υπόστρωμα του υποδοχέα τύπου ΙΙ του TGFβ-1, η φωσφορυλίωση της οποίας οδηγεί στη στρατολόγηση της λιγάσης ουμπικουιτίνης Smuf1. Η πρωτεΐνη Smurf1 στη συνέχεια καταλύει την ουμπικουτινίωση της RhoA GTΡάσης η επακόλουθη πρωτεολυτική της οποίας απαιτείται για την αναδιοργάνωση των αποικοδόμηση διακυτταρικών συνδέσμων των επιθηλιακών κυττάρων (76). Παράλληλα, οι υποδοχείς του TGFβ-1 ενεργοποιούν τη MAPK κινάση TAK1 η οποία κατόπιν ενεργοποιεί τις κινάσες ΜΕΚΚ4 και την p38 και επάγει με τον τρόπο αυτό την απόπτωση σε φυσιολογικά αλλά και καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 19) (76). Επίσης έχει βρεθεί ÓΤΙ 0 TGFβ-1 ίзιοπογανз γρήγορα τо RhoA/B/ROCK/LIMK2/cofilin μονοπάτι ρυθμίζοντας με τον τρόπο αυτό την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (99).

Η διττή ικανότητα του TGFβ να δρα μέσω του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών αλλά και μέσω των MAPK κινασών συντελεί στη διαδικασία της επιθηλιακο-μεσεγχυματικής μετατροπής η οποία εξαρτάται εν μέρει από τα μονοπάτια των ERK και/ή p38 MAPK κινασών. Παρόλο που σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται συνεργασία μεταξύ των TGFβ-1-επαγώμενων μονοπατιών, συχνά τα διαφορετικά μονοπάτια ανταγωνίζονται μεταξύ τους. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ άμεσης ενεργοποίησης των Smad και των MAPK μονοπατιών καθορίζει τις αποκρίσεις του κυττάρου στον TGFβ-1 (*100*).



Εικόνα 19 : Οι σηματοδοτικές πτυχές του TGFβ-1 μονοπατιού (από αναφορά (76))

<u>Προυποθέσεις για την επιτυχημένη διεξαγωγή του σήματος του</u> <u>TGFβ-1</u>

<u>Πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση των Smads και</u> ενδοκύτωση των υποδοχέων του TGFβ-1

Υπήρχε η αρχική θεωρία ότι οι Smad πρωτεΐνες εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρονται γρήγορα στον πυρήνα όπου και συσσωρεύονται μετά από την ενεργοποίηση από τον TGFβ-1 (80, 101-104). Ωστόσο, μέσα από ποικίλες μελέτες, δείχθηκε ότι οι Smad πρωτεΐνες μετακινούνται συνεχώς από και προς τον πυρήνα (80, 105). Η συνεχής αυτή μετακίνηση των Smad πρωτεΐνών ακόμα και σε κύυταρα στα οποία οι υποδοχείς είναι ενεργοί, υποδεικνύει ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 έχει αναπτύξει πολλούς μηχανισμούς παρακολούθησης της ενεργότητας των υποδοχέων. Έτσι, παρουσία μεγάλης ποσότητας συνδέτη, οι ίδιες Smad πρωτεΐνες μπορούν να επαναφωσφορυλιωθούν προκειμένου να διατηρήσουν την παρατεταμμένη σηματοδότηση, δεδομένου του περιορισμένου αριθμού Smad πρωτεΐνικών μορίων ανά κύτταρο. Με το πέρας της σηματοδότησης οι πρωτεΐνες Smad μπορούν ταχύτατα να επιστρέψουν στο κυτταρόπλασμα, σταματώντας άμεσα την μεταγραφή γονιδίων στόχων από την στιγμή που οι υποδοχείς σταματήσουν να ενεργοποιούνται (106).

Άλλη μια σημαντική προϋπόθεση για την επιτυχημένη μεταγωγή του σήματος του TGFβ-1 είναι η ενδοκύτωση των συμπλόκων υποδοχέων/Smad πρωτεϊνών μέσω δύο διαφορετικών μονοπατιών α) μέσω κυστιδίων κλαθρίνης και β) μέσω καβεολίων (caveolin-lipid rafts). Η ενδοκύτωση των υποδοχέων του TGFβ-1 η οποία πραγματοποιείται μέσω των κυστιδίων κλαθρίνης προωθεί τη σηματοδότηση μέσω TGFβ-1 καθώς τα ενδοσώματα (EEA1-positive) είναι εμπλουτισμένα σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα των R-Smad με τη SARA. Αντιθέτως, το ενδοκυτικό μονοπάτι το οποίο πραγματοποιείται μέσω lipid rafts περιέχει τους υποδοχείς οι οποίοι είναι προσδεδεμένοι με τα σύμπλοκα της ανασταλτικής Smad7 με τη λιγάση ουμπικουιτίνης Smurf2 και συμπλόκων των υποδοχέων του TGFβ-1 σε δυο διακριτά ενδοκυτικά διαμερίσματα ρυθμίζει τόσο την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Smad όσο και την αποικοδόμηση των υποδοχέων (Εικόνα 20) (*90*).



Ο ρόλος των RhoGTPασών στην ενδοκύτωση των υποδοχέων του <u>ΤGFβ-1 και στη μεταφορά των Smad πρωτεϊνών μέσω των</u> πυρηνικών πόρων

Εικόνα 20:

Τα διαφορετικά μονοπάτια

Τα μέλη της οικογενείας των Rab GTPασών αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της μεταφοράς κυστιδίων και κατανέμονται σε διαφορετικά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα. Η Rab5 είναι κύριος ρυθμιστής της ενδοκύτωσης και μέσω αλληλεπίδρασης με πολλαπλές πρωτεΐνες συμμετέχει στη σύντηξη και στη μετακίνηση των κυστιδίων (80, 107).

Πράγματι, η πρωτεΐνη RIN1 η οποία αποτελεί GEF της Rab5 GTPάσης, μέσω ενεργοποίησης της πρωτεΐνης Rab5, οδηγεί τους υποδοχείς του TGFβ-1 στο μονοπάτι ενδοκύτωσης κυστιδίων κλαθρίνης, το οποίο προωθεί τη σηματοδότηση μέσω των πρωτεϊνών Smad. Καταστολή του Rho GEF RIN1 μέσω της πρωτεΐνης SNAI1 η οποία επάγεται από το μονοπάτι του TGFβ-1, προκαλεί μείωση της σηματοδότησης μέσω των TGFβ-1 υποδοχέων δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό θηλειά αυτοκαταστολής (negative feedback loop). Οι υποδοχείς του TGFβ-1 ανακυκλώνονται μέσω ενδοκύτωσης η οποία εξαρτάται από τη GTPάση Rab11 (80, 90).

Η μετακίνηση των πρωτεϊνών Smad μέσω των πυρηνικών πόρων βασίζεται στην αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες ιμπορτίνες (importins) στο κυτταρόπλασμα και με επιπρόθετες αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες

νουκλεοπορίνες. Οι πρωτεΐνες Smad απελευθερώνονται στο νουκλεόπλασμα και οι ιμπορτίνες επιστρέφουν προς ανακύκλωση στο κυτταρόπλασμα. Οι πυρηνικές Smad πρωτεΐνες μέσω αλληλεπιδράσεων με τις εξπορτίνες (exportins) και την ενεργή Ran GTPάση (Ran-GTP) μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα πάλι μέσω αλληλεπιδράσεων με τις νουκλεοπορίνες. Το σύμπλοκο των πρωτεΐνών Smad–exportin–Ran–GTP το οποίο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα αποσπάται με τη δράση ενός GAP παράγοντα ο οποίος προκαλεί την υδρόλυση του GTP που φέρει η Ran GTPάση και με τον τρόπο αυτό απελευθερώνονται οι πρωτεΐνες Smad, οι εξπορτίνες και η Ran-GTP. Η κυτταροπλασματική Ran-GDP πρωτεΐνη διαχέεται μέσω των πυρηνικών πόρων όπου συναντά τον GEF παράγοντα RCC1 ο οποίος συμβάλει στην ανταλλαγή του GDP με GTP και στην αποκατάσταση της Ran-GTP πρωτεΐνης (*108-109*).

Οι πρωτέΐνες Rho ως διαμεσολαβητές στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ-1

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αποτελεί γρήγορη απόκριση του κυττάρου στα εξωτερικά ερεθίσματα (80, 110-115). Η σύνδεση των προσδετών (ligands) στους κατάλληλους υποδοχείς ενεργοποιεί σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία προκαλούν γρήγορες αλλά και μακροπρόσθεσμες αλλαγές στο πολυμερισμό της ακτίνης και στην οργάνωση των μικροϊνιδίων (80, 116-120).

Όπως έχει μελετηθεί στο παρελθόν, ο TGFβ-1 μπορεί να μεταβάλει την μορφολογία των κυττάρων και την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η δράση του TGFβ-1 οδηγεί σε σχηματισμό ενός πλήρως οργανωμένου δικτύου ινιδίων του στρες υποστρέφοντας με τον τρόπο αυτό τον καρκινικό φαινότυπο επιθηλιακών κυττάρων (121). Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάδοση του μηνύματος από τον TGFβ-1 στο κύτταρο είναι οι Rho, Rac1 αλλά και η Jun-N-terminal κινάση. Συγκεκριμένα, στους μετασχηματισμένους Η-Ras NIH3T3 ινοβλάστες η επίδραση του TGFβ-11 οδηγεί σε πολυμερισμό της ακτίνης και τη δημιουργία εκτεταμένου δικτύου ινιδίων του φαίνεται να συνδέεται με την αύξηση της

έκφρασης αλλά και την άμεση ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoB (99, 121).

Στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τις Rho πρωτεΐνες στους ινοβλάστες ποντικού Swiss3T3 και ρυθμίζει τις μεταβολές της οργάνωσης του κυτταροσκελετού συμμετέχουν οι πρωτεΐνες ROCK, LIMK2, και κοφιλίνη. Συγκεκριμένα η κινάση ROCK η οποία αποτελεί πρωτεΐνη τελεστή των RhoA, RhoB και RhoC GTPασών φωσφωρυλιώνει και ενεργοποιεί τη κινάση LIMK2 η οποία στη συνέχεια φωσφωρυλιώνει πρωτεΐνες όπως η κοφιλίνη η οποία δρα στον αποπολυμερισμό της ακτίνης. Η φωσφορυλίωση της κοφιλίνης συντελεί στην απενεργοποίησή της επιτρέποντας με τον τρόπο αυτό το πολυμερισμό της ακτίνης και τη δημιουργία των ινιδίων του στρες (99). Στα κύτταρα αυτά, ο TGFβ-1 επάγει τη διαφοροποίησή τους από ινοβλάστες σε μυο-ινοβλάστες γεγονός το οποίο αποδεικνύεται από την ενισχυμένη έκφραση της πρωτεΐνης α-SMA (α-Smooth Muscle Actin) και την επακόλουθη ενσωμάτωσή της σε κατασκευές μικροϊνιδίων (80, 122). Η μετατροπή των ινοβλαστών σε μυο-ινοβλάστες αποτελεί παθοφυσιολογικό γνώρισμα ποικίλων χρόνιων ασθενειών των πνευμόνων και του άσθματος (80, 123-125).

<u>Ο ρόλος των RhoGTΡασών στην TGFβ-1-επαγώμενη</u> <u>αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά την</u> διαδικασία της Επιθηλιο-Μεσεγχυματικής Μετατροπής (EMT) των <u>κυττάρων</u>

Οι πιο καλά μελετημένες αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης οι οποίες επάγονται από το μονοπάτι του TGFβ-1 συνιστούν τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, διαδικασία η οποία είναι γνωστή ως επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) (80).

Η ΕΜΤ χαρακτηρίζεται από την διάσπαση των επιθηλιακών διακυτταρικών συνδέσμων, την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, το σχηματισμό ινιδίων του στρες, την αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων, το μη εντοπισμό της πρωτεΐνης E-cadherin στους συνδέσμους και την αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης N-cadherin. Η ΕΜΤ έχει συσχετιστεί

τόσο με την ανάπτυξη και συγκεκριμένα με τις κινήσεις των εμβρυικών ιστών όσο και με τον καρκίνο και ειδικά με τη μετάσταση (Εικόνα 21) (*80, 126-127*).

Το γρηγορότερο γεγονός κατά την TGFβ-1-επαγώμενη EMT είναι η ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης η οποία συμβαίνει στα πρώτα πέντε λεπτά επίδρασης με TGFβ-1 και διατηρείται για σύντομο χρονικό διάστημα (15 λεπτά-3 ώρες) ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Η ενεργοποίηση της RhoA ακολουθείται από την ενεργοποίηση κινασών όπως η ROCK και λαμβάνει χώρα τόσο κάτω από φυσιολογικές όσο και κάτω από παθολογικές συνθήκες όπως για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη της καρδιάς σε έμβρυα κοτόπουλου, κατά την διαφοροποίηση των νευρικών κυττάρων σε μυϊκά ή σε ασθένειες όπως η ίνωση (tubulointerstitial fibrosis) και η ρετινοπάθεια (proliferative vitroretinopathy) (*80, 128-130*).



Εικόνα 21 : Μεσολαβητές και ενεργοποιητές της ΕΜΤ. Τα πρώτου σταδίου καρκινικά κύτταρα (πράσινα) διατηρούν τις ιδιότητες των επιθηλιακών κυττάρων παρόμοιες με αυτές του γειτονικού φυσιολογικού επιθηλίου (καφέ). Η ενεργοποίηση των κύριων ρυθμιστών της ΕΜΤ όπως οι παράγοντες Twist, Snail και SIP1 στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε δραματικές αλλαγές στο πρότυπο γονιδιακής έκφρασης και στη συμπεριφορά των κυττάρων. Οι παράγοντες Twist, Snail και SIP1 καταστέλουν την έκφραση του γονιδίου της E-cadherin μέσω ρυθμιστικών στοιχείων (E-boxes) στον υποκινητή του και επάγουν την έκφραση ενός ολόκληρου ΕΜΤ προγράμματος μεταγραφής (από αναφορά (*131*)).

Η ενεργοποίηση των RhoGTΡασών από τον TGFβ-1 μέσω Smadεξαρτώμενων και Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών

Η ενεργοποίηση των RhoGTPασών από τον TGFβ-1 μεσολαβείται τόσο μέσω των Smad πρωτεϊνών αλλά όσο και μέσω εναλλακτικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η χρήση ενός αναστολέα της ΜΑΡ κινάσης p38 αλλά και η υπερέκφραση μιας ανενεργής μεταλλαγμένης μορφής αυτής σε κύτταρα καρκίνου προστάτη εμπόδισε την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μετά από επίδραση με TGFβ-1 (80, 132). Επίσης, στα ίδια κύτταρα βρέθηκε ότι ο TGFβ-1επαγώμενος σχηματισμός ινιδίων του στρες απαιτεί τη παρουσία ενεργού μονοπατιού της ΡΙ3 κινάσης (80, 133). Παράλληλα, σε σύστημα διαφοροποίησης μυικών κυττάρων δείχθηκε ότι η αναστολή της ΜΑΡ κινάσης p38 μπλοκάρει την ενεργοποίηση του γονιδίου της α-SMA αλλά και άλλων γονιδίων της οικογενείας από τον TGFβ-1 (80, 134). Παρόλο που η ταχεία ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών ως απόκριση στον TGFβ-1 φαίνεται να προϋποθέτει τη συμμετοχή Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών, σε μερικές περιπτώσεις φαίνεται οι Smad πρωτεΐνες να παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο σε αυτή την ενεργοποίηση. Συγκεκριμένα, η χρήση μιας μορφής του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 η οποία φέρει μετάλλαξη στη περιοχή πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών έδειξε ότι η αλληλεπίδραση του υποδοχέα τύπου Ι με τις R-Smad πρωτεΐνες απαιτείται για την ενεργοποίηση των RhoGTPασών και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ-1 (80, 99, 135). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της ανασταλτικής Smad πρωτεΐνης , Smad7, η οποία μπλοκάρει το TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι, κατέστειλε την ενεργοποίηση των Rho GTPασών και τον πολυμερισμό της ακτίνης (80, 99, 136). Η παρατήρηση αυτή όμως έρχεται σε αντίθεση με μελέτη στην οποία βρέθηκε ότι η Smad7 πρωτεΐνη χρειάζεται για την ενεργοποίηση της Cdc42 GTPάσης και το σχηματισμό των ινιδίων της ακτίνης (133).

Η ικανότητα του μονοπατιού του TGFβ-1 να επηρεάζει τη γρήγορη αλλά και τη μακροπρόθεσμη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διάφορους τύπους κυττάρων (80, 99, 122, 132) ευνοεί το

ενδεχόμενο ύπαρξης, πέραν του μη-γενωμικού μηχανισμού ενεργοποίησης, ενός δεύτερου παράλληλου γενωμικού μηχανισμού ο οποίος ρυθμίζει τη μακροχρόνια δράση του TGFβ-1 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

<u>Επικοινωνία (Cross-talk) μεταξύ των μονοπατιών των Rho</u> <u>GTΡασών και του TGFβ-1</u>

Παράλληλα με τον εδραιωμένο θετικό ρόλο των RhoGTPασών στην αναδιοργάνωση της ακτίνης από τον TGFβ-1, μερικές από τις Rho πρωτεΐνες φαίνεται να παίζουν και αρνητικό ρόλο στο TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι όταν τα επίπεδα έκφρασης τους είναι υψηλά. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου RhoB πρωτεΐνης ανταγωνίζεται τη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός υποκινητή με θέσεις πρόσδεσης των Smad πρωτεΐνών ενώ η υπερέκφραση της επικρατούσας αρνητικής μορφής της RhoB πρωτεΐνης ενίσχυσε την ενεργοποίηση του (*80, 137*). Σε ένα διαφορετικό σύστημα, βρέθηκε ότι η εκτοπική έκφραση της RhoB πρωτεΐνης και όχι της RhoA, προκάλεσε τη μείωση της έκφρασης του γονιδίου του υποδοχέα τύπου ΙΙ του TGFβ-1 και ανταγωνίστηκε τις ιδιότητες του TGFβ-1 στον πολλαπλασιασμό κερατινοκυττάρων HaCaT του ανθρώπου και καρκινικών κυττάρων του παγκρέατος (*37, 80*)

Οι Rho πρωτεΐνες μπορούν να έχουν και θετικό ρυθμιστικό ρόλο στο TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι καθώς βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της επικρατούσας αρνητικής μορφής της RhoA GTPάσης σε νευρικά κύτταρα κατέστειλε τη φωσφορυλίωση από τον υποδοχέα τύπου Ι, την επακόλουθη πυρηνική μετατόπιση και την μεταγραφική ενεργότητα των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3 ενώ η χρήση της ενδοτοξίνης C3 η οποία μπλοκάρει και τις τρεις Rho πρωτεΐνες, προκάλεσε επίσης την εξασθένιση της μεταγραφικής δράσης των R-Smad πρωτεϊνών (*80, 138*).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Par6, η οποία είναι ρυθμιστής της πολικότητας των κυττάρων και του σχηματισμού των κυτταρικών συνδέσμων, αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του TGFβ-1 στα σημεία των συνδέσμων και η φωσφορυλίωσή της από τον υποδοχέα τύπου I ευνοεί την αλληλεπίδραση της με την E3 λιγάση ουμπικουιτίνης Smurf1. Η Smurf1 στρατολογεί την πρωτεΐνη RhoA, η ουμπικουιτινίωση της οποίας προκαλεί τη πρωτεολυτική της διάσπαση και τη καταστροφή των κυτταρικών συνδέσμων που αποτελεί χαρακτηριστικό της ΕΜΤ διαδικασίας (80, 139).

Τέλος, μια πρόσφατη μελέτη μικροσυστοιχιών miRNA τα οποία ρυθμίζονται θετικά ή αρνητικά από τον TGFβ-1 σε επιθηλιακά NMuMG κύτταρα ταυτοποίησε το mir-155 ως αυτό το οποίο ενεργοποιείται ισχυρότερα από τον TGFβ-1. Η καταστολή του mir-155 εμπόδισε την επαγώμενη από TGFβ-1-EMT και τη μετακίνηση των κυττάρων ενώ η εκτοπική του έκφραση κατέστειλε τη σύνθεση της RhoA. Δεδομένου ότι τα επίπεδα του mir-155 εμφανίζονται ιδιαίτερα αυξημένα στον καρκίνο του μαστού, οι νέες μελέτες υποδεικνύουν ότι στρατηγικές βασισμένες στα miRNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνων όπως του μαστού (80, 140).

Ερευνητικοί στόχοι διδακτορικής διατριβής

Οι στόχοι της παρούσης διδακτορικής διατριβής ήταν οι εξής :

1) Μελέτη του μηχανισμού της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από τον TGFβ-1. Ο στόχος ήταν η ταυτοποίηση των εμπλεκόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών του TGFβ-1 τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση αυτή και η ανίχνευση των μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB.

2) Διερεύνηση του ρόλου της μικρής GTPάσης RhoB σε μακροπρόθεσμες αποκρίσεις του κυττάρου στον TGFβ-1 όπως η επαγωγή της μετακίνησης των κυττάρων η οποία αποτελεί δείκτη μεταστατικότητας, το σταμάτημα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής των κυττάρων.

3) Μελέτη του ρόλου της RhoB σε μηχανισμό αυτοκαταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού TGFβ-1/Smad.

Ο απώτερος στόχος της συγκεκριμένης έρευνας ήταν αφ' ενός η σε βάθος κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων η οικογένεια των πλειοτροπικών κυτταροκινών του TGFβ-1 και ειδικότερα ο TGFβ-1 ελέγχει σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η μετάναστευση των κυττάρων, η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και αφ' ετέρου η δημιουργία εργαλείων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για την θεραπεία νοσημάτων που προκαλούνται από την απορύθμιση του μονοπατιού του TGFβ-1 όπως ο καρκίνος.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<u>Υλικά</u>

Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών

Τα ένζυμα περιορισμού, τα ρυθμιστικά τους διαλύματα και οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των πλασμιδίων, αγοράστηκαν από τις εταιρείες Gibco-BRL, New England Biolabs, Promega και Minotech. Τα δεόξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia ,Gibco-BRL και Promega ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια από το εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) και από την Invitrogen. Για την κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB και των μεταλλαγμένων μορφών αυτού χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pGL3basic της Promega. Η RNase Α και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma. Ο δείκτης μοριακού βάρους λ Bst E ΙΙ κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από τη New England Biolabs με το ένζυμο περιορισμού BstEII.

Οι πλασμιδιακές κατασκευές pcDNA RhoB V14 και pcDNA3-HARhoBN19, pcDNA 3.1 RhoA wt, pEXV RhoA V14 και pEXV-MycRhoAN19 είναι μια προσφορά του εργαστηρίου του κου Στουρνάρα.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων LB περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone και yeast extract της εταιρείας Difco. Η αγαρόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα χημικά των εταιρειών Merck και Sigma καθώς και άλλων εμπορικών πηγών. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Kit της εταιρείας Qiagen ενώ για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το Wizard SV gel & PCR cleanup system της εταιρείας Promega.

<u>Αδενοιοί</u>

Οι αδενοιοί ALK5ca, Smad3, Smad4 dominant negative και LacZ ήταν μια ευγενική προσφορά της Λ.Βαρδούλη από το εργαστήριο του καθ.Χ Στουρνάρα και το εργαστήριο του Δρ.Α.Μουστάκα. Ο ανασυνδυασμένος αδενοίος Ad-GFP είναι μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του καθ.Β.Ζαννή και της Κ.Σκούρτη-Σταθάκη από το εργαστήριο του Δρ.Δ.Καρδάση.

Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Το θρεπτικά υλικά Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), RPMI -1640 και OPTIMEM, το ένζυμο Trypsin – EDTA, τα αντιβιοτικά Πενικιλλίνη -Στρεπτομυκίνη αλλά και η Lipofectamine 2000 αγοράστηκαν από την Invitrogen/Life Technologies. Ο ορός Fetal Bovine Serum (FBS) αγοράστηκε από τη BioChrom.

<u>Απομόνωση RNA & RT-PCR</u>

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β1 (TGF-β1), που αποτελεί τον συνδέτη (ligand) των αντίστοιχων υποδοχέων TGF-βRI και TGF-βRII, αγοράστηκε από την εταιρεία R & D Systems. Ο αναστολέας της δράσης της MEK, U0126 αγοράστηκε από την εταιρεία Upstate biotechnology ενώ ο αναστολέας του ALK5 SB431542 ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του κ.Χ.Στουρνάρα. Οι αναστολείς της μεταγραφής και της μετάφρασης, ακτινομυκίνη D (actinomycin D) και κυκλοεξαμίδιο (cycloheximide) αλλά και ο αναστολέας δράσης της MEK PD98059 είναι μια ευγενική προσφορά του ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του εργαστηρίου του Δρ. Α.Ηλιόπουλου.

Το Trizol για την εξαγωγή του RNA όπως και το ένζυμο Super-Script RNAse H-reverse transcriptase αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen. Οι random primers και οι αναστολείς RNασών (RNAsin) που χρησιμοποήθηκαν για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης αγοράστηκαν από την εταιρεία Promega.

Ανοσοαποτύπωση, ανοσοφθορισμός και ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης

Τα scrambled ,Smad3, και RhoB siRNAs αγοράστηκαν από την Eurofins MWG Operon ενώ το p53 (catalogue no: D-003329-05-0010) siRNA αγοράστηκε από τη Dharmacon. Τα RhoA, RhoB (catalogue no: D-008395-03) και RhoC siRNAs, το anti-RhoC αντίσωμα αλλά και η C3 transferase ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου της καθ. Anne Ridley.

Τα αντισώματα anti-RhoA (SC-418), anti-RhoB (SC-180) και anti-Smad3 (SC-8332) της Santa Cruz, το anti-E-Cadherin αλλά και το MTT buffer ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του καθ. Χ.Στουρνάρα. Το αντίσωμα anti-myc 9E10 αγοράστηκε από την Sigma ενώ τα δευτερεύοντα αντισώματα anti-mouse (HRP) και anti-rabbit αλλά και το anti-actin από την εταιρεία Chemicon. Το αντίσωμα anti-HA αγοράστηκε από τη Roche ενώ τα αντισώματα, anti-Sp1(SC-14027), anti-NF-YA (SC-10779) αγοράστηκαν από τη Santa Cruz. Το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-NF-YA (#556359) το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα ανοσοφθορισμού αγοράστηκε από την BD Pharmingen. To anti-phospho Smad3 (C25A9) αντίσωμα αγοράστηκε από τη εταιρεία Cell Signaling. Тα αντισώματα που αναγνωρίζουν τηv φωσφορυλιωμένη αλλά και ολική πρωτεΐνη ERK1/2 είναι μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Δρ. Χ.Τσατσάνη. Το αντισώματα anti-tubulin ευγενική προσφορά του και anti-p53 είναι μια εργαστηρίου TOU Δρ.Α.Ηλιόπουλου. Τα αντισώματα Alexa Fluor 488 και Alexa Fluor 555 αγοράστηκαν από την Invitrogen/Life Technologies.

Τα σφαιρίδια G-Sepharose αγοράστηκαν από την εταιρεία General Electric Health Care ενώ τα μαγνητικά σφαιρίδια Dynabeads M-280 streptavidin από την Invitrogen/Life Technologies.

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκαν από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Για την αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) ανοσοαποτύπωσης (ECL-hyperfilm) της εταιρείας Pierce.

Δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal assay) και μέτρηση της δραστικότητας λουσιφεράσης (Luciferase assay)

Το Salmon Sperm το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη συμπλήρωση του συνολικού DNA στα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης των κυττάρων αγοράστηκε από τις εταιρείες New England Biolabs και Invitrogen/Life Technologies. Ο ο-νιτροφαινυλογαλακτοπυρανοζίτης (ONPG), που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma. Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega.

<u>Πειράματα επούλωσης πληγής (Oris[™] Cell Migration Assay)</u>

To Oris TM Cell Migration Assay kit (Platypus Technologies/AMS Biotechnology) και η χρώση VybrantTM CFDA SE Cell Tracer (Molecular probes) ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου της καθ.Anne Ridley.

<u>Μέθοδοι</u>

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)

Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% και 0,5% (παρασκευαστικό gel). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 150ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1-2 gr αγαρόζης. Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική για το DNA), και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα - φορέα της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 Volt, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel γίνεται στα 50 Volt.

<u>Απομόνωση τμημάτων DNA</u>

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) αλλά και τα ενθέματα (inserts), τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται παραπάνω, και οι ζώνες αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας (νυστέρι). Ακολούθως, οι ζώνες τοποθετούνται σε κολώνες Promega, οπότε ακολουθείται η προτεινόμενη από την κατασκευάστρια εταιρεία, πειραματική διαδικασία η οποία συνοψίζεται ως εξής :

Στο δείγμα προστίθενται αρχικά ίσος όγκος από το διάλυμα Membrane binding solution και τοποθετείται στους 55°C για 10 λεπτά μέχρι να λιώσουν τα κομμάτια αγαρόζης. Το δείγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε κολώνα των 2ml. Ακολουθεί επώαση για ένα λεπτό και κατόπιν φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 13.000 στροφές. Το υπερκείμενο αφαιρείται και στη κολώνα προστίθενται 700μl από το διάλυμα Wash solution (με αιθανόλη) και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό σε 13.000 στροφές. Το υγρό ακολουθεί απομακρύνεται και το δείγμα προστίθενται 500μl Wash solution και τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 13.000 στροφές). Το υγρό απομακρύνεται και το δείγμα τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση (1 λεπτό, 13.000 στροφές). Μετά η κολώνα τοποθετείται σε σωλήνα των 1.5ml και προστίθενται στο δείγμα 50μl (για περισσότερο συγκεντρωμένο DNA προτείνεται η χρήση 30μl nuclease free H₂O) H₂O στο κέντρο της κολώνας. Το δείγμα αφήνεται για 1 λεπτό και κατόπιν φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές. Ο τελικός όγκος στη περίπτωση των 30μl H₂O είναι 28μl.

<u>Αποφωσφορυλίωση DNA</u>

Στην περίπτωση που ένας πλασμιδιακός φορέας κόπηκε μόνο με ένα ένζυμο, προτού χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση συρραφής υποβλήθηκε σε αποφωσφορυλίωση των άκρων του. Για το λόγο αυτό στην αντίδραση της πέψης προστίθεται 1μl ενζύμου SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 30 λεπτά με 1 ώρα. Ακολούθησε καθαρισμός με το Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System της Promega ή κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε ddH₂O.

<u>Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη</u>

✓ Προσθήκη 2^{1/2} όγκων απόλυτης αιθανόλης και 1/10 του όγκου οξικό νάτριο
3Μ

- ✓ Επώαση Ο/Ν στους -20°C ή για 20 λεπτά στους -80°C
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 15 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου (RT)
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 500μl 75% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 13000rpm, 5 λεπτά, θερμοκρασία δωματίου (RT)
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Επαναδιάλυση σε ddH₂O

Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 15-20μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 20-30 ng για το φορέα και ,ανάλογα με τη σχέση μεγέθους φορέα/ενθέματος, περίσσεια DNA του ενθέματος. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.Η αντίδραση είχε διάρκεια ~16 ώρες (overnight) και έγινε στους 16°C ή στους 4 °C.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B, DH5a, BL21 της <u>E.coli (transformation)</u>

Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 100μl -200μl βακτηριακών κυττάρων DH10B (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells) και τα 15 μl ή 20 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή του πλασμιδίου που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν υφίσταται θερμικό σοκ στους 42⁰ C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 900 μΙ θρεπτικού LB (LB : 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1%NaCl). Το τρυβλίο Perti με θρεπτικό LB -άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλλίνη (100μg/ml) ή καναμυκίνη (100μg/ml) όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37⁰ C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Στη περίπτωση του πλασμιδίου απλώνονται τα 100-200ml καλλιέργειας στο τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Στη περίπτωση της αντίδρασης σύνδεσης το δείγμα φυγοκεντρείται σε 3000 στροφές για 4 λεπτά, αφαιρούνται ~800ml LB και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται στο θρεπτικό που μένει και κατόπιν απλώνεται στο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 16 - 18 ώρες (overnight).

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening)

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε βακτηριακό γύαλινο σωλήνα ο οποίος περιέχει 2 ml LB-ampicillin, για 16 -18 ώρες, στους 37⁰ C υπό συνεχή ανάδευση.

Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται 1ml το οποίο αφού περαστεί σε σωλήνα των 1.5ml, φυγοκεντρείται στις 13500 στροφές για 1 min, σε θερμοκρασία δωματίου και αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο με πιπέττα Pasteur υπό κενό, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 600μl διαλύματος λύσης (lysis buffer : 8% sucrose, 5% Triton-100x, 500mM EDTA pH8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5). Κατόπιν στα κύτταρα προστίθενται 20μl λυσοζύμης (10 mg/ml) και αφού αναδευτούν (vortex) αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί βρασμός για 90 δευτερόλεπτα και μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο. Το αποτέλεσμα της παραπάνω διαδικασίας είναι η παραμονή του πλασμιδιακού DNA σε διαλυτή μορφή, ενώ οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου είναι δυνατό να κατακρημνιστούν. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα 13500 στροφές απομακρύνεται με οδοντογλυφίδα, και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με 600 μl κρύας ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται στους -20⁰ C, τουλάχιστον για 20 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13500 στροφές

επί 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA κατακρημνίζεται ως ίζημα, ξεπλένεται με 1ml 75% αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 13500 στροφές επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το DNA επαναδιαλύεται σε 20-30 μl (ανάλογα με το μέγεθος της πελέτας) αποστειρωμένου νερού.

Αλκαλική λύση των βακτηρίων

Στις περιπτώσεις στις οποίες το DNA χρειάζεται να απομονωθεί σε καθαρότερη μορφή προκειμένου να χρησιμοποιηθεί είτε για αντίδραση αλληλούχισης (sequencing) είτε για παροδική επιμόλυνση κυττάρων (για τον έλεγχο της έκφρασης πλασμιδίων) ακολουθείται η αλκαλική λύση των βακτηρίων. Συγκεκριμένα :

Στην πελέτα προστίθενται 150μΙ διαλύματος P1 (QIAGEN) με 100 μg/ml
RNase A

- Επαναδιάλυση της πελέτας με πιπέτα
- Προσθήκη 150μΙ διαλύματος P2 (QIAGEN) και απότομη ανακίνηση
- Προσθήκη 150μΙ διαλύματος P3 (QIAGEN) και απότομη ανακίνηση
- ✓ Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρά σωληνάκια των 1,5ml
- Προσθήκη 2/3 του όγκου (300μl) ισοπροπανόλη και ανακίνηση
- Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13000rpm (max)
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 500μΙ 75% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13000rpm
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας
- ✓ Επαναδιάλυση σε ~30-35μl H₂O

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation)

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν κολώνες Qiagen (Qiagen- tip 500), βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας οι οποίες συνοπτικά είναι οι εξής :

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο, όπου έχει γίνει το striking ή ο μετασχηματισμός, με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε βακτηριακό γύαλινο σωλήνα ο οποίος περιέχει 2 ml LB-αμπικιλλίνη, για 5-6 ώρες, στους 37⁰ C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια η μικρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φλάσκα 200ml LB-αμπικιλίνη και επωάζεται για 16-18 ώρες στους 37°C. Η καλλιέργεια κατανέμεται σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στους 25° C στις 3500 στροφές.

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 4ml από το διάλυμα P1 (+RNase). Κατόπιν προστίθενται 4ml από το P2 διάλυμα, το δείγμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά προστίθενται 4ml από το διάλυμα P3. Το μείγμα μεταφέρεται στο πάγο για 15-20 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στους 4°C στις 3500 στροφές.Η κολώνα εξισσοροπείται με τη προσθήκη 4ml από το QBT διάλυμα. Το υπερκείμενο από τα δείγματα μεταφέρεται στη κολώνα και μετά ξεπλένεται με 2 φορές με 10ml από το QC διάλυμα. Κατόπιν, η κολώνα τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα των 15ml και προστίθενται 5ml από το QF (elution buffer). Το δείγμα, αφού γίνει προσθήκη 3.5ml ισοπροπανόλης, μοιράζεται ισότιμα σε σωλήνες των 1.5ml και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 13000 στροφές, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται στο ίζημα 1ml 70% αιθανόλη με ακόλουθη φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 13000 στροφές, Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE (10 mM Tris-HCI, 1mM EDTA pH 8). Η συγκέντρωση του μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm (UV) ενώ η ποιότητά του εκτιμάται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Υπολογισμός ποσότητας

 $5 \ \mu I \ RNA \ \sigma \epsilon \ 1mI \ H_2O$

[OD 260nm] x 10 = µg/µl

Κατασκευές πλασμιδίων και ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Πλασμίδια αναφοράς : Τα πλασμίδια αναφοράς (-1605/+86) RhoB-Luc και (-726/+86) RhoB-Luc που φέρουν περιοχές του υποκινητή του γονιδίου της RhoB δημιουργήθηκαν μέσω απομόνωσης των αντίστοιχων τμημάτων του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB από γενωμικό DNA με τη βοήθεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) .Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 μl, στα οποία περιέχονται 100ng από γενωμικό DNA, 50 pmol από κάθε εκκινητή (5μl από αραίωση 10pmol/μl) 5μl από 2 mM συγκέντρωση δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 1μl DMSO (στις περισσότερες περιπτώσεις), 1 U Vent πολυμεράσης και 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου. Στη περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση αντί της Vent στο συνολικό όγκο της αντίδρασης έγινε προσθήκη 3μl MgCl₂ 25mM. Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR περιγράφονται στον πίνακα 1.

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο :

- 1. 94⁰ C για 3 λεπτά
- 2. 94⁰ C για 1 λεπτό
- 3. 56⁰ C για 1 λεπτό
- 4. 72⁰ C για 2 λεπτά
- 5. 35 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
- 6. 72⁰ C για 5 λεπτά
- 7. 4⁰ C
- 8. Τέλος

Πίνακας 1 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τμήματων των RhoA και RhoB υποκινητών του ανθρώπου. Οι θέσεις περιορισμού είναι τονισμένες (bold). Στη περίπτωση της κατασκευής (-726/+86) RhoB-Luc η θέση περιορισμού της HindIII δεν βρίσκεται στον εκκινητή αλλά στη θέση -726 του PCR προιόντος.

Όνομα	Αλληλουχία
εκκινητή	
hRhoB-1605	5' GA AGATCT TTCCCATGCAATGGATAGACAGAGCCCAGC 3'
hRhoB -825	5' GGGATCAGAGTTCATAGTGAAAAGAG 3'

hRhoB+86	5' GA AGATCT CGGCCTAGCTCTCTCCCGGGTCTC 3'
hRhoB+19	5' GG AAGCTT TGCGGTGGCAGATGAGGGCTG 3'
hRhoA-799	5' GCG GGTACC AATGTGATGGGTGGACTGGT 3'
hRhoA+166	5'GCG AAGCTT ACCAGACCGTGGACTAACGA

Ακολούθησε πέψη των προιόντων PCR με τα ένζυμα Bglll(-1605/+86) ή HindIII (-726/+86)και κλωνοποίηση τους στον φορέα pGL3 basic (Promega) στις αντίστοιχες θέσεις περιορισμού. Το πλασμίδιο αναφοράς (-799/+166) RhoA-Luc κατασκευάστηκε μέσω απομόνωσης του αντίστοιχου τμήματος του υποκινητή του γονιδίου της RhoA μέσω πανομοιότυπης αντίδρασης PCR από γενωμικό DNA και κλωνοποίηση του στον φορέα pGl3 basic στις θέσεις των ενζύμων Kpnl καιHindIII.

Τα πλασμίδια αναφοράς (227/+86) και (-85/+86) RhoB-Luc τα οποία φέρουν ελλειματικές μορφές του υποκινητή του γονιδίου της RhoB κατασκευάστηκαν μέσω πέψης του πλασμιδίου (-726/+86) RhoB-Luc με τα ένζυμα Kpnl και Sacl αντίστοιχα και επακόλουθη επανασύνδεση των φορέων. Το πλασμίδιο (-726/+19) RhoB-Luc δημιουργήθηκε μέσω αντίδρασης PCR κατά την οποία απομονώθηκε το αντίστοιχο τμήμα του υποκινητή της RhoB από γενωμικό DNA και κλωνοποίηση του στο φορέα pGL3 basic στη θέση του περιοριστικού ενζύμου HindIII. Τα πλασμίδια αναφοράς (227/+19) και (-85/+19) RhoB-Luc τα οποία φέρουν ελλειματικές μορφές του υποκινητή του γονιδίου της RhoB κατασκευάστηκαν μέσω πέψης του πλασμιδίου (-726/+19) RhoB-Luc με τα ένζυμα Kpnl και Sacl αντίστοιχα και επακόλουθη επανασύνδεση των φορέων.

Οι κατασκευές (-726/-227) RhoB/adML-Luc and (-726/-85) RhoB/adML-Luc δημιουργήθηκαν με απομόνωση των αντίστοιχων τμημάτων DNA από το πλασμίδιο (-726/+86) RhoB-Luc με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων Kpnl και Sacl και κλωνοποίηση τους στο πλασμίδιο pGL3 adML το οποίο φέρει τη περιοχή -44/+1 του υποκινητή του αδενοϊού (Adevovirus Major Late Minimal Promoter). Η κατασκευή pGL3 adML ήταν μια ευγενική προσφορά της Βέτας Παπακώστα.

Το πλασμίδιο (-85/-54) RhoB/adML-Luc κατασκευάστηκε μέσω αντίδρασης σύνδεσης ενός δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου που αντιστοιχεί στη περιοχή -85/-54 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB στις θέσεις περιορισμού των ενζύμων Sacl και Xhol του pGL3 adML φορέα. Η κατασκευή (-53/-27) RhoB-Luc δημιουργήθηκε μέσω ένθεσης ενός δίκλωνου ολιγονουκλεοτιδίου που αντιστοιχεί στη περιοχή -53/-27 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB στον φορέα pGL3 basic στις θέσεις των ενζύμων Sacl-Xhol.

Δημιουργία δίκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων

5μg από το forward ολιγονουκλεοτιδίο 5μg από το reverse (συμπληρωματικό) ολιγονουκλεοτιδίο 2 μl NEB2 10x buffer ddH₂O μέχρι τα 20μl

✓ Επώαση στους 92°C για 2 λεπτά

- ✓ Σταδιακή ψύξη μέχρι τους 20°C περίπου
- ✓ Αποθήκευση στους -20°C

 ✓ Προσθήκη 1μΙ από το δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο στην αντίδραση σύνδεσης με τον φορέα

Το πλασμίδιο αναφοράς (-53/+19) RhoB-Luc κατασκευάστηκε μέσω πέψης του πλασμιδίου (-53/-27) RhoB-Luc με τα περιοριστικά ένζυμα Xhol και HindIII και επακόλουθη σύνδεση του κομμένου φορέα με δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στη περιοχή -27/+19 του υποκινητή της RhoB. Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν για τη κατασκευή των αντίστοιχων πλασμιδίων παρατίθεται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2 : Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη κλωνοποίηση των τμημάτων του υποκινητή του γονιδίου της RhoB

Όνομα	Αλληλουχία
ολιγονουκλεοτιδίου	
hRhoB -85/-54 F'	5' ATGAGCTCAGCCGGCTGGTTTCCCATTGGACG 3'
hRhoB -85/-54 R'	5'CGTCCAATGGGAAACCAGCCGGCTGAGCTCAT 3'
hRhoB -53/-27 F'	5' CTATATTAAGAAAGTGGCCGGACTCGAATTC 3'

hRhoB -53/-27 R'	5'TCGAGAATTCGAGTCCGGCCACTTTCTTAATATAGAGC
	Т3'
hRhoB -27/+19 F'	5'TCGAGTTTAAATAGCGGGCGCTAGGGCCGCAGCCCT
	CATCTGCCACCGCAGATATCA 3'
hRhoB -27/+19 R'	5'AGCTTGATATCTGCGGTGGCAGATGAGGGCTGCGG
	CCCTAGCGCCCGCTATTTAAAC 3'

Ο συνθετικός υποκινητής p(CAGA)₁₂ –E1B-luc προσφέρθηκε από τον Δρ. Μουστάκα A. (LICR-Upsalla, Sweden) ενώ Το πλασμίδιο αναφοράς (-2300/+8) p21-luc έχει περιγραφεί προηγουμένως (*141*).). Ο συνθετικός υποκινητής pG₅-E1B-luc, που πρειέχει 5 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 εκφράζεται από το πλασμίδιο pBXG1. Η αλληλουχία των ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για τις αντιδράσεις PCR περιγράφονται στο πίνακα Ι στο τέλος του παραρτήματος 'υλικά και μέθοδοι'.

Πλασμίδια έκφρασης : Τα πλασμίδια pcDNAlampSmad3myc, pcDNAlampSmad3Flag και pcDNAlampSmad4myc έχουν περιγραφεί προηγουμένως (*142*). Η κατασκευή pcDNA3-BioSmad3 ήταν μια ευγενική προσφορά της Βέτας Παπακώστα.

Οι φορείς έκφρασης της διπλά μεταλλαγμένης μορφής της στη περιοχή πρόσδεσης του DNA πρωτεΐνης Smad3 (pcDNA3-FlagSmad3 R74K/K81R), της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα ALK5 σε σύντηξη με τον επίτοπο HA αλλά και αγρίου τύπου μορφών των υποδοχέων τύπου Ι και II σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Δρ.Α.Μουστάκα (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden). Τα πλασμίδια έκφρασης των πρωτεϊνών NF-YA και NF-YB του ποντικού καθώς και της πρωτεΐνης NF-YC του αρουραίου προσφέρθηκαν από τον Dr. Roberto Mantovani (Department of Genetics and Biology of Microorganisms, University of Milano, Italy). Το cDNA της μεταλλαγμένης μορφής Smad3 R74K/K81R αλλά και το cDNA του NF-YA παράγοντα απομονώθηκαν με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων EcoRI και Xhol

(Smad3) και EcoRI και Notl (NF-YA) και κατόπιν κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα έκφρασης pcDNA3 σε σύντηξη με τον επίτοπο 6myc ο οποίος έχει κλωνοποιηθεί στις θέσεις BamHI και EcoRI (Εικόνα 22).

Τα cDNA που αντιστοιχούν στην αγρίου τύπου RhoA αλλά και στις δύο μεταλλαγμένες μορφές αυτής RhoAV14 (συστασιακά ενεργή) και RhoAN19 (dominant negative) απομονώθηκαν μετά από αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο DNA 1ng (10μl από αραίωση 10ng/μl) από κάθενα από τα πλασμίδια pcDNA 3.1 RhoA wt, pEXV RhoA V14 και pEXV-MycRhoAN19 αντίστοιχα και εκκινητές οι οποίοι περιγράφονται στον πίνακα 3. Ακολούθησε πέψη των προιόντων των PCR αντιδράσεων με το ένζυμο περιορισμού EcoRI και ένθεση τους στην αντίστοιχη περιοριστική θέση του φορέα pcDNA3-6myc (Εικόνα 22). Το ενδεχόμενο τοποθέτησης του ενθέματος με το σωστό προσανατολισμό επιβεβαιώθηκε με πέψη των δειγμάτων με το ένζυμο EcoRV (κόβει μες στο ένθεμα στη θέση 135) αλλά και με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος anti-myc.

Οι κατασκευές οι οποίες δημιουργήθηκαν είναι οι εξής :

pcDNA3-6mycRhoAwt pcDNA3-6mycRhoAV14 pcDNA3-6mycRhoAN19



Εικόνα 22 : Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3 στον οποίο κλωνοποιήθηκε αρχικά ο επίτοπος 6myc στις θέσεις BamHI και EcoRI και στη συνέχεια τα cDNA των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών των RhoA και RhoB πρωτεϊνών στη περιοριστική θέση EcoRI.

Το cDNA που αντιστοιχεί στην αγρίου τύπου RhoB απομονώθηκε μέσω αντίδρασης PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο cDNA από ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT και εκκινητές οι οποίοι περιγράφονται στον πίνακα Ι. Ακολούθησε πέψη του PCR προιόντος με το ένζυμο EcoRI και ένθεση του στην αντίστοιχη θέση του φορέα pcDNA3-6myc μετά από πέψη και αποφωσφορυλίωση του. Τα cDNA που αντιστοιχούν στις δύο μεταλλαγμένες μορφές της RhoB, RhoBV14 (συστασιακά ενεργή) και RhoBN19 (dominant negative) απομονώθηκαν μετά από αντίδραση PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία DNA τα πλασμίδια pcDNA RhoB V14 και pcDNA3-HARhoBN19 αντίστοιχα και εκκινητές οι οποίοι περιγράφονται στον πίνακα 3 και είναι πανομοιότυποι με τους που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση της αγρίου τύπου μορφής. Το ενδεχόμενο τοποθέτησης των ενθεμάτων με το σωστό προσανατολισμό επιβεβαιώθηκε με πέψη των δειγμάτων με τα ένζυμα Notl (κόβει μες στο ένθεμα στη θέση 208) και Xhol (κόβει μες στο ένθεμα στη θέση 465) αλλά και με ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του αντισώματος anti-myc. Οι κατασκευές οι οποίες δημιουργήθηκαν είναι οι εξής :

pcDNA3-6mycRhoBwt

pcDNA3-6mycRhoBV14

pcDNA3-6mycRhoBN19

Πίνακας 3 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών των πρωτεϊνών RhoA και RhoB και της αγρίου τύπου μορφής του NF-YA παράγοντα. Η κλωνοποίηση της πρωτεΐνης RhoA έγινε με τον sense εκκινητή της RhoB καθώς η αλληλουχία των δυο πρωτεϊνών στη περιοχή αυτή είναι σχεδόν πανομοιότυπη. Οι θέσεις περιορισμού είναι με τονισμένες (bold).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
hRhoBcDNA sense	5'GCG GAATTC ATGGCGGCCATCCGCAAG 3'
hRhoBcDNA antisense	5'GCG GAATTC TCATAGCACCTTGCAGCAGTT 3'
hRhoAcDNA antisense	5' GCG GAATTC TCACAAGACAAGGCACCCAGA 3'
hNF-YA sense	5' GCG <u>GAATTC</u> ATGGAGCAGTATACGACAAAC 3'
hNF-YA antisense	5' <u>GCGGCCGC</u> TTAGGAAACTCGGATGATCTG 3'

Για την κλωνοποίηση της RhoB πρωτεΐνης έτσι ώστε να μπορεί να βιοτινυλιωθεί *in vivo* χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3amp (Εικόνα 22) στον οποίο είχε εντεθεί το 22 αμινοξέων πεπτίδιο Bio (ευγενική

προσφορά Βέτας Παπακώστα) και είχε υποστεί πέψη με τον περιοριστικό ένζυμο EcoRI. Με το ίδιο ένζυμο απομονώθηκε το cDNA της αγρίου τύπου μορφής από το φορέα pcDNA3amp6myc και κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pcDNA3ampBio.

Τα πλασμίδια βακτηριακής έκφρασης pGEX4T1-RhoBwt και pGEX4T1-RhoBV14 κατασκευάστηκαν μέσω πέψης των πλασμιδίων pcDNA3-6mycRhoBwt και pcDNA3-6mycRhoBV14 με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και κατόπιν κλωνοποίηση τους στην αντιστοίχη θέση του φορέα pGEX4T1 ο οποίος φέρει τον επίτοπο GST. Οι κατασκευές οι οποίες δημιουργήθηκαν είναι οι εξής : GST-RhoBwt και GST-RhoBV14

Κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών : Το cDNA της επικρατούσας αρνητικής μορφής της πρωτεΐνης RhoB, RhoBN19, αλλά και τα cDNA που αντιστοιχούν στην αγρίου τύπου (project rotation Κάλλιας Τζαβλάκη) και στη επικρατούσα αρνητική μορφή της πρωτεΐνης RhoA μαζί με τον επίτοπο 6myc κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις των περιοριστικών ενζύμων Kpnl και Xbal του φορέα pAdTrackCMV μετά από πέψη των πλασμιδίων που φέρουν τα αντίστοιχα cDNA σε σύντηξη με τον επίτοπο 6myc τα οποία περιγράφηκαν ανασυνδυασμένοι αδενοιοί κατασκευάστηκαν παραπάνω. Oı όπως περιγράφεται (Εικόνα 23) στην αναφορά (143) με τη χρήση του συστήματος Ad-Easy-1 όπου η κατασκευή του αδενοϊού πραγματοποιείται σε βακτηριακά κύτταρα BJ-5183 και στη συνέχεια επιμολύνει κύτταρα 911 ή HEK293T μέσα στα οποία επιτυγχάνεται το πακετάρισμα του αδενοιού. Αναλυτικά η διαδικασία κατασκευής των ανασυνδυασμένων αδενοϊών διακρίνεται σε 4 στάδια :

Α) Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA

- Το γονίδιο κλωνοποιείται αρχικά στο φορέα pAd-Track
- Το πλασμίδιο υποβάλλεται σε πέψη με το ένζυμο Pmel
- Απομόνωση του DNA από πηκτή αγαρόζης

✓ Το κομμένο DNA χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό των κυττάρων
E.coli BJ5183-AD1 τα οποία είναι ήδη μετασχηματισμένα με το πλασμίδιο pAdEasy
Όλη η ποσότητα των βακτηριακών κυττάρων από το μετασχηματισμό απλώνεται σε πιάτο καναμυκίνης

Απομονώνεται το DNA ορισμένων αποικιών σε μικρή κλίμακα

✓ Η επιλογή των θετικών κλώνων γίνεται με πέψη με το ένζυμο Pacl

Η χαμηλή ζώνη που προκύπτει από την πέψη μπορεί να είναι 3kb ή 4,5kb ανάλογα με τον ανασυνδυασμό. Και οι δύο περιπτώσεις είναι σωστές.

Ένας από τους θετικούς κλώνους επιλέγεται και μετασχηματίζεται στα
 DH10β τα οποία δεν έχουν ικανότητα ανασυνδυασμού

 Όλη η ποσότητα των βακτηριακών κυττάρων από το μετασχηματισμό απλώνεται σε πιάτο καναμυκίνης

 Μία αποικία βακτηρίων επιλέγεται και ακολουθεί απομόνωση DNA σε μεγάλη κλίμακα

✓

B) Διαμόλυνση κυττάρων 911 με το ανασυνδυασμένο DNA

 Ορισμένη ποσότητα από το ανασυνδυασμένο DNA υποβάλλεται σε πέψη με το ένζυμο Pacl

✓ Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη

✓ Επαναδιάλυση της πελέτας του DNA σε H₂O

-1,5x10⁶ κύτταρα 911 τοποθετούνται σε τρυβλίο p100 με DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% P/S

- 4,5 μg DNA αραιώνονται σε τελικό 50 μl με H₂O

- ετοιμάζονται 2 σωληνάκια:

A: 50 µl DNA + 450 µl Optimem

B: 20 µl Lipofectamine + 480 µl Optimem

Το περιεχόμενο του Α προστίθεται στο Β

✓ Ανάμιξη με πιπέτα και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

Αφαίρεση του θρεπτικού από το τριβλίο και αντικατάσταση με DMEM
 εμπλουτισμένο με 2% Heat Inactivated Horse Serum (HS) χωρίς αντιβιοτικό

 Το μίγμα προστίθεται στα κύτταρα μετά το τέλος των 20 λεπτών και επωάζονται Ο/Ν

✓ Αντικατάσταση του θρεπτικού με φρέσκο DMEM με 2% HS, 1% P/S

✓ 48 ώρες αργότερα επιβεβαιώνεται η έκφραση του ιού στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού



✓ Τα κύτταρα επωάζονται μέχρι να λυθούν, μετά από 10-14 ημέρες περίπου

Εικόνα 23 : Σχηματική απεικόνιση του συστήματος AdEasy. Το επιθυμητό γονίδιο κλωνοποιείται αρχικά στο φορέα pAdTrackCMV και στη συνέχεια αφού το πλασμίδιο γίνει γραμμικό με τη χρήση του ενζύμου Pmel, πραγματοποείται ο ανασυνδυασμός του με το πλασμίδιο pAdEasy το οποίο βρίσκεται στα βακτηριακά κύτταρα BJ-5183 και φέρει το γονιδιακό σκελετό του αδενοϊού. Το ανασυνδυασμένο γραμμικό (μέσω Pacl) πλασμίδιο επιμολύνει κύτταρα 911 ή HEK293T μέσα στα οποία λαμβάνει χώρα το πακετάρισμα του αδενοϊού. Οι ανασυνδυασμένοι αδενοιοί δημιουργούνται συνήθως σε 7-10 μέρες (από αναφορά (143).

Γ) Πολλαπλασιασμός του αδενοϊού

✓ Τα λυμμένα κύτταρα από το τρυβλίο p100 συλλέγονται και χρησιμοποιούνται για τη μόλυνση κυττάρων 911 σε φλάσκα T175 με DMEM με 2% HS, 1% P/S

✓ Τα κύτταρα λύνονται μετά από 2 ημέρες περίπου και μέρος αυτών χρησιμοποιείται για τη μόλυνση 4-5 φλασκών T175 με κύτταρα 911 σε DMEM με 2% HS, 1% P/S

- Τα κύτταρα συλλέγονται πριν λυθούν περίπου 1-2 ημέρες μετά τη μόλυνση
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 1000rpm, 10 λεπτά, 4°C
- Αφαίρεση του θρεπτικού και επαναδιάλυση σε 1ml θρεπτικού
- ✓ Τοποθέτηση στους -80°C
- ✓ Ξεπάγωμα στους 37 °C, vortex
- Επανάληψη παγώματος-ξεπαγώματος 2 φορές
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 3500rpm, 10 λεπτά, 4°C
- ✓ Το υπερκείμενο μοιράζεται σε σωληνάκια και αποθηκεύεται στους -80°C

Δ) Τιτλοδότηση του αδενοϊού

Αρχικά, τα τρυβλία διαμέτρου 35mm (με πλέγμα-grid) τα οποία χρησιμοποιούνται για το πείραμα τιτλοδότησης των αδενοϊών καλύπτονται με 1ml κολλαγόνου συγκέντρωσης 25μg/ml (σε PBS, φυλάσσεται στους 4°C) για 30 λεπτά. Η αρχική αραίωση (stock solution) του διαλύματος κολλαγόνου αποτελείται από 1mg/ml κολλαγόνο σε 0.5M οξικό οξύ και φυλάσσεται στους - 20°C. Το κολλαγόνο αφαιρείται στη συνέχεια από τα τρυβλία και φυλάσσεται ώστε να επαναχρησιμοποιηθεί, ενώ τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για περίπου 30 λεπτά σε στείρες συνθήκες (hood).

Τα κύτταρα 911 από μια φλάσκα διαμέτρου 75mm αραιώνονται σε 10ml θρεπτικό με 10% FBS και μοιράζονται στα τρυβλία με το κολλαγόνο (1ml/τρυβλίο). Ακολουθεί overnight επώαση των κυττάρων στους 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂. Την επόμενη μέρα δημιουργούνται διαδοχικές αραιώσεις κλίμακας 10^2 - 10^8 για κάθε αδενοϊο. Η μόλυνση των κυττάρων πραγματοποιείται με 1ml από τις αραιώσεις 10^5 , 10^6 , 10^7 . Συγκεκριμένα, ετοιμάζονται 1100μl από κάθε αραίωση εκτός από την 10^2 για την οποία αρκούν 500μl. Αφού κατανεμηθούν ομοιόμορφα οι αραιώσεις των αδενοϊών τα τρυβλία επωάζονται στους 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂ για 2 ώρες προκειμένου να επιτευχθεί η μόλυνση των κυττάρων. Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό που περιέχει τον ιό, στα τρυβλία προστίθεται 1ml θρεπτικού το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται και κατόπιν προστίθενται 2ml θρεπτικού/τρυβλίο. Τα κύτταρα επωάζονται στους 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂ για 48 ώρες.

Στη συνέχεια αφαιρείται το θρεπτικό από τα τρυβλία, προστίθεται PBS το οποίο επίσης αφαιρείται και τα τρυβλία αφήνονται να στεγνώσουν για 15-20 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 1ml 4% Paraformaldehyde (PFA) προσεκτικά σε κάθε τρυβλίο για 2 λεπτά προκειμένου να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Κατόπιν, τα τρυβλία εκπλένονται με τη προσθήκη 1ml PBS. Στη περίπτωση που οι ανασυνδυασμένοι αδενοιοί φέρουν στη κατασκευή τους και φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (green fluorescent protein) (όπως για παράδειγμα οι αδενοιοί οι οποίο περιγράφονται στις σελ.52-53) τα πράσινα κύτταρα (σε PBS) μπορούν στο σημείο αυτό να μετρηθούν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού. Στη περίπτωση όμως στην οποία οι αδενοιοί δε φέρουν GFP, η διαδικασία τιτλοδότησης συνεχίζει ως εξής : Μετά από έκλυση των κυττάρων με 1ml PBS-Tween20 0,05%, προστίθενται σε κάθε τρυβλίο 650μl του αντισώματος Ad hexon 5 (αραίωση 500x PBS σε то οποίο επαναχρησιμοποιείται) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς ανακίνηση). Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκπλένονται 2x με 1ml PBS και 1x με 1ml PBS-Tween20 0,05%. Κατόπιν προστίθενται 650μl (ή αρκετή ποσότητα για να καλύψει την επιφάνεια του τρυβλίου) αντίσωμα rabbit anti-mouse-FITC (1:100 ή 1:50 αραίωση) ή anti-mouse Alexa Fluor (1:500 αραίωση) για 1 ώρασε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανακίνηση αλλά σε σκοτάδι. Σε αυτό το σημείο και αφού τα τρυβλία εκπλυθούν 1-2x με PBS και παραμείνουν σε PBS τα πράσινα κύτταρα μπορούν να μετρηθούν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού.

Υπολογισμός FFU/ml : Μετρώνται τα πράσινα κύτταρα όσο δυνατόν περισσότερων τετραγώνων του τρυβλίου και βγαίνει ο μέσος όρος αυτών. Το κάθε τρυβλίο διαμέτρου 35mm αποτελείται από 200 τετράγωνα. Κάθε τετράγωνο έχει επιφάνεια 0,04cm² επομένως η συνολική επιφάνεια του τρυβλίου είναι 8cm².

Παράδειγμα : Στη περίπτωση που σε ένα τρυβλίο τοποθετήθηκε 1ml της 10⁶ αραίωσης του αδενοϊού και μετρήθηκαν 8 πράσινα κύτταρα/0,04cm² ο τίτλος του αδενοϊού αντιστοιχεί σε 1,6 x 10⁹ FFU/ml (8 πράσινα κύτταρα x 200 τετράγωνα x 10⁶).

Άρα FFU/ml = αριθμός (μέσος όρος) πράσινων κυττάρων x 200 x αραίωση του αδενοϊού Οι ανασυνδυασμένοι αδενοιοί οι οποίοι κατασκευάστηκαν και είναι λειτουργικοί τόσο σε επίπεδο μόλυνσης των κυττάρων αλλά και σε έκφρασης της επιθυμητής πρωτεΐνης είναι οι εξής : ad-GFP6mycRhoAwt

ad-GFP6mvcRhoAN19

ad-GFP6mycRhoBN19

<u>Κυτταροκαλλιέργειες</u>

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές ΗαCaT (ανθρώπινα κερατικοκύτταρα), Swiss3T3 (ινοβλάστες ποντικού), HepG2 (κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος), ΗΕΚ293Τ (νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου), (κύτταρα ανθρώπινου ρετινοβλαστώματος 911 μετασχηματισμένα με πλασμίδιο που φέρει τμήμα του γονιδιώματος του αδενοϊού 5), JEG-3 (Smad3-/-) (κύτταρα χοριοκαρκινώματος), DU145 και PC3 (καρκινικά κύτταρα προστάτη). Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm² και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα 37 C^0 και σε συνθήκες 5% CO_2 . Αποθέματα καλλιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80° C σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48 - 72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραίωση στις φλάσκες 1 : 10).

Μόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς

Στα πειράματα όπου έγινε χρήση των αδενοϊών στα κύτταρα HaCaT, DU145 και PC3, το θρεπτικό δύο ώρες περίπου πριν τη μόλυνση αντικαταστήθηκε με DMEM ή RPMI με 2% HS (ή FBS/FCS) , 1% P/S αντίστοιχα. Οι αδενοϊοί προστέθηκαν στα κύτταρα σε MOI (multiplicity of infection) 80-100 και ακολούθησε επώαση overnight. Κατόπιν το θρεπτικό αντικαταστήθηκε και πάλι με το επιθυμητό για το συγκεκριμένο πείραμα και ακολούθησε (ή όχι) επίδραση με TGFβ-1.

Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)

Οι παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης Ca₃(PO₄)₂ με τα εκάστοτε κατάλληλα πλασμίδια. Τα HEK293T κύτταρα αραιώνονται σε 2.5x10⁵ κύτταρα ανά well και σε 5x10⁵ κύτταρα ανά τρυβλίο p60, ενώ τα HepG2 σε διπλάσιες ποσότητες αντίστοιχα, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίων αναφοράς και έκφρασης ή/και DNA συμπλήρωσης (Salmon Sperm DNA), 2 μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31μl CaCl₂ 2M και 195 μl ddH₂O (H₂O for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 12 μg.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-100 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης, Western blotting) το μείγμα περιέχει μέχρι 17 μg πλασμιδίου έκφρασης, 31μl CaCl₂ 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl.

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο Hepes Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mMHepes pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄7H₂O, 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells.

Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες.

Η παροδική επιμόλυνση κυττάρων HaCaT, DU145 και PC3 με siRNAs (σε συγκέντρωση 100-200pmole/well σε τρυβλίο 6-well) έγινε με τη χρησιμοποίηση της Lipofectamine 2000 σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen/LifeTechnologies. Στη περίπτωση επιμόλυνσης κυττάρων HaCaT με το siRNA έναντι στη πρωτεΐνη Smad3 ή στη p53 πραγματοποιήθηκε διπλή επιμόλυνση (η δεύτερη περίπου 24 ώρες μετά τη πρώτη) σε συγκέντρωση 200pmole/well (Smad3) και 150pmole/well (p53). Τα κύτταρα DU145 και PC3 επιμολύνονται παροδικά με siRNAs μέσω reverse transfection δηλαδή το μείγμα της Lipofectamine 2000 και των siRNAs προστίθεται σε κύτταρα τα οποία μόλις έχουν αραιωθεί (split) και βρίσκονται σε διάλυμα.

Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για τον σκοπό αυτό το μείγμα συγκατακρήμνισης (βλ. παραπάνω) περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal).

Αφού προηγηθεί έκπλυση των κυττάρων με 1ml PBS, προστίθεται κατάλληλος όγκος (200μl για τα HepG2) 1x Cell Culture Lysis Buffer (Promega) και τα τρυβλία ανακινούνται για 10-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με ξύστρο και τα δείγματα μετά από ανάδευση, τοποθετούνται στους -80⁰C για ~15 λεπτά και κατόπιν στους 37^{0} C μέχρι να ξεπαγώσουν (~2 λεπτά). Τα δείγματα υφίστανται φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 13000 στροφές και σε θερμοκρασία δωματίου. Σε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456 μl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3), 132 μl ONPG (8 mg/ml σε 0.1 M Sodium Phosphate buffer), και 6 μl 100x salt (3M KCl, 1M MgCl₂, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd H₂O,

τελικός όγκος 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο 37⁰C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200 μl διαλύματος Na₂CO₃ 1 M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον υποκινητή του πλασμιδίου αναφοράς, ως αποτέλεσμα της επιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης. Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστικότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly) και που, επίσης, εκφράζεται στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 40μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 60μl υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε

Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Η συλλογή των κυττάρων τα οποία είτε επωάσθηκαν με TGFβ-1 παρουσία ή μη αναστολέων είτε επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης πραγματοποιείται με την εξής διαδικασία : Γίνεται έκπλυση των κυττάρων με παγωμένο PBS διάλυμα και στη συνέχεια αφού προστεθεί 1ml PBS, αποκόλληση αυτών με ξύστρο Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C, αναρρόφηση και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος λύσης CO-IP (20 mM Tris-HCI pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, παρουσία αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα δείγματα αφήνονται να ανακινούνται για 30 λεπτά στους 4°C και κατόπιν φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 5 λεπτά, στους 4°C.

Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford-Lowry

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε πιάτου σε πειράματα μέτρησης της επίδρασης των αδενοϊών στα προς μελέτη γονίδια . Αρχικά γίνεται αραιώση κάθε δείγματος σε αποστειρωμένο νερό με αναλογία 1:10 και χρησιμοποίηση 10μl από το αραιωμένο δείγμα στην αντίδραση. Από κάθε πιάτο φτιάχνονται τουλάχιστον δύο δείγματα προκειμένου να ληφθεί υπόψην η τιμή του μέσου όρου. Σε πλαστικό σωλήνα των 1.5ml τοποθετούνται 190μl H₂0, 10μl από την αραιώση 100μl από το αντιδραστήριο A' (1ml A +20μl S) του kit της Biorad και τέλος 800μl από το αντιδραστήριο (reagent) Β. Το δείγμα αναδεύεται ελαφρώς και επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.Το τυφλό αποτελείται από το μείγμα των αντιδραστηρίων με τη διαφορά ότι στη θέση του κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιείται το διάλυμα στο οποίο έχουν λυθεί τα κύτταρα (Lysis Buffer). Η φωτομέτρηση γίνεται στις πλαστικές κυβέτες, στα 750nm ορατού φάσματος.

Οι τιμές υπολογίζονται με βάση την πρότυπη καμπύλη της BSA:

y = α + β x y=OD (τιμή φωτομέτρησης) x=µgr πρωτεΐνης

α=0.02348 β=0.00745

Μέσω της παραπάνω εξίσωσης υπολογίζεται η μέση τιμή του x για κάθε δείγμα. Η μεγαλύτερη τιμή από όλα τα δείγματα θεωρείται ως μονάδα και διαιρείται με τις υπόλοιπες με αποτέλεσμα την εξαγωγή συντελεστών βάσει των οποίων πρόκειται να υπολογιστούν τα κατάλληλα μl από κάθε δείγμα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και κατ' επέκταση ανοσοαποτύπωση (Western Blotting).

Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης-Ανοσοαποτύπωση

(Western Blot)

Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το 4X SDS Loading Buffer [2.5 ml Tris-HCl, 1.6 ml β-mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue]. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 8.5%, 10.5% ή 12.5% [Stacking gel: ddH₂O 1.8 ml, 30% acrylamide 0.45 ml, stacking buffer (Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8) 0.75 ml, 10% APS 30 μl, TEMED 3 μl. Running gel: ddH₂O 2.3/1.8/1.6 ml, 30% acrylamide 1.4/1.8/2.1 ml, running buffer (Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8) 1.25 ml, 10% APS 80 μl, TEMED 4 μl]. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 grTris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 200 Volt και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης με 1000 ml Transfer Buffer [700 ml H2O, 100 ml 10x TGS, 200 ml methanol].

Ακολουθεί σε ορισμένες περιπτώσεις χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Poinceau, έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20] [1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με εκπλύσεις Jμ διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20] για 30 λεπτά με 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 1 ώρα με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, αραιωμένο 1: 10000 σε TBS-T, δευτερεύον αντίσωμα HRP, γίνεται και πάλι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε ECL-hyperfilm ή σε Fuji medical X-Ray film (Super RX) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer : 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH

6.7) και επώαση στους 50⁰ C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις και επωάσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Καθαρισμός πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST, από κύτταρα E.coli.

Μετά τον μετασχηματισμό κυτταρών DH10B της E.coli με το πλασμίδιο έκφρασης της GST πρωτεΐνης, επιμολύνονται, με μία μόνο αποικία, 25 ml καλλιέργειας LB/ampicillin. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37^{0} C overnight, και την επόμενη μέρα μεταφέρεται σε καλλιέργεια 200 ml LB/ampicillin. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD), που μετράται στα 600 nm, να φτάσει στο 0.6-0.8. Κατόπιν προστίθεται ο παράγοντας επαγωγής της πρωτεϊνικής έκφρασης IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM, και η καλλιέργεια επωάζεται κατά προτίμηση στους 30⁰ C - ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης - για 4-5 ώρες ακόμα. Στη συνέχεια, η φλάσκα με την καλλιέργεια παγώνεται για 5 λεπτά στους 4⁰ C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰ C, και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 8 ml παγωμένου PBS. Το εναιώρημα υφίσταται sonication 6 φορές επί 15 δευτερόλεπτα, με ενδιάμεσα διαλλείματα των 30 δευτερολέπτων, μέχρι να καταστεί διαυγές, ενώ η όλη διεργασία γίνεται κρατώντας τα δείγματα σε πάγο. Κατόπιν προστίθενται 400 μl 20% Triton-X-100 (τελική συγκεντρωση 1%), τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται στους 4⁰ C via 30 λεπτά και φυνοκεντρούνται στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰ C. Εφ' όσων η GST πρωτεΐνη εκφράζεται στο πρώτο υπερκείμενο, προστίθενται σε αυτό κατάλληλη 50% σφαιρίδια γλουταθειόνηςσεφαρόζης, εξισορροπημένων σε PBS. Τα δείγματα αφήνονται σε περιστροφή, overnight στους 4⁰ C. Στην περίπτωση που η GST πρωτεΐνη παγιδεύεται σε σωματίδια και μεμβράνες, μετά την φυγοκέντρηση κάθε πελέτα επαναδιαλύεται σε 400µl solubilization buffer (25 mM Triethenolamine 7.51M, 1.5% Sarcosyl, 1 mM EDTA). Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται στους 4⁰ C για 10 λεπτά και κατόπιν προστίθενται 8μl Triton X-100 1% και 4 μl CaCl2 0.1M (τελικές συγκεντρώσεις 2% και 1mM). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰ C και στο υπερκείμενο προστίθενται τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, όπως παραπάνω.

Το επόμενο πρωί τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4⁰ C. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια υφίστανται για 3 φορές την ακόλουθη διαδικασία : έκπλυση με 1 ml παγωμένου PBS/1% Triton, περιστροφή για 5 λεπτά στους 4⁰ C, και φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4⁰ C. Μετά την τελευταία έκπλυση, στα σφαιρίδια προστίθεται 1000 μl PBS, και ύστερα από στιγμιαία φυγοκέντρηση και αφαίρεση του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθενται όσος όγκος PBS. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4⁰ C. Σε 10-20 μl δείγματος προστίθεται ίσος όγκος 4x SDS Loading Buffer, και μετά από βρασμό για 5 λεπτών, αναλύεται η έκφραση της GST πρωτεΐνη σε 8.5% ή 10.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με χρωστική Commasie, που καθιστά ορατές τις πρωτεΐνες.

Χρώση πρωτεϊνών με Coomassie

Για τη χρώση των πρωτεϊνών με Coomassie η πηκτή πολυακρυλαμίδης επωάζεται για περίπου 20 λεπτά με το διάλυμα της χρωστικής Coomassie σε κινούμενη πλατφόρμα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν η περίσσεια χρωστική απομακρύνεται με επώαση με τα διαλύματα αποχρωματισμού fast και slow destaining.

	Fast destaining	Slow destaining
ddH ₂ O	400 ml	875 ml
Methanol	500 ml	75 ml
Acetic acid	100 ml	50 ml
Όγκος	1 litre	

In vitro αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down)

Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας επιμόλυνσης ΗΕΚ293Τ κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης Α, την αλλαγή του

θρεπτικού, τις εκπλύσεις με PBS, την αποκόλληση με ξύστρο και τη φυγοκέντρηση (βλ. παραπάνω), τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200 μΙ WCE (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM KCl, 10% Glycerol, кал 2 mM DTT кал πρωτεϊνικοί αναστολείς που προστίθενται λίγο πριν τη χρήση). Ακολουθεί διαδικασία παγώματος στους - 80⁰ C και ξεπαγώματος σε πάγο (freeze and thaw) για 3 φορές, έτσι ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Μετά την φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά και την απομάκρυνση του debris, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους - 80⁰ C. Η GST πρωτεΐνη Β (βλ. τρόπο παρασκευής παραπάνω) εξισορροπείται με τη προσθήκη 1ml 2x Interaction Buffer (40 mM Hepes pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 0.4% NP40, 0.4% BSA, 15% Glycerol, 4 mM PMSF και αναστολείς της πρωτεόλυσης) και σύντομη περιστροφή τους στους 4°C. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση καί αφαίρεση του υπερκείμενου, στη GST πρωτεΐνη Β προστίθενται 200μl 2x Interaction Buffer, κατάλληλη ποσότητα από τη πρωτεΐνη A και dd H₂O, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 400 μl. Ακολουθεί περιστροφή overnight στους 4^0 C. Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, γίνεται 2-4 εκπλύσεις με διάλυμα το οποίο περιέχει KCI 100 mM ή 250 mM KCl, 20 mM Hepes pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.2% NP40, 4 mM PMSF, και αναστολείς της πρωτεόλυσης. Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθενται ίσος όγκος 2x SDS Loading Buffer. Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά και ανίχνευση της πρωτεΐνης Α (ή του επίτόπου της, εάν φέρει) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (βλ. παραπάνω).

Συν-ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Co-IP)

Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης δύο πρωτεϊνών με διαφορετικό επίτοπο (πρωτεΐνες 1 και 2). Η συλλογή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιείται με τον εξής τρόπο: Αρχικά, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με παγωμένο PBS διάλυμα και στη συνέχεια αφού προστεθεί 1ml PBS, αποκόλληση αυτών με ξύστρο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C, αναρρόφηση και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος (300-550μl) λύσης CO-IP (20 mM Tris-HCI pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, παρουσία αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα δείγματα αφήνονται να ανακινούνται για 30 λεπτά στους 4°C και κατόπιν φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 5 λεπτά, στους 4°C.

Ακολουθεί pre-clearing των δειγμάτων με τη προσθήκη 35μl 50% σφαιριδίων protein G ,προ-εξισορροπημένων σε διάλυμα λύσης, με περιστροφή για 1,5 ώρες στους 4⁰ C. Στη συνέχεια και μετά από σύντομη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νεό σωληνάκι και σε αυτό προστίθεται κατάλληλη ποσότητα αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει τη μία από τις δύο πρωτεΐνες (πρωτεΐνη 1) και τα δείγματα αφήνονται να περιστραφούν overnight στους 4⁰ C. Την επόμενη μέρα προστίθενται 35μl 50% σφαιριδίων protein G στα δείγματα και αφήνονται σε περιστροφή για 3 ώρες στους 4⁰ C. Κατόπιν γίνονται τρεις εκπλύσεις με διάλυμα λύσης (περιστροφή στους 4⁰ C για 5 λεπτά και στιγμιαία φυγοκέντρηση), στα σφαιρίδια προστίθεται 4x SDS Loading Buffer και τα δείγματα βράζονται για 5 λεπτά. Ακολουθεί ανάλυση της ηλεκτροφορητικής ικανότητας των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι αυτής ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 1 και 2. Η κατακρήμνιση της πρωτεΐνης 1 ανιχνεύεται με τη χρήση αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης 1 μετά από stripping της μεμβράνης.

<u>Το σύστημα της in vivo βιοτινιλίωσης πρωτεϊνών και η</u> συνκατακρήμνιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (in vivo biotinylation)

Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης έστω μιας πρωτεϊνης 1 σε σύζευξη με το πεπτίδιο Bio, 29 αμινοξέων, το οποίο υφίσταται βιοτινιλίωση με την συνέκφραση της λιγάσης BirA (βακτηριακής προέλευσης). Τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν και με τον φορέα έκφρασης έστω της πρωτεϊνης 2. Η συλλογή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιείται με τον εξής τρόπο: Αρχικά, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με παγωμένο PBS διάλυμα και στη συνέχεια αφού προστεθεί 1ml PBS, αποκόλληση αυτών με ξύστρο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C, αναρρόφηση και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος (300-550μl) λύσης CO-IP (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, παρουσία αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα δείγματα αφήνονται να ανακινούνται για 30 λεπτά στους 4°C και κατόπιν φυγοκεντρούνται στις 13000rpm για 5 λεπτά, στους 4[°]C.

Από το υπερκείμενο κρατείται ποσότητα 50 μΙ που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνική ανάλυση. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 35 μ 50% σφαιριδίων στρεπταβιδίνης που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια και μεγάλη ειδικότητα πρόσδεσης σε βιοτινιλιωμένες πρωτεϊνες και που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα λύσης ή PBS. Στα σφαιρίδια αυτά προσκολλάται η βιοτινιλιωμένη πρωτεϊνη και η πρωτεΐνη 2 αν και εφ'όσων αυτή αλληλεπιδρά με την πρώτη. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται για 3-4 ώρες στους 4⁰ C. Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση και έκπλυση με 1 ml παγωμένου διαλύματος λύσης για κάθε δείγμα, με περιστροφή στους 4⁰ C και μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Ακολουθεί προσθήκη 12.5 μl 4x SDS Loading Buffer. Μετά από βρασμό 5 λεπτών, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι αυτής ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 1 και 2. Η έκφραση των βιοτινιλιωμένων πρωτεϊνών ανιχνεύεται με χρήση ενός πολυμερούς που φέρει στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Η ανίχνευση αυτή επιτυγχάνεται με επώαση των μεμβρανών (μετά από stripping) με streptavidin-HRP σε αραίωση 1: 10000 TBS-T 0.1% για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T 0.1%, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Н ανίχνευση πρωτεϊνών των γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) όπως περιγράφεται παραπάνω.

<u>Μέθοδος κατακρήμνισης πρωτεϊνών με βιοτινυλιωμένα</u> ολιγονουκλεοτίδια (DNAP, DNA affinity precipitation)

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 5 μl Dynabeads M-280

✓ 1 πλύση με 500 μΙ διαλύματος 1x B&W (10mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM EDTA & 2mM NaCl)

✓ Προσθήκη 7 μΙ 2x B&W και 7 μΙ βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια (0,5μΜ)
 Ως αρνητικό δείγμα τα σφαιρίδια επωάζονται μόνο με 14 μΙ διαλύματος 1x
 B&W

- Επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ 2 πλύσεις με 500 μΙ διαλύματος 1x B&W
- 1 πλύση με 500 μΙ διαλύματος BBRC (10mM Glycerol, 1mM Tris-Cl pH 7.5, 2mM KCl, 4mM MgCl₂ & 0.2mM EDTA)
- ✓ Προσθήκη: 500 μΙ διαλύματος BBRC

150 μg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (σε διάλυμα λύσης Co-IP : 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, παρουσία αναστολέων της πρωτεόλυσης)

8 µg poly dI-dC

- ✓ Επώαση για 2 ώρες με περιστροφή στους 4°C
- 3 πλύσεις με 500 μΙ διαλύματος BBRC
- ✓ Προσθήκη 4x χρωστικής και βρασμός στους 100°C για 10 λεπτά

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονταν προσδεδεμένες πάνω στο DNA αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και ανάλυση Western Blot.

Ετοιμασία βιοτινυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων (ds oligos)

Τα δίκλωνα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια ετοιμάζονται ως εξής: 5μg από το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτιδίο 5μg από το συμπληρωματικό ολιγονουκλεοτιδίο (χωρίς βιοτίνη) 2 μl NEB2 10x buffer ddH₂O μέχρι τα 20μl

- ✓ Επώαση στους 92°C για 2 λεπτά
- ✓ Σταδιακή ψύξη μέχρι τους 20°C περίπου

- ✓ Προσθήκη ddH₂O για να είναι η τελική συγκέντρωση 5μM
- ✓ Αποθήκευση στους -20°C

Σε ορισμένες περιπτώσεις αντί για βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμοποιήθηκαν τμήμα DNA που ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας έναν από τους βιοτινυλιωμένους εκκινητές (forward). Το προϊόν της PCR (-161/+19) απομονώθηκε από πηκτή αγαρόζης και χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Η ποσότητα υπολογίστηκε βάσει το ότι για ένα τμήμα 600 βάσεων χρειάζονται 2μg στην αντίδραση.

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα βιοτινυλιωμένα (bio) ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στα DNAP.

Πίνακας 4 : Οι αλληλουχίες των βιοτινυλιωμένων (bio) ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιήθηκαν στα DNAP. Η μετάλλαξη στο CCAAT είναι τονισμένη (bold).

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
Bio-CAGA-4-F	5' CAGACAGTCAGACAGTCAGACAGTCAGACAGT 3'
hRhoB-161 sense Bio	5' CTGGGCCGTCAATCAAGCTGG 3'
hRhoB CAAT wt-Bio	5' GCCGGCTGGTTTCCCATTGGACGGCTATATTAAG 3'
hRhoB CAAT mut-Bio	5' GCCGGCTGGTTTCCCA G T C GACGGCTATATTAAG 3'
hRhoB CAAT distal-Bio	5' GGCTGCAGGGGGGGGGCGATCAGAGCTAAGCTCC 3'

Μέθοδος ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP)

 ✓ Τα κύτταρα τοποθετούνται σε p100 πιάτο και επωάζονται για 48 ώρες περίπου

- Αφαίρεση του θρεπτικού
- 1 πλύση με 7ml θρεπτικού (DMEM)
- Προσθήκη 9ml θρεπτικού
- Προσθήκη 1ml formaldehyde (10%) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακίνηση
- ✓ Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (ή στους 37°C)

 ✓ Προσθήκη 1ml γλυκίνης (1,375M) σταγόνα-σταγόνα (γρήγορα) και ανακίνηση

- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ 3 πλύσεις με 10 ml 1x PBS/0,5mM PMSF
- ✓ Προσθήκη 7 ml 1x PBS/0,5% NP-40/0,5mM PMSF
- Ξύσιμο των κυττάρων και μεταφορά σε falcons 15ml
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 1000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε 5ml Swelling buffer
- Επώαση στον πάγο για 10 λεπτά

Σπάσιμο των κυττάρων με το μηχάνημα "Dounce" (ταχύτητα 2,5-3), 20-30
 φορές για κάθε δείγμα

Έλεγχος των κυττάρων για να διαπιστωθεί αν έχουν σπάσει ικανοποιητικά και ελευθερώθηκαν οι πυρήνες:

πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα αναμιγνύονται 5μl Trypan Blue (0,4% σε
 PBS) και 5μl από το δείγμα

- παρατήρηση στο μικροσκόπιο: όσο περισσότερα κύτταρα έχουν βάψει μπλε
 τόσο πιο αποτελεσματική ήταν η διαδικασία

- ✓ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm, 5 λεπτά, 4°C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση της πελέτας σε 2ml Sonication buffer

Σπάσιμο της χρωματίνης με 10-14 υπέρηχους (sonication) των 30 sec σε
 50% ένταση (ανάμεσα στον κάθε κύκλο υπερήχων μεσολαβεί διάστημα 5
 λεπτών στον πάγο)

- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 15 λεπτά, 4°C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε σωληνάκια των 1,5 ml
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 15 λεπτά, 4°C
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε σωληνάκια των 1,5 ml

 ✓ 50μΙ από το κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται για έλεγχο ενώ η υπόλοιπη ποσότητα αποθηκεύεται στους -80°C

- ✓ Στα 50μΙ προστίθενται 150μΙ Η₂Ο και 10,5μΙ ΝaCl 4Μ
- ✓ Επώαση στους 65°C Ο/Ν

Καθαρισμός δείγματος ελέγχου:

- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Ανάμιξη (το μίγμα πρέπει να γίνει ομοιογενές)
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 5 λεπτά, RT
- Μεταφορά της επάνω φάσης
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου και 1μl γλυκογόνου (20μg/μl)
- Μεταφορά της επάνω φάσης

✓ Προσθήκη 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και 2^{1/2} όγκους απόλυτη αιθανόλη

- ✓ Ανάμιξη και επώαση στους -80°C για 30 λεπτά
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 10 λεπτά, RT
- Απομάκρυνση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 500 μΙ 75% αιθανόλης
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 10 λεπτά, RT
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Στέγνωμα της πελέτας και επαναδιάλυση σε 20μl H₂O
- Έλεγχος της ποιότητας του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης 1%

Αν η χρωματίνη έχει σπάσει σε κομμάτια μικρότερα των 1000 βάσεων, ακολουθεί η παρακάτω διαδικασία:

Για το κάθε δείγμα αρχικά απαιτούνται:

20 μΙ καθαρά σφαιρίδια protein G για το μέρος στο οποίο δεν θα προστεθεί αντίσωμα (-ab),

20 μΙ για το μέρος στο οποίο θα προστεθεί το αντίσωμα, και

40 μl για το preclearing της χρωματίνης

- Προσθήκη 1,5ml Sonication Buffer
- ✓ Περιστροφή για 10 λεπτά στους 4°C
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Επανάληψη 2 φορές των 4 παραπάνω σταδίων

Προσθήκη 494μl Sonication Buffer + 5μl BSA (100mg/ml) + 1μl λDNA (0,5μg/μl)

- ✓ Περιστροφή για 2 ώρες στους 4°C
- ✓ Μεταφορά από 150µl beads σε 2 σωληνάκια και αποθήκευση στους 4°C

✓ Φυγοκέντρηση των υπόλοιπων beads (για preclearing) στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C

- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Ξεπάγωμα της χρωματίνης από τους -80°C
- Προσθήκη στα σφαιρίδια 1500μl από τη χρωματίνη
- ✓ Προσθήκη 15μl BSA (100mg/ml) και 3μl λ DNA (0,5μg/μl)
- ✓ Περιστροφή για 2 ώρες στους 4℃
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι και μέτρηση του όγκου

✓ Η χρωματίνη μοιράζεται εξίσου σε 2 νέα σωληνάκια, ενώ σε ένα τρίτο αποθηκεύεται στους -20°C το 1/10 του όγκου που μεταφέρθηκε σε κάθε σωληνάκι (input)

Στο πρώτο σωληνάκι δεν προστίθεται αντίσωμα (-ab) ενώ στο δεύτερο προστίθεται το αντίσωμα (20μl για α-Sp1, α-RXR και α-HNF-3β) (+ab)

- ✓ Περιστροφή για 2 ώρες στους 4℃
- ✓ Φυγοκέντρηση των σφαιριδίων που ήταν αποθηκευμένα στους 4°C στις
 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Προσθήκη των δειγμάτων (-ab, +ab) στα καθαρά σφαιρίδια
- ✓ Περιστροφή στους 4°C Ο/Ν
- 2 πλυσίματα με το Wash buffer A

Το κάθε πλύσιμο περιλαμβάνει 10 λεπτά περιστροφή στους 4°C και φυγοκέντρηση στις 6000 rpm, 3 λεπτά, 4°C

- ✓ 2 πλύσεις με 1ml Wash buffer B
- ✓ 2 πλύσεις με 1ml Wash buffer C
- ✓ 2 πλύσεις με 1ml TE buffer
- Προσθήκη 150μl Elution buffer (φρέσκο)
- ✓ Vortex
- ✓ Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά
- ✓ Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 1 λεπτό, RT
- Μεταφορά του υπερκειμένου (150μl) σε νέο σωληνάκι
- Προσθήκη 150µl Elution buffer
- ✓ Vortex

- ✓ Επώαση στους 65°C για 10 λεπτά
- ✓ Vortex
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 1 λεπτό, RT

 ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου στο σωληνάκι του προηγούμενου υπερκειμένου (300μΙ τελικά)

✓ Προσθήκη 100μΙ Η₂Ο και 21μΙ NaCl 4Μ

✓ Για το input προσθήκη Elution buffer μέχρι τα 300μl, 100μl H₂O και 21μl NaCl 4M

- ✓ Ανάδευση, σύντομη φυγοκέντρηση και επώαση στους 65℃ Ο/Ν
- Προσθήκη 1µl RNAse A (10mg/ml, DNase-free)
- ✓ Επώαση στους 37°C για 1 ώρα
- ✓ Προσθήκη 2μΙ ΕDTA (0,5Μ) και 2μΙ Πρωτεϊνάση Κ (10mg/ml)
- ✓ Επώαση στους 42°C για 2 ώρες
- ✓ Προσθήκη 200μl H₂O
- ✓ Προσθήκη 1/10 του όγκου (42μΙ) CH₃COONa 3M
- Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική 25:24:1
- Ανάμιξη (το μίγμα πρέπει να γίνει ομοιογενές)
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 5 λεπτά, RT
- Μεταφορά της επάνω φάσης
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφόρμιου και 1μl γλυκογόνου (20μg/μl)
- Μεταφορά της επάνω φάσης
- ✓ Προσθήκη 2^{1/2} όγκων απόλυτης αιθανόλης και 1μΙ γλυκογόνο (20 mg/ml)
- ✓ Επώαση στους -20°C Ο/Ν
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 30 λεπτά, 4°C
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml 75% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm, 10 λεπτά, RT
- Αφαίρεση του υπερκειμένου
- Στέγνωμα της πελέτας και επαναδιάλυση του input σε 100μl 10mM Tris
 (pH 7,5) και των δειγμάτων σε 50μl 10mM Tris (pH 7,5).

Swelling Buffer	Sonication Buffer
25mM Hepes pH	
7,9	50mM Hepes pH 7,9

1,5mM MgCl ₂	140mM NaCl
10mM KCI	1mM EDTA
0,5% NP-40	1% Triton X-100
1mM DTT	0,1% Na- deoxycholate
0,5mM PMSF	0,1% SDS
2µg/ml aprotinin	0,5mM PMSF
	2µg/ml aprotinin

Wash Buffer A	Wash Buffer B	Wash Buffer C
50 mM Hepes pH 7,9	50 mM Hepes pH 7,9	20 mM Tris-CI pH 8
140 mM NaCl	500 mM NaCl	1 mM EDTA
1mM EDTA	1mM EDTA	250 mM LiCl
1% Triton X-100	1% Triton X-100	0,5% NP-40
0,1% Na-deoxycholate	0,1% Na-deoxycholate	0,5% Na-deoxycholate
0,1% SDS	0,1% SDS	0,5mM PMSF
0,5 mM PMSF	0,5 mM PMSF	2µg/ml aprotinin
2µg/ml aprotinin	2µg/ml aprotinin	

TE	Elution Buffer
10mM Tris-Cl pH 8	50mM Tris-Cl pH 8
1mM EDTA	1mM EDTA
	1% SDS
	50mM NaHCO₃
	χωρίς αναστολείς

Τα δείγματα αναλύονται στη συνέχεια με PCR. Οι εκκινητές οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης και ανιχνεύουν περιοχές του υποκινητών των γονιδίων RhoB, p21 και PAI-1 παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5: Οι αλληλουχίες των εκκινητών οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
hRhoBchip-313	5' TCTGAATGGGAGTCGCCAACGC 3'
hRhoBchip-185	5'AGTCCGCGCTGCTGCTGC 3'
hRhoB-1605	5'GAAGATCTTTCCCATGCAATGGATAGACAGAGCCCAGC3'
hRhoBchip-1326	5' GCACGCCAGGACTGAACTCATTTATCC 3
PAI-1chip sense	5' CCTCCAACCTCAGCCAGACAAG 3'
PAI-1chip antisense	5' CCCAGCCCAACAGCCACAG 3'
p21 chip sense	5' GGTGTCTAGGTGCTCCAGGT 3'
p21 chip antisense	5' GCACTCTCCAGGAGGACACA 3'

Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών

Η συλλογή των κυττάρων και η διαδικασία εξαγωγής του RNA πραγματοποιείται κατάλληλα χρονικά διαστήματα μετά την επίδραση με TGFβ-1 (5ng/ml) ή/και κατάλληλους αναστολείς της δράσης των πρωτεϊνών MEK και ALK5 αλλά και γενικούς αναστολείς της μεταγραφής και της μετάφρασης (1 ώρα προ-επώαση με τους αναστολείς).Η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται με Trizol σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen/Life Technologies.

- Αφαίρεση του θρεπτικού
- Προσθήκη 1ml 1x PBS (κρύο) και απομάκρυνση

- ✓ Προσθήκη 1ml TRIZOL
- ✓ Ομογενοποίηση των κυττάρων με πιπέτα και μεταφορά σε σωληνάκια 2ml
- Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Προσθήκη 200 μΙ CHCl₃
- ✓ Ανακίνηση για ~10 δευτερόλεπτα (vortex)
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000rpm, 15 λεπτά, 4°C
- ✓ Μεταφορά της υδατικής φάσης (~500 μl) σε σωληνάκι 1,5ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπανόλης και ανακίνηση
- Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000rpm, 15 λεπτά, 4°C, αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη 1ml 75% Et-OH
- Σύντομη ανακίνηση (vortex)
- ✓ Φυγοκέντρηση: 12000rpm, 15 λεπτά, 4°C, αφαίρεση του υπερκειμένου
- Στέγνωμα της πελέτας στον αέρα
- ✓ Επαναδιάλυση σε 30-50 μl H₂O

Υπολογισμός ποσότητας

5 μl RNA σε 1ml H₂O

[OD 260nm] x 40 x (200/1000) = µg/µl

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription)

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Invitrogen για τη χρήση του ενζύμου SuperScript Rnase H-reverse transcriptase.

- ✓ Ανάμιξη:
 - * 10 μl RNA (100ng/μl)_ 1μg συνολικά
 - * 3 µl Random Primers (100ng/µl)
 - * 5 µl dNTPs (2mM)
 - * 15 µl H₂O
- ✓ 5 λεπτά στους 65°C
- Σύντομη επώαση στον πάγο
- Σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ Προσθήκη

- * 10 μI 5x first strand buffer
- * 5 µl DTT 0,1M
- * 1 µl RNase OUT
- Ανάμιξη και σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- Προσθήκη 1 μl SuperScript Rnase H-reverse transcriptase
- Ανάμιξη και σύντομη φυγοκέντρηση
- ✓ 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (25°C)
- ✓ 50 λεπτά στους 42°C
- ✓ 15 λεπτά στους 70°C (απενεργοποίηση)
- * Όλες οι επωάσεις γίνονται σε μηχάνημα PCR
- * Τελικός όγκος αντίδρασης 50 μl
- * Το cDNA που παράγεται από την αντίδραση αποθηκεύεται στους -20 °C

* Το cDNA χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των επιπέδων των μεταγράφων των διαφόρων γονιδίων με τους εκκινητές του πίνακα 6.

Πίνακας 6 : Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των μεταγράφων των γονιδίων RhoA, RhoB, p21, PAI-1 και GAPDH. Οι εκκινητές για τη RhoB και ο sense εκκινητής για τη RhoA, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε cDNA από κύτταρα ποντικού όπως τα Swiss3T3 για το λόγο αυτό σχεδιάστηκε μόνο ο antisense εκκινητής για τη RhoA ποντικού.

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
hRhoA sense	5' CCAGACTAGATGTAGTATTTTTTG 3'
hRhoA antisense	5' ATTAGAGCCAGATGCTTAAGTCC 3'
mRhoA antisense	5' GAGCCAGACCCTGCAGTCCAG 3'
hRhoB sense	5' CCCACCGTCTTCGAGAACTA 3'
hRhoB antisense	5' CTTCCTTGGTCTTGGCAGAG 3'
p21cDNA sense	5' CTGCCCAAGCTCTACCTTCC 3'
p21cDNA antisense	5' CAGGTCCACATGGTCTTCCT 3'

PAI-1cDNA sense	5' GTGGTCTGTGTCACCGTATC 3'
PAI-1cDNA antisense	5' GTAGTTGAATCCGAGCTGCC 3'
GAPDH –F	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3
GAPDH-R	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)

Προετοιμασία κυττάρων (σε τριβλία 6-well)

Η καλυπτρίδα αποστειρώνεται σε 100% Et-OH και φλόγα και τοποθετείται
 στο πηγαδάκι

- Προσθήκη 500 μΙ / πηγαδάκι διαλύματος ζελατίνης 0,1%
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- Αφαίρεση του διαλύματος (aspiration)
- ✓ Πλύσιμο με 1ml DMEM 2 φορές
- ✓ Προσθήκη 1ml θρεπτικού (DMEM με FBS)
- Προσθήκη κατάλληλου αριθμού κυττάρων

ακολουθεί ο επιθυμητός χειρισμός των κυττάρων και την ημέρα συλλογής τους ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές, για 3 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS+/+ (PBS, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂). Ακολουθεί σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde (PFA) σε PBS+/+, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές, ώστε τα αντισώματα να περνούν στο εσωτερικό τους, με χρήση διαλύματος 1 ml/well 0.5% Triton-X-100 σε Buffer 1 (10x Buffer 1 : 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄x2H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO₃, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6.0-6.5). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνονται 2 εκπλύσεις όπως περιγράφονται παραπάνω, καθώς και 2 ακόμα με τον ίδιο τρόπο, αλλά σε διάλυμα 1.5 ml/well PBS+/+/1.5% FBS (χρησιμοποιείται για μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων). Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με 50 μl πρωταρχικού αντισώματος, το οποίο αραιώνεται 1:200 σε διάλυμα PBS+/+/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στους 4⁰ C, σε επίπεδη επιφάνεια για 30 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS+/+/1.5% FBS.

Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται με 50 μl IgG-Alexa Fluor σε αραίωση 1:500 σε διάλυμα PBS+/+/1.5% FBS . Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι (καθώς το Alexa Fluor είναι φωτοευαίσθητο), στους 4^0 C, σε επίπεδη επιφάνεια και για 30 λεπτά. Η περαιτέρω διεργασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Γίνονται 2 εκπλύσεις με διάλυμα PBS+/+/1.5% FBS, και 2 ακόμα με διάλυμα PBS+/+. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας-αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 C⁰ και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DMLB και η φωτογράφηση τους με LEICA DC 300F digital camera χρησιμοποιώντας Zeiss Plan-neofluar 40×/0.75 φακούς.

Χρώση ροδαμίνης-φαλλοιδίνης

Τα κύτταρα στρώνονται σε 6-well τρυβλίο. Σε κάθε well έχει προηγουμένως τοποθετηθεί αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22 x 22 mm καλυμμένη με 500 μl/well 0.1% gelatin. Μετά από επώαση των κυττάρων για κατάλληλα χρονικα διαστήματα αρχίζει η διαδικασία της χρώσης.

Τα κύτταρα εκπλένονται μία φορά, για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% πformaldehyde (PFA) σε PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές με χρήση διαλύματος 0,5% Triton-x-100 σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς ανάδευση). Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με 1.5 ml/well PBS + 1.5% FBS και επώαση των κυττάρων με 100 μl ροδαμίνης- φαλλοιδίνης, η οποία έχει αραιωθεί 1:100 σε διάλυμα PBS + 1.5% FBS. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον, με ανοικτό το καπάκι του τρυβλίου για 40 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS.

Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 C⁰ και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DMLB και η φωτογράφηση τους με LEICA DC 300F digital camera χρησιμοποιώντας Zeiss Plan-neofluar 40×/0.75 φακούς.

Ανίχνευση ΕΜΤ (επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής) (ΕΜΤ <u>assay)</u>

Κύτταρα HaCaT είτε μετά από μόλυνση με αδενοιο είτε μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNAs, αναπτύσσονται σε θρεπτικό 2% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια αραιώνονται σε θρεπτικό το οποίο περιέχει 10ng/ml TGFβ-1 και τοποθετούνται α) $3x10^5$ - $5x10^5$ κύτταρα/well σε 6-well τρυβλία στα οποία είχε τοποθετηθεί προηγουμένως καλυπτρίδα β) σε τρυβλία p60 ή p100. Τα κύτταρα επωάζονται με TGFβ-1 για 60-72 ώρες. Στη συνέχεια στα 6-well πραγματοποιείται πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση χρώσης E-Cadherin. Συγκεκριμένα, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με PBS και κατόπιν μονιμοποίηση τους με διάλυμα Μεθανόλης-Ακετόνης 1:1 (το οποίο φυλάσσεται από πριν στους -20°C) για 15-20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με PBS και προσθήκη PBS + 5% FBS (+ 0.1M για glycine) 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου για μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων. Στη συνέχεια γίνονται τρεις εκπλύσεις των κυττάρων με PBS + 5% FBS και προσθήκη 50 μl E-Cadherin αντισώματος, το οποίο αραιώνεται 1:200 σε PBS + 5% FBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή overnight στους 4°C σε σκοτάδι. Ακολουθούν εκπλύσεις των κυττάρων με PBS + 5% FBS και προσθήκη anti-mouse IgG Alexa Fluor (1:500) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται τρεις εκπλύσεις με PBS και προσθήκη χρωστικής DAPI (1µg/ml) για 5 λεπτά σε σκοτάδι. Τα κύτταρα υφίστανται 3 εκπλύσεις με PBS και στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 C⁰ και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται με μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DMLB και η φωτογράφηση τους με LEICA DC 300F digital camera χρησιμοποιώντας Zeiss Plan-neofluar 40×/0.75 φακό.

Σε κάθε πείραμα, κάθε δείγμα μοιράζεται σε 2 τρυβλία 6-well, γιατί εκτός από ανίχνευση χρώσης E-Cadherin πραγματοποιείται και χρώση ροδαμίνης φαλλοιδίνης σύμφωνα με τη διαδικασία η οποία περιγράφεται παραπάνω.

Παράλληλα, γίνεται συλλογή πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από το p60 ή p100 τρυβλίο με τη χρησιμοποίηση CO-IP Lysis Buffer (20 mM Tris-HCI pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, παρουσία αναστολέων της πρωτεόλυσης) όπως περιγράφεται στην 'απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων'. Η ποσότητα ολικής πρωτεΐνης κάθε δείγματος υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford-Lowry και ίσες ποσότητες ολικής πρωτεΐνης από όλα τα δείγματα φορτώνονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί ανάλυση με Western blot με τη χρησιμοποίηση των αντισωμάτων anti-E-Cadherin (1: 5000 σε TBS-T 0,05% overnight 4⁰C) και anti-actin (1:1000 σε TBS-T 0,05% 1 ώρα RT ή overnight 4^oC).

Μέτρηση κυτταρικής ανάπτυξης (cell growth) /MTT assay

Κύτταρα τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με siRNAs, αναπτύσσονται σε θρεπτικό 2% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια αραιώνονται σε θρεπτικό 2% FBS το οποίο περιέχει 10ng/ml TGFβ-1 και τοποθετούνται σε 96-well τρυβλίο (10.000-20.000 κύτταρα/well). Μετά από 20 ή 44 ώρες αφαιρείται το θρεπτικό από τα κύτταρα και προστίθενται 100μl διαλύματος MTT (3-(4,5Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) συγκέντρωσης 0.5mg/ml σε θρεπτικό χωρίς phenol red. Μετά από 4 ώρες επώασης των κυττάρων με το MTT (στους 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂), το θρεπτικό αφαιρείται και στα κύτταρα προστίθενται 200μl DMSO προκειμένου να επαναδιαλυθεί η formazan, το μεταβολικό προιόν του MTT των μιτοχονδρίων των κυττάρων τα οποία πολλαπλασιάζονται. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 550nm (Reference 655nm).

Κλασματοποίηση Triton-x-100

Κύτταρα JEG-3 μετά από μόλυνση με αδενοιούς και επίδραση (ή μη) με TGFβ-1 υφίστανται 2 εκπλύσεις με κρύο PBS και προσθήκη 500μl διαλύματος εκχύλισης με Triton-x-100 (0,3% Triton-X-100, 5mM Tris-HCl, pH:7,4, 2mM EGTA, 300mM sucrose, 2µM phalloidin, 400µM PMSF & 10µM leupeptin) για 5 λεπτά σε πάγο. Ακολουθεί απομάκρυνση του διαλύματος εκχύλισης από τα τρυβλία και μεταφορά του σε σωληνάκι των 1.5ml. Το διαλυτό σε Triton-x-100 κλάσμα των πρωτεϊνών κατακρημνίζεται με τη προσθήκη ίσου όγκου 6% PCA. Οι αδιάλυτες σε Triton-x-100 πρωτεΐνες που παραμένουν στο τρυβλίο κατακρημνίζονται με τη προσθήκη 1ml 3% PCA και αποκολλώνται με απόξεση. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 12000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ιζήματα (αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο και στεγνώσουν) διαλυτοποιούνται σε 100-200μl 0,1N NaOH . Ίσος όγκος από όλα τα δείγματα μαζί με SDS loading buffer φορτώνεται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και αναλύεται με Western Blot με τη χρησιμοποίηση anti-actin (1:5000 σε TBS-T 0.05% 1 ώρα RT ή overnight 4°C) αντισώματος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το Tinascan v.2 software.

Πειράματα επούλωσης πληγής

(Wound healing assay/Oris[™] Cell Migration Assay)

Η μετακίνηση των κυττάρων αναλύθηκε με τη χρησιμοποίηση Oris[™] migration chambers σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Platypus Technologies (AMS Biotechnology) (Εικόνα 24). Συγκεκριμένα κύτταρα HaCaT τα οποία είτε είχαν επιμολυνθεί παροδικά με siRNAs είτε μολυνθεί με αδενοϊούς υφίστανται χρώση με Vybrant[™] CFDA SE Cell Tracer (Molecular probes) με τον εξής τρόπο :

- Προσθήκη 54μl DMSO στη Fluor dye για να επιτευχθεί 10mM stock solution (σε σκοτάδι)
- Αραίωση (split) των κυττάρων, μέτρηση και φυγοκέντρηση τους
- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε PBS έτσι ώστε να είναι 2.5x10⁶/5ml
 PBS
- Προσθήκη χρωστικής σε αραίωση 1:1000 δηλαδή τελική συγκέντρωση 10μΜ
- Επώαση των κυττάρων με τη χρωστική στους 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂ για 15 λεπτά (με λίγο ανοικτό το καπάκι).
- Φυγοκέντρηση (900 στροφές 4 λεπτά), αφαίρεση υπερκείμενου (σε σκοτάδι), επαναδιάλυση τους σε 5ml θρεπτικό 0.2% FBS και επώαση τους στους 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂ για 20 λεπτά
- Φυγοκέντρηση (900 στροφές 4 λεπτά), έκπλυση με θρεπτικό
- Φυγοκέντρηση (900 στροφές 4 λεπτά), προσθήκη ποσότητας θρεπτικού 0.2% FBS (στα transfected) χωρίς αντιβιοτικό) εμπλουτισμένο με ή χωρίς TGFβ-1 (10ng/ml), έτσι ώστε να είναι ~50.000 κύτταρα/well. (100μl κύτταρα/well)
- Μοίρασμα των κυττάρων σε 96-well τρυβλίο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί προηγουμένως OrisTM Cell Seeding Stoppers (Εικόνα 24)
- Μετά από 24 με 36 ώρες, απομακρύνονται οι stoppers δημιουργώντας
 μια στρογγυλή, χωρίς κύτταρα, ζώνη μετακίνησης στο κέντρο κάθε well
- Έκπλυση των κυττάρων με PBS
- Προσθήκη φρέσκου 200μl/well θρεπτικού εμπλουτισμένου με ή χωρίς
 TGFβ-1 (10ng/ml)

- Επώαση του τρυβλίου για 24 με 48 ώρες ώστε να επιτευχθεί η μετακίνηση των κυττάρων στη ζώνη μετακίνησης
- Με τη προσθήκη πλαστικής μάσκας στο τρυβλίο έτσι ώστε να μένει ελεύθερη μόνο η ζώνη μετακίνησης, τα δείγματα φωτομετρούνται σε σπεκτροφωτόμετρο στα 535nm τη στιγμή μηδέν και μετά από 24 ή/και 48 ώρες
- Τα κύτταρα παρατηρούνται και φωτογραφίζονται τη στιγμή μηδέν (μόλις απομακρυνθούν οι stoppers) και μετά από 24 ή/και 48 ώρες με Hamamatsu Photonics ORCA-ER CCD camera σε (Nikon) Eclipse TE 100-E microscope με 5x Plan Fluor 1.30 NA φακό (Nikon) και Metamorph 5.01 software (Molecular Devices)
- Ανάλυση των εικόνων με Image J software για το καθορισμό της περιοχής η οποία καλύφθηκε από τα κύτταρα που μετακινήθηκαν

Η ίδια τεχνική ακολουθείται και για τα DU145 και PC3 κύτταρα με την εξής όμως σημαντική διαφορά : τα κύτταρα DU145 και PC3 επιμολύνονται παροδικά με τα siRNAs με reverse transfection. Επομένως τα κύτταρα βάφονται πρώτα με τη φθορίζουσα χρωστική και αφού επαναδιαλυθούν ώστε να είναι 0.8x10⁶(DU145) και 0.6x10⁶ (PC3) κύτταρα/ml στη συνέχεια προστίθενται 100μl κύτταρα στο μείγμα με το siRNA και τη Lipofectamine 2000 το οποίο έχει τοποθετηθεί προηγουμένως σε untreated 96-well τρυβλίο (μπορεί να γίνει και με την αντίστροφη σειρά, το μείγμα προστίθεται στο τρυβλίο με τα κύτταρα). Τα κύτταρα επωάζονται με το transfection mix για 6 ώρες και στη συνέχεια τα τρυβλία φυγοκεντρούνται στις σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαιρούνται 80μΙ θρεπτικό και προστίθενται 150μΙ φρέσκο θρεπτικό RPMI 1% FCS (χωρίς αντιβιοτικά). Ακολουθούν 3 εκπλύσεις των κυττάρων (150μΙ θρεπτικό, φυγοκέντρηση 1200 στροφές για 5 λεπτά) και μετά προστίθενται 150μΙ φρέσκο θρεπτικό 1% FCS (χωρίς αντιβιοτικά). Κατόπιν, μεταφέρονται 100μl κυττάρων/well σε 96-well τρυβλίο στο οποίο έχουν τοποθετηθεί προηγουμένως οι Oris[™] Cell Seeding Stoppers (προσεκτική ανακίνηση του τρυβλίου πάνωκάτω)(Εικόνα 24). Τα κύτταρα αφήνονται να επωαστούν για 36 ώρες και μετά ακολουθεί η απομάκρυνση των stoppers, έκπλυση (2x) των κυττάρων με θρεπτικό και προσθήκη 200μl RPMI 1% FCS (χωρίς αντιβιοτικά). Το πρωτόκολλο για τη λήψη φωτογραφιών συνεχίζει όπως περιγράφεται προηγουμένως.



Εικόνα 24 : Το Oris[™] Cell Migration Assay (Platypus Technologies).

Μελέτη τυχαίας μετακίνησης κυττάρων (Random Migration Assay)

Κύτταρα DU145 και PC3 μετά από παροδική επιμόλυνση (reverse transfection) με siRNAs και επίδραση με TGFβ-1 (είτε επίδραση με C3 transferase και TGFβ-1) υφίστανται (μετά από περίπου 36 ώρες) αραίωση (split) και μεταφορά σε 24-well τρυβλίο (20.000κύτταρα/well) σε θρεπτικό RPMI (+Hepes+Glutamine) 1% FCS (χωρίς αντιβιοτικά). Μετά από περίπου 24 ώρες μεταφέρονται με διαφορετικό καπάκι (για τη παροχή CO₂) σε stage μικροσκοπίου time-lapse η οποία είχε προθερμανθεί στους 37⁰C. Πραγματοποιείται λήψη (phase-contrast) φωτογραφιών των κυττάρων κάθε 5 λεπτά για 16-17 ώρες σε συνθήκες 37 C⁰ και 5% CO₂ με τη χρησιμοποίηση Hamamatsu Photonics ORCA-ER CCD camera του Eclipse TE 100-E μικροσκοπίου (Nikon), φακό 10x Plan Fluor 1.30 NA (Nikon) και Metamorph 5.01 (Molecular Devices) software. Η ανάλυση των videos, η μέτρηση της κινητικότητας, των μορφολογικών αλλαγών αλλά και πολλών διαφορετικών χαρακτηριστικών των κυττάρων γίνεται με το Image J software.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1

Αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της μικρής GTΡάσης RhoB από τον TGFβ-1 σε κύτταρα Swiss3T3, HepG2, DU145, PC3 και HaCaT

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι ο TGFβ-1 επάγει την γρήγορη ενεργοποίηση των μικρών GTPασών RhoA και RhoB και ότι η ενεργοποίηση αυτή είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ-1 σε κύτταρα ινοβλαστών (99). Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη του ενδεχόμενου ύπαρξης, πέραν της μη γενωμικής ενεργοποίησης των RhoA και RhoB πρωτεϊνών, ενός δεύτερου παράλληλου γενωμικού μονοπατιού το οποίο ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης των δύο αυτών Rho πρωτεϊνών αλλά κατά συνέπεια τη μακροχρόνια δράση του TGFβ-1 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης αλλά και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετακίνηση των κυττάρων.

Αρχικά, ο δυνητικός ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ-1 στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις RhoA και RhoB GTPάσες ανιχνεύθηκε μέσω μέτρησης των mRNA επιπέδων τους μετά από επίδραση με TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, κύτταρα ινοβλαστών ποντικού Swiss3T3 και ηπατώματος ανθρώπου HepG2 μετά από ανάπτυξή τους σε θρεπτικό με μηδενική ή ελάχιστη ποσότητα ορού, επωάστηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για διαστήματα από 30 λεπτά έως 24 ώρες. Ακολούθησε η απομόνωση του RNA από τα κύτταρα και ανάλυση με τη μέθοδο RT-PCR. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25Α, επίδραση με TGFβ-1 σε κύτταρα Swiss3T3 είχε ως αποτέλεσμα την γρήγορη αύξηση (1.6-2.2 fold) των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB η οποία ανιχνεύεται από τα πρώτα 30 λεπτά και παραμένει μέχρι και στις 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1. Αντιθέτως, δεν παρατηρήθηκε καμία επαγωγή των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoA. Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο GAPDH (-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

Με παρόμοιο τρόπο δείχθηκε ότι η επίδραση με TGFβ-1 επάγει την αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB και όχι του γονιδίου της RhoA σε κύτταρα ηπατοβλαστώματος ανθρώπου HepG2. Αναλυτικότερα, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 25Β, η αύξηση των επιπέδων mRNA της RhoB ανιχνεύεται από τη πρώτη ώρα επίδρασης (2.4 fold) και διατηρείται αλλά μειωμένη (1.4 fold) μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1.



Εικόνα 25: Ο TGFβ-1 προκαλεί γρήγορη αύξηση των mRNA επιπέδων του γονιδίου της RhoB και όχι του γονιδίου της RhoA σε κύτταρα Swiss3T3 και HepG2. Ανάλυση RT-PCR κυττάρων Swiss3T3 (A) και HepG2 (B) μετά από επίδραση με TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Η ανάλυση έγινε με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για την αναγνώριση του mRNA των RhoB, RhoA και GAPDH γονιδίων. Τα επίπεδα mRNA των RhoA και RhoB κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο GAPDH mRNA και η μέση τιμή από δύο ανεξάρτητα πειράματα παρατίθεται κάτω από κάθε εικόνα PCR.

Αντίστοιχη ανάλυση RT-PCR σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT έδειξε ότι επίδραση με TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1-24 ώρες) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων mRNA της RhoB η οποία ανιχνεύεται μετά από 1 ώρα επίδρασης (2.5 fold) και διατηρείται στα ίδια υψηλά επίπεδα και μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1 (Εικόνα 26A). Η μεγαλύτερη επαγωγή των επιπέδων mRNA της RhoB παρατηρείται μετά από 3 ώρες επίδρασης με TGFβ-1(3.3 fold). Όπως και στις άλλες δυο
κυτταρικές σειρές, ο TGFβ-1 δεν προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoA, παρατήρηση η οποία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο της RhoB αποτελεί ειδικό στόχο του μονοπατιού του TGFβ-1. Ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης σε κύτταρα HaCaT με τη χρησιμοποίηση αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει ειδικά την ενδογενή RhoB πρωτεΐνη η οποία έδειξε ότι ενώ η πρωτεΐνη RhoB βρίσκεται σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα στα κύτταρα αυτά, ο TGFβ-1 προκαλεί αρχικά (3 ώρες) μικρή αλλά στη συνέχεια (24 ώρες), μεγάλη συσσώρευση της πρωτεΐνη RhoB (Εικόνα 26B).

Αντίθετα και σε συμφωνία με αποτελέσματα από την RT-PCR ανάλυση, τα επίπεδα της ενδογενούς RhoA πρωτεΐνης ανιχνεύονται ιδιαίτερα υψηλά συγκριτικά με τα επίπεδα της πρωτεΐνης RhoB στα κύτταρα HaCaT και όχι μόνο δεν επηρεάζονται θετικά από την επώαση με TGFβ-1 αλλά στη πραγματικότητα παρατηρείται και μια μικρή μείωση τους μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1 (Εικόνα 26C).

Μια πρώτη ανάλυση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης RhoB μετά από επίδραση με TGFβ-1 πραγματοποιήθηκε και στα καρκινικά κύτταρα προστάτη, DU145 και PC3. Συγκεκριμένα, έγινε RT-PCR ανάλυση σε κύτταρα DU145 και PC3 μετά από επίδραση με TGFβ-1 για 3 ώρες καθώς και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης μετά από επίδραση TGFβ-1 για 24 ώρες. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27, επώαση με TGFβ-1 είχε ως αποτέλεσμα τόσο την αύξηση των επιπέδων mRNA όσο και των πρωτεϊνικών επιπέδων της RhoB



Εικόνα 26 : Ο TGFβ-1 προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτέινης της RhoB σε κύτταρα HaCaT. Κάθε δείγμα συγκρίνεται με δείγμα ελέγχου κυττάρων με ακριβώς τις ίδιες ώρες επώασης με χαμηλή (0.2%)ποσότητα ορού. Ανάλυση RT-PCR (A) και ανοσοαποτύπωσης (B,C) κυττάρων HaCaT μετά από επίδραση με TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. (A) H RT-PCR ανάλυση έγινε με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για την αναγνώριση του cDNA των RhoB, RhoA και GAPDH γονιδίων .Τα επίπεδα mRNA των RhoA και RhoB κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο GAPDH mRNA και η μέση τιμή από τρία ανεξάρτητα πειράματα παρατίθεται σε γράφημα (*, p<0,05, **, p<0,001). (B,C) Η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκε με αντισώματα ειδικά για την αναγνώριση των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και ακτίνη όπως αναγράφεται στην εικόνα.



Εικόνα 27 : Ο TGFβ-1 προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτέινης της RhoB σε κύτταρα DU145 και PC3. (Α) RT-PCR ανάλυση κυττάρων DU145 και PC3 μετά από επίδραση TGFβ-1 για 3 ώρες. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για την αναγνώριση του cDNA των RhoB και GAPDH γονιδίων. (Β) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης κυττάρων DU145 και PC3 κυττάρων μετά από επίδραση με TGFβ-1 για 24 ώρες με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις πρωτείνες RhoB και Tubulin.

Η μελέτη του μηχανισμού επαγωγής της έκφρασης της RhoB GTPάσης από τον TGFβ-1 πραγματοποιήθηκε στα κύτταρα HaCaT για το λόγο ότι η επαγωγή των επιπέδων mRNA του γονιδίου της από τον TGFβ-1 στα κύτταρα HaCaT είναι μεγαλύτερη από ότι στις άλλες κυτταρικές σειρές και τα HaCaT αποτελούν πολύ καλό κυτταρικό μοντέλο για τη μελέτη βιολογικών λειτουργιών που εξαρτώνται από τον TGFβ-1 όπως η μετακίνηση, ο πολλαπλασιασμός και η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή των κυττάρων.

<u>Το γονίδιο της RhoB αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του</u> μονοπατιού του TGFβ-1

Η αύξηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης της RhoB GTPάσης από τον TGFβ-1 είναι δυνατόν να οφείλεται είτε σε επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB είτε σε σταθεροποίηση των προϋπαρχόντων μορίων mRNA της RhoB μέσα στο κύτταρο. Προκειμένου να διελευκανθεί ποιο από τα δύο ενδεχόμενα ισχύει, κύτταρα HaCaT επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 ώρες παρουσία ή απουσία ενός γενικού αναστολέα της μεταγραφής, της ακτινομυκίνης D (5µg/ml). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28 (A&B), η παρουσία της ακτινομυκίνης D ανέστειλε την αύξηση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης της RhoB GTPάσης από τον TGFβ-1. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση της ακτινομυκίνης D στην έκφραση δύο καλά χαρακτηρισμένων γονιδίων στόχων του TGFβ-1 : το γονιδίο που κωδικοποιεί για τον αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF1} (p21) (*141*) και του γονιδίου του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου PAI-1 (*144*). Όπως αναμενόταν, η ακτινομυκίνη D ανέστειλε την ενεργοποίηση και των δύο γονιδίων από τον TGFβ-1 (Εικόνα 28A).

Στη συνέχεια μελετήθηκε εάν η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 είναι άμεση ή απαιτεί τη *de novo* σύνθεση νέων πρωτεϊνών η οποία εξαρτάται από τον TGFβ-1. Για το λόγο αυτό, έγινε ανάλυση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB σε κύτταρα HaCaT μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGFβ-1 για 3 ώρες παρουσία κυκλοεξαμιδίου

(20µg/ml) (cycloheximide-CHX) то οποίο αποτελεί αναστολέα της μετάφρασης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 28C, η παρουσία TOU κυκλοεξαμιδίου απουσία TGFβ-1 προκάλεσε σημαντική αύξηση (5.5-fold) στα επίπεδα mRNA του γονιδίου της RhoB, παρατήρηση η οποία έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες (52). Επίσης, η επώαση με κυκλοεξαμίδιο δε μπόρεσε να καταστείλει την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 (8-fold ενεργοποίηση παρουσία TGFβ-1 και κυκλοεξαμιδίου έναντι 2.9-fold παρουσία μόνο TGFβ-1, Εικόνα 28C) παρατήρηση η οποία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο της RhoB αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ-1. Επιπρόσθετα δείχθηκε ότι η παρουσία του κυκλοεξαμιδίου δε μπόρεσε να εμποδίσει την επαγωγή των γονιδίων p21^{WAF1} και PAI-1 από τον TGFβ-1 (Εικόνα 28C). Όπως αναμενόταν, το κυκλοεξαμίδιο ανέστειλε την επαγωγή της σύνθεσης της πρωτεΐνης RhoB από τον TGFβ-1 (Εικόνα 28D).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της εικόνας 28 δείχνουν ότι η επαγωγή της έκφραση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 στα κύτταρα HaCaT γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής και δεν χρειάζεται τη *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών αλλά μεσολαβείται από τα TGFβ-1-επαγώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια.



Εικόνα 28 : Το γονίδιο της RhoB GTΡάσης αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο των TGFβ-1-επαγώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών. Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε 0.2% FBS, προ-επωάστηκαν με 5μg/ml ακτινομυκίνης D (A & B) ή με 20μg/ml κυκλοεξαμίδιο (C & D) για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 επιπλέον ώρες. Κατόπιν έγινε ανάλυση RT-PCR των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για τα γονίδια RhoB, RhoA, p21, PAI-1 και GAPDH (A & C) και ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα για τις πρωτεΐνες RhoB και β-ακτίνη (B & D). Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, RhoA,p21 και PAI-1 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05, **, p<0,001).

Η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον ΤGFβ-1 χρειάζεται τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Smad αλλά και των MEK/ERK πρωτεϊνών

Όπως προαναφέρθηκε, ο TGFβ-1 επάγει εκτός από το Smad μονοπάτι και εναλλακτικά σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών σε διάφορους τύπους κυττάρων (71, 76). Προηγούμενες γονιδιωματικές μελέτες σε κύτταρα HaCaT τα οποία βρισκόταν σε διαδικασία επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής μετά από επίδραση με TGFβ-1, έδειξαν ότι η καταστολή του MEK/ERK σηματοδοτικού μονοπατιού επηρέασε αρνητικά την ενεργοποίηση πληθώρας γονιδίων συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου της RhoB (65).

Αρχικά, η ανίχνευση των σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία συμμετέχουν στην μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HaCaT με τη χρησιμοποίηση ειδικών αναστολέων της δράσης της κινάσης MEK και του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1, ALK5 παρουσία επίδρασης με TGFβ-1.

Επίδραση με TGFβ-1 για 3 ώρες σε κύτταρα HaCaT είχε ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της MAPK ERK κινάσης ενώ η παρουσία του αναστολέα της MEK1 κινάσης, U0126 (Εικόνα 29B) κατέστειλε τη φωσφορυλίωση αυτή σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (145-146). Η προ-επώαση με τον αναστολέα U0126 μπλόκαρε επίσης την ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 τόσο σε επίπεδο mRNA (Εικόνα 29A) όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (Εικόνα 29B). Σε αντίθεση με τη περίπτωση του γονιδίου της RhoB, ο αναστολέας U0126 δεν είχε επίδραση στην ενεργοποίηση των γονιδίων p21 και PAI-1 από τον TGFβ-1 (Εικόνα 29A). Επομένως, φαίνεται ότι η συμμετοχή του MEK/ERK σηματοδοτικού μονοπατιού στην δράση του TGFβ-1 είναι εξειδικευμένη για το γονίδιο της RhoB. Παρόμοιες παρατηρήσεις λήφθηκαν με τη χρησιμοποίηση ενός διαφορετικού αναστολέα δράσης της κινάσης MEK1, του PD98059 (Εικόνα 30).



Εικόνα 29 : Η γρήγορη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 μεσολαβείται από το MEK/ERK μονοπάτι. Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε 0.2% FBS, προ-επωάστηκαν ή όχι με 10μΜ U0126 αναστολέα για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 επιπλέον ώρες. Ακολούθησε (Α) ανάλυση RT-PCR των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για τα γονίδια RhoB, RhoA, p21, PAI-1 και GAPDH και (Β) ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα για τις πρωτεΐνες RhoB, φωσφορυλιωμένη και ολική ERK1/2 και β-ακτίνη. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, RhoA, p21 και στη την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05 **, p<0,001).



Εικόνα 30 : Η γρήγορη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 μεσολαβείται από το MEK/ERK μονοπάτι. Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε 0.2% FBS, προ-επωάστηκαν ή όχι με 20μΜ PD98059 αναστολέα για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 επιπλέον ώρες. Ακολούθησε (A) ανάλυση RT-PCR των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για τα γονίδια RhoB, RhoA, p21, PAI-1 και GAPDH. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, RhoA,p21 και PAI-1 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05 **).

Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της ERK από τον TGFβ-1 μετά από 24 ώρες επίδρασης γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση αυτή είναι γρήγορη μεν αλλά παροδική (Εικόνα 31). Σε συμφωνία με τη παρατήρηση αυτή, δείχθηκε ότι η μακροπρόθεσμη (μετά από 24 ώρες επίδρασης) επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 δεν επηρεάζεται από τη παρουσία του αναστολέα της δράσης της MEK1 κινάσης (Εικόνα 31). Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό ότι ελέγχθηκε επίσης η ενδεχόμενη δράση του μονοπατιού των JNK κινασών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 με τη χρησιμοποίηση ειδικού αναστολέα αλλά δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στην επαγωγή της έκφρασης της RhoB GTPάσης (data no shown). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα των Εικόνων 29-31 δείχνουν ότι η δράση του TGFβ-1 στην γρήγορη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB στα κύτταρα HaCaT μεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των MEK/ERK κινασών.



Εικόνα 31 : Η ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της ΕRK από τον TGFβ-1 δεν απαιτείται για τη μακροπρόθεσμη (24 ώρες) επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1. Κύτταρα HaCaT αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 0.2% FBS για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν ή μη με 10μΜ αναστολέα U0126 για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάστηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (30 λεπτά-24 ώρες). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα τέθηκαν προς RT-PCR ανάλυση με εκκινητές ειδικούς για τα cDNA των γονιδίων των RhoA και RhoB GTPασών και προς ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα για τη φωσφορυλιωμένη (P-ERK1/2) και ολική μορφή (ERK1/2) των πρωτεϊνών ERK1/2.

Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 ελέγχθηκε στα κύτταρα HaCaT με τέσσερις διαφορετικές προσεγγίσεις οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα είτε την καταστολή είτε την υπερέκφραση πρωτεϊνών του μονοπατιού. Συγκεκριμένα οι προσεγγίσεις ήταν οι εξής :

α) χρησιμοποίηση του ειδικού αναστολέα του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 (ALK5), SB431542

β) παροδική επιμόλυνση με siRNA ειδικού για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3

γ) υπερέκφραση μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών διαφορετικών
πρωτεϊνών του Smad μονοπατιού και

δ) μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της RhoB σε κύτταρα JEG-3 τα
οποία δεν εκφράζουν ενδογενή Smad3

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 32, προ-επώαση (για 1 ώρα) των κυττάρων HaCaT με τον αναστολέα του ALK5 SB431542, κατέστειλε την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB μετά από 3 ώρες επίδραση με

TGFβ-1. Το αποτελέσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών είναι απαραίτητο για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1. Ο αναστολέας του ALK5, SB431542, κατέστειλε επίσης την αύξηση των επιπέδων mRNA των γονιδίων p21 και PAI-1 από τον TGFβ-1 (Εικόνα 32A). Παρόμοια καταστολή της έκφρασης των τριών αυτών γονιδίων παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα HaCaT επωάσθηκαν με TGFβ-1 παρουσία του αναστολέα SB431542 για 24 ώρες (Εικόνα 33). Επομένως, φαίνεται ότι το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών χρειάζεται τόσο για τη γρήγορη όσο και για τη μακροπρόθεσμη ενεργοποίηση του γονιδίου της TGFβ-1. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έδειξε ότι η παρουσία του αναστολέα SB431542 ανέστειλε τη φωσφορυλίωση της Smad3 και την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της RhoB πρωτεϊνης (Εικόνες 32B & 33B).



Εικόνα 32 : Η γρήγορη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 μεσολαβείται από το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι. (A) Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε 0.2% FBS, προ-επωάστηκαν ή όχι με 10μΜ αναστολέα SB431542 για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 επιπλέον ώρες. Ακολούθησε (A) ανάλυση RT-PCR των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για τα γονίδια RhoB, RhoA, p21, PAI-1 και GAPDH και (B) ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα για τις πρωτεΐνες RhoB, φωσφορυλιωμένη και ολική Smad3, φωσφορυλιωμένη και ολική ERK1/2 και β-ακτίνη. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, RhoA, p21 και PAI-1 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05).



Εικόνα 33 : Η μακροπρόθεσμη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 μεσολαβείται από το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι. (A) Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε 0.2% FBS, προ-επωάστηκαν ή όχι με 10μM SB431542 αναστολέα για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 24 επιπλέον ώρες. Ακολούθησε ανάλυση (A) RT-PCR των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για τα γονίδια RhoB, RhoA και GAPDH και (B) ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα για τις πρωτεΐνες RhoB, φωσφορυλιωμένη και ολική Smad3 και β-ακτίνη. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, και RhoA σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05).

Η επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 παρουσιάστηκε σημαντικά ελαττωμένη σε κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με siRNA ειδικό για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3 σε σύγκριση με τα κύτταρα τα οποία είχαν επιμολυνθεί με μη ειδικό siRNA (siRNA ελέγχου) (1.7 fold έναντι 2.9 fold αντίστοιχα, Εικόνα 34A). Πανομοιότυπα αποτελέσματα προέκυψαν στη περίπτωση στην οποία τα κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν επιμολυνθεί με τα siRNAs επωάστηκαν με TGFβ-1 για 24 ώρες (Εικόνα 34C). Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έδειξε ότι η αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3 επηρέασε σημαντικά τα πρωτεινικά επίπεδα της GTΡάσης RhoB σε κύτταρα HaCaT στα οποία είχε γίνει επίδραση με TGFβ-1 είτε για 3 (Εικόνα 34B) είτε για 24 ώρες (Εικόνα 34D).



Εικόνα 34 : Η πρωτεΐνη Smad3 χρειάζεται για την επαγωγή της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1. Κύτταρα HaCaT μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNA ελέγχου (scrambled) ή siRNA ειδικού για τη πρωτεΐνη Smad3, αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 0.2% FBS και στη συνέχεια επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 (A,B) και για 24 (C,D) ώρες. (A,C) RT-PCR ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων με εκκινητές ειδικούς για τα γονίδια των RhoA και RhoB GTPασών. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, και RhoA σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05 **, p<0,001). (B,D) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με τη χρησιμοποίηση ειδικών αντισωμάτων για τις πρωτεΐνες RhoB, Smad3 και β-ακτίνη.

Ο ρόλος των πρωτεϊνών Smad ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές του γονιδιου της RhoB GTΡάσης στα κύτταρα HaCaT επιβεβαιώθηκε μέσω υπερέκφρασης των ALK5 και Smad πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Συγκεκριμένα όπως φαίνεται στην Εικόνα 35, η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1, ALK5ca, προκάλεσε σημαντική (5.7 fold) αύξηση των επιπέδων του mRNA (35A) και της πρωτεΐνης της RhoB (35B), ενώ η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Smad3 (αλλά όχι της πρωτεΐνης Smad2) σε συνδυασμό με επίδραση TGFβ-1 για 3 ώρες οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση (7.7 fold) των επιπέδων της πρωτεΐνης RhoB (35A,B).



Εικόνα 35 : Η υπερέκφραση μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 (ALK5ca) και των Smad πρωτεϊνών επιβεβαίωσε την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB GTPάσης από το ΤGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι. Κύτταρα HaCaT μολύνθηκαν με αδενοϊο ελέγχου (ad-LacZ) ή με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν τις πρωτεΐνες HA-tagged ALK5ca (ad-HA-ALK5ca), Flag-tagged Smad2 (ad-Flag-Smad2), ή Flag-tagged Smad3 (ad-Flag-Smad3), αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες 0.2% FBS και στη συνέχεια επώαστηκαν (+) η όχι (-) με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 ώρες. Ακολούθησε (Α) ανάλυση RT-PCR με εκκινητές ειδικούς για την αναγνώριση των cDNA των RhoA, RhoB και GAPDH γονιδίων. Το διαγράμμα δείχνει τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA των γονιδίων RhoB, και RhoA σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, p<0,05). (B) ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των υπερεκφρασμένων μέσω αδενοϊών πρωτεϊνών HA-ALK5ca, Flag-Smad2 and Flag-Smad3 με αντισώματα για τους επιτόπους HA και Flag οι οποίοι ανιχνεύουν τις πρωτεΐνες ALK5ca, Smad2 και Smad3 αντίστοιχα, αλλά και αντισώματα για τις πρωτεΐνες RhoB και β-tubulin.

Ο ρόλος του Smad σηματοδοτικού μονοπατιού στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 ελέγχθηκε επίσης σε κύτταρα ινοβλαστών Swiss3T3 μέσω της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3. Συγκεκριμένα, κύτταρα Swiss3T3 μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν τις πρωτεΐνες Smad2 (ad-Smad2) και Smad3 (ad-Smad3) ή τον αδενοϊό ελέγχου (ad-LacZ) και επωάσθηκαν (ή όχι) με TGFβ-1 για 2 ώρες. Η RT-PCR ανάλυση η οποία ακολούθησε έδειξε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Smad3 προκάλεσε σημαντική αύξηση (2.1 fold) των επιπέδων mRNA της RhoB ακόμη και απουσία επίδρασης με TGFβ-1 (Εικόνα 36). Η επώαση με TGFβ-1 ενίσχυσε ελαφρώς (2.3 fold έναντι 2.1fold) την επαγωγή αυτή. Αντιθέτως, η υπερέκφραση μέσω αδενοϊού της πρωτεΐνης Smad2 δεν είχε ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB απουσία (1.3 fold) ή παρουσία επίδρασης TGFβ-1 (1.9 fold) (Εικόνα 36).



Εικόνα 36 : Υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad μέσω αδενοϊών σε κύτταρα Swiss3T3 επιβεβαίωσε το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης Smad3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB GTPάσης. Κύτταρα Swiss3T3 τα οποία είχαν μολυνθεί με αδενοϊό ελέγχου (ad-LacZ) ή αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν τις πρωτεΐνες Smad2 (ad-Smad2) και Smad3 (ad-Smad3), αναπτύχθηκαν σε συνθήκες απουσίας ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν (ή όχι) με 5ng/ml TGFβ-1 για 2 ώρες. Για την RT-PCR ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για την αναγνώριση των cDNA των RhoA, RhoB και GAPDH γονιδίων Οι τιμές κάτω από την εικόνα PCR αντιπροσωπεύουν τις κανονικοποιημένες τιμές (από δύο ανεξάρτητα πειράματα) που αντιστοιχούν στα mRNA των RhoA και RhoB γονιδίων σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή mRNA του γονιδίου GAPDH.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν έως τώρα καθιστούν τη Smad3 και σε λιγότερο βαθμό τη Smad2, ενεργοποιητές της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB. Για περαιτέρω επιβεβαίωση των παρατηρήσεων αυτών, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά ανθρώπινου χοριοκαρκινώματος, JEG-3, η οποία δεν εκφράζει ενδογενώς την πρωτεΐνη Smad3 (147) και μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA των RhoA και RhoB γονιδίων μετά από επίδραση με TGFβ-1 απουσία ή παρουσία υπερεκφρασμένης μέσω αδενοιού πρωτείνης Smad3. Αναλυτικότερα, κύτταρα JEG-3 μολύνθηκαν είτε με τον αδενοϊο ελέγχου (ad-LacZ) είτε με αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την πρωτεΐνη Smad3, αναπτύχθηκαν σε συνθήκες απουσίας ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν (ή όχι) με TGFβ-1 για 24 ώρες. Ακολούθησε ανάλυση RT-PCR η οποία έδειξε ότι η επίδραση TGFβ-1 σε κύτταρα JEG-3 είχε ως αποτέλεσμα πολύ μικρή (1.6 fold) ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 37Α). Ωστόσο, ο TGFβ-1 παρουσία υπερεκφρασμένης (μέσω αδενοϊού) πρωτεΐνης Smad3 προκάλεσε μεγάλη (4.5 fold) αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 37Α). Σε συμφωνία με τα mRNA δεδομένα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της RhoB αυξήθηκαν σημαντικά μετά από επίδραση με TGFβ-1 μόνο παρουσία υπερεκφρασμένης Smad3 (Εικόνα 37Β).

Ο απαραίτητος ρόλος της πρωτεΐνης Smad3 στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 επιβεβαιώθηκε και μέσω μιας επιπρόσθετης προσέγγισης. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων RhoA και RhoB σε κύτταρα JEG-3 μετά από επίδραση TGFβ-1 για 3 και 24 ώρες παρουσία ή απουσία του αναστολέα δράσης της MEK1 κινάσης, U0126. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 38A, η επίδραση με TGFβ-1 και για τα δύο παραπάνω χρονικά διαστήματα δεν οδήγησε σε επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB. Ο TGFβ-1 δεν επάγει επίσης τη φωσφορυλίωση των κινασών ERK1/2 μετά από 3 ώρες επίδρασης, αξιοσημείωτο είναι όμως ότι τα επίπεδα των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 είναι ιδιαίτερα αυξημένα στα κύτταρα JEG-3 απουσία TGFβ-1 (Εικόνα 38B). Παρόλα αυτά και ενώ μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1, παρατηρείται αύξηση της φωσφορυλίωσης των ERK1/2, το mRNA του γονιδίου της RhoB δεν αυξάνει, πιθανότατα λόγω της απουσίας ενδογενούς Smad3 πρωτεΐνης στα κύτταρα αυτά.

Η συνεισφορά της πρωτεΐνης Smad3 στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ-1 μελετήθηκε με πείραμα κλασματοποίησης της ακτίνης σε κύτταρα JEG-3 μετά από μόλυνση με

αδενοϊο ελέγχου ή αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την πρωτεΐνη Smad3 και επίδραση με TGFβ-1 για 24 ώρες. Συγκεκριμένα, έγινε ανάλυση και ποσοτικοποίηση ανοσοαποτύπωσης των διαλυτών και αδιάλυτων σε Tritonx100 κλασμάτων του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Όπως φαίνεται στον πίνακα 7, ο λόγος G/ολική ακτίνη στα κύτταρα JEG-3 μετά από επίδραση με TGFβ-1 για 24 ώρες μειώνεται συγκριτικά με τα κύτταρα απουσία TGFβ-1, γεγονός που σημαίνει ότι ο TGFβ-1 επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης Smad3 στα κύτταρα JEG-3 προκάλεσε μείωση στο λόγο G/ολική ακτίνη, η οποία έγινε ακόμη μεγαλύτερη παρουσία επίδρασης TGFβ-1 και αντιστοιχεί σε καθαρή μετάβαση της ισορροπίας προς τη πολυμερισμένη ακτίνη. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη Smad3 είναι σημαντική για τον πολυμερισμό της ακτίνης ο οποίος μεσολαβείται από τον TGFβ-1 και τις Rho GTPάσες.



Εικόνα 37 : Ο TGFβ-1 επάγει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB σε κύτταρα JEG-3 μόνο παρουσία υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης Smad3. Κύτταρα JEG-3 τα οποία είχαν μολυνθεί με αδενοϊο ελέγχου (ad-LacZ) ή αδενοϊο ο οποίος εκφράζει τη πρωτεΐνη Smad3 (ad-Smad3), αναπτύχθηκαν σε συνθήκες απουσίας ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν (ή όχι) με 5ng/ml TGFβ-1 για 24 ώρες. Ακολούθησε (A) ανάλυση RT-PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για την αναγνώριση των cDNA των RhoA, RhoB και GAPDH γονιδίων Οι τιμές κάτω από την εικόνα PCR αντιπροσωπεύουν τις κανονικοποιημένες τιμές (από δύο ανεξάρτητα πειράματα) που αντιστοιχούν στα mRNA των RhoA και RhoB γονιδίων σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή mRNA του γονιδίου GAPDH (B) ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα ειδικά για τις πρωτεΐνες RhoB, Tubulin και τις φωσφορυλιωμένες και ολικές μορφές των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3.



Εικόνα 38 : Ο TGFβ-1 δεν επάγει μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB σε κύτταρα JEG-3 ακόμη και παρουσία φωσφωρυλιωμένων ERK1/2. Κύτταρα JEG-3 αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες απουσίας ορού, προ-επωάστηκαν ή όχι με 10μM U0126 αναστολέα για 1 ώρα και στη συνέχεια επωάσθηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 3 ή 24 επιπλέον ώρες. Ακολούθησε (Α) ανάλυση RT-PCR των κυτταρικών εκχυλισμάτων με τη χρησιμοποίηση εκκινητών ειδικών για τα γονίδια RhoB, RhoA και GAPDH. Οι τιμές κάτω από την εικόνα PCR αντιπροσωπεύουν τις κανονικοποιημένες τιμές (από δύο ανεξάρτητα πειράματα) που αντιστοιχούν στα mRNA των RhoA και RhoB γονιδίων σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή mRNA του γονιδίου GAPDH (B) ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα ειδικά για τις φωσφορυλιωμένες και ολικές μορφές των πρωτεϊνών ERK1/2.

Sample	G/Total actin	± stErr
adv-LacZ	0.45	0,01
adv-LacZ + TGF-β1	0.37*	0,05
ad-Smad3	0.40*	0,03
adv-Smad3 + TGF-β1	0.34*	0,05

Πίνακας 7 : Επίδραση της εκτοπικής έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3 στον πολυμερισμό της ακτίνης σε κύτταρα JEG-3. Κύτταρα JEG-3 (Smad3-/-) τα οποία είχαν μολυνθεί με αδενοϊό ελέγχου (ad-LacZ) ή αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την πρωτεΐνη Smad3 (ad-Smad3), αναπτύχθηκαν σε συνθήκες απουσίας ορού, και επωάστηκαν με TGFβ-1 για 24 ώρες. Τα διαλυτά και αδιάλυτα κλάσματα του κυτταροσκελετού της ακτίνης παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στα 'Υλικά και Μέθοδοι' και το περιεχόμενό τους αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση με αντισώμα που αναγνωρίζει την ακτίνη. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6 αντιστοιχούν στο λόγο G/ολική ακτίνη σε κάθε συνθήκη και είναι αντιπροσωπευτικά πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων.

Συμπερασματικά, τα δεδομένα των εικόνων 32-38 και του πίνακα 7, υποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών χρειάζεται για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 και ότι η Smad3 αποτελεί βασικό μεταγραφικό ρυθμιστή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB και του πολυμερισμού της ακτίνης σε απόκριση στον TGFβ-1.

Ο TGFβ-1 επάγει τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB

Στη συνέχεια ελέγχθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης η ενδεχόμενη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB μετά από επίδραση με TGFβ-1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 39, επώαση κυττάρων HaCaT με TGFβ-1 για 3 ώρες οδήγησε στη πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή (-313/-185) αλλά όχι στη μακρινή (-1605/-1326) περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Για τον έλεγχο των συνθηκών του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής του ανθρώπινου γονιδίου PAI-1 και συγκεκριμένα η περιοχή - 795/-615 του υποκινητή του και δείχθηκε ότι η πρωτεΐνη Smad3 προσδένεται σε αυτή μετά από επίδραση με TGFβ-1. Με αντίστοιχο τρόπο δείχθηκε ότι η Smad3 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB και σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2 στα οποία όπως προαναφέρθηκε ο TGFβ-1 επάγει την έκφρασή της (data no shown).



Εικόνα 39 : Στρατολόγηση της πρωτέινης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB σε κύτταρα HaCaT. (Α) Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής -1605/+1 του ανθρώπινου υποκινητή της RhoB. Τα βέλη δείχνουν τη θέση των εκκινητών οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Επίσης, παρατίθενται οι δύο αλληλοχίες TATA (TATA-1 και TATA-2). (Β) Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε κύτταρα HaCaT μετά από επίδραση (+TGFβ-1) ή μη (-TGFβ-1) 5ng/ml TGFβ-1 για 3 ώρες με τη χρησιμοποίηση πολυκλωνικού αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει τη πρωτεΐνη Smad3 για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης. Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με εκκινητές ειδικούς για τις περιοχές -1,605/-1,326 και -313/-185 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB αλλά και της περιοχής -795/-615 του υποκινητή του γονιδίου του PAI-1. Το input αντιστοιχεί στο 10% της χρωματίνης η οποία αντισώματος (-ab).

Η πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB επιβεβαιώθηκε και μέσω πειραμάτων κατακρήμνισης πρωτεϊνών μέσω DNA (DNA Affinity Precipitation, DNAP) όπως περιγράφεται στα 'Υλικά και Μέθοδοι'. Συγκεκριμένα, η υπερεκφρασμένη 6myc-Smad3 πρωτεΐνη προσδέθηκε στην βιοτινυλιωμένη περιοχή -161/+19 του υποκινητή της RhoB όπως επίσης και σε βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχου το οποίο περιέχει 4 αλληλουχίες πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad (4xCAGAC) αλλά με διαφορετική συγγένεια πιθανότατα λόγω της παρουσίας πολλαπλών στοιχείων SBE στο δεύτερο. Επιπρόσθετα βρέθηκε ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στο RhoB υποκινητή είναι άμεση καθώς σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain) της Smad3 (Smad3 R74K/K81R) κατέστειλαν την πρόσδεση αυτή (Εικόνα 40) (148).



Εικόνα 40 : Η πρωτεΐνη Smad3 προσδένεται άμεσα στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Πείραμα κατακρήμνισης πρωτεϊνών μέσω DNA (DNAP) με εκχυλίσματα από κύτταρα HEK293T τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με τους φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου πρωτεΐνης Smad3 (6myc-Smad3) ή της διπλά μεταλλαγμένης μορφής της (6myc-Smad3R74K/K81R). Χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές είτε βιοτινυλιωμένο προιόν PCR το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή -161/+19 του RhoB υποκινητή είτε βιοτινυλιωμένο δίκλωνο ολιγονουκλεοτίδιο το οποίο περιέχει τέσσερα αντίγραφα της αλληλουχίας SBE (4xCAGAC).

Για τη μελέτη του μηχανισμού της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB GTPάσης από τον TGFβ-1 έγινε κλωνοποίηση των υποκινητών των ανθρώπινων γονιδίων RhoA και RhoB σε σύντηξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης (Εικόνα 41A) και η χρησιμοποίησή τους σε πειράματα μέτρησης της δραστικότητας της λουσιφεράσης προκειμένου να ανιχνευθεί η απόκριση τους στο TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι. Αρχικά, οι δύο αυτές κατασκευές των υποκινητών -726/+86 RhoB-Luc και 799 /+166 RhoA-Luc υπερεκφράστηκαν σε κύτταρα HepG2 απουσία ή παρουσία φορέων έκφρασης της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1, ALK5ca, και των πρωτεϊνών Smad2, Smad3 και Smad4. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 41, η υπερέκφραση της ενεργής μορφής του υποδοχέα, ALK5ca, ενίσχυσε (2.2 fold) την ενεργότητα της περιοχής -726 /+86 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB ενώ παρουσία των υπερεκφρασμένων Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών η ενεργότητα αυτή ενισχύθηκε περισσότερο

(3.7 fold). Η υπερέκφραση των Smad2 και Smad4 πρωτεϊνών ενεργοποίησε τον υποκινητή της RhoB (2.3 fold) αλλά σε μικρότερο βαθμό από ότι η υπερέκφραση των Smad3 και Smad4 (3.4 fold) ενώ η παρουσία του υποδοχέα ALK5ca ενίσχυσε περαιτέρω και τη δράση των Smad2/Smad4 (2.6 fold) (Εικόνα 41B). Αντιθέτως, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών ALK5ca, Smad2/Smad4/ και Smad3/Smad4 προκάλεσε ελάχιστη (1.2-1.6 fold) ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoA (Εικόνα 41C). Επομένως, σε συμφωνία με τα δεδομένα από την RT-PCR ανάλυση, τα αποτελέσματα από τη μέτρηση της δραστικότητας των υποκινητών των RhoA και RhoB γονιδίων δείχνουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 στοχεύει και ενεργοποιεί μεταγραφικά εξειδικευμένα το γονίδιο της RhoB και ότι οι πρωτεΐνες Smad δρουν ως μεταγραφικοί ρυθμιστές του υποκινητή και κατ'επέκταση του γονιδίου της RhoB.

Στη συνέχεια, κλωνοποιήθηκε η κοντινή περιοχή (-227/+86) του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB και χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μέτρησης δραστικότητας λουσιφεράσης σε κύτταρα HaCaT. Δείχθηκε ότι η επίδραση με TGFβ-1 ή η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα ALK5 προκάλεσε αύξηση της ενεργότητάς του 42). То αποτέλεσμα συμφωνεί (Εικόνα αυτό Jμ то πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης της Εικόνας 39Β και επιβεβαιώνει τη στόχευση και ενεργοποίηση της κοντινής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από μονοπάτι TGFβ-1/Smad.



Εικόνα 41: Το TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι αυξάνει την ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της RhoB σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2. (A) Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδίων αναφοράς (-726/+86) RhoB-Luc και (-799/+166) RhoA-Luc τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μέτρησης της δραστικότητας λουσιφεράσης των (B,C). Το +1 αντιστοιχεί στη θέση έναρξης της μεταγραφής κάθε γονιδίου. (B,C) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα 1μg από τα πλασμίδια (-726 / +86) RhoB-Luc ή (-799 / +166) RhoA μαζί με τους φορείς έκφρασης της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 (ALK5ca) ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad2, Smad3 και Smad4 (1μg από το καθένα) όπως φαίνεται κάτω από κάθε ραβδόγραμμα. Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 42 : Ενεργοποίηση της κοντινής περιοχής του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB σε κύτταρα HaCaT από τον TGFβ-1. Κύτταρα HaCaT επιμολύνθηκαν παροδικά με τα 50ng από το πλασμίδιο (-227 / +86) RhoB-Luc και είτε επωάστηκαν με 10ng/ml TGFβ-1 για 24 ώρες είτε συν-επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 (ALK5ca) (1.5μg). Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμίδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Η κοντινή περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85/-54 είναι απαραίτητη και

<u>κποβ μεταξύ των νουκλεοποίων -85/-54 είναι απαραιτητη και</u> επαρκής για τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες <u>Smad</u>

Μια πρώτη έρευνα για θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων στην περιοχή -1605/+86 του ανθρώπινου υποκινητή του γονιδίου της RhoB αποκάλυψε την παρουσία τριών 'κλασικών' στοιχείων πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad (Smad Binding Elements SBEs: 5'- CAGAC-3') στις θέσεις -295/-290, -278/-274 και +20/+24 (Εικόνα 43Α). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43A, η ενεργότητα της περιοχή -1605/+86 του υποκινητή της RhoB τριπλασιάστηκε (3 fold) από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3/Smad4. Διαδοχικές απαλοιφές τμημάτων του 5' άκρου του υποκινητή της RhoB στις θέσεις -726, -227 και -85 δεν επηρέασαν την ενεργοποίηση του υποκινητή από τις πρωτεΐνες Smad (3 fold σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα SBEs των θέσεων

-295/-290 και -278/-274 πιθανότατα δεν είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των πρωτεϊνών Smad (Εικόνα 43A). Με παρόμοιο τρόπο, δείχθηκε ότι οι μεταλλαγμένες μορφές του 3' άκρου του υποκινητή του γονιδίου της RhoB -726/+19, -227/+19 και -85/+19 οι οποίοι δε φέρουν το κοντινό (+20 /+24) στοιχείο SBE ενεργοποιήθηκαν εξίσου αποτελεσματικά από τις πρωτεΐνες Smad (Εικόνα 42A). Επομένως, η πρώτη αυτή ανάλυση χαρτογράφησε τη περιοχή -85/+19 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB ως αυτή η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση από το TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν επιπλέον μεταλλαγμένες μορφές προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι η περιοχή -85/+19 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB είναι η μόνη περιοχή η οποία απαιτείται για ενεργοποίηση μέσω των πρωτεϊνών Smad. Οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές (-726/-85) RhoB/AdML και (-726/-227) RhoB/AdML ήταν σε σύντηξη με τη περιοχή -44/+1 του υποκινητή (AdML) του αδενοϊού και δεν περιείχαν τη κοντινή περιοχή -85/+19. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43A, καμία από τις παραπάνω κατασκευές δεν ενεργοποιήθηκε από τις υπερεκφρασμένες Smad3/Smad4 πρωτεΐνες επιβεβαιώνοντας ότι η περιοχή -85/+19 του υποκινητή της RhoB είναι αυτή που απαιτείται για την απόκριση στο TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι.



Εικόνα 43 : Η κοντινή περιοχή -85/-54 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. (A,B) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με 100ng από τα πλασμίδια αναφοράς που φέρουν τις μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή της RhoB σε σύντηξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης παράλληλα με φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 (1μα από το κάθε πλασμίδιο). Οι τιμές της σχετικής δραστικότητας λουσιφεράσης (+/- S.E.M) παρατίθενται ως fold ενεργοποίησης λόγω της υπερέκφρασης των Smad3/Smad4 πρωτεϊνών. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. Οι διαφορετικοί φορείς αναφοράς οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται με ευθείες γραμμές ενώ οι περιοχές οι οποίες απαλοίφθηκαν με διακεκομμένες γραμμές. Το βέλος αναφέρεται στο σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB. Οι αλληλουχίες των τριών δυνητικών θέσεων πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών (CAGAC) παρατίθενται υπογραμμισμένες. Επίσης απεικονίζονται οι δύο ΤΑΤΑ (ΤΑΤΑ-1και ΤΑΤΑ-2) αλληλουχίες του υποκινητή όπως επίσης και το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT-2 στο (B). AdML: adenovirus major late promoter (*, p<0.05, **, p<0.001)

Η περιοχή -85/+19 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB περιέχει δύο αλληλουχίες ΤΑΤΑ (ΤΑΤΑ- 1 και ΤΑΤΑ-2) όπως και ένα ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT (CCAAT-2) στη θέση -61/-57 το οποίο, όπως έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες, απαιτείται για την απόκριση του γονιδίου σε γενοτοξικό στρες (63). Προκειμένου να χαρτογραφηθεί με περισσότερη ακρίβεια η ελάχιστη περιοχή του υποκινητή της RhoB GTPάσης η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad, δημιουργήθηκαν δύο επιπλέον μεταλλαγμένες μορφές : η μια μορφή περιείχε τη περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και -54 σε σύντηξη με τη περιοχή AdML και η δεύτερη μορφή περιείχε τη περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και -54 σε σύντηξη με τη περιοχή AdML και η δεύτερη μορφή περιείχε τη περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και -54 σε σύντηξη με τη περιοχή AdML και η δεύτερη μορφή περιείχε τη περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -53 και +19. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 43B, η υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 προκάλεσε αύξηση (2.3 fold) της δραστικότητας του -85/-54 RhoB/AdML υποκινητή ενώ δε μπόρεσε να ενεργοποιήσει τον υποκινητή - 53/+19 RhoB (1.3 fold). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ελάχιστη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB η οποία απαιτείται για την ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad εντοπίζεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -84/-54. Παρόλα αυτά η βέλτιστη ενεργοποίηση προϋποθέτει τη παρουσία των δύο αλληλουχιών ΤΑΤΑ του γονιδίου της RhoB.

Η αλληλουχία CCAAT δεν είναι επαρκής για τη πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της <u>RhoB</u>

Η παρούσα μελέτη συνέχισε με τη διεξαγωγή πειραμάτων κατακρήμνισης πρωτεϊνών μέσω DNA (DNAP) με τη χρησιμοποίηση ενός δίκλωνου βιοτινυλιωμένου ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο αντιστοιχεί στην περιοχή -76/-44 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB η οποία περιέχει την αλληλουχία CCAAT-2 (Εικόνα 44Α). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 44Β, η πρωτεϊνη 6myc-Smad3 προσδέθηκε στο ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει την περιοχή -76/-44 όπως επίσης και στο θετικό ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχου το οποίο περιέχει πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Smad3 (4xCAGAC). Κατόπιν σχεδιάστηκε ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει διπλή σημειακή μεταλλαγή στην αλληλουχία CCAAT-2 η οποία καταστρέφει το ρυθμιστικό στοιχείο αυτό (Εικόνα 44Α). Η πρωτεΐνη Smad3 δε μπόρεσε να προσδεθεί στο μεταλλαγμένο ολιγονουκλεοτίδιο (-76/-44 RhoB CCAAT mut) (Εικόνα 44Β).

Προκειμένου να ελεγχθούν οι συνθήκες του πειράματος αλλά και η επιτυχία της μετάλλαξης του στοιχείου CCAAT-2 πραγματοποιήθηκαν πειράματα DNAP με εκχυλίσματα κυττάρων ΗΕΚ293Τ τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης 6myc-NF-YA και των πρωτεϊνών NF-YB, NF-YC οι οποίες δε φέρουν κάποιο επίτοπο. Όπως έχει δειχθεί σε παλαιότερη μελέτη, οι NF-Y μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε αλληλουχίες CCAAT ως ετεροτριμερή σύμπλοκα (149). Το NF-Y προσδέθηκε σύμπλοκο στο αγρίου τύπου -76/-44 RhoB ολιγονουκλεοτίδιο αλλά όχι σε αυτό με τις μεταλλαγές στην αλληλουχία CCAAT-2 (Εικόνα 44B). Σε συμφωνία με τα δεδομένα από τα πειράματα πρόδεσης στο DNA, μετρήσεις της δραστικότητας λουσιφεράσης όπου χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο αναφοράς -85/+19 RhoB-Luc το οποίο έφερε τις νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις στην αλληλουχία CCAAT-2 έδειξαν ότι η ενεργότητα της περιοχής αυτής του RhoB υποκινητή είναι σαφώς ελαττωμένη απουσία ή παρουσία υπερεκφρασμένων NF-Y και Smad3/Smad4 πρωτεϊνών (Εικόνα 44C). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη σημασία της αλληλουχίας CCAAT-2 τόσο για τη βασική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της RhoB όσο και για την ενεργοποίησή του από τους NF-Y και Smad3 μεταγραφικούς παράγοντες.

Η πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 θα μπορούσε είτε να μεσολαβείται αποκλειστικά από την αλληλουχία CCAAT-2 είτε να χρειάζεται επιπλέον αλληλουχίες (flanking sequences) οι οποίες βρίσκονται δεξιά και αριστερά του ρυθμιστικού στοιχείου CCAAT. Για να διευκρινιστεί ποιο από τα δύο ενδεχόμενα ισχύει, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατακρήμνισης πρωτεϊνών μέσω DNA (DNAP) με τη χρησιμοποίηση βιοτυλιωμένων ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία περιείχαν α) την αντίστοιχη περιοχή (-62/-28) του υποκινητή του γονιδίου της RhoA η οποία περιλαμβάνει την ίδια αλληλουχία CCAAT αλλά διαφορετικές γειτονικές αλληλουχίες (Εικόνα 45) και β) την περιοχή -125/-93 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB η οποία περιλαμβάνει την πάνω (upstream) αλληλουχία CCAAT (CCAAT-1, -110/-106).



Εικόνα 44: Οι παράγοντες NF-Y και Smad3 προσδένονται στην περιοχή -76/-44 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB και το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT είναι απαραίτητο για τη πρόσδεση αυτή. (Α) Η αλληλουχία της κοντινής περιοχής του ανθρώπινου RhoB υποκινητή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -161/+19. Οι αλληλουχίες των ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα κατακρήμνισης πρωτεϊνών μέσω DNA (DNAP) απεικονίζονται υπογραμμισμένες. Τα δύο ρυθμιστικά στοιχεία CCAAT (CCAAT-1 και CCAAT-2) παρουσιάζονται με βέλη και οι δύο σημειακές μεταλλάξεις οι οποίες πραγματοποιήθηκαν στον υποκινητή της RhoB παρατίθενται πάνω από την αλληλουχία. (B) Πείραμα DNAP στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από κύτταρα ΗΕΚ293Τ τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά είτε με το φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης 6myc-Smad3 είτε με τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών 6myc-NF-YA, NF-YB και NF-YC. Το δίκλωνο βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή -76/-44 του RhoB υποκινητή (αγρίου τύπου ή μεταλλαγμένο) και το ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει τις πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Smad3 (4xCAGAC) χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές. Οι πρωτεΐνες NF-YB και NF-YC δε μπορούν να ανιχνευθούν στην ανοσοαποτύπωση γιατί δε φέρουν επίτοπο. (C) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με 100ng από τα αναγραφόμενα πλασμίδια αναφοράς παράλληλα με φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών NF-Y ή Smad3/Smad4 (1μg από τον καθένα). Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε (*, p<0,05, **, p<0,001).



Εικόνα 45 : Ομολογία μεταξύ της κοντινής περιοχής των υποκινητών των γονιδίων RhoA και RhoB η οποία περιέχει τις αλληλουχίες CCAAT. Οι αριθμοί αναφέρονται στο σημείο έναρξης της μεταγραφής κάθε γονιδίου. Τα βέλη δείχνουν τη θέση και τη φορά των αλληλουχιών CCAAT σε κάθε αλληλουχία. h : άνθρωπος m: ποντίκι

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 46Α, η πρόσδεση της πρωτεΐνης 6myc-Smad3 στην περιοχή -62/-28 του RhoA υποκινητή ήταν σχεδόν μη ανιχεύσιμη γεγονός που υποδεικνύει ότι επιπρόσθετες γειτνιάζουσες του στοιχείου CCAAT αλληλουχίες χρειάζονται για τη πρόσδεση. Παράλληλα, ο μεταγραφικός παράγοντας NF-Y προσδέθηκε και στα δύο ολιγονουκλεοτίδια -125/-93 και -76/-44, τα οποία περιέχουν τις αλληλουχίες CCAAT-1 και CCAAT-2 αντίστοιχα, και μάλιστα με την ίδια συγγένεια σε αντίθεση με την πρωτεΐνη Smad3 η οποία δε μπόρεσε να προσδεθεί στην περιοχή -125/-93(Εικόνα 46B). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την παρατήρηση ότι η στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB περιορίζεται στην περιοχή -76/-44 και ότι το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT είναι μεν απαραίτητο αλλά δεν είναι από μόνο του επαρκές για την πρόσδεση αυτή.



Εικόνα 46 : Το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT είναι απαραίτητο αλλά όχι επαρκές για την πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή της RhoB. (A,B) Πειράματα DNAP στα οποία χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα από κύτταρα HEK293T τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά είτε με το φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης 6myc-Smad3 είτε με τους φορείς έκφρασης των πρωτεΐνών 6myc-NF-YA, NF-YB και NF-YC είτε με συνδυασμό Smad3 και NF-Y φορέων. Τα δίκλωνα βιοτινυλιωμένα ολιγονουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στις περιοχές - 76/-44 και -125/-93 του RhoB υποκινητή, στην περιοχή -62/-28 του RhoA υποκινητή και το ολιγονουκλεοτίδιο που φέρει τις πολλαπλές θέσεις πρόσδεσης της πρωτεΐνης Smad3 (4xCAGAC) χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές. Οι πρωτεΐνες NF-YB και NF-YC δε μπορούν να ανιχνευθούν στην ανοσοαποτύπωση γιατί δε φέρουν επίτοπο.

Τα πειράματα πρόσδεσης στο DNA που παρουσιάζονται στις Εικόνες 44B και 46A, υποδεικνύουν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad και NF-Y προσδένονται στις ίδιες ή αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις στην περιοχή -76/-44 του υποκινητή του γονιδίου της GTPάσης RhoB. Για το διαχωρισμό των πιθανοτήτων αυτών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα DNAP με τη χρησιμοποίηση εκχυλισμάτων κυττάρων HEK293T μετά από επιμόλυνση τους με τις τρεις πρωτεΐνες του NF-Y συμπλόκου και την πρωτεΐνη 6myc-Smad3 είτε χωριστά είτε σε συνδυασμό. Η παρουσία του NF-Y συμπλόκου κατέστειλε την πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στο ολιγονουκλεοτίδιο -76/-44 (Εικόνα 46B). Δεδομένου ότι ο NF-Y παράγοντας έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το

137

στοιχείο CCAAT, το παραπάνω αποτέλεσμα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πρόσδεση των πρωτεϊνών NF-Y και Smad3 στο στοιχείο αυτό είναι αμοιβαίως αποκλειώμενη και ότι η πρόσδεση του παράγοντα NF-Y ανταγωνίζεται αυτή της Smad3.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες Smad3 και NF-Y ενεργοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου της RhoB με μη συνεργατικό τρόπο

Η πρόσδεση των NF-Y και Smad3 μεταγραφικών παραγόντων σε αλληλοεπικαλυπτόμενες θέσεις της κοντινής περιοχής του RhoB υποκινητή οδήγησε στην ανάγκη μελέτης ενδεχόμενης συνεργατικής δράσης μεταξύ των παραγόντων αυτών στη ρύθμιση του γονιδίου της RhoB. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης της δραστικότητας λουσιφεράσης στα οποία οι παράγοντες NF-Y και Smad3 ήταν υπερεκφρασμένοι χωριστά ή ταυτόχρονα αλλα σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Στο πείραμα το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 47Α, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδια αναφοράς -85/+19 RhoB luc παράλληλα με σταθερή συγκέντρωση των φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών NF-YA, NF-YB και NF-ΥC (250μg από κάθε πλασμίδιο) απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πλασμιδίων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 (0.5-1μg από κάθε πλασμίδιο). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 47Α, η NF-Y επαγώμενη ενεργότητα του RhoB υποκινητή ενισχύθηκε κατά τρόπο αθροιστικό από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 και η ενίσχυση αυτή ήταν ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης τους. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθησαν και με το αντίστροφο πείραμα στο οποίο η ποσότητα των Smad3/Smad4 πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν σταθερή (1μg από το κάθε πλασμίδιο) ενώ οι φορείς εκφρασης των πρωτεϊνών του NF-Y συμπλόκου βρισκόταν σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (0.1-0.5μg από κάθε πλασμίδιο) (Εικόνα 47Β). Επομένως, η δράση των Smad και NF-Y παραγόντων στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB δε κρίνεται συνεργατική και φαίνεται ότι οι παράγοντες αυτοί δρουν ανεξάρτητα στη ρύθμιση του RhoB υποκινητή.



Εικόνα 47 : Η δράση των NF-Y και Smad παραγόντων στην ενεργοποιήση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB είναι αθροιστική και όχι συνεργατική. (A) Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-85/+19) RhoB-luc (100ng) μαζί με (A) φορείς έκφρασης του NF-Y συμπλόκου (NF-YA, NF-YB, NF-YC, 250 ng από κάθε πλασμίδιο) απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 (0.5-1 μg από κάθε πλασμίδιο) και (B) φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 (1μg από κάθε πλασμίδιο) απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 (1μg από κάθε πλασμίδιο) απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 (1μg από κάθε πλασμίδιο) απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων των φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών NF-YA, NF-YB και NF-YC (0.1- 0.5 από κάθε πλασμίδιο). Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε (*, p<0,05).

Η δράση του μονοπατιού των ΜΕΚ/ΕRΚ κινασών στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB είναι ανεξάρτητη της πυρηνικής μετατόπισης των NF-Y και Smad παραγόντων

Όπως προαναφέρθηκε το σηματοδοτικό μονοπάτι των MEK/ERK κινασών συμμετέχει στη TGFβ-1-επαγώμενη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο συμβαίνει αυτό παραμένει άγνωστος. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο TGFβ-1 επάγει την πυρηνική μετατόπιση του παράγοντα NF-YA μέσω της ενεργοποίησης του ERK μονοπατιού με αποτέλεσμα ο NF-YA να προσδένεται στη χρωματίνη και να ρυθμίζει τη TGFβ-1-επαγώμενη μεταγραφή του γονιδίου στόχου κυκλίνης A2 (150). Δεδομένου ότι οι παράγοντες NF-Y και Smad προσδένονται και ενεργοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου της RhoB, ο παραπάνω μηχανισμός θα μπορούσε να ισχύει και στη περίπτωση του γονιδίου της RhoB. Προκειμένου λοιπόν να διερευνηθεί το ενδεχόμενο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού και απομόνωσης κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων σε κύτταρα HaCaT μετά από επίδραση με TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (15-120 λεπτά) και ανιχνεύθηκε ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των NF-YA και Smad3 πρωτεϊνών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 48, ενώ η επίδραση με TGFβ-1 προκάλεσε τη γρήγορη συσσώρευση της πρωτεΐνης Smad3 στον πυρήνα, δεν επηρέασε τον εντοπισμό του NF-YA ο οποίος βρισκόταν στον πυρήνα είτε απουσία είτε παρουσία TGFβ-1. Επιπλέον, η χρησιμοποίηση του αναστολέα δράσης της MEK1 κινάσης δεν είχε καμία επίδραση στην TGFβ-1-επαγώμενη πυρηνική μετατόπιση της πρωτεΐνης Smad3 αλλά ούτε στον συστασιακό πυρηνικό εντοπισμό του NF-YA παράγοντα (Εικόνες 49&50). Επιπρόσθετα, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε κύτταρα HaCaT μετά από επίδραση TGFβ-1 παρουσία του αναστολέα της MEK1 έδειξαν ότι τα TGFβ-1 και MEK/ERK μονοπάτια δεν επηρεάζουν τη στρατολόγηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-YA στους υποκινητές των RhoB, p21 και PAI-1 γονιδίων (Εικόνα 51).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δεν υποστηρίζουν την ύπαρξη στα κύτταρα HaCaT ενός παρόμοιου με αυτόν της μελέτης (150) μηχανισμού ρύθμισης του NF-Y παράγοντα από τον TGFβ-1 και υποδεικνύουν ότι το TGFβ-1/MEK/ERK σηματοδοτικό μονοπάτι δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση της πυρηνο-κυτταροπλασματικής μεταφοράς των πρωτεϊνών NF-Y και Smad στα κύτταρα αυτά.



Εικόνα 48 : Ο TGFβ-1 δεν επηρεάζει τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του NF-YA στα κύτταρα HaCaT. Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες 0.2% ορού και στη συνέχεια επώαστηκαν (ή όχι) με 10ng/ml TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (15-120 λεπτά). Οι ενδογενείς πρωτεΐνες NF-YA και Smad3 ανιχνεύθηκαν με ανοσοφθορισμό με τη χρησιμοποίηση πρωτοταγών anti-NF-YA και anti-Smad3 αντισωμάτων και δευτεροταγών anti-mouse Alexa Fluor και anti-rabbit Alexa Fluor αντισωμάτων αντίστοιχα. Έγινε επίσης χρώση των πυρήνων με DAPI.



Εικόνα 49 : Το σηματοδοτικό μονοπάτι των ΜΕΚ/ΕRΚ κινασών δεν επηρεάζει τη TGFβ-1-επαγώμενη πυρηνική μετατόπιση της πρωτεΐνης Smad3 αλλά ούτε το συστασιακό πυρηνικό εντοπισμό του παράγοντα NF-YA σε κύτταρα HaCaT. Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες 0.2% ορού, προ-επωάστηκαν (+) ή όχι (-) για 1 ώρα με 10μΜ του αναστολέα της MEK1, U0126 και στη συνέχεια επώαστηκαν (ή όχι) με 10ng/ml TGFβ-1 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (15 λεπτά και 3 ώρες). Οι ενδογενείς πρωτεΐνες NF-YA και Smad3 ανιχνεύθηκαν με ανοσοφθορισμό με τη χρησιμοποίηση πρωτοταγών anti-NF-YA και anti-Smad3 αντισωμάτων και δευτεροταγών anti-mouse Alexa Fluor και anti-rabbit Alexa Fluor αντισωμάτων αντίστοιχα. Έγινε επίσης χρώση των πυρήνων με DAPI.



Εικόνα 50 : Η καταστολή της δράσης της κινάσης ΜΕΚ1 δεν επηρεάζει την πυρηνική συσσώρευση του παράγοντα NF-YA στα κύτταρα HaCaT. Κύτταρα HaCaT, αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε συνθήκες 0.2% FBS προ-επωάστηκαν(+) ή όχι (-) με 10μΜ αναστολέα της MEK1, U0126, και στη συνέχεια επωάστηκαν με 10ng/ml TGFβ-1 για 1 επιπλέον ώρα. Ίσες ποσότητες κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων τέθηκαν σε αναλύση ανοσοαποτύπωσης με τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων ειδικών για την αναγνώριση των πρωτεϊνών NF-YA, Smad3, Sp1 και των φωσφορυλιωμένων και ολικών ERK1/2 πρωτεϊνών. C : κυτταροπλασματικό, N : πυρηνικό



Εικόνα 51 : Η καταστολή της δράσης της κινάσης MEK1 δεν επηρεάζει την πρόσδεση του παράγοντα NF-YA στους υποκινητές γονιδίων στόχων του TGFβ-1 σε κύτταρα HaCaT. Πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε κύτταρα HaCaT τα οποία αφού προεπωάστηκαν ή όχι με 10μΜ αναστολέα της MEK1, U0126, στη συνέχεια επωάστηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 1 επιπλέον ώρα. Για την ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα τα οποία αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες NF-YA και Smad3. Στις αντιδράσεις ελέγχου δεν προστέθηκε αντίσωμα στην ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (-ab). Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με εκκινητές που ανθρώπινου p21 υποκινητή και -795/-615 του ανθρώπινου PAI-1 υποκινητή. Το input αντιστοιχεί στο 10% της χρωματίνης η οποία χρησιμοποιήθηκε σε κάθε ανοσοκατακρήμνιση.
Η TGFβ-1-επαγώμενη στρατολόγηση της πρωτεΐνη Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB GTΡάσης εξαρτάται από το μονοπάτι των MEK/ERK κινασών και την ογκοκατασταλτική <u>πρωτεΐνη p53</u>

Προηγούμενες μελέτες αποκάλυψαν ένα νέο μηχανισμό επικοινωνίας μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών TGFβ-1/Smad και MAPK μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης p53 (151). Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση του MEK/ERK μονοπατιού επάγει τη φωσφορυλίωση στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης p53 η οποία στη συνέχεια διευκολύνει την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών p53 και Smad (151). Ακόμη πιο πρόσφατα, έγινε γνωστό ότι το μονοπάτι του TGFβ-1 δρα συνεργατικά με αυτό του ογκογονιδίου Ras και μιας μεταλλαγμένης μορφής της πρωτεΐνης ρ53 με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου των πρωτεϊνών p53/p63/Smad το οποίο ανταγωνίζεται τις λειτουργίες της πρωτεΐνες p63 και ευνοεί τη μετακίνηση των κυττάρων και τη μετάσταση (152). Δεδομένου ότι ο TGFβ-1 επάγει τη φωσφορυλίωση της ERK πρωτεΐνης στα κύτταρα HaCaT τα οποία εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 (153) η παρούσα μελέτη συνέχισε με τη διερεύνηση του ενδεχόμενου ρόλου της μεταλλαγμένης πρωτείνης p53 στη ρύθμιση του γονιδίου της RhoB GTPάσης από το TGFβ-1/Smad σηματοδοτικό μονοπάτι στα κύτταρα αυτά. Αρχικά, αναλύθηκε ο ρόλος του ΜΕΚ/ERK μονοπατιού στη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του RhoB υποκινητή μετά από επίδραση με TGFβ-1 σε κύτταρα HaCaT. Συγκεκριμένα, κύτταρα HaCaT προεπωάστηκαν (ή όχι) με τον αναστολέα δράσης της κινάσης ΜΕΚ1, U0126 για 1 ώρα, επωάστηκαν με TGFβ-1 για μια επιπλέον ώρα και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 52A, η επίδραση με TGFβ-1 ενίσχυσε 2.5 φορές (2.5 fold) τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB ενώ ο αναστολέας της MEK1 κατέστειλε την πρόσδεση αυτή. Στη συνέχεια, κύτταρα HaCaT επιμολύνθηκαν παροδικά είτε με siRNA ελέγχου είτε με siRNA ειδικό για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 (Εικόνα 52C), επωάστηκαν με TGFβ-1 για 1 ώρα και

υποβλήθηκαν σε ανάλυση ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης με τη χρησιμοποίηση αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει ειδικά την πρωτεΐνη Smad3. Η αποσιώπηση της έκφρασης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 είχε ως αποτέλεσμα τη καταστολή της TGFβ-1-επαγώμενης στρατολόγησης της ενδογενούς πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 52B). Τα αποτελέσματα των Εικόνων 29 και 52 υποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των MEK/ERK κινασών συνεργάζεται με αυτό των πρωτεΐνών Smad και με την ενδογενή μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της GTPάσης RhoB ως απόκριση στον TGFβ-1.



Εικόνα 52 : Η καταστολη της ορασης της ΜΕΚ1 κινασης η αποσιωπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 εμπόδισε τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB. (A,B) Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε κύτταρα HaCaT τα οποία είτε (A) είχαν προ-επωαστεί για 1 ώρα (ή όχι) με 10μΜ του αναστολέα της ΜΕΚ1, U0126 και επωαστεί με 10ng/ml TGFβ-1 για 1 επιπλέον ώρα είτε (B) είχαν επιμολυνθεί παροδικά με siRNA ελέγχου (Scr) ή με siRNA ειδικό για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 και επωαστεί με 10ng/ml TGFβ-1 για 1 ώρα. Στις ανοσοκατακρημνίσεις χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει την ενδογενή πρωτεΐνη Smad3. Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν με εκκινητές οι οποίοι αντιστοιχούν στην περιοχή -313/-185 του ανθρώπινου RhoB υποκινητή. Οι τιμές του διαγράμματος αναφέρονται στην αύξηση τη πρόσδεσης της πρωτεΐνης Smad3 στο RhoB υποκινητή σε σύγκριση με την αντίδραση ελέγχου η οποία πραγματοποιήθηκε απουσία αντισώματος. (*, p<0,05). (C) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης ολικών εκχυλισμάτων κυττάρων HaCaT τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με siRNA ελέγχου (Scr) ή με siRNA ειδικό για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης p53 με τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων ειδικών για την αναγνώριση των πρωτεϊνών p53 και ακτίνη.

Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 στις TGFβ-1-επαγώμενες κυτταρικές λειτουργίες

Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μετακίνηση των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1

Η μελέτη του δυνητικού ρόλου της μικρής GTPάσης RhoB σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες οι οποίες επάγονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 εστιάστηκε αρχικά στη διερεύνηση της συμμετοχής της RhoB πρωτεΐνης στη μετακίνηση των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1. Μια πρώτη προσπάθεια ανίχνευσης πιθανής δράσης της πρωτεΐνης RhoB έγινε με τη χρησιμοποίηση της τοξίνης Clostridial botulinum exoenzyme C3 transferase, η οποία καταστέλει τη δράση των πρωτεΐνών RhoA, RhoB και RhoC, σε κύτταρα καρκίνου προστάτη PC3 απουσία ή παρουσία TGFβ-1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 53, η επώαση των κυττάρων PC3 με τη C3 transferase προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία και στη κινητικότητα των κυττάρων ενώ η επίδραση με TGFβ-1 διέσωσε μερικώς το φαινότυπο αυτό.



Εικόνα 53: Η καταστολή της δράσης των πρωτεϊνών RhoA,RhoB και RhoC προκαλεί σημαντικές μεταβολές στη μορφολογία και στη μετακίνηση των κυττάρων οι οποίες όμως διασώζονται μερικώς από την επίδραση του TGFβ-1. Κύπαρα PC3 αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 1% FCS για 24 ώρες, επωάστηκαν με 1μg/ml C3 transferase για 1 ώρα και στη συνέχεια στο θρεπτικό τους μέσο προστέθηκε TGFβ-1 (10ng/ml) για 17 επιπλέον ώρες. Καθόλη τη διάρκεια της επώασης τα κύπαρα βρισκόταν σε συνθήκες 37⁰C και 5% C0₂ σε θάλαμο μικροσκοπίου Timelapse όπου γινόταν λήψη φωτογραφιών ανά 5 λεπτά με 20Χ φακό.

Στη συνέχεια η μελέτη εστιάστηκε στην ανάλυση της μετακίνησης τριών κυτταρικών μοντέλων: των φυσιολογικών κυττάρων HaCaT και δύο καρκινικών σειρών προστάτη, των κυττάρων DU145 και PC3 μετά από επίδραση TGFβ-1 σε συνθήκες καταστολής της δράσης ή της έκφρασης της RhoB πρωτεΐνης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα επούλωσης πληγής (wound healing) με τη χρησιμοποίηση του συστήματος Oris[™] στις παραπάνω κυτταρικές σειρές είτε μετά από αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB μέσω ειδικού siRNA είτε μετά από υπερέκφραση μέσω αδενοϊού της επικρατούσας ανενεργής μορφής της (adRhoBN19). Αρχικά, όπως φαίνεται στην Εικόνα 54, η επίδραση με TGFβ-1 για 24-48 ώρες οδήγησε σε αύξηση της μετακίνησης των κυττάρων HaCaT και DU145, ενώ η απώλεια της δράσης ή της έκφρασης της RhoB πρωτεΐνης DU145) της μετακίνησης των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1.

Παρόμοια αποτελέσματα λήφθησαν και στα PC3 κύτταρα με τη διαφορά ότι η επίδραση του TGFβ-1 στη μετακίνησή τους ήταν μικρότερη σε σχέση με αυτή των HaCaT και DU145 κυττάρων και ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB μέσω δύο διαφορετικών siRNAs κατέστειλε σε κάποιο βαθμό και τη μετακίνηση τους απουσία TGFβ-1 (Εικόνες 55 & 56). Στα κύτταρα PC3 διερευνήθηκε επίσης ο ρόλος των πρωτεϊνών RhoA και RhoC στην TGFβ-1-επαγώμενη μετακίνηση. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 56, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης RhoA δεν φαίνεται να επιδρά αρνητικά στη κυτταρική μετακίνηση η οποία επάγεται από τον TGFβ-1 σε αντίθεση με τη πρωτεΐνη RhoC η αποσιώπηση της οποίας καταστέλει σημαντικά τη μετακίνηση των κυττάρων PC3 απουσία και παρουσία TGFβ-1. Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί επίσης το γεγονός ότι η αποσιώπηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoC επάγει την αύξηση των επιπέδων mRNA της RhoB, χωρίς όμως να συμβαίνει και το αντίστροφο δηλαδή η αποσιώπηση της έκφρασης της RhoB να επηρεάζει τα επίπεδα mRNA των RhoA και RhoC,(Εικόνα 56B) αφήνοντας ενδείξεις για πιθανή αρνητική ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της GTPάσης RhoB από τα άλλα μέλη της Rho υποοικογένειας.



Εικόνα 54: Η πρωτεΐνη RhoB εμπλέκεται στη μετακίνηση των κυττάρων HaCaT και DU145 η οποία επάγεται από τον TGFβ-1. Κύτταρα HaCaT (A, B) και DU145 (D, E) επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ελέγχου (Scr-siRNA) ή με siRNA ειδικού για την αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της RhoB (RhoB-siRNA) (A,D) ή μολύνθηκαν με αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν τη πρωτεΐνη GFP (ad-GFP MOI:100) ή την επικρατούσα ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης RhoB (ad-GFPmycRhoBN19 MOI:100) (B,E). Μετά από 24-36 ώρες, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 96-well σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Oris[™] Cell Migration System και επωάστηκαν με 10ng/ml TGFβ-1 για 48 επιπλέον ώρες. Οι φωτογραφίες λήφθησαν από μικροσκόπιο Timelapse με 5Χ φακό στη στιγμή μηδέν και μετά από 48 ώρες. Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη μετακίνηση των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (Scr-siRNA, ad-GFP) (* p<0.05). (C,F) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων HaCaT (C) ή DU145 (F) τα οποία είτε είχαν επιμολυνθεί παροδικά με τα Scr-siRNA και RhoB-siRNA είτε είχαν μολυνθεί με τους αδενοϊούς ad-GFP και ad-GFPmycRhoBN19. Η ανάλυση έγινε με τη χρησιμοποίηση των ακόλουθων αντισωμάτων : anti-RhoB, anti-β-tubulin, anti-myc (το οποίο αναγνωρίζει τον 6myc επίτοπο της RhoBN19 πρωτεΐνης) και anti-GFP.



Εικόνα 55: Η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoB μπλοκάρει τη μετακίνηση κυττάρων PC3 ως απόκριση στον TGFβ-1. (A) Κύτταρα PC3 μολύνθηκαν με αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν τη πρωτεΐνη GFP (ad-GFP MOI:100) ή την επικρατούσα ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης RhoB (ad-GFPmycRhoBN19 MOI:100). Μετά από 24-36 ώρες, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 96-well σύμφωνα με το πρωτόκολλο του OrisTM Cell Migration System και επωάστηκαν με 10ng/ml TGFβ-1 για 24 επιπλέον ώρες. Οι φωτογραφίες λήφθησαν από μικροσκόπιο Timelapse με 5X φακό στη στιγμή μηδέν και μετά από 24 ώρες. Το διάγραμμα απεικονίζει τη μετακίνηση των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (ad-GFP). (B) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων PC3 τα οποία είχαν μολυνθεί με τους αδενοϊούς ad-GFP και ad-GFPmycRhoBN19. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα : anti-β-tubulin και anti-myc (το οποίο αναγνωρίζει τον 6myc επίτοπο της RhoBN19 πρωτεΐνης).



Εικόνα 56: Οι πρωτέϊνες RhoB και RhoC εμπλέκονται στη μετακίνηση των κυττάρων PC3 απουσία και παρουσία TGFβ-1. (Α) Κύτταρα PC3 επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ελέγχου (Scr-siRNA) ή με ειδικών siRNAs για την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων των RhoA (RhoA-siRNA) RhoB (RhoB-siRNA #1 & #2) και RhoC (RhoC-siRNA). Μετά από 24-36 ώρες, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 96-well σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Oris[™] Cell Migration System και επωάστηκαν με 10ng/ml TGFβ-1 για 24 επιπλέον ώρες. Οι φωτογραφίες λήφθησαν από μικροσκόπιο Timelapse με 5Χ φακό στη στιγμή μηδέν και μετά από 24 ώρες. Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη μετακίνηση των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (Scr-siRNA). (Β) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων PC3 τα οποία είχαν επιμολυνθεί παροδικά με τα αναγραφόμενα siRNAs. Η ανάλυση έγινε με τη χρησιμοποίηση των ακόλουθων αντισωμάτων : anti-RhoA, anti-RhoB, anti-RhoC και anti-β-tubulin.

Η παρατήρηση ότι η πρωτεΐνη RhoC σε αντίθεση με τη RhoA παίζει σημαντικό θετικό ρόλο στη μετακίνηση των κυττάρων PC3 διερευνήθηκε περαιτέρω σε κύτταρα HaCaT. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επούλωσης πληγής με τη χρησιμοποίηση του συστήματος OrisTM σε κύτταρα HaCaT είτε μετά από μόλυνση με αδενοϊούς που εκφράζουν την αγρίου τύπου ή την επικρατούσα ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης RhoA (A) είτε μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNAs ειδικά για την αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA και RhoC (B). Και στις δύο περιπτώσεις ακολούθησε επώαση των κυττάρων με TGFβ-1 για 48 ώρες.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών κρίνονται ιδιαίτερα ενδιαφέροντα καθώς βρέθηκε ότι η καταστολή της δράσης ή η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoA προκάλεσε πολύ μεγάλη αύξηση τόσο των βασικών όσο και των TGFβ-1-επαγώμενων επιπέδων μετακίνησης των κυττάρων HaCaT (Εικόνα 57). Αντίστοιχα, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoA είχε παρόμοιο αποτέλεσμα με αυτό της καταστολής της δράσης της πρωτεΐνης RhoA, δηλαδή μείωση της μετακίνησης (Εικόνα 57Α). Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC προκάλεσε επίσης αύξηση αλλά μικρότερη από αυτή της πρωτεΐνης RhoA στη μετακίνηση των κυττάρων HaCaT (Εικόνα 57Β) γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του ίδιου πειράματος στα κύτταρα PC3 στα οποία είχε προκαλέσει αισθητή μείωση στη κινητικότητα τους (Εικόνα 56Α).



Εικόνα 57: Η καταστολή της δράσης ή η αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA και RhoC έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της μετακίνησης κυττάρων HaCaT απουσία και παρουσία TGFβ-1. Κύτταρα HaCaT (A) μολύνθηκαν με αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν τη πρωτεΐνη GFP (ad-GFP MOI:100), την αγρίου τύπου ή την επικρατούσα ανενεργή μορφή της πρωτεΐνης RhoA (ad-GFPRhoAwt και ad-GFPRhoAN19 αντίστοιχα MOI:100) ή (B) επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ελέγχου (Scr-siRNA) ή με ειδικών siRNA για την αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων RhoA (RhoA-siRNA) και RhoC (RhoCsiRNA). Μετά από 24-36 ώρες, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 96-well σύμφωνα με το πρωτόκολλο του OrisTM Cell Migration System και επωάστηκαν με 10ng/ml TGFβ-1 για 48 επιπλέον ώρες. Οι φωτογραφίες λήφθησαν από μικροσκόπιο Timelapse με 5X φακό στη στιγμή μηδέν και μετά από 48 ώρες. Τα διαγράμματα απεικονίζουν τη μετακίνηση των κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (Scr-siRNA, ad-GFP).

<u>Μέτρηση της επίδρασης των πρωτεϊνών Rho και του TGFβ-1 στη</u> τυχαία μετακίνηση (random migration) κυττάρων DU145 και PC3

Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η δράση των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC στη τυχαία μετακίνηση κυττάρων DU145 και PC3 ως απόκριση στο μονοπάτι του TGFβ-1. Αρχικά, έγινε μια προσπάθεια ανίχνευσης ενδεχόμενων μορφολογικών αλλαγών των κυττάρων PC3 μετά από αποσιώπηση καθενός από τα μέλη της υποοικογένειας των Rho πρωτεϊνών με τη χρησιμοποίηση μικροσκοπίου Timelapse. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της πρωτεΐνης RhoB μετατρέπει τα κύτταρα σε πιο μικρά και σφαιρικά, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης RhoA τα μετατρέπει σε πιο επιμήκη με μακριές προσφύσεις ενώ η αποσιώπηση της πρωτεΐνης RhoC προκαλεί ένα ενδιάμεσο φαινότυπο μεταξύ αυτών των RhoA και RhoB ο οποίος αντιστοιχεί σε ανομοιογενές μείγμα πληθυσμού κυττάρων (Εικόνα 58).

Ακολούθησαν πειράματα στα οποία μετρήθηκε η ταχύτητα της τυχαίας μετακίνησης κυττάρων DU145 και PC3 μετά από αποσιώπησης της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC και επίδραση με TGFβ-1. Η κίνηση των κυττάρων παρατηρήθηκε με μικροσκόπιο Timelapse σε συνθήκες 37⁰C και 5% C0₂ για 16 ώρες μετά τη προσθήκη του TGFβ-1 ενώ καθόλη τη διάρκεια γινόταν λήψη φωτογραφιών ανά 5 λεπτά. Η ταχύτητα των κυττάρων σε μΜ/λεπτό μετρήθηκε με το Image J software. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 59, η επίδραση με TGFβ-1 επάγει μια μικρή αύξηση της ταχύτητας μετακίνησης των κυττάρων DU145 ενώ ακόμη μικρότερη είναι η αύξηση στη ταχύτητας μετακίνησης των κυττάρων PC3. Ωστόσο, η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB προκάλεσε σημαντική μείωση στη ταχύτητα μετακίνησης και των δύο κυτταρικών σειρών και ο TGFβ-1 απουσία της πρωτεΐνης RhoB δεν μπόρεσε να επαναφέρει στα αρχικά επίπεδα ούτε καν να αυξήσει τη ταχύτητα των κυττάρων αυτών. Στα κύτταρα PC3 η επίδραση TGFβ-1 μάλιστα προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη μείωση της ταχύτητας τους συγκριτικά με τη μείωση μόνο από την αποσιώπηση της πρωτεΐνης RhoB (Εικόνα 59Β).

Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoA είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας μετακίνησης των κυττάρων DU145 και PC3 απουσία TGFβ-1. Παρόλα αυτά στα κύτταρα DU145 η επίδραση με TGFβ-1 αύξησε τη ταχύτητα μετακίνησης τους και την επανέφερε στα ίδια επίπεδα με αυτά του δείγματος ελέγχου (Scr-siRNA +TGFβ-1) (Εικόνα 59Α) ενώ στα κύτταρα PC3 δε προκάλεσε καμία επιπλέον αλλαγή στη ταχύτητα τους (Εικόνα 59Β).

Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC δε προκάλεσε σημαντική αλλαγή στη ταχύτητα κίνησης των κυττάρων DU145 ενώ η επίδραση με TGFβ-1 αύξησε τη ταχύτητα αλλά λιγότερο σε σχέση με την αύξηση της ταχύτητας των κυττάρων ελέγχου (Scr-siRNA +TGFβ-1) (Εικόνα 59A). Αντίθετα αλλά σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τα πειράματα επούλωσης πληγής (Εικόνα 56A), στα κύτταρα PC3 η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC είχε αρνητική επίδραση στη ταχύτητα της μετακίνησης τους και η επίδραση με TGFβ-1 έκανε εντονότερο το φαινόμενο αυτό (Εικόνα 59B).



Εικόνα 58: Μορφολογικές αλλαγές των κυττάρων PC3 λόγω της αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC. Κύτταρα PC3 επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ελέγχου (control siRNA) ή με ειδικών siRNAs για την αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC όπως αναγράφεται πάνω από κάθε εικόνα. Μετά από περίπου 36 ώρες τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο μικροσκοπίου Timelapse σε συνθήκες 37⁰C και 5% CO₂ όπου γινόταν λήψη φωτογραφιών ανά 5 λεπτά με 10Χ φακό.



Εικόνα 59: Η αποσιώπηση των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC προκαλεί μεταβολές στη ταχύτητα μετακίνησης κυττάρων DU145 και PC3 απουσία και παρουσία TGFβ-1. Κύτταρα PC3 επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ελέγχου (control siRNA) ή με ειδικών siRNAs για την αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC όπως αναγράφεται στο κάτω μέρος κάθε διαγράμματος. Στη συνέχεια τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ώρες (κατά τη διάρκεια των οποίων αραιώθηκαν σε νέο τρυβλίο 20.000 κύτταρα/well σε 24-well τρυβλίο) σε συνθήκες 1% FCS και αφού προστέθηκε στο θρεπτικό τους TGFβ-1 (10ng/ml) μεταφέρθηκαν σε θάλαμο μικροσκοπίου Timelapse σε συνθήκες 37⁰C και 5% CO₂ όπου γινόταν λήψη φωτογραφιών ανά 5 λεπτά με 10Χ φακό για 16 επιπλέον ώρες. Η ανάλυση των ταινιών και η μέτρηση της ταχύτητας των κυττάρων έγινε με τη χρησιμοποίηση των Metamorph και Image J software.

Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 στην TGFβ-1-επαγώμενη Επιθηλιο-Μεσεγχυματική Μετατροπή (ΕΜΤ) κυττάρων HaCaT

Τα κύτταρα HaCaT, τα οποία αποτέλεσαν το κύριο κυτταρικό μοντέλο μελέτης του μηχανισμού ρύθμισης του γονιδίου της GTPάσης RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1, είναι γνωστό ότι μετά από επίδραση TGFβ-1 υφίστανται σταμάτημα του πολλαπλασιασμού τους (growth arrest) αλλά και επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) (*154*). Η διαδικασία EMT των κυττάρων παίζει σημαντικό ρόλο καθόλη τη διάρκεια της ζωής τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και σε παθολογικές διεργασίες όπως η μετάσταση του καρκίνου. Παρόλο που αρκετές κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες έχουν βρεθεί να εμπλέκονται στην EMT, ο TGFβ-1 έχει ταυτοποιηθεί ως η κινητήρια δύναμη της διαδικασίας αυτής. Πρόσφατα δείχθηκε επίσης ότι η επαγωγή της EMT από τον TGFβ-1 χρειάζεται την δράση των Rho GTPασών σε πληθώρα κυτταρικών τύπων (*129, 136, 155-158*).

Κατά τη διαδικασία της ΕΜΤ, παρατηρείται επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών των μεσεγχυματικού φαινοτύπου των κυττάρων όπως οι Ν-Cadherin, Vimentin και Fibronectin αλλά και μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών του επιθηλιακού φαινοτύπου των κυττάρων όπως οι E-Cadherin, α & γ-Catenin (131). Η πρωτεΐνη E-Cadherin αποτελεί βασικό συστατικό των διακυτταρικών συνδέσμων και χρειάζεται τόσο για το σχηματισμό του επιθηλίου στο έμβρυο όσο και για τη διατήρηση της ομοιόστασής του στον ενήλικα. Απώλεια της έκφρασης της E-Cadherin αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα της ΕΜΤ και παρατηρείται κατά την ανάπτυξη αλλά και στο καρκίνο και μάλιστα τα επίπεδα έκφρασής της είναι αντιστρόφως ανάλογα του σταδίου και της έκτασης του καρκίνου. Η κληρονόμηση ενός μεταλλαγμένου αλληλόμορφου του γονιδίου της E-Cadherin δημιουργεί αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης γαστρικού καρκινώματος. Έχει βρεθεί ότι η μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης E-Cadherin σε διαφορετικά κυτταρικά μοντέλα σχετίζεται είτε με την υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου της είτε με τη καταστολή της μεταγραφής του (131).

Για το λόγο ότι η πρωτεΐνη E-Cadherin αποτελεί γνώρισμα του επιθηλιακού φαινοτύπου των κυττάρων, ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στην TGFβ-1-επαγώμενη EMT σε κύτταρα HaCaT μελετήθηκε μέσω καταστολής της έκφρασης της RhoB και ανίχνευσης της ενδοκυττάριας κατανομής αλλά και των επιπέδων έκφρασης της E-Cadherin στα κύτταρα αυτά. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανοσοαποτύπωσης σε κύτταρα HaCaT τα οποία :

α) είχαν μολυνθεί με αδενοϊο που εκφράζει την επικρατούσα αρνητική
(dominant negative) μορφή της RhoB πρωτεΐνης

β) είχαν επιμολυνθεί παροδικά με siRNA ειδικού για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 60, η υπερέκφραση μέσω αδενοϊού της επικρατούσας (dominant negative) αρνητικής μορφής της RhoB πρωτεΐνης (adRhoBN19), είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της χρώσης της πρωτεΐνης Ε-Cadherin στα κύτταρα. Η ελάττωση όμως της χρώσης αυτής έγινε εντονότερη παρουσία επίδρασης TGFβ-1 για 72 ώρες. Στη χρώση των πυρήνων με DAPI φαίνεται καθαρά η διάσπαση των διακυτταρικών δεσμών καθώς τα κύτταρα σε αντίθεση με αυτά των δειγμάτων με τον αδενοιο ελέγχου (ad-GFP) βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους, χαρακτηριστικό γνώρισμα απώλειας του επιθηλιακού φαινοτύπου. Στα κύτταρα στα οποία είχε υπερεκφραστεί αδενοϊός ελέγχου (ad-GFP) παρουσία TGFβ-1 0 παρατηρήθηκε πολύ μικρή αλλαγή στην κατανομή της χρώσης της Ε-Cadherin (Εικόνα 60). Η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των ίδιων δειγμάτων έδειξε ότι η υπερέκφραση της ανενεργής μορφής της RhoB GTΡάσης παρουσία TGFβ-1 δεν προκάλεσε μεγαλύτερη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης E-Cadherin συγκριτικά με τη μείωση που προκάλεσε η επίδραση TGFβ-1 από μόνη της (adGFP+TGFβ-1) και αντιστοιχεί περίπου στο 50% (κανονικοποίηση και μέτρηση των δειγμάτων με Tina scan software) (Εικόνα 62A). Επομένως, φαίνεται ότι η κατανομή της πρωτεΐνης E-Cadherin και όχι η έκφρασή της είναι αυτή που επηρεάστηκε από την υπερέκφραση της RhoBN19 (Εικόνα 62A).

Παρόμοια αλλά εντονότερα αποτελέσματα είχε η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα HaCaT. Αναλυτικά, επίδραση με TGFβ-1 για 72 ώρες στο δείγμα με το siRNA ελέγχου (scr+TGFβ-1), οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης RhoB, μείωση της χρώσης της πρωτείνης E-Cadherin, διατάραξη των κυτταρικών συνδέσμων και επομένως επαγωγή της ΕΜΤ διαδικασίας (Εικόνες 61&62). Παράλληλα, η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB από μόνη της ήταν σε θέση να προκαλέσει ανακατανομή της πρωτεΐνης E-Cadherin από τους διακυτταρικούς συνδέσμους στο περιπυρηνικό κυτταρόπλασμα και ως συνέπεια να διασπάσει τις συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων γεγονός το οποίο είναι προφανές τόσο με τη χρώση των πρωτεϊνών E-Cadherin και ακτίνης όσο και χρώσης των πυρήνων με DAPI (Εικόνα 61). Ωστόσο η παρουσία TGFβ-1 έκανε περισσότερο αισθητή την απώλεια του επιθηλιακού φαινοτύπου καθώς εκτός από την ανακατανομή της πρωτείνης E-Cadherin στο κύτταρα οδήγησε και σε μείωση κατά 60% της έκφρασης της ακόμα και μετά από 48 ώρες επίδρασης (Εικόνα 62B, κανονικοποίηση και μέτρηση των δειγμάτων με Tina scan software). Επομένως τα αποτελέσματα των Εικόνων 60-62, υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη RhoB παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων και πιθανότατα δρα ανασταλτικά στη διαδικασία της EMT καθώς η επαγωγή της EMT απουσία RhoB είναι σαφώς ισχυρότερη.



DAPI

Εικόνα 60 : Η υπερέκφραση της επικρατούσας αρνητικής μορφής της RhoB επάγει τη διαδικασία ΕΜΤ σε κύτταρα HaCaT.

Πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης E-Cadherin σε κύτταρα HaCaT μετά από μόλυνση με τον αδενοϊο ελέγχου (adGFP MOI:100) ή τον αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την επικρατούσα αρνητική μορφή της πρωτεΐνης RhoB (adRhoBN19 MOI:100) και επώαση (ή μη) με 10ng/ml TGFβ-1 για 72 ώρες. Η πρωτεΐνη E-Cadherin ανιχνεύθηκε με τη χρησιμοποίηση του πρωτοταγούς αντισώματος anti-E-Cadherin και του δευτεροταγούς anti-mouse Alexa Fluor IgG. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.



Εικόνα 61 : Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB επάγει τη διαδικασία ΕΜΤ σε κύτταρα HaCaT.

Πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού για την ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης E-Cadherin σε κύτταρα HaCaT μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNA ελέγχου (scr-siRNA 200pmole/3x10⁵ κύτταρα) ή siRNA ειδικού για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB (RhoB-siRNA 200pmole/3x10⁵) και επώαση τους (ή μη) με 10ng/ml TGFβ-1 για 72 ώρες. Η πρωτεΐνη E-Cadherin ανιχνεύθηκε με τη χρησιμοποίηση του πρωτοταγούς αντισώματος anti-E-Cadherin και του δευτεροταγούς anti-mouse Alexa Fluor IgG. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI ενώ της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοιδίνη.



Εικόνα 62: Ο TGFβ-1 προκαλεί μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεϊνης E-Cadherin σε κύτταρα HaCaT απουσία της RhoB. Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης σε κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν επωαστεί με 10ng/ml TGFβ-1 για 48 ή/και 72 ώρες μετά από (A) μόλυνση με αδενοϊούς (ελέγχου ad-GFP ή της επικρατούσας αρνητικής μορφής της RhoB, ad-RhoBN19) (B) παροδική επιμόλυνση με siRNAs (ελέγχου scr-siRNA ή ειδικό για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB, RhoB-siRNA). Ίσες ποσότητες των δειγμάτων αναλύθηκαν με τη χρησιμοποίηση αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν τις ενδογενείς πρωτεΐνες E-Cadherin, RhoB και ακτίνη.

<u>Ο ρόλος της RhoB πρωτεΐνης στο σταμάτημα του</u> <u>πολλαπλασιασμού (growth arrest) κυττάρων HaCaT που επάγεται</u> <u>από τον TGFβ-1</u>

Όπως προαναφέρθηκε, ο TGFβ-1 εκτός από την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή επάγει και το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού στα κύτταρα HaCaT μέσω της μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορα στάδια του κυτταρικού κύκλου όπως τα γονίδια p21^{CDKN1A}, p15^{CDKN2B} και c-myc. Η δράση αυτή του TGFβ-1 του προσδίδει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στα πρώιμα στάδια του καρκίνου. Παράλληλα, οι Rho GTPάσες έχουν δειχθεί να συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω ρύθμισης των επιπέδων της κυκλίνης D1 (cyclin D1) όπως επίσης και των p21^{WAF1} και p27^{KIP1} πρωτεϊνών οι οποίες προσδένονται και τροποποιούν τη δράση των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (CDKs) (Εικόνα 6 Εισαγωγής) (1, 8). Επίσης η σχέση της RhoB GTPάσης με την επαγωγή της απόπτωσης επιβεβαιώθηκε σε πρόσφατη δημοσίευση στην οποία βρέθηκε ότι η καταστολή της έκφρασης της RhoB προκαλεί αύξηση της απόπτωσης των κυττάρων κατά 300% (158). Για τους παραπάνω λόγους, στη συνέχεια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε μια πρώτη διερεύνηση ενδεχόμενου ρόλου της πρωτεΐνης RhoB στην TGF-επαγώμενη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Συγκεκριμένα, κύτταρα HaCaT επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ειδικού για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB και στη συνέχεια επωάστηκαν με TGFβ-1 για 24 ώρες. Ακολούθησε αντίδραση MTT στην οποία μετρήθηκαν τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα συγκριτικά με αυτά τα οποία είχαν επιμολυνθεί με siRNA ελέγχου (scr-siRNA). Όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα της Εικόνας 63, η αποσιώπηση της έκφρασης της RhoB GTPάσης επηρέασε το κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ-1, ενισχύοντας κατά 20% περίπου το ποσοστό των ανενεργών μεταβολικά κυττάρων είτε λόγω επαγωγής της απόπτωσης είτε λόγω παύσης του κυτταρικού τους κύκλου. Επομένως φαίνεται ότι η πρωτεΐνη RhoB παίζει αρνητικό ρόλο στο σταμάτημα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων το οποίο επάγεται από τον TGFβ-1.



Εικόνα 63 : Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB ευνοεί το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων το οποίο επάγεται από τον TGFβ-1. Πείραμα μέτρησης των μεταβολικά ενεργών HaCaT κυττάρων μετά από επιμόλυνση τους με siRNA ελέγχου (Scr-siRNA) ή siRNA ειδικού για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB (RhoB-siRNA) και επώαση τους (ή μη) με 10ng/ml TGFβ-1 για 24 ώρες. Η προσθήκη 0.5mg/ml διαλύματος MTT έγινε 4 ώρες πριν τη συλλογή και μέτρηση των δειγμάτων σε σπεκτροφωτόμετρο.

Είναιθ γνωστό ότι ο TGFβ-1 επάγει τη μεταγραφή του γονιδίου p21^{CDKN1A} το οποίο αποτελεί αναστολέα του κυτταρικού κύκλου και μέσω της επαγωγής αυτής στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επομένως, ένας ενδεχόμενος τρόπος με τον οποίο η πρωτεΐνη RhoB δρα ανασταλτικά στην κυτταροστατική απόκριση των κυττάρων στον TGFβ-1 θα μπορούσε να είναι μέσω επίδρασής της στην έκφραση του γονιδίου p21^{WAF1}. Για τη διερεύνηση της πιθανότητας αυτής, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις RT-PCR στις οποίες μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου p21 μετά από επίδραση TGFβ-1 για 24 ώρες σε κύτταρα HaCaT μετά από καταστολή της δράσης ή της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB. Στην Εικόνα 64 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των πρώτων μετρήσεων με βάση τα οποία φαίνεται ότι είτε η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της RhoB είτε η αποσιώπηση της έκφρασης του γονιδίου της παρουσία TGFβ-1 οδήγησε σε σημαντική επιπλέον αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου p21^{WAF1} συγκριτικά με αυτήν που προέρχεται μόνο από την επίδραση με TGFβ-1 (2,4 έναντι 1,5 και 4,3 έναντι 2 fold αντίστοιχα). Αξιοσήμειωτη παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή και των βασικών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου p21^{WAF1} (Εικόνα 64). Παρόμοια αποτελέσματα λήφθησαν με την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB στις δύο επιπρόσθετες καρκινικές κυτταρικές σειρές προστάτη, DU145 και PC3 (data no shown).



Εικόνα 64 : Η καταστολή της δράσης ή η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB έχουν ως αποτέλεσμα ενισχύση της TGFβ-1-επαγώμενης αύξησης των επιπέδων mRNA του γονιδίου p21^{WAF1}.

Ανάλυση RT-PCR σε κύτταρα HaCaT τα οποία (A) μετά από μόλυνση με αδενοϊο ελέγχου (adGFP MOI:100) ή αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την επικρατούσα ανενεργή μορφή της RhoB (ad-RhoBN19 MOI:100) (B) μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNA ελέγχου (Scr-siRNA 200pmole/3x10⁵ κύτταρα) ή siRNA ειδικού για τη πρωτεΐνη RhoB (RhoB-siRNA 200pmole/3x10⁵ κύτταρα) αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 0.2% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 10ng/ml TGFβ-1 για επιπλέον 24 ώρες. Για την ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για τα γονίδια p21 και GAPDH. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA του γονιδίου p21 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου.

Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου p21^{CDKN1A} επιβεβαιώθηκε και μέσω πειραμάτων μέτρησης της δραστικότητας λουσιφεράσης σε κύτταρα HepG2 μετά από παροδική συνεπιμόλυνσή τους με το φορέα αναφοράς του υποκινητή του γονιδίου p21 (-2300/+8 p21WAF-Luc) σε συνδυασμό με φορείς έκφρασης των αγρίου τύπου αλλα και μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης RhoB. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 65, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB κατέστειλε τη βασική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21 ενώ η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής της μορφής (RhoBV14) αύξησε ακόμη περισσότερο τη καταστολή αυτή. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής της πρωτεΐνης RhoB αλλά και της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης του μορφής της πρωτεΐνης κου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB αλλά και της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης κου μορφής της πρωτεΐνης κου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB αλλά και της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης κου μορφής της πρωτεΐνης κου τύπου μορφής του τύπου μορφής της πρωτεΐνης κου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB αλλά και της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης κου μορφής του μορφής της πρωτεΐνης κου μορφής του μορφής της πρωτεΐνης RhoB αλλά και της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης κου μορφής του μορφής κου μορφής του μου μορφής του μου μορφης του μου μορφής του μου μορφής του μου μορφ



Εικόνα 65 : Η υπερέκφραση της ενεργής πρωτεΐνης RhoB καταστέλει την ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου p21^{cDKN1A}. Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με 200ng από το πλασμίδιο αναφοράς (-2300/+8) p21WAF-Luc και με (1μg) από τους φορείς έκφρασης των αγρίου τύπου μορφών των πρωτεΐνών RhoA (RhoAwt) και RhoB (RhoBwt) και της συστασιακά ενεργής (RhoBV14) αλλά και επικρατούσας αρνητικής μορφής (RhoBN19) της πρωτεΐνης RhoB. Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Συμμετοχή της πρωτεΐνης RhoB σε θηλειά αυτοκαταστολής (autoinhibitory loop)

Η ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης RhoB στη μεταγραφή του γονιδίου p21^{CDKN1A} έδωσε το έναυσμα για τη διερεύνηση ενδεχόμενου ρόλου της στη ρύθμιση επιπλέον γονιδίων στόχων του μονοπατιού του TGFβ-1 όπως του PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) αλλά και του ίδιου του γονιδίου της RhoB. Στις Εικόνες 66 και 67, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από αναλύσεις RT-PCR στις οποίες μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων PAI-1 και RhoB σε κύτταρα HaCaT μετά από καταστολή της δράσης ή αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB και επίδραση TGFβ-1 για 24 ώρες. Παρατηρήθηκε ότι ο TGFβ-1 προκαλεί μεγαλύτερη μακροπρόθεσμη (μετά από 24 ώρες επίδρασης) επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου PAI-1 σε συνθήκες στις οποίες είτε η δράση της (ad-RhoBN19) είτε η έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB (RhoB-siRNA) είχε κατασταλεί (Εικόνα 66).

Στην περίπτωση του ίδιου του γονιδίου της RhoB, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση μέσω αδενοϊού της επικρατούσας αρνητικής μορφής της πρωτεΐνης RhoB (RhoBN19) ενίσχυσε τη TGFβ-1-επαγώμενη (μετά από 24 ώρες επίδρασης) αύξηση των επιπέδων mRNA της (Εικόνα 67A). Σε συμφωνία με το αποτέλεσμα από την RT-PCR ανάλυση, παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoB (RhoBN19) προκάλεσε αύξηση της βασικής ενεργότητας του υποκινητή (-726/+86) της RhoB ενώ η υπερέκφραση της αγρίου τύπου (RhoBwt) και συστασιακά ενεργής μορφής (RhoBV14) της μείωσε τη βασική ενεργότητα του RhoB υποκινητή (32% και 22% αντίστοιχα) (Εικόνα 67B).

Στη συνέχεια, έγινε μια προσπάθεια χαρτογράφησης της περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της RhoB η οποία είναι υπεύθυνη για τη ρύθμιση της αυτοκαταστολής της έκφρασης του γονιδίου της. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν αντιπροσωπευτικές πλασμιδιακές κατασκευές που περιείχαν διαφορετικά τμήματα του RhoB υποκινητή. Το τελικό αποτέλεσμα της χαρτογράφησης αυτής παρουσιάζεται στην Εικόνα 68A, με βάση το οποίο φαίνεται ότι η περιοχή -85/+19 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB είναι επαρκής για την αυτοκαταστολή του μέσω της υπερέκφρασης της αγρίου

τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB και μάλιστα το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT το οποίο βρίσκεται στην περιοχή αυτή βρέθηκε να είναι απαραίτητο καθώς σημειακές μεταλλαγές αυτού μπλοκάρουν την αρνητική αυτορύθμιση της δραστικότητας του RhoB υποκινητή (Εικόνα 68B). Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί επίσης η μείωση της ενεργότητας του RhoB υποκινητή από την υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoA (Εικόνα 68A). Παρόμοιο αποτέλεσμα βρέθηκε να έχει και η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoA (-799/+166 RhoA-Luc).



Εικόνα 66 : Η καταστολή της δράσης ή η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτέινης RhoB έχουν ως αποτέλεσμα την ενισχύση της TGFβ-1-επαγώμενης αύξησης των επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1. Ανάλυση RT-PCR σε κύτταρα HaCaT τα οποία (A) μετά από μόλυνση με αδενοϊο ελέγχου (adGFP MOI:100) ή αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την επικρατούσα ανενεργή μορφή της RhoB (ad-RhoBN19 MOI:100) (B) μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNA ελέγχου (Scr-siRNA 200pmole/3x10⁵ κύτταρα) ή siRNA ειδικού για τη πρωτεΐνη RhoB (RhoB-siRNA 200pmole/3x10⁵ κύτταρα) αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 0.2% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 10ng/ml TGFβ-1 για επιπλέον 24 ώρες. Για την ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για τα γονίδια PAI-1 και GAPDH. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου.



Εικόνα 67 : Η καταστολή της δράσης της πρωτεΐνης RhoB έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της βασικής ενεργότητας του υποκινητή της και την ενισχύση της TGFβ-1επαγώμενης αύξησης των επιπέδων mRNA του γονιδίου της. (A) Ανάλυση RT-PCR σε κύτταρα HaCaT τα οποία (Α) μετά από μόλυνση με αδενοϊο ελέγχου (adGFP MOI:100) ή αδενοϊο ο οποίος εκφράζει την επικρατούσα ανενεργή μορφή της RhoB (ad-RhoBN19 MOI:100) αναπτύχθηκαν σε συνθήκες 0.2% FBS για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 10ng/ml TGFβ-1 για επιπλέον 24 ώρες. Για την ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για τα γονίδια PAI-1 και GAPDH. Τα διαγράμματα δείχνουν τις κανονικοποιημένες τιμές των επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1 σε σχέση με την αντίστοιχη τιμή των mRNA επιπέδων του GAPDH γονιδίου. (B) Κύτταρα HepG2 συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με 100ng από το πλασμίδιο αναφοράς (-726/+86) RhoB-Luc και με (1μg) από τους φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου (RhoBwt), της συστασιακά ενεργής (RhoBV14) αλλά και της επικρατούσας αρνητικής μορφής (RhoBN19) της πρωτεΐνης RhoB. Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 68: Το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT το οποίο βρίσκεται στην περιοχή -61/-57 του RhoB υποκινητή είναι απαραίτητο για την αυτοκαταστολή του γονιδίου της RhoB. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με 1μg από τα πλασμίδια αναφοράς (A) (-85/+1) RhoB-Luc και (B) (-85/+19) mut CCAAT RhoB-Luc παράλληλα με φορείς έκφρασης των αγρίου τύπου πρωτεϊνών RhoA και RhoB αλλά και της επικρατούσας ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoB (1μg από τον καθένα). Στα διαγράμματα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της βγαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Η συμμετοχή της αλληλουχίας CCAAT στην αρνητική αυτορύθμιση του γονιδίου της RhoB αλλά και στη μεταγραφική ενεργοποίηση του RhoB υποκινητή από το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι οδήγησε στην υπόθεση πιθανής ανασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης RhoB στη λειτουργία των πρωτεϊνών Smad. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε ο ρόλος των Smad πρωτείνων στη ρύθμιση TOU υποκινητή της RhoB παρουσία υπερεκφρασμένης RhoB πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 69, οι πρωτεΐνες Smad3/Smad4 δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν το RhoB υποκινητή παρουσία υπερεκφρασμένης RhoB πρωτεΐνης.



Εικόνα 69 : Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB καταστέλει την ενεργοποίηση του υποκινητή της από τις πρωτεΐνες Smad.

Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με 0.5μg από το πλασμίδιο αναφοράς (-85/+1) RhoB-Luc παράλληλα με φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών 6myc-Smad3/6myc-Smad4 ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου αλλά και της επικρατούσας ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoB (1μg από τον καθένα). Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο δυνητικός ανασταλτικός ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη δράση των πρωτεϊνών Smad ως ρυθμιστών της μεταγραφής σε ευρύτερο πλαίσιο με δύο προσεγγίσεις: α) μέσω χρησιμοποίησης της υβριδικής πρωτείνης GAL4-Smad3 και ενός συνθετικού υποκινητή που φέρει πέντε θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα GAL4 (pG₅-E1B-Luc) και β) μέσω της χρησιμοποίησης του υποκινητή (p(CAGA)₁₂-E1B-LuC) ο οποίος φέρει 12 θέσεις πρόσδεσης (CAGAC) των πρωτεϊνών Smad. Η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις είχε ως αποτέλεσμα τη καταστολή της μεταγραφικής δράσης της πρωτεΐνης Smad3 (περίπου στο 50%) (Εικόνα 70 A και B).

Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη RhoB δε δρα ανασταλτικά μόνο στην ενεργοποίηση του δικού της γονιδίου μέσω επίδρασης στη λειτουργία του Smad μονοπατιού αλλά η δράση της αυτή φαίνεται να επεκτείνεται και σε άλλα γονίδια στόχους των Smad όπως τα γονίδια p21^{WAF1} και PAI-1.

Μια απαραίτητη προϋπόθεση της σωστής λειτουργίας του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών είναι η επιτυχής φωσφορυλίωσή τους μέσω του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 και η επακόλουθη είσοδος και συσσώρευσή τους στο πυρήνα όπου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του TGFβ-1 . Επομένως καταστολή ή μείωση της φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών Smad έχει ως αποτέλεσμα τη καταστολη ή τη μείωση της μεταγραφικής τους δράσης αντίστοιχα. Για το λόγο αυτό, στη συνέχεια της παρούσας μελέτης εξετάστηκε το ενδεχόμενο τα αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης RhoB να εμποδίζουν τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad3 από τον TGFβ-1. Με βάση τα αποτελέσματα της Εικόνας 71 φαίνεται ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB καταστέλει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RhoB από τον TGFβ-1 ενώ η υπερέκφραση της ανασταλτικής μορφής RhoBN19 την κατέστειλε σε μικρότερο βαθμό (Εικόνα 71Α). Επίσης η αποσιώπηση της έκφρασης της RhoB μέσω siRNA αυξάνει τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Smad3 ως απόκριση στον TGFβ-1 ενώ η αποσιώπηση της RhoA όχι (Εικόνα 71Β). Επομένως, η ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης RhoB στη λειτουργία των πρωτεϊνών Smad φαίνεται να πηγάζει από την ανασταλτική δράση της RhoB στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad3.

172



Εικόνα 70 : Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB καταστέλει τη μεταγραφική δράση των πρωτεϊνών Smad. Κύτταρα HEK293T (A) επιμολύνθηκαν παροδικά με 1μg από το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή pG₅-E1B-Luc παράλληλα με φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-Smad3 ανεξάρτητα ή σε συνδυασμό με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου ή και την επικρατούσας ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoB (1μg από τον καθένα) ή (B) επιμολύνθηκαν παροδικά με 1μg από το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή p(CAGA)₁₂ E1B-Luc και είτε επωάστηκαν με 5ng/ml TGFβ-1 για 24 ώρες είτε συνεπιμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης 6myc-Smad3. Και στις δύο περιπτώσεις έγινε συνεπιμόλυνση με τον φορέα έκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB. Στα διαγράμματα φαίνονται οι τιμές της % σχετική δραστικότητας λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 71: Τα επίπεδα της πρωτέινης RhoB επηρεάζουν τη TGFβ-1-επαγώμενη φωσφορυλίωση της πρωτείνης Smad3. (A) Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης των πρωτεινών Smad3, RhoBwt και RhoBN19 (dominant negative RhoB) σε σύντηξη με τον επίτοπο 6myc (5μg από το κάθε πλασμίδιο σε 5x10⁵ κύτταρα), αναπτύχθηκαν σε συνθήκες απουσίας ορού για 24 ώρες και επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 5ng/ml TGFβ-1 για 1 επιπλέον ώρα. Ίσες ποσότητες από τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντισώματα anti-phospho Smad3 και anti-myc. (B) Κύτταρα DU145 επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA ελέγχου ή με siRNAs ειδικά για την αποσιώπηση της έκφρασης των κυττάρων σε συνθήκες 1% ορού για 24 ώρες και επώαση τους με 10ng/ml TGFβ-1 για 1 ώρα. Ίσες ποσότητες από τα κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντισώματα αnti-phospho Smad3, anti-RhoB και anti-tubulin.

Δεδομένου ότι η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad3 είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη μεταφορά της στο πυρήνα, ακολούθησε μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού της Smad3 παρουσία ή απουσία της υπερεκφρασμένης αγρίου τύπου ή επικρατούσας αρνητικής μορφής της πρωτεΐνης RhoB. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 72, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB εμποδίζει τη μεταφορά της Smad3 στο πυρήνα μετά από επίδραση με TGFβ-1 αποκαλύπτοντας ένα πολύ σημαντικό ρόλο της RhoB GTPάσης στην αρνητική αυτορύθμιση του TGFβ-1/Smad σηματοδοτικού μονοπατιού



Εικόνα 72: Η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB εμποδίζει τη μεταφορά της πρωτεΐνης Smad3 στο πυρήνα. Πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε κύτταρα HaCaT μετά από παροδική επιμόλυνση τους με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της αγρίου Flag-Smad3 σε συνδυασμό με τους φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου (B) και της επικρατούσας αρνητικής μορφής της πρωτεΐνης RhoB (RhoBN19, C) σε σύντηξη με τον επίτοπο 6myc, ανάπτυξη τους σε συνθήκες 0.2% FBS για 24 ώρες και επώαση τους με 5ng/ml TGFβ-1 για 1 ώρα. Η υπερεκφρασμένη πρωτεΐνη Smad3 ανιχνεύθηκε με τη χρησιμοποίηση του πρωτοταγούς αντισώματος anti-Flag και του δευτεροταγούς anti-mouse Alexa Fluor IgG ενώ η υπερεκγρασμένη πρωτεΐνη RhoB ανιχνεύθηκε μέσω του πρωτοταγούς αντισώματος anti-myc (Eργ. Ridley) και του δευτεροταγούς anti-rabbit Alexa Fluor. Η χρώση των πυρήνων έγινε με DAPI.

Ο τρόπος με τον οποίο η πρωτεΐνη RhoB επιδρά αρνητικά στη φωσφορυλίωση της Smad3 πρωτεΐνης από τον υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-(ALK5) θα μπορούσε να οφείλεται ενδεχομένως στο γεγονός ότι τα 1 αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης RhoB εμποδίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ της Smad3 και της πρωτεΐνης SARA (η οποία στρατολογεί την πρωτεΐνη Smad3 στο σύμπλοκο των υποδοχέων) ή του υποδοχέα ALK5. Η πρώτη πιθανή περίπτωση ελέγχθηκε μέσω πειραμάτων συνανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών (Co-IP) στα οποία διερευνήθηκε το ενδεχόμενο αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών RhoB και SARA αλλά και το ενδεχόμενο η παρουσία υπερεκφρασμένης RhoB πρωτεΐνης (διαδοχικών αυξανόμενων συγκεντρώσεων) να επηρεάζει αρνητικά την αλληλεπίδραση μεταξύ των Smad3 και SARA πρωτεϊνών. Στα παραπάνω πειράματα δεν ανιχνεύθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτεΐνης RhoB με τη SARA και επίσης η υπερέκφραση της RhoB δε βρέθηκε να έχει σημαντική αρνητική επίδραση στην αλληλεπίδραση των Smad3 και SARA πρωτεϊνών (data no shown).

Ωστόσο, η μελέτη της δεύτερης περίπτωσης έδειξε κάτι πολύ ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της Smad3 με τον ALK5 υποδοχέα γεγονός το οποίο πιθανόν να οδηγεί στη καταστολή της φωσφορυλίωσης της Smad3 (Εικόνα 73). Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση των αγρίου τύπου μορφών των υποδοχέων τύπου Ι και ΙΙ του TGFβ-1, της πρωτεΐνης Smad3 σε σύντηξη με το πεπτίδιο Bio και της πρωτεΐνης RhoBwt απουσία ή παρουσία της λιγάσης βιοτίνης BirA. Για το λόγο ότι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Smad3 με τον ALK5 έχει πολύ μικρή διάρκεια, ακολούθησε προεπώαση των δειγμάτων με τον αναστολέα δράσης κινάσης του ALK5, SB431542 και στη συνέχεια, προκειμένου να δημιουργηθούν τα απαραίτητα πρωτεινικά σύμπλοκα, προστέθηκε TGFβ-1 εξωγενώς.



Εικόνα 73 : Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB μπλοκάρει την αλληλεπίδραση της Smad3 πρωτεΐνης με τον υποδοχέα τύπου I του TGFβ-1 (ALK5). Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio-Smad3 και τους φορείς έκφρασης των υποδοχέων τύπου I και II του TGFβ-1 σε σύντηξη με τον επίτοπο Flag και της πρωτεΐνης 6mycRhoBwt σε ποσότητα 7 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7 μg) στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα και ακολούθησε ανάπτυξη των κυττάρων σε συνθήκες απουσίας ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επώαση (+) ή μη (-) με 5ng/ml TGFβ-1 για 1 ώρα.Σε κάποια από τα δείγματα όπως αναγράφεται προηγήθηκε προεώαση για 1 ώρα με τον αναστολέα του ALK5, SB431542 (10μM). Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με 1/10 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αγαρόζη στρεπταβιδίνη (inputs). Τα δείγματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντισώματα anti-flag anti-Strepatavidin HRP.

Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB, η οποία μιμείται ουσιαστικά την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της από τον TGFβ-1, εμποδίζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Smad3 με τον υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1 και κατά συνέπεια καταστέλλει τη φωσφορυλίωση και την επακόλουθη μεταφορά της στο πυρήνα. Ένας πιθανός τρόπος μέσω του οποίου η πρωτεΐνη RhoB δρα ανασταλτικά στη λειτουργία του μονοπατιού Smad είναι μέσω αλληλεπίδρασης της με τη πρωτεΐνη Smad3 εμποδίζοντας ως συνέπεια την αλληλεπίδραση της Smad3 με τον υποδοχέα ALK5 ως απόκριση στον TGFβ-1. Η προσέγγιση αυτή ελέγχθηκε στη συνέχεια της παρούσας μελέτης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo.* Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν πειράματα GST pull down (Εικόνα 74) αλλά και συνανοσοκατακρήμνισης πρωτεϊνών (Co-IP) (Εικόνα 75) στα οποία ανιχνεύθηκε η φυσική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών RhoB και Smad3.



Εικόνα 74: Φυσική *in vitro* αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών RhoB και Smad. Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης των αγρίου τύπου μορφών των πρωτεϊνών RhoA και RhoB σε ποσότητα 30 μg. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν στους 4 C^o overnight με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης στα οποία έχει συζευχθεί η GST πρωτεϊνη (control) ή οι GST – Smad2/3/4 πρωτεΐνες οι οποίες απομονώθηκαν από βακτήρια Ecoli. Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/10 του αρχικού πρωτεινικού εκχυλίσματος. Η ανάλυση της συνκατακρήμνισης (GST-pull down) των Rho πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια γλουταθειόνηςσεφαρόζης έγινε με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι του επίτοπου 6myc και έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης RhoA. Οι ποσότητες των GST πρωτεϊνών φαίνονται στο πήκτωμα ακρυλαμίδης μετά από χρώση με Coomassie blue στο κάτω μέρος της εικόνας.



Εικόνα 75: Φυσική *in vivo* αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών RhoB και Smad3. Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου μορφής των πρωτεϊνών Smad3 σε σύντηξη με τον επίτοπο 6myc (6mycSmad3) και RhoB σε σύντηξη με το πεπτίδιο Bio (Bio-RhoB) και τέθηκαν σε αντίδραση ανοσοκατακρήμνισης (IP) με τη χρησιμοποίηση του αντισώματος anti-RhoB ή του μη ειδικού αντισώματος anti-GST (αντίσωμα ελέγχου). Το input αντιστοιχεί περίπου στο 1/10 του αρχικού πρωτεινικού εκχυλίσματος. Οι πρωτεΐνες οι οποίες κατακρημνίστηκαν μέσω του anti-RhoB αντισώματος όπως και τα inputs αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση (WB) με τη χρησιμοποίηση του μονοκλωνικού αντισώματος anti-myc. Η πρωτεΐνη RhoB η οποία ανοσοκατακρημνίστηκε ανιχνεύθηκε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας anti-RhoB αντίσωμα.

Συμπερασματικά, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB GTPάσης από τα TGFβ-1-επαγώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια παίζει σημαντικό ρόλο στην αύξηση των επιπέδων της RhoB πρωτεΐνης η οποία με τη σειρά της εμπλέκεται με θετικό ή αρνητικό ρόλο σε ποικίλες βιολογικές λειτουργίες που λαμβάνουν χώρα ως απόκριση στον TGFβ-1 όπως η μετακίνηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή αλλά και η αρνητική αυτορύθμιση του ίδιου του μονοπατιού του TGFβ-1.
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1

Η δέσμευση του TGFβ-1 στους υποδοχείς του στην επιφάνεια του κυττάρου δίνει το έναυσμα για την ενεργοποίηση πολλαπλών σημαδοτικών μονοπατιών τα οποία συνδέονται μεταξύ τους αλλά και με επιπλέον δίκτυα και δρώντας ως αισθητήριοι μηχανισμοί εμπλέκονται στην απόκριση του κυττάρου στα διάφορα ερεθίσματα του περιβάλλοντος. Οι ενδεχόμενες μεταβολές στην ένταση αλλά και στη διασύνδεση και συνεργατικότητα των διαφορετικών αυτών μονοπατιών ευθύνονται πιθανότατα για τη μετατροπή των ιδιοτήτων του μονοπατιού του TGFβ-1 από ογκοκατασταλτικές σε ογκογονικές κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης (*71*).

Η ογκοκατασταλτική δράση του TGFβ-1 είναι γνωστό ότι μεσολαβείται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή γονιδίων τα οποία σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου όπως το p21^{CIP1}, p15^{INK4b} και C-Myc αντίστοιχα (*142, 159-163*). Ωστόσο, η διερεύνηση του διττού αυτού ρόλου του TGFβ-1 στην ανάπτυξη των όγκων προυποθέτει την ανακάλυψη και μελέτη νέων γονιδιακών στόχων του μονοπατιού του και ιδιαίτερα γονιδίων που να συμμετέχουν είτε θετικά είτε αρνητικά στις προ-ογκογονικές δράσεις του όπως η επαγωγή της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT), της μετανάστευσης και της επιβίωσης των κυττάρων.

Οι πρώτες ενδείξεις ότι το γονίδιο της μικρής GTPάσης RhoB αποτελεί δυνητικό μεταγραφικό στόχο του μονοπατιού του TGFβ-1 προέκυψαν από γονιδιωματικές αναλύσεις κατά την διαδικασία της επιθηλιακο-μεσεγχυματικής μετατροπής κερατινοκυττάρων (HaCaT) ή επιθηλιακών κυττάρων καρκίνου μαστού (NMuMG) (65-66) αλλά και σε αποπτωτικά κύτταρα ηπατώματος Fao (67) καθώς επίσης και σε επιδερμικούς ινοβλάστες (68). Η μελέτη της ενδεχόμενης ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 αλλά και του μηχανισμού μέσω του οποίου συμβαίνει είναι πολύ σημαντική τόσο για τη βαθύτερη κατανόηση της δράσης του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ-1 όσο και για τη λειτουργία της RhoB πρωτεΐνης η οποία βασίζεται στη μεταγραφική ρύθμιση λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της μέσα στο κύτταρο (6, 164).

Στην αρχή της παρούσας μελέτης επιβεβαιώθηκαν οι γονιδιωματικές αναλύσεις και συγκεκριμένα δείχθηκε ότι επίδραση με TGFβ-1 είχε ως αποτέλεσμα την γρήγορη αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού Swiss3T3 στα οποία σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες ο TGFβ-1 επάγει τη μη γενωμική ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoB (99), σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοβλαστώματος HepG2, σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT όπως και σε κύτταρα καρκίνου προστάτη DU145 και PC3 (Εικόνες 25, 26 και 27). Η αύξηση των επιπέδων mRNA της RhoB ανιχνεύεται από τα πρώτα 30-60 λεπτά επίδρασης με TGFβ-1 εμφανίζεται μέγιστη στις 2-3 ώρες και διατηρείται με μικρές αυξομειώσεις μέχρι τις 24 ώρες. Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB επιβεβαιώθηκε και σε επίπεδο πρωτεΐνης στις παραπάνω κυτταρικές σειρές (Εικόνες 26 και 27). Η επίδραση του TGFβ-1 εξειδικεύεται στην έκφραση της πρωτεΐνης RhoB καθώς δε παρατηρήθηκε μεταβολή των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoA. Τα βασικά επίπεδα mRNA της RhoA παρουσιάζονται σαφώς υψηλότερα από τα αντίστοιχα της RhoB γεγονός που πιθανότατα σχετίζεται με το μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης μες το κύτταρο και με τη μέχρι τώρα περιορισμένη γνώση όσον αφορά τη ρύθμιση της μεταγραφής της. Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί η μικρή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της RhoA παρουσία TGFβ-1 για 24 ώρες (Εικόνα 26C) η οποία ενδεχομένως να πηγάζει από μια ενδορύθμιση των επιπέδων έκφρασης των μελών της RhoA υποοικογένειας και να προκύπτει από την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης RhoB από τον TGFβ-1. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με αποτελέσματα σε επίπεδο mRNA και ενεργότητας των υποκινητών των RhoA και RhoB τα οποία προέκυψαν και θα συζητηθούν στη συνέχεια.

Ακολούθησε η διερεύνηση του μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 σε κερατινοκύτταρα HaCaT. Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν καθώς σε αυτά ανιχνεύθηκε η μέγιστη αύξηση των επιπέδων mRNA της RhoB από τον TGFβ-1 αλλά και για το λόγο ότι αποτελούν πολύ καλό μοντέλο για τη μελέτη της επίδρασης του TGFβ-1 σε βιολογικές διεργασίες όπως το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού (growth arrest) και η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) (*154*).

Η γνώση ότι η RhoB έχει πολύ μικρό χρόνο ημιίσειας ζωής μέσα στο κύτταρο (20 λεπτά για το mRNA, 2 ώρες για τη πρωτεΐνη) (*51-52*) οδηγεί σε δύο πιθανούς τρόπους μέσω τον οποίων ο TGFβ-1 επάγει την αύξηση των

επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB: α) μέσω σταθεροποίησης των μορίων mRNA και πρωτεΐνης ή β) μέσω μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου. Έχει δειχθεί παλαιότερα ότι ο TGFβ-1 επάγει τη συσσώρευση της RhoB επιθηλιακά κύτταρα Mv1Lu πρωτεΐνης σε μέσω καταστολής της πρωτεολυτικής αποικοδόμησής της από το 26S πρωτεάσωμα χωρίς να επηρεάζει τα επίπεδα του mRNA της (137). Για το διαχωρισμό μεταξύ αυτών των δύο πιθανοτήτων, πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα οποία μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της RhoB μετά από επίδραση με TGFβ-1 απουσία ή παρουσία ενός γνωστού αναστολέα της μεταγραφής, της ακτινομυκίνης D. Η προεπώαση των κυττάρων με την ακτινομυκίνη D είχε ως αποτέλεσμα τη πλήρη καταστολή της ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 (Εικόνα 28A&B) γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση της έκφρασης της RhoB από το μονοπάτι του TGFβ-1 στα κύτταρα HaCaT γίνεται στο επίπεδο της μεταγραφής. Παρόλο που η μεταγραφική ρύθμιση είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργία της RhoB πρωτεΐνης, δεν έχουν βρεθεί έως τώρα πολλοί παράγοντες να επιδρούν στη μεταγραφή της και οι περισσότεροι μηχανισμοί ρύθμισης αρκούνται σε μετα-μεταφραστικό επίπεδο. Επομένως, σε συμφωνία με παλαιότερες μελέτες και δεδομένου ότι τα επίπεδα έκφρασης της RhoA δεν επηρεάζονται από τον TGFβ-1, φαίνεται έως τώρα ότι η RhoB είναι το μόνο μέλος της υποοικογένειας το οποίο υφίσταται ρύθμιση σε μεταγραφικό επίπεδο (2).

Ένα επόμενος στόχος ο οποίος τέθηκε ήταν η ανάλυση του ενδεχόμενου το μονοπάτι του TGFβ-1 να δρα έμμεσα στην επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB μέσω της *de novo* σύνθεσης πρωτεϊνών οι οποίες στη συνέχεια συμμετέχουν στη μεταγραφική της ενεργοποίηση. Για να διευκρινιστεί η πιθανότητα αυτή, πραγματοποιήθηκε απομόνωση RNA από κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν προ-επωαστεί με κυκλοεξαμίδιο, (το οποίο μπλοκάρει τη σύνθεση των πρωτεϊνών επεμβαίνοντας στη κίνηση των μορίων tRNA και mRNA σε σχέση με το ριβόσωμα) και στη συνέχεια επωαστεί με TGFβ-1 και μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB αλλά και των γονιδίων p21^{WAF1} και PAI-1 τα οποία αποτελούν γνωστούς μεταγραφικούς στόχους του TGFβ-1 (*141, 144*). Με βάση αυτά τα πειράματα βρέθηκε ότι η προσθήκη του κυκλοεξαμιδίου στα κύτταρα HaCaT προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA τόσο του γονιδίου της RhoB όσο και των

p21^{WAF1} και PAI-1 γονιδίων (Εικόνα 28C). Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι το κυκλοεξαμίδιο επάγει σημαντική και παρατεταμένη αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB (52). Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να είναι σύνηθες σε διαφορετικά αλλά ασταθή mRNA γονιδίων τα οποία επάγονται από μιτογόνες ουσίες και έχουν μικρό χρόνο ημίσειας ζωής λόγω αλληλουχιών πλούσιων σε ΑU στο 3' άκρο των μη μεταφραζόμενων περιοχών τους οι οποίες πιθανότατα να ευθύνονται για τη γρήγορη αποικοδόμηση του mRNA (165). Η παρουσία όμως του κυκλοεξαμιδίου δεν επηρέασε τη θετική επίδραση του TGFβ-1 στη μεταγραφή του γονιδίου της RhoB υποστηρίζοντας ότι η επαγωγή της έκφρασης της RhoB από τον TGFβ-1 δε χρειάζεται τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών αλλά είναι άμεση. Παράλληλα, πρόσφατη μελέτη βασισμένη σε σύστημα επαγώμενης μέσω τετρακυκλίνης έκφρασης της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου Ι της ακτιβίνης, ALK4, σε εμβρυικά βλαστοκύτταρα ποντικού έδειξε επίσης ότι το γονίδιο της RhoB ήταν ανάμεσα σε αυτά τα οποία ενεργοποιούνται από τον TGFβ-1 παρουσία κυκλοεξαμιδίου (166).

Έχει βρεθεί σχετικά πρόσφατα ότι η πρόσδεση του TGFβ-1 στους υποδοχείς του επάγει διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια, εναλλακτικά αυτού των πρωτεϊνών Smad όπως τα μονοπάτια των πρωτεϊνών ERK1/2, TGFβ-1-activated kinase 1 (TAK1), Par6, p38 και cJun N-terminal kinase (JNK) αλλά και το μονοπάτι των RhoA/B/ROCK/LIMK2/cofilin το οποίο ρυθμίζει τη γρήγορη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (71, 76, 99-100). Στη παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκαν τα πρώτα αποτελέσματα των γονιδιωματικών αναλύσεων ως προς τη συμμετοχή του μονοπατιού των κινασών MEK/ERK στη ρύθμιση του γονιδίου της GTPάσης RhoB από τον TGFβ-1. Συγκεκριμένα, η χρησιμοποίηση δυο διαφορετικών αναστολέων της δράσης κινάσης της ΜΕΚ1 (U0126 και PD98059) κατέστειλε την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 (Εικόνα 29). Παρόλα αυτά, η ανασταλτική δράση του αναστολέα της ΜΕΚ1 δε φαίνεται να παρουσιάζει γενικό χαρακτήρα όσον αφορά τη μεταγραφική απόκριση γονιδίων στο μονοπάτι του TGFβ-1 καθώς δεν επηρέασε την ενεργοποίηση των γονιδίων p21^{WAF1} και PAI-1 (Εικόνα 29). Προηγούμενη μελέτη είχε δείξει επίσης ότι η TGFβ-1-επαγώμενη αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου p21 δεν

επηρεάζεται αρνητικά από τη χρησιμοποίηση του αναστολέα της ΜΕΚ1, U0126, στη συγκέντρωση των 10μM (167). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK ανιχνεύθηκε μετά από μια ώρα επίδρασης με TGFβ-1 και τα επίπεδα της ακολούθησαν σταδιακή μείωση μες τις επόμενες 8 ώρες επίδρασης έως την πλήρη εξασθένισή τους 24 ώρες μετά την αρχική προσθήκη του TGFβ-1 (Εικόνα 31). Ωστόσο, η απουσία φωσφορυλιωμένης πρωτεΐνης ERK δε φάνηκε να συνοδεύεται από αντίστοιχη μείωση της ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συμμετοχή του μονοπατιού των ΜΑΡΚ κινασών περιορίζεται στην γρήγορη επαγωγή της έκφρασης της RhoB ως απόκριση στον TGFβ-1. Αντιθέτως, η χρησιμοποίηση του αναστολέα δράσης κινάσης του υποδοχέα τύπου Ι του TGFβ-1, SB431542, προκάλεσε πλήρη καταστολή της ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB τόσο μετά από 3 όσο και μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1 (Εικόνες 32 και 33). Παρόμοιες παρατηρήσεις προέκυψαν και μέσω της χρησιμοποίησης ειδικού siRNA για την αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης Smad3 (Εικόνα 34).

Η συμμετοχή του μονοπατιού των πρωτεϊνών Smad στη ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 επιβεβαιώθηκε και από πειράματα υπερέκφρασης μέσω αδενοϊών διαφόρων συστατικών του μονοπατιού τους όπως της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα ALK5, ALK5ca, και των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3 σε κύτταρα HaCaT και Swiss3T3 (Εικόνες 35 και 36). Επίσης, η πολύ μικρή αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης της RhoB αλλά και η μικρή επαγωγή πολυμερισμού της ακτίνης μετά από επίδραση TGFβ-1 σε κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3, τα οποία δεν εκφράζουν ενδογενώς τη πρωτεΐνη Smad3, και η διάσωση του φαινοτύπου αυτού μέσω εκτοπικής έκφρασης της Smad3 μέσω αδενοιού (Εικόνες 37 και 38) αποτελούν επιπλέον ενδείξεις της απαραίτητης δράσης του μονοπατιού των Smad και συγκεκριμένα της πρωτεΐνης Smad3 στην ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 αλλά και στην αναδιοργάνωση του Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι η κυτταροσκελετού. υπερέκφραση της πρωτεΐνης Smad3 στα κύτταρα JEG-3 (Smad3-/-) απουσία TGFβ-1 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης της RhoB αλλά και την επαγωγή πολυμερισμού της ακτίνης και δημιουργίας ινιδίων του στρες (Εικόνες 37 και 38). Επιπρόσθετα, επίδραση με TGFβ-1 για 24 ώρες σε κύτταρα JEG-3 (Smad3-/-) παρόλο που οδήγησε σε επαγωγή της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 δε μπόρεσε να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 38) γεγονός το οποίο ενισχύει τη μέχρι τώρα υπόθεση για απαραίτητο ρόλο της πρωτεΐνης Smad3 στην μακροπρόθεσμη ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB αλλά και στην επακόλουθη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ-1.

Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η διαδικασία ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικές φάσεις : Στην πρώτη φάση, η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad και ERK από τους υποδοχείς του TGFβ-1 συντελεί στη συνεργατική ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB καθώς απενεργοποίηση καθένος εκ των δυο μονοπατιών κατέστειλε την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB. Στη δεύτερη φάση, η φωσφορυλίωση της ERK πρωτεΐνης δεν απαιτείται πλέον για τη μεταγραφή του γονιδίου της RhoB η οποία μεσολαβείται στο σημείο αυτό είτε μόνο από τις πρωτεΐνες Smad είτε από τις Smad σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στο RhoB υποκινητή.

Ο ρόλος του μονοπατιού των MEK/ERK στη σηματοδότηση μέσω TGFβ-1 δεν έχει κατανοηθεί πλήρως αν και πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνησή του. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση των Smad αλλά και των ERK πρωτεϊνών είναι απαραίτητη για την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή η οποία επάγεται από τον TGFβ-1 και αποτελεί καίριο γεγονός για την ογκογένεση και την μετάσταση (168). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η κινάση ERK φωσφωρυλιώνει τις πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 στη περιοχή του linker και ρυθμίζει με τον τρόπο αυτό τη μεταφορά τους στον πυρήνα (92) ενώ παράλληλα, υποστρώματα των πρωτεϊνών ERK1/2 αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες Smad και ρυθμίζουν συνεργατικά τη γονιδιακή έκφραση (169). Πρόσφατα δείχθηκε επίσης ότι το μέλος της οικογένειας του TGF β -1, BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein-4), επάγει τη φωσφορυλίωση της ERK σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC και ότι τα μονοπάτια των ERK και Smad πρωτεϊνών επικοινωνούν με θετικό ή αρνητικό τρόπο όπως για παράδειγμα μέσω της ανασταλτικής δράσης της πρωτεΐνης Smad6 στη φωσφορυλίωση της ERK (170). Η παρατήρηση όμως ότι η δράση του TGFβ-1/MEK1/ERK μονοπατιού εντοπίζεται αποκλειστικά στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB και όχι των άλλων δύο γονιδίων στόχων του TGFβ-1 τα οποία μελετήθηκαν δίνει μια πρώτη ένδειξη για ειδικό μηχανισμό ρύθμισης που αφορά τον υποκινητή του γονιδίου της RhoB και όχι κάποιο ευρύτερο μηχανισμό επικοινωνίας και αλληλεπίδρασης των MEK1/ERK και Smad μονοπατιών.

Στη συνέχεια της παρούσας μελέτης και με τη χρήση πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης αλλά και κατακρήμνισης πρωτεϊνών μέσω DNA (DNAP) διαπιστώθηκε η στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 μετά από επίδραση με TGFβ-1 στη κοντινή (-161/+19) περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Βρέθηκε επίσης ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στο RhoB υποκινητή είναι άμεση καθώς σημειακές μεταλλαγές στην περιοχή δέσμευσης στο DNA (Smad3 R74K/K81R) κατέστειλαν τη πρόσδεση αυτή (Εικόνες 39 και 40).

Η ανάγκη βαθύτερης κατανόησης του μηχανισμού ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από το TGFβ-1/Smad μονοπάτι οδήγησε στη κλωνοποίηση των υποκινητών των ανθρώπινων RhoA και RhoB γονιδίων (Εικόνα 41A). Σε πειράματα μέτρησης της δραστικότητας λουσιφεράσης τα οποία ακολούθησαν βρέθηκε ότι το μονοπάτι των Smad και ιδιαίτερα η Smad3 πρωτεΐνη ενεργοποιεί σημαντικά τον υποκινητή της RhoB αλλά ελάχιστα τον υποκινητή του γονιδίου της RhoA (Εικόνες 41B). Τα αποτελέσματα αυτά σε συμφωνία με τα δεδομένα από την RT-PCR ανάλυση οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο της RhoB αποτελεί εξειδικευμένο μεταγραφικό στόχο του TGFβ-1.

Η κατασκευή μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή του γονιδίου της RhoB που φέρουν διαδοχικές απαλοιφές στο αμινοτελικό αλλά και στο καρβοξυτελικό άκρο και η χρησιμοποίησή τους σε πειράματα μέτρησης δραστικότητας λουσιφεράσης (Εικόνες 42 και 43) ενίσχυσε τα προηγούμενα δεδομένα σύμφωνα με τα οποία η ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από το TGFβ-1/Smad μονοπάτι μεσολαβείται από την πρόσδεση των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 στη κοντινή (-85/+19) περιοχή του RhoB υποκινητή. Η περιοχή (-85/+19) του RhoB υποκινητή δεν φαίνεται να περιέχει κάποια κλασική αλληλουχία πρόσδεσης της πρωτεΐνης Smad3 (SBE: CAGAC). Συνεχίζοντας όμως τη προσπάθεια χαρτογράφησης με τη δημιουργία νέων μεταλλαγμένων μορφών διαπιστώθηκε ότι η ελάχιστη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB η οποία είναι απαραίτητη και επαρκής για την ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και -54. Πειράματα κατακρήμνισης πρωτεΐνών μέσω DNA (DNAP) επιβεβαίωσαν τη πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στη περιοχή -76/-44 του RhoB υποκινητή παρόλη την απουσία κλασικών ρυθμιστικών στοιχείων πρόσδεσης των πρωτεΐνών Smad (SBEs) στη περιοχή αυτή (Εικόνα 43).

Η περιοχή όμως του υποκινητή του γονιδίου της RhoB -76/-44 περιέχει ένα ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT (CCAAT-2) στις θέσεις -61/-57 το οποίο βρέθηκε να είναι απαραίτητο για τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 καθώς σημειακές μεταλλαγές στην αλληλουχία του μείωσαν σημαντικά πρόσδεσή της (Εικόνα 44). Το στοιχείο CCAAT-2 φαίνεται να είναι πολύ σημαντικό για τη ρύθμιση του γονιδίου της RhoB καθώς οι μεταλλάξεις του δεν επηρέασαν δραστικά μόνο την ενεργοποίηση του RhoB υποκινητή από το μονοπάτι των πρωτεϊνών Smad αλλά και τα βασικά επίπεδα ενεργότητας του (Εικόνα 44).

Ωστόσο, το στοιχείο CCAAT δε φαίνεται να είναι επαρκές για την ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των πρωτεϊνών Smad για το λόγο ότι η Smad3 δε μπόρεσε να προσδεθεί στην αντίστοιχη CCAAT αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου της RhoA όπως επίσης δε μπόρεσε να προσδεθεί και στο στοιχείο CCAAT-1 που βρίσκεται στη περιοχή -110/-106 του RhoB υποκινητή (Εικόνες 45 και 46). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι εκτός από το στοιχείο CCAAT επιπλέον γειτονικές αλληλουχίες είναι απαραίτητες για τη πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3.

Οι αλληλουχίες CCAAT αποτελούν κατεξοχήν θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Nuclear Factor Y (NF-Y) (*171*) και μάλιστα σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες το στοιχείο CCAAT-2 του υποκινητή του γονιδίου της RhoB έχει δειχθεί ότι απαιτείται για την απόκριση του γονιδίου σε γενοτοξικό στρες πιθανότατα μέσω στρατολόγησης του παράγοντα NF-Y (*63*). Στη παρούσα μελέτη δείχθηκε η ισχυρή πρόσδεση του παράγοντα NF-YA εξίσου και στα δύο στοιχεία CCAAT του RhoB υποκινητή καθώς επίσης και η καταστολή της πρόσδεσής του μέσω των σημειακών μεταλλάξεων στην αλληλουχία CCAAT (Εικόνες 44 και 46) Επίσης διαπιστώθηκε η ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από την υπερέκφραση

των τριών πρωτεϊνών του συμπλόκου του NF-Y (NF-YA, NF-YB και NF-YC) (Εικόνα 44).

Τα παραπάνω δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-Y και Smad προσδένονται στις ίδιες ή αλληλεπικαλυπτόμενες θέσεις στη κοντινή περιοχή του RhoB υποκινητή. Για το λόγο αυτό στη πορεία της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε το ενδεχόμενο συνεργατικής πρόσδεσης και δράσης των Smad3 και NF-Y παραγόντων στην ενεργοποίηση του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB. Τα αποτελέσματα όμως των πειραμάτων πρόσδεσης στο DNA και μέτρησης της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB έδειξαν ότι η παρουσία του NF-Y συμπλόκου μπλόκαρε την πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στην περιοχή -76/-44 του RhoB υποκινητή και ότι η δράση των παραγόντων NF-Y και Smad στην ενεργοποίηση του RhoB υποκινητή δεν είναι συνεργατική αλλά ανεξάρτητη (Εικόνες 46Β και 47). Δεδομένου λοιπόν της μεγαλύτερης συγγένειας του παράγοντα NF-Y για την αλληλουχία CCAAT φαίνεται ότι η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων NF-Y και Smad στη περιοχή αυτή είναι αμοιβαίως αποκλειώμενη και ότι η πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 ανταγωνίζεται αυτή του NF-Y. Επομένως είναι πιθανόν το κύτταρο ανάλογα με τα ερεθίσματα του περιβάλλοντος, να χρησιμοποιεί τους παράγοντες NF-Y και Smad για την ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB GTPάσης ώστε να επιτυγχάνει την απόκρισή του.

Μια πρόσφατη ενδιαφέρουσα μελέτη ήρθε να συσχετίσει τον παράγοντα NF-Y με το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 σε κύτταρα επιθηλιακά και ινοβλαστών. Συγκεκριμένα, έδειξε ότι ο TGFβ-1 μέσω του μονοπατιού των ERK πρωτεϊνών ρυθμίζει τη μεταφορά στο πυρήνα του NF-YA με συνέπεια την πρόσδεση του NF-Y στη χρωματίνη και τη TGFβ-1εξαρτώμενη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της κυκλίνης A2 το οποίο αποτελεί μεταγραφικό στόχο του παράγοντα NF-Y (*150*). Το μοντέλο αυτό ενεργοποίησης του NF-Y από το TGFβ-1/ERK μονοπάτι θα μπορούσε να εξηγήσει ενδεχομένως το ρόλο της συμμετοχής των πρωτεϊνών MEK/ERK στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε ο μηχανισμός αυτός στα κύτταρα HaCaT χωρίς όμως να διαπιστωθεί ρύθμιση του NF-Y από τον TGFβ-1 σε επίπεδο υποκυττάριου εντοπισμού. Αναλυτικότερα, δείχθηκε ότι επίδραση με TGFβ-1 σε κύτταρα HaCaT για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (12-120 λεπτά) οδήγησε σε γρήγορη συσσώρευση της πρωτεΐνης Smad3 στο πυρήνα ενώ δεν επηρέασε τον ενδοκυττάριο εντοπισμό του NF-YA παράγοντα ο οποίος ανιχνεύθηκε συστασιακά στο πυρήνα καθόλη της διάρκεια της επίδρασης με TGFβ-1 (Εικόνα 48). Επιπρόσθετα, η καταστολή της δράσης της MEK1 κινάσης μέσω του αναστολέα U0126 δεν επηρέασε τη μεταφορά του NF-YA παράγοντα στο πυρήνα αλλά ούτε και της πρωτεΐνης Smad3 (Εικόνες 49 και 50).

Επιπλέον βρέθηκε ότι το μονοπάτι των ΜΕΚ1/ERK πρωτεϊνών δε συμμετέχει ούτε στη στρατολόγηση του παράγοντα NF-YA στους υποκινητές των γονιδίων RhoB, p21^{WAF1} και PAI-1 (Εικόνα 51) ενισχύοντας τα παραπάνω αποτελέσματα τα οποία υποστηρίζουν ότι ο ρόλος του μονοπατιού TGFβ-1/MEK1/ERK στην ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB στα κύτταρα HaCaT δε βασίζεται στη ρύθμιση της δράσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-Y.

Όπως προαναφέρθηκε, το σηματοδοτικό μονοπάτι των πρωτεϊνών MEK1/ERK δεν εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετακίνησης των πρωτεϊνών Smad μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος σε κύτταρα HaCaT. Η χρησιμοποίηση όμως του αναστολέα δράσης της κινάσης MEK1 σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης έδειξε ότι απουσία ενεργού MEK1/ERK μονοπατιού ο TGFβ-1 δεν επάγει τη στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 52A). Αντίθετα, στους υποκινητές των γονιδίων p21^{WAF1} και PAI-1 η πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 δεν επηρεάζεται (Εικόνα 51).

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ενεργοποίηση του MEK1/ERK μονοπατιού επάγει τη φωσφορυλίωση στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης p53 η οποία ευνοεί την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεΐνών p53 και Smad (151). Με βάση ακόμη πιο πρόσφατα δεδομένα διαπιστώθηκε η συνεργατική δράση του TGFβ-1 με το ογκογονίδιο Ras και μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης p53 η οποία οδηγεί στο σχηματισμό ενός p53/p63/Smad συμπλόκου το οποίο ανταγωνίζεται τις λειτουργίες της p63 πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη Smad3 στο σύμπλοκο p53/p63/Smad δε δρα ως μεταγραφικός παράγοντας αλλά ως πλατφόρμα η οποία φέρνει κοντά τις πρωτεΐνες p53 και p63 καθώς η απενεργοποίηση ή αποσιώπηση της έκφρασής της εμποδίζει την αλληλεπίδραση p53-p63. (152). Πιο αναλυτικά, οι μεταλλαγές στα μονοπάτια των πρωτεϊνών p53 και Ras επάγουν την ανάπτυξη και επιβίωση των κυττάρων στις νεοπλασίες των πρώτων σταδίων αλλά επίσης σκιαγραφούν ένα κυπαρικό υπόβαθρο με συγκεκριμένη ροπή προς μετάσταση. Το υπόβαθρο αυτό πρόκειται να αξιοποιηθεί κατά την ανάπτυξη των όγκων μόλις τα κύπαρα αποκτήσουν πρόσβαση σε υψηλές συγκεντρώσεις TGFβ-1 οι οποίες είτε παράγονται αυτόνομα είτε προέρχονται από το περιβάλλον (152). Παρουσία μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης, ο TGFβ-1 αποκτά τον έλεγχο έναντι της p63, γεγονός που προσδίδει πρόσφορο έδαφος στην ανάπτυξη των ογκογονικών του ιδιοτήτων. Πράγματι, η αποσιώπηση της έκφρασης της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης σε μεταστατικά καρκινικά κύπαρα δεν επηρεάζει την έκφραση των συστατικών του ογκογονικού προγράμματος του TGFβ-1 αλλά προλαμβάνει τη δημιουργία του φαινοτύπου του. Η απενεργοποίηση της p63 πρωτεΐνης προκαλεί μετασχηματισμό των κυπάρων σε κακοήθεις όγκους ενώ διασώζει τις μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη (152). Βρέθηκαν δύο γονίδια, τα Sharp1 και Cyclin G2 μέσω των οποίων η p63 εμποδίζει τη διαδικασία της μετάστασης.

Όλα τα παραπάνω δεδομένα υποστηρίζουν ένα μοντέλο το οποίο συσχετίζει τη δράση των μονοπατιών TGFβ-1 και MEK1/ERK μέσω της πρωτεΐνης p53. Το μοντέλο αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να ισχύει και στη περίπτωση του γονιδίου της RhoB καθώς η πρωτεΐνη p53 είναι μεταλλαγμένη στα κύτταρα HaCaT και μάλιστα στη προηγούμενη μελέτη ανιχνεύθηκε η αλληλεπίδρασή της με την p63 μετά από επίδραση με TGFβ-1 στα κύτταρα αυτά (*152*). Στη πορεία λοιπόν της παρούσας μελέτης, ελέγχθηκε ο ρόλος της μεταλλαγμένης p53 πρωτεΐνης στη στρατολόγηση της Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB και διαπιστώθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασής της p53 παρεμποδίζει την πρόσδεση της Smad3 στο RhoB υποκινητή (Εικόνα 52B). Επομένως, φαίνεται ότι στα κύτταρα HaCaT, το μονοπάτι των MEK1/ERK κινασών συνεργάζεται με αυτό των πρωτεϊνών Smad και με τη μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη στη ρύθμιση του γονιδίου της RhoB ως απόκριση στον TGFβ-1.

Στην εικόνα 76 παρουσιάζεται το προτεινόμενο μοντέλο μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 στα κύτταρα HaCaT το οποίο συνοψίζει τα δεδομένα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με εκείνα παλαιότερων μελετών (99, 122, 151-152, 172-173). Η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 μεσολαβείται από την ενεργοποίηση των μονοπατιών των Smad και ERK πρωτεϊνών και χρειάζεται για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, τη κυτταρική μετακίνηση αλλά και επιπλέον βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου ως απόκριση στον TGFβ-1. Αναλυτικότερα, η φωσφορυλίωση των Smad και ERK πρωτεϊνών από τον TGFβ-1 οδηγεί στη συσσώρευσή τους στο πυρήνα όπου η ενεργοποιημένη ERK φωσφωρυλιώνει τη μεταλλαγμένη p53 πρωτεΐνη και ευνοεί το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ των p53, p63 και Smad πρωτεϊνών τα οποία εξυπηρετούν δύο πιθανούς σκοπούς :

α) ενισχύουν τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών Smad στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 μαζί με τη p63 λειτουργούν ως πλατφόρμα για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Smad με επιπλέον παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στη κοντινή περιοχή του RhoB υποκινητή όπως ο NF-Y παράγοντας ο οποίος προσδένεται στο ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT-1 το οποίο βρίσκεται κοντά στη θέση πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών. Έχει βρεθεί πρόσφατα ότι ο παράγοντας NF-Y αλληλεπιδρά με τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη p53 και τη στρατολογεί στα ρυθμιστικά στοιχεία CCAAT πολλών γονιδίων στόχων του και αυτή με τη σειρά της στρατολογεί τη πρωτεΐνη p300 η οποία καταλύει την ακετυλίωση των ιστονών ως απόκριση στη βλάβη του DNA (173). Η στρατολόγηση της πρωτεΐνης p53 σε αλληλουχίες CCAAT εμποδίζεται απουσία έκφρασης του NF-YA παράγοντα. Επομένως, οι ενδογενείς πρωτεΐνες NF-Y, μεταλλαγμένη p53 και ο παράγοντας p300 σχηματίζουν τριμερές σύμπλοκο μετά από γενοτοξικό στρες (173). Σε συμφωνία με το μοντέλο αυτό, στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε η συστασιακή πρόσδεση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης p53 στη κοντινή περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB (data no shown).

β) ανταγωνίζονται τις αντι-μεταναστευτικές ιδιότητες της ενδογενούς p63. Θεωρείται ότι η μεταβολή των ιδιοτήτων του TGFβ-1 από ογκοκατασταλτικές σε ογκογονικές σχετίζεται με τη κατανομή της p63 μέσα στο κύτταρο σε τρεις ομάδες : ελεύθερη, προσδεδεμένη σε πρωτεΐνες Smad σε μεταγραφικά σύμπλοκα ή απενεργοποιημένη σε p53/p63/Smad πρωτεινικά σύμπλοκα (152).

Το αποτέλεσμα του παραπάνω μηχανισμού είναι η ενεργοποίηση μέσω του μονοπατιού των πρωτεϊνών Smad του υποκινητή του γονιδίου της RhoB, η αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης RhoB μες το κύτταρο και η συμμετοχή της σε λειτουργίες του κυττάρου ως απόκριση στον TGFβ-1 όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η κυτταρική μετανάστευση.



Εικόνα 76 : Προτεινόμενος μηχανισμός μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από τον TGFβ-1 ο οποίος συντελεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, στη κυτταρική μετανάστευση αλλά και σε άλλες βιολογικές λειτουργίες του κυττάρου.

Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ-1 στις TGFβ-1-επαγώμενες κυτταρικές λειτουργίες

Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μετακίνηση των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1

Η μετανάστευση των κυττάρων αποτελεί διαδικασία άρρηκτα συνδεδεμένη με φυσιολογικές αλλά και με παθολογικές διαδικασίες όπως η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Ο TGFβ-1 και οι Rho GTPάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση πολλών καρκινικών κυτταρικών σειρών (18, 45-46, 49, 152, 158, 174-177). Ο ρόλος της μικρής GTPάσης RhoB στη μετακίνηση των κυττάρων ως απόκριση στον TGFβ-1 μελετήθηκε αρχικά μέσω χρησιμοποίησης της Clostridium botulinum C3 transferase η οποία καταστέλει τη δράση των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC μέσω ADPριβοζυλίωσης της ασπαραγίνης 41 στη περιοχή πρόσδεσης των πρωτεϊνών τελεστών (178). Μέσω του συγκεκριμένου πειράματος δείχθηκε ότι η καταστολή των τριών Rho πρωτεϊνών έχει σοβαρές επιπτώσεις στη μορφολογία και στη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων προστάτη PC3. Η επίδραση με TGFβ-1 παρουσία της C3 transferase διασώζει μερικώς τις σοβαρές αυτές μεταβολές δίνοντας στα κύτταρα ένα ενδιάμεσο φαινότυπο. Μια πιθανή εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι η διάσωση του φαινοτύπου που προκαλείται από την C3 transferase να μεσολαβείται από επιπλέον μεταγραφικές δράσεις του TGFβ-1 πλην της ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB καθώς η λειτουργία της RhoB πρωτεΐνης καταστέλεται από τη C3 transferase.

Στη συνέχεια, η μελέτη εστιάστηκε ειδικά στο ρόλο της RhoB πρωτεΐνης στη μετακίνηση των φυσιολογικών κυττάρων HaCaT αλλά και των καρκινικών κυττάρων προστάτη DU145 είτε μέσω καταστολής της δράσης από την υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της (RhoBN19) είτε μέσω αποσιώπησης της έκφρασης του γονιδίου της. Βρέθηκε ότι η RhoB GTPάση χρειάζεται εξειδικευμένα για τη κυτταρική μετανάστευση των κυττάρων HaCaT και DU145 η οποία επάγεται από τον TGFβ-1 (Εικόνα 54) υποστηρίζοντας το σημαντικό ρόλο της πρωτεΐνης RhoB στις αποκρίσεις των κυττάρων αυτών στον TGFβ-1. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες οι οποίες είχαν διαπιστώσει τη συνεισφορά της RhoB στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ-1 (99, 122). Ωστόσο, η RhoB δε βρέθηκε να συμμετέχει στη μετανάστευση κυττάρων νεφρού η οποία επάγεται από συνδυασμό των παραγόντων TGFβ-1 και EGF (158) αλλά στο συγκεκριμένο μοντέλο δεν είναι γνωστό εάν επάγεται η έκφραση της πρωτεΐνης RhoB.

Η καταστολή της δράσης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα PC3 μείωσε τη μεταναστευτικότητα τους (Εικόνα 55). Για το λόγο όμως ότι η επίδραση του TGFβ-1 στη μετακίνηση των κυττάρων PC3 είναι σαφώς μικρότερη από αυτή των επιθηλιακών κυττάρων DU145 και HaCaT, η μεταβολή στη TGFβ-1επαγώμενη κινητικότητά τους λόγω αποσιώπησης της έκφρασης της RhoB είναι ελάχιστη. Ωστόσο, η απουσία της πρωτεΐνης RhoB μειώνει τα βασικά επίπεδα μεταναστευτικότητας των κυττάρων PC3 γεγονός το οποίο δε παρατηρήθηκε στις άλλες δύο κυτταρικές σειρές οι οποίες μελετήθηκαν (Εικόνες 54 και 56). Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 50% των βασικών επιπέδων μετακίνησης τους ενώ η επίδραση με TGFβ-1 προκάλεσε ακόμα μεγαλύτερη μείωση. Η αποσιώπηση της πρωτεΐνης RhoA μείωσε κατά ένα μικρό ποσοστό τα βασικά επίπεδα μετακίνησης των κυττάρων PC3 αλλά η επίδραση με TGFβ-1 επανέφερε τη μετακίνηση τους στα ίδια επίπεδα με αυτά των κυττάρων ελέγχου κάτι που δε συνέβη όμως στη περίπτωση αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB.

Το συμπέρασμα των πρώτων αυτών πειραμάτων μέτρησης της μεταναστευτικότητας των κυττάρων είναι ότι η πρωτεΐνη RhoB και στις τρεις κυτταρικές σειρές HaCaT, DU145 και PC3 οι οποίες μελετήθηκαν παίζει σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση των κυττάρων η οποία επάγεται από το μονοπάτι του TGFβ-1. Ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μετανάστευση των κυττάρων έχει δειχθεί άλλοτε θετικός και άλλοτε αρνητικός ανάλογα με τη κυτταρική σειρά αλλά και με τα ερεθίσματα και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Έχει δειχθεί ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη μετακίνηση των μακροφάγων εξαρτάται από το υπόστρωμα (177). Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι η απουσία της RhoB προκαλεί μείωση της μετανάστευσης των μακροφάγων (RhoB-/- Bone marrow macrophages, BMMs) σε υπόστρωμα γυαλιού λόγω της μειωμένης δυνατότητας προσκόλλησής τους αλλά όχι σε

υπόστρωμα καλυμμένο με φιμπρονεκτίνη στο οποίο τα RhoB -/- μακροφάγα μετακινούνται γρηγορότερα από τα αγρίου τύπου λόγω της μικρότερης επιφάνειας τους (177). Παράλληλα έχει δειχθεί ότι εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού οι οποίοι δεν εκφράζουν τη πρωτεΐνη RhoB εμφανίζουν μειωμένη μεταναστευτικότητα σε υπόστρωμα φιμπρονεκτίνης καθώς επίσης και μειωμένη μετακίνηση ως απόκριση στην *in vitro* επούλωση πληγών (wound healing) γεγονότα τα οποία σχετίζονται πιθανότατα με τις περιορισμένες ιδιότητες προσκόλλησης σε υπόστρωμα των κυττάρων αυτών λόγω περιβαλλοντικών συνθηκών στρες (6, 18). Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι η εκτοπική έκφραση της RhoB πρωτεΐνης ανταγωνίζεται την ογκογονική δράση του μονοπατιού Ras/PI3K/Akt και ως συνέπεια εμποδίζει το μετασχηματισμό και τη μετανάστευση των κυττάρων ενώ επίσης παίζει αρνητικό ρόλο στη μετάσταση κυττάρων μελανώματος στο πνεύμονα μοντέλου ποντικού (49).

Η διερεύνηση του ρόλου των πρωτεϊνών RhoA και RhoC στη μετακίνηση κυττάρων HaCaT έδωσε μη αναμενόμενα αλλα ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, δείχθηκε ότι η καταστολή της δράσης της πρωτεΐνης RhoA ή αποσιώπηση της έκφρασής της προκάλεσε πολύ μεγάλη αύξηση της μεταναστευτικότητας των κυττάρων HaCaT ενώ η επίδραση με TGFβ-1 ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την αύξηση αυτή. Αντίστοιχα η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφή της μείωσε τη μετακίνηση των κυττάρων HaCaT. Αύξηση της μετακίνησής τους προκάλεσε και η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC αλλά σε μικρότερη κλίμακα και η αύξηση αυτή δεν ενισχύθηκε από την παρουσία του TGFβ-1 (Εικόνα 57). Τα επιθηλιακά κύτταρα HaCaT έχουν πολύ ισχυρούς συνδέσμους μεταξύ τους, αναπτύσσονται και μετακινούνται υπό μορφή αποικιών. Οι Rho GTPάσες κατανέμονται στα σημεία των διακυτταρικών συνδέσμων (179). Πιθανότατα λοιπόν η απουσία των RhoA και RhoC GTΡασών να προκαλεί τη διάσπαση των διακυτταρικών συνδέσμων (junctions) και μέσω αυτού την αύξηση της μετακίνησης των κυττάρων. Πράγματι βρέθηκε πολύ πρόσφατα ότι η αποσιώπηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoC είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Ε-Cadherin η οποία αποτελεί βασικό συστατικό των συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων (158).

196

Η αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και RhoC προκάλεσε και μορφολογικές αλλαγές οι οποίες ήταν πιο προφανείς σε κύτταρα PC3. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB έδωσε στα κύτταρα ένα περισσότερο σφαιρικό φαινότυπο, μείωσε το μέγεθος και τη διάμετρο τους (spread area) (Εικόνα 58). Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενη μελέτη στην οποία τα RhoB-/μακροφάγα εμφανίστηκαν πιο σφαιρικά από τα αγρίου τύπου (*177*). Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoA μετέτρεψε τα κύτταρα σε πιο επιμήκη, με μακριές προσφύσεις (protrusions) ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC έδωσε ένα ενδιάμεσο φαινότυπο αυτών των RhoA και RhoB, κατά τον οποίο ο πληθυσμός των κυττάρων είναι μείγμα τριών διακριτών ομάδων κυττάρων με βάση τη μορφολογία τους, διακρίνονται δηλαδή σε επιμήκη, μικρά και σφαρικά και σε μεγάλης διαμέτρου (Εικόνα 58).

Πειράματα στα οποία πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ταχύτητας της τυχαίας μετακίνησης κυττάρων DU145 και PC3 έδειξαν μικρή αύξηση της ταχύτητας μετακίνησης και των δύο κυτταρικών σειρών μετά από επίδραση με TGFβ-1 (Εικόνα 59). Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB προκάλεσε μείωση της ταχύτητας των βασικών επιπέδων μετακίνησης των κυττάρων. Η επίδραση με TGFβ-1 απουσία της πρωτεΐνης RhoB δε προκάλεσε αύξηση στη ταχύτητα μετακίνησης ενώ μάλιστα στη περίπτωση των κυττάρων PC3 προκάλεσε και μικρή μείωση της ταχύτητάς τους. Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoA είχε ως αποτέλεσμα την μείωση της ταχύτητας των κυττάρων ενώ η επίδραση με TGFβ-1 επανέφερε τη ταχύτητα μετακίνησης των κυττάρων DU145 στα ίδια επίπεδα με αυτά των κυττάρων ελέγχου ενώ στα κύτταρα PC3 δε προκάλεσε καμία επιπλέον αλλαγή. Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoC δεν είχε καμία σημαντική επίδραση στη ταχύτητα μετακίνησης των κυττάρων DU145 ενώ προκάλεσε μείωση στη ταχύτητα των βασικών επιπέδων μετακίνησης των κυττάρων PC3 η οποία έγινε εντονότερη με την παρουσία TGFβ-1 σε συμφωνία με τα πειράματα επούλωσης πληγής.

Το συμπέρασμα από τα πειράματα διερεύνησης της μετακίνησης των κυττάρων DU145, PC3 και HaCaT είναι ότι η πρωτεΐνη RhoB εμπλέκεται στη βασική αλλά και στην TGFβ-1-επαγώμενη μετακίνηση τους. Φαίνεται λοιπόν ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB και η επακόλουθη

αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της είναι σημαντική για τις αποκρίσεις του κυττάρου στον TGFβ-1 και ειδικά για αυτήν της κυτταρικής μετανάστευσης.

Τα κύτταρα HaCaT στα οποία διερευνήθηκε στα πλαίσια της παρούσης διατριβής ο μηχανισμός της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι του TGFβ-1 αλλά και ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στη κυτταρική μετανάστευση η οποία επάγεται από τον TGFβ-1 αποτελούν πολύ καλό μοντέλο για τη μελέτη δύο επιπλέον βιολογικών διεργασιών οι οποίες βασίζονται στη σηματοδότηση μέσω του TGFβ-1 και σχετίζονται άμεσα με το καρκίνο: α) την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) των κυττάρων και β) το στάματημα του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Ο ρόλος της ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ-1 στην TGFβ-1-επαγώμενη Επιθηλιο-Μεσεγχυματική Μετατροπή (ΕΜΤ) κυττάρων HaCaT

Ο TGFβ-1 έχει ταυτοποιηθεί ως η κινητήρια δύναμη της διαδικασίας της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) των κυττάρων η οποία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και κατά την μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Πρόσφατα έχει δειχθεί ότι η επαγωγή της ΕΜΤ από τον TGFβ-1 χρειάζεται την δράση των Rho GTPασών σε πληθώρα κυτταρικών τύπων (129, 136, 155-158). Το γρηγορότερο γεγονός κατά την TGFβ-1-επαγώμενη ΕΜΤ είναι η ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης η οποία συμβαίνει στα πρώτα πέντε λεπτά επίδρασης με TGFβ-1 και διατηρείται για σύντομο χρονικό διάστημα ανάλογα με το κυτταρικό τύπο και ακολουθείται από την ενεργοποίηση κινασών όπως της ROCK (80). Σε πρόσφατη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η καταστολή της δράσης της RhoA μέσω υπερέκφρασης της επικρατούσας ανενεργής μορφής της με тŋ χρησιμοποίηση ανασυνδυασμένου αδενοϊού ή η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoA προκαλεί επαγωγή της ΕΜΤ σε ενδοθηλιακά κύτταρα (180).

Ακόμη πιο πρόσφατα βρέθηκε ότι οι Rho πρωτεΐνες έχουν διακριτές λειτουργίες στη διαδικασία της ΕΜΤ σε νεφρικά κύτταρα ΗΚC (human renal proximal tubule cell line) (158). Στη μελέτη αυτή δείχθηκε ότι η μείωση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης E-cadherin, πρωτεΐνης μάρτυρα του επιθηλιακού φαινοτύπου των κυττάρων, εξαρτάται από τη κινάση ROCK ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA και RhoC επίσης οδηγεί σε απώλεια της E-cadherin μέσω όμως διαφορετικών μηχανισμών. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση της έκφρασης της RhoA οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταγραφικού καταστολέα Snail1 και σε επακόλουθη ελάττωση της μεταγραφής του γονιδίου της E-cadherin ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης της RhoC ενεργοποιεί την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης Εcadherin μέσω πρωτεασώματος. Η απώλεια της RhoC εμποδίζει τη μετακίνηση των κυττάρων η οποία επάγεται από την ΕΜΤ κατά 50% (158). Επίσης βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη RhoB παίζει ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων καθώς η αποσιώπηση της έκφρασής της αυξάνει την απόπτωση ката 300% (158).

Η ανακάλυψη νέων γονιδιακών στόχων του μονοπατιού του TGFβ-1 οι οποίοι συμμετέχουν είτε θετικά είτε αρνητικά στις προ-ογκογονικές δράσεις του όπως η επαγωγή της διαδικασίας ΕΜΤ των κυττάρων είναι απαραίτητη για τη κατανόηση του διττού ρόλου του TGFβ-1 στα διαφορετικά στάδια της καρκινογένεσης. Για το λόγο αυτό στη παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια πρώτη διερεύνηση του ενδεχόμενου ρόλου της πρωτεΐνης RhoB, η οποία αποτελεί ένα νέο μεταγραφικό στόχο του TGFβ-1, στη διαδικασία της EMT. Η μελέτη έγινε σε κύτταρα HaCaT στα οποία ο TGFβ-1 επάγει ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της GTPάσης RhoB και επίσης αποτελούν πολύ καλό μοντέλο για την TGFβ-1-επαγώμενη EMT. Βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα HaCaT, χωρίς τη προσθήκη TGFβ-1 εξωγενώς, προκαλεί ανακατανομή της πρωτεΐνης Εcadherin από τους συνδέσμους των κυττάρων στο περιπυρηνικό κυτταρόπλασμα και ως συνέπεια το διαχωρισμό των κυττάρων πιθανότατα λόγω διάσπασης των διακυτταρικών συνδέσμων και την απώλεια της διακυτταρικής επαφής (cell-cell contact). Η επίδραση με TGFβ-1 σε κύτταρα HaCaT απουσία της πρωτεΐνης RhoB έκανε ακόμη πιο αισθητή την απώλεια του επιθηλιακού φαινοτύπου καθώς προκάλεσε μείωση στην έκφραση της

199

πρωτέινης E-cadherin. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και λόγω καταστολής της δράσης της πρωτείνης RhoB μέσω υπερέκφρασης της επικρατούσας ανενεργής μορφής της (Εικόνες 60-62). Η καταστολή της δράσης ή της έκφρασης της πρωτείνης RhoB δεν φαίνεται να εμποδίζει το σχηματισμό ινιδίων του στρες αλλά επιδρά αρνητικά στους διακυτταρικούς συνδέσμους μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η επαφή μεταξύ των κυττάρων. Παρόμοια αποτελέσματα δείχθηκαν και σε πρόσφατη μελέτη σε νεφρικά κύτταρα μετά από επίδραση συνδυασμού TGFβ-1 και EGF με τη διαφορά όμως ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτείνης RhoB δεν επηρέασε την έκφραση της Ε-cadherin αλλά προκάλεσε μεταβολές στον ενδοκυττάριο εντοπισμό της κινάσης FAK (focal adhesion kinase) (*158*). Στο μοντέλο όμως αυτό των νεφρικών κυττάρων δεν είναι γνωστό εάν η επίδραση με TGFβ-1 και EGF προκαλεί επαγωγή της έκφρασης της πρωτείνης RhoB.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, ο ρόλος της πρωτεΐνης RhoB μοιάζει να είναι ανασταλτικός στη διαδικασία της EMT καθώς η επαγωγή της EMT από τον TGFβ-1 απουσία της RhoB είναι γρηγορότερη και εντονότερη. Σε ένα κυτταρικό μοντέλο το οποίο υφίσταται τόσο σταμάτημα του πολλαπλασιασμού (growth arrest) όσο και EMT ως απόκριση στον TGFβ-1 όπως τα κύτταρα HaCaT, η πρωτεΐνη RhoB μπορεί να δρα ανασταλτικά στην διάσπαση των διακυτταρικών συνδέσμων και ως συνέπεια στην επαγωγή της EMT αλλά μπορεί ταυτόχρονα να εμπλέκεται και στο ογκοκατασταλτικό μονοπάτι του TGFβ-1. Ένα αντίστοιχο παράδειγμα γονιδιακού στόχου του TGFβ-1 ο οποίος εμποδίζει τη διαδικασία EMT αλλά συμμετέχει ενεργά στο κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ-1 σε κύτταρα HaCaT είναι ο μεταγραφικός παράγοντας Meox2 (*181*).

<u>Ο ρόλος της RhoB πρωτεΐνης στο σταμάτημα του</u> <u>πολλαπλασιασμού (growth arrest) κυττάρων HaCaT που επάγεται</u> <u>από τον TGFβ-1</u>

Η απόκριση των κυττάρων στο κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ-1, η οποία επιτυγχάνεται με σταμάτημα της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού τους (growth arrest), προσδίσει στο μονοπάτι του TGFβ-1 ογκοκατασταλτικές ιδιότητες στα πρώτα στάδια του καρκίνου. Το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου στα επιθηλιακά κύτταρα μεσολαβείται από την άμεση ρύθμιση της έκφρασης μια μικρής ομάδας γονιδίων από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Ο TGFβ-1 επάγει την έκφραση των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p21^{WAF1} και p15^{CDKN2B} ενώ αναστέλει την έκφραση του ογκογονιδίου Myc και των αναστολέων της διαφοροποίησης ld1, ld2 και ld3 (*182*). Παράλληλα, οι Rho GTPάσες έχουν δειχθεί να συμμετέχουν στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μέσω ρύθμισης των επιπέδων της κυκλίνης D1 (cyclin D1) όπως επίσης και των p21^{WAF1} και p27^{KIP1} πρωτεϊνών οι οποίες προσδένονται και τροποποιούν τη δράση των εξαρτώμενων από κυκλίνη κινασών (CDKs) (*1, 8*).

Στη παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα HaCaT διπλασιάζει το ποσοστό των κυττάρων τα οποία δεν είναι μεταβολικά ενεργά είτε λόγω σταματήματος του πολλαπλασιασμού τους είτε λόγω απόπτωσης ως απόκριση στον TGFβ-1 (Εικόνα 63). Επομένως, φαίνεται ότι η πρωτεΐνη RhoB έχει ανασταλτικό ρόλο στο κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ-1.

Μεταξύ των έξι γνωστών γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη,των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από το TGFβ-1/Smad μονοπάτι όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η επαγωγή του γονιδίου p21 έχει συσχετιστεί σε πολλούς τύπους επιθηλιακών κυττάρων με ενεργό κυτταροστατικό πρόγραμμα (183). Επιπλέον, η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης p21 έχει συνδεθεί με τη μετατροπή των ιδιοτήτων του TGFβ-1 από κυτταροστατική κυτοκίνη σε κυτοκίνη Jμ ιδιότητες επαγωγής TOU κυτταρικού πολλαπλασιασμού (184). Ο TGFβ-1 επάγει τη γρήγορη αύξηση των επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης της p21 αλλά επίσης συντελεί στη διατήρηση των αυξημένων επιπέδων της p21 για μεγάλα χρονικά διαστήματα (185-188). Η μακροπρόθεσμη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του p21 παίζει σημαντικό ρόλο στο κυτταροστατικό πρόγραμμα των επιθηλιακών κυττάρων (186).

Η ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης RhoB στο σταμάτημα του πολλαπλασιασμού που επάγεται από τον TGFβ-1 οδήγησε στη διερεύνηση ενδεχόμενης δράσης της στη ρύθμιση της μακροπρόθεσμης έκφρασης του γονιδίου p21 από τον TGFβ-1. Πράγματι, βρέθηκε ότι η καταστολή της δράσης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα HaCaT μέσω υπερέκφρασης της

201

επικρατούσας ανενεργής μορφής της, RhoBN19, ενίσχυσε την αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου p21 η οποία επάγεται μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ-1 (Εικόνα 64Α). Η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα HaCaT αλλά και στις δύο καρκινικές σειρές προστάτη DU145 και PC3 προκάλεσε επίσης αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου p21. Η επίδραση με TGFβ-1 απουσία της πρωτεΐνης RhoB εκτόξευσε τα επίπεδα mRNA του p21 και στις τρεις παραπάνω κυτταρικές σειρές (Εικόνα 64B). Η αρνητική δράση της πρωτεΐνης RhoB στην έκφραση του γονιδίου p21 επιβεβαιώθηκε και με μέτρηση της ενεργότητας του υποκινητή (-2300/+8) του p21 παρουσία υπερεκφρασμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης RhoB. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου ή της συστασιακά ενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoB προκαλεί μείωση των βασικών επιπέδων ενεργότητας του p21 υποκινητή ενώ η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της RhoB όπως και της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoA προκαλεί μικρή αύξηση των βασικών επιπέδων ενεργότητας του.

Έχει δειχθεί προηγουμένως ότι σε περιπτώσεις όπου εμποδίζεται η σηματοδότηση μέσω των Rho πρωτεϊνών, η συστασιακά ενεργή μορφή του Ras επάγει τη έκφραση του γονιδίου p21 με συνέπεια να σταματάει η είσοδος στη φάση σύνθεσης του DNA του κυτταρικού κύκλου (189). Όταν όμως οι πρωτεΐνες Rho είναι ενεργές, η επαγωγή του γονιδίου p21 από το Ras καταστέλεται με συνέπεια την επαγωγή της σύνθεσης του DNA. Τα κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τη πρωτεΐνη p21 δε χρειάζονται τη σηματοδότηση μέσω των πρωτεϊνών Rho για την επαγωγή της σύνθεσης του DNA από το ενεργοποιημένο Ras, υποδεικνύοντας ότι από τη στιγμή που θα ενεργοποιηθεί η πρωτεΐνη Ras, ο πρωταρχικός ρόλος των πρωτεϊνών Rho είναι η καταστολή της επαγωγής του γονιδίου p21 (189). Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι η ενεργοποίηση της RhoA από τη φιμπρονεκτίνη προκαλεί τη συσσώρευση της κυκλίνης D1 ενώ μειώνει τα επίπεδα mRNA του γονιδίου p21 κατά τη πρόοδο της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου (10). Στα πειράματα όμως αυτά για τη καταστολή της δράσης της RhoA πρωτεΐνης είχε χρησιμοποιηθεί η C3 transferase η οποία καταστέλει και τις πρωτεΐνες RhoB και RhoC.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, προκύπτει ότι η πρωτεΐνη RhoB δρα ανασταλτικά στο σταμάτημα της ανάπτυξης των κυττάρων HaCaT ως απόκριση στον TGFβ-1 πιθανότατα μέσω μείωσης των επιπέδων της έκφρασης του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου, p21. Στο σημείο αυτό της μελέτης τέθηκε όμως το εξής ερώτημα από τη στιγμή που η δράση της πρωτεΐνης RhoB στη διαδικασία της EMT αλλά και στο κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ-1, δηλαδή τόσο στις ογκογονικές όσο και στις ογκοκατασταλτικές ιδιότητες του TGFβ-1 μονοπατιού είναι ανασταλτική, ποιος ο ρόλος της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της από τον TGFβ-1; Μια πιθανή εξήγηση δίδεται στην επόμενη ενότητα.

Συμμετοχή της πρωτεΐνης RhoB σε θηλειά αυτοκαταστολής (autoinhibitory loop) του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ-1

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ενδεχόμενος ρόλος της πρωτεΐνης RhoB στην έκφραση δύο επιπλέον γονιδιακών στόχων του TGFβ-1, του γονιδίου PAI-1 και του δικού της γονιδίου. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη των επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1 μετά από καταστολή της δράσης ή αποσιώπησης της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB ήταν παρόμοια με αυτά του p21 γονιδίου. Δηλαδή ο TGFβ-1 απουσία ενεργής πρωτεΐνης RhoB επάγει μεγαλύτερη μακροπρόθεσμη αύξηση των επιπέδων έκφρασης του PAI-1 (Εικόνα 66).

Ενδιαφέροντα ήταν και τα δεδομένα που προέκυψαν από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της RhoB μετά από υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της RhoB παρουσία TGFβ-1. Παρατηρήθηκε ότι σε αντιστοιχία με τις περιπτώσεις των γονιδίων p21 και PAI-1, η καταστολή της δράσης της πρωτεΐνης RhoB ενισχύει την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της από τον TGFβ-1 (Εικόνα 67Α). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με πειράματα μέτρησης της ενεργότητας του υποκινητή (-726/+86) του γονιδίου της RhoB παρουσία υπερεκφρασμένων αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης RhoB. Συγκεκριμένα η υπερέκφραση της αγρίου τύπου ή της συστασιακά ενεργής μορφής της RhoB προκάλεσε μεγάλη μείωση των βασικών επιπέδων ενεργότητας του

υποκινητή της ενώ η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της αύξησε τα βασικά επίπεδα ενεργότητάς τους (Εικόνα 67Β).

Αξιοσημείωτη είναι στο σημείο αυτό η παρατήρηση ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoA προκάλεσε επίσης μείωση της ενεργότητας του RhoB υποκινητή (Εικόνα 68). Το αποτέλεσμα αυτό υποστηρίζει δεδομένα από την ανάλυση RT-PCR τα οποία έδειξαν ότι η αποσιώπηση της έκφρασης των πρωτεϊνών RhoA ή RhoC προκαλεί αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 56B) χωρίς όμως το φαινόμενο αυτό να συμβαίνει και αντίστροφα. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ενδείξεις για ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB από τα άλλα μέλη της RhoA υποοικογένειας.

Χαρτογράφηση της περιοχής του υποκινητή η οποία είναι υπεύθυνη για την αυτοκαταστολή του γονιδίου της RhoB έδειξε ότι η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και +19 του RhoB υποκινητή ευθύνεται για την αρνητική αυτή ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της RhoB. Σημειακές μεταλλαγές στο ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT το οποίο βρίσκεται στην περιοχή αυτή εμπόδισαν τη μείωση των βασικών επιπέδων ενεργότητας του υποκινητή από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB (Εικόνα 68). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η κοντινή περιοχή του RhoB υποκινητή και μάλιστα η αλληλουχία CCAAT στη θέση -61/-57 είναι απαραίτητη και επαρκής για την αυτοκαταστολή του γονιδίου αλλά και για τη καταστολή από την πρωτεΐνη RhoA.

Το ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT-2 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB όπως δείχθηκε στη παρούσα μελέτη δε συμμετέχει μόνο στην αρνητική αυτορύθμιση του γονιδίου της RhoB αλλά και στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου από το μονοπάτι των πρωτεϊνών Smad. Για το λόγο αυτό στη συνέχεια ελέγχθηκε το ενδεχόμενο η ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης RhoB στη μεταγραφή του γονιδίου της να σχετίζεται με την πρόσδεση των πρωτεϊνών Smad στον υποκινητή της RhoB. Πράγματι βρέθηκε ότι παρουσία υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης RhoB, οι πρωτεΐνες Smad3/Smad4 δε μπορούν να ενεργοποιήσουν τον υποκινητή του γονιδίου της RhoB (Εικόνα 69).

Η αρνητική επίδραση της πρωτεΐνης RhoB στη μεταγραφική ικανότητα των Smad πρωτεϊνών όμως δεν αφορά αποκλειστικά τη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της RhoB αλλά αποτελεί γενικότερο φαινόμενο καθώς βρέθηκε ότι η υπερέκφραση της πρωτεΐνης RhoB καταστέλει επίσης την ενεργοποίηση τεχνητών υποκινητών με θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad (Εικόνα 70). Σε προηγούμενη μελέτη είχε δειχθεί ότι σε επιθηλιακά κύτταρα, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου RhoB πρωτεΐνης ανταγωνίζεται τη μεταγραφική ενεργοποίηση ενός υποκινητή με θέσεις πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών ενώ η υπερέκφραση της επικρατούσας αρνητικής μορφής της RhoB ενίσχυσε την ενεργοποίησή του (80, 137).

Πως μπορεί όμως μια πρωτεΐνη η οποία δε μπαίνει στο πυρήνα όπως η GTΡάση RhoB να επηρεάζει τη λειτουργία ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος δρα στον πυρήνα όπως οι πρωτεΐνες Smad ;

Όπως είναι γνωστό οι πρωτεΐνες Smad μετακινούνται συνεχώς από και προς πυρήνα. Παρουσία TGFβ-1, OI R-Smad TOV πρωτεϊνες φωσφορυλιώνονται από τον υποδοχέα τύπου Ι μες στα ενδοσώματα και ως τριμερή σύμπλοκα με τη Smad4 εισέρχονται στο πυρήνα όπου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του TGFβ-1 (106, 190). Επομένως, η μεταγραφική ικανότητα των πρωτεϊνών Smad, εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση και την επακόλουθη μεταφορά τους στο πυρήνα. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη RhoB εντοπίζεται κυρίως στα ενδοσώματα όπου πραγματοποιείται η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών Smad στη συνέχεια της μελέτης διερευνήθηκε ο ενδεχόμενος ρόλος της RhoB στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad3. Βρέθηκε λοιπόν ότι η υπερέκφραση της αγρίου τύπου μορφής της πρωτεΐνης RhoB καταστέλει τη φωσφορυλίωση της Smad3 μετά από επίδραση με TGFβ-1 ενώ η αποσιώπηση της έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB προκαλεί αύξηση στη φωσφορυλίωση της Smad3 (Εικόνα 71).

Ως αναμενόταν λόγω καταστολής της φωσφορυλίωσής της, η πρωτεΐνη Smad3 παρουσία υπερεκφρασμένης αγρίου τύπου πρωτεΐνης RhoB, παραμένει στο κυτταρόπλασμα μετά από επίδραση με TGFβ-1 (Εικόνα 72). Σε προηγούμενη μελέτη δείχθηκε ότι η υπερέκφραση της επικρατούσας ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης RhoA σε κύτταρα Monc-1 (neural crest stem cell line) παρεμποδίζει τη μεταφορά στο πυρήνα των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3 λόγω καταστολής της φωσφορυλίωσής τους, μειώνει την ενεργοποίηση από τον TGFβ-1 ενός υποκινητή με θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad αλλά και την επαγωγή της έκφρασής της πρωτεΐνης α-SMA (alpha-smooth muscle actin) από τον TGFβ-1. Η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής μορφής της RhoA ενίσχυσε την ενεργότητα του υποκινητή με τις θέσεις πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών (138). Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η χρησιμοποίηση της C3 transferase, η οποία καταστέλει τις RhoA, RhoB και RhoC πρωτεΐνες παρεμποδίζει τη μεταφορά στο πυρήνα των πρωτεϊνών Smad και εξασθενεί την ενεργοποίηση του υποκινητή με τις θέσεις πρόσδεσης των Smad (138). Η χρησιμοποίηση όμως της C3 transferase σε κύτταρα HaCaT, DU145 και PC3 στη παρούσα μελέτη δεν επηρέασε τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Smad3 αποτέλεσμα το οποίο εξηγείται πιθανότατα από τη παράλληλη θετική δράση της πρωτεΐνης RhoA και την αρνητική δράση της πρωτεΐνης RhoB στη φωσφορυλίωση αυτή.

Δύο πιθανοί τρόποι μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η καταστολή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Smad3 από την αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης RhoB είναι: α) η RhoB εμποδίζει την αλληλεπίδραση της Smad3 με τη πρωτεΐνη SARA η οποία τη στρατολογεί στο σύμπλοκο των υποδοχέων του TGFβ-1 προκειμένου να φωσφορυλιωθεί β) η RhoB εμποδίζει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Smad3 με τον υποδοχέα τύπου I του TGFβ-1 ο οποίος τη φωσφορυλιώνει. Το πρώτο ενδεχόμενο ελέγχθηκε στη παρούσα μελέτη αλλά δεν ανιχνεύθηκε κάποια σημαντική επίδραση της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης RhoB στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών SARA και Smad3 αλλά ούτε αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών RhoB και SARA. Ωστόσο, βρέθηκε ότι παρουσία υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης RhoB εμποδίζεται η αλληλεπίδραση της Smad3 με τον υποδοχέα τύπου I του TGFβ-1 (Εικόνα 73).

Ένας ενδεχόμενος τρόπος μέσω του οποίου η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης Smad3 και του υποδοχέα ALK5 καταστέλλεται από τη παρουσία των αυξημένων επιπέδων της πρωτεΐνης RhoB, είναι η ίδια η RhoB να αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη Smad3. Πράγματι ανιχνεύθηκε η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεΐνών RhoB και Smad3 (Εικόνες 74 και 75).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν τον ενεργό ρόλο της πρωτεΐνης RhoB σε μηχανισμό αυτοαναστολής (autoinhibitory loop) του μονοπατιού του TGFβ-1. Ένα καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν σε μηχανισμό αυτοαναστολής του TGFβ-1/Smad μονοπατιού είναι αυτό των πρωτεϊνών Smad6 και Smad7. Οι ανασταλτικές πρωτεΐνες Smad6 και Smad7 αποτελούν βασικούς ρυθμιστές των μονοπατιών TGFβ-1 και BMP συμμετέχοντας σε θηλειά αυτοκαταστολής καθώς επάγονται μεταγραφικά από TGFβ-1 και BMP αντίστοιχα και στη συνέχεια σχηματίζουν σταθερά σύμπλοκα με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς τύπου Ι, εμποδίζοντας τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών R-Smad ή στρατολογούν τις E3 λιγάσες ουμπικουιτίνης Smurf1/2 προκαλώντας με τον τρόπο αυτό την ουμπικουτινίωση και πρωτεολυτική αποικοδόμηση των υποδοχέων. Επίσης οι ανασταλτικές Smad πρωτεΐνες εμποδίζουν τη σηματοδότηση TGFβ-1/BMP είτε μέσω αλληλεπίδρασης με μεταγραφικούς καταστολείς όπως οι απακετυλάσες ιστονών Hoxc-8 και CtBP είτε μέσω παρεμπόδισης του σχηματισμού των TGFβ-1-επαγώμενων συμπλόκων μεταξύ των πρωτεϊνών Smad και του DNA (*180, 191*).

Το μοντέλο που υποστηρίζουν τα δεδομένα της παρούσας μελέτης συνοψίζεται ως εξής:

Αρχικά, ο TGFβ-1 με τη συμμετοχή των Smad και MEK/ERK σηματοδοτικών του μονοπατιών επάγει την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της RhoB μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της. Μετά από μακροπρόθεσμη επίδραση με TGFβ-1, η πρωτεΐνη RhoB έχει συσσωρευθεί μες το κύτταρο οπότε μέσω αλληλεπίδρασης με τη πρωτεΐνη Smad3 αλλά και ενδεχομένως μέσω άλλων μηχανισμών, μπλοκάρει την αλληλεπίδραση της Smad3 με το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGFβ-1 με συνέπεια η Smad3 να μη μπορεί να φωσφορυλιωθεί. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η είσοδος της πρωτεΐνης Smad3 στο πυρήνα και η λειτουργία της στη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων στόχων του TGFβ-1 όπως τα γονίδια p21, PAI-1, RhoB αλλά πιθανότατα και επιπλέον γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετατροπής των κυττάρων. Με λίγα λόγια, η αύξηση της πρωτεΐνης RhoB μες το κύτταρο λειτουργεί ως μοριακός αισθητήρας μέσω του οποίου το μονοπάτι του TGFβ-1 ουσιαστικά αυτοαναστέλει τη δράση του. Αυτός ο μηχανισμός εξηγεί την ανασταλτική δράση της πρωτεΐνης RhoB στις αποκρίσεις του κυττάρου στον TGFβ-1 είτε αυτές προέρχονται από ογκοκατασταλτικές είτε από ογκογονικές ιδιότητες του μονοπατιού.

Στη παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο μηχανισμός ενεργοποίησης του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι του

207

TGFβ-1. Η ανακάλυψη και κατανόηση νέων μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασής της πρωτεΐνης RhoB αλλά και όλης της οικογένειας των Rho GTPασών είναι πολύ σημαντική καθώς η RhoB αλλά και όλες οι Rho πρωτεΐνες εμφανίζονται πολύ σπάνια μεταλλαγμένες σε καρκίνους. Η έκφραση τους όμως είναι αυτή η οποία συνήθως επηρεάζεται (1). Στη περίπτωση της RhoB η ρύθμιση της έκφρασής της αποκτά ιδιαίτερη σημασία καθώς τόσο το mRNA όσο και η πρωτεΐνη της είναι πολύ ασταθή μόρια με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής μες το κύτταρο. Ο θετικός ρόλος της στην επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων από τον TGFβ-1, ο αρνητικός ρόλος της σε TGFβ-1-επαγώμενες κυτταρικές λειτουργίες όπως το σταμάτημα του πολλαπλασιασμού και η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή και φυσικά η συμμετοχή της στο μηχανισμό αρνητικής αυτορύθμισης του TGFβ-1 μονοπατιού καθιστούν την πρωτεΐνη RhoB πολύπλοκο αλλά πολλά υποσχόμενο στόχο για την επίτευξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων στο καρκίνο και ενδεχομένως και σε άλλες ασθένειες.

<u>Βιβλιογραφία</u>

- 1. Vega, F. M., and Ridley, A. J. (2008) Rho GTPases in cancer cell biology, *FEBS letters 582*, 2093-2101.
- 2. Wennerberg, K., and Der, C. J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it), *J Cell Sci 117*, 1301-1312.
- 3. Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A., and Sander, C. (1991) The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids, *Biochemistry 30*, 4637-4648.
- 4. Wennerberg, K., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance, *J Cell Sci 118*, 843-846.
- 5. Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology, *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- 6. Prendergast, G. C. (2001) Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis, *Nat Rev Cancer 1*, 162-168.
- 7. Benitah, S. A., Valeron, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J., and Lacal, J. C. (2004) Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation, *Biochim Biophys Acta 1705*, 121-132.
- 8. Hall, A. (2009) The cytoskeleton and cancer, *Cancer Metastasis Rev 28*, 5-14.
- Mettouchi, A., Klein, S., Guo, W., Lopez-Lago, M., Lemichez, E., Westwick, J. K., and Giancotti, F. G. (2001) Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle, *Mol Cell 8*, 115-127.
- 10. Danen, E. H., Sonneveld, P., Sonnenberg, A., and Yamada, K. M. (2000) Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression, *J Cell Biol 151*, 1413-1422.
- 11. Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002) RHO-GTPases and cancer, *Nat Rev Cancer 2*, 133-142.
- 12. Gachet, Y., Tournier, S., Millar, J. B., and Hyams, J. S. (2001) A MAP kinasedependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast, *Nature 412*, 352-355.
- 13. Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies, *Nat Rev Mol Cell Biol 9*, 690-701.
- Roberts, A. W., Kim, C., Zhen, L., Lowe, J. B., Kapur, R., Petryniak, B., Spaetti, A., Pollock, J. D., Borneo, J. B., Bradford, G. B., Atkinson, S. J., Dinauer, M. C., and Williams, D. A. (1999) Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense, *Immunity 10*, 183-196.
- 15. Vincent, S., Jeanteur, P., and Fort, P. (1992) Growth-regulated expression of rhoG, a new member of the ras homolog gene family, *Mol Cell Biol 12*, 3138-3148.
- 16. Adamson, P., Paterson, H. F., and Hall, A. (1992) Intracellular localization of the P21rho proteins, *J Cell Biol 119*, 617-627.
- 17. Gampel, A., Parker, P. J., and Mellor, H. (1999) Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase rhoB, *Curr Biol 9*, 955-958.
- 18. Wheeler, A. P., and Ridley, A. J. (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility, *Exp Cell Res 301*, 43-49.
- 19. Bishop, A. L., and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins, *Biochem J 348 Pt 2*, 241-255.
- 20. Allal, C., Favre, G., Couderc, B., Salicio, S., Sixou, S., Hamilton, A. D., Sebti, S. M., Lajoie-Mazenc, I., and Pradines, A. (2000) RhoA prenylation is

required for promotion of cell growth and transformation and cytoskeleton organization but not for induction of serum response element transcription, *J Biol Chem 275*, 31001-31008.

- 21. Stamatakis, K., Cernuda-Morollon, E., Hernandez-Perera, O., and Perez-Sala, D. (2002) Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway, *J Biol Chem* 277, 49389-49396.
- 22. Schmidt, A., and Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch, *Genes Dev 16*, 1587-1609.
- 23. Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells, *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.
- 24. Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002) ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho, *Nat Cell Biol 4*, 408-415.
- 25. Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back, *Science (New York, N.Y 302*, 1704-1709.
- 26. Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L. (2003) Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation, *Science (New York, N.Y 302*, 1775-1779.
- 27. Zhang, Y., Wang, H. R., and Wrana, J. L. (2004) Smurf1: a link between cell polarity and ubiquitination, *Cell Cycle 3*, 391-392.
- 28. Riento, K., Guasch, R. M., Garg, R., Jin, B., and Ridley, A. J. (2003) RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling, *Mol Cell Biol* 23, 4219-4229.
- 29. Burridge, K., and Wennerberg, K. (2004) Rho and Rac take center stage, *Cell 116*, 167-179.
- 30. Ridley, A. (2000) Rho GTPases. Integrating integrin signaling, *J Cell Biol 150*, F107-109.
- 31. Linder, S., and Aepfelbacher, M. (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells, *Trends Cell Biol 13*, 376-385.
- 32. Settleman, J. (2001) Rac 'n Rho: the music that shapes a developing embryo, *Dev Cell 1*, 321-331.
- 33. Karnoub, A. E., Symons, M., Campbell, S. L., and Der, C. J. (2004) Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity, *Breast cancer research and treatment* 84, 61-71.
- 34. Wei, L., Imanaka-Yoshida, K., Wang, L., Zhan, S., Schneider, M. D., DeMayo, F. J., and Schwartz, R. J. (2002) Inhibition of Rho family GTPases by Rho GDP dissociation inhibitor disrupts cardiac morphogenesis and inhibits cardiomyocyte proliferation, *Development 129*, 1705-1714.
- 35. Adini, I., Rabinovitz, I., Sun, J. F., Prendergast, G. C., and Benjamin, L. E. (2003) RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development, *Genes Dev 17*, 2721-2732.
- 36. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A. I., and Treisman, R. (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL, *Cell 113*, 329-342.
- 37. Adnane, J., Seijo, E., Chen, Z., Bizouarn, F., Leal, M., Sebti, S. M., and Munoz-Antonia, T. (2002) RhoB, not RhoA, represses the transcription of the transforming growth factor beta type II receptor by a mechanism involving activator protein 1, *J Biol Chem* 277, 8500-8507.
- 38. Zohn, I. M., Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., and Der, C. J. (1998) Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested, *Oncogene 17*, 1415-1438.

- 39. Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., and Symons, M. (1995) An essential role for Rac in Ras transformation, *Nature 374*, 457-459.
- 40. Kamai, T., Arai, K., Tsujii, T., Honda, M., and Yoshida, K. (2001) Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour, *BJU Int 87*, 227-231.
- 41. Fritz, G., Just, I., and Kaina, B. (1999) Rho GTPases are over-expressed in human tumors, *Int J Cancer 81*, 682-687.
- 42. Schnelzer, A., Prechtel, D., Knaus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graeff, H., Harbeck, N., Schmitt, M., and Lengyel, E. (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b, *Oncogene 19*, 3013-3020.
- 43. Jordan, P., Brazao, R., Boavida, M. G., Gespach, C., and Chastre, E. (1999) Cloning of a novel human Rac1b splice variant with increased expression in colorectal tumors, *Oncogene 18*, 6835-6839.
- 44. Yoshioka, K., Matsumura, F., Akedo, H., and Itoh, K. (1998) Small GTPbinding protein Rho stimulates the actomyosin system, leading to invasion of tumor cells, *J Biol Chem* 273, 5146-5154.
- 45. del Peso, L., Hernandez-Alcoceba, R., Embade, N., Carnero, A., Esteve, P., Paje, C., and Lacal, J. C. (1997) Rho proteins induce metastatic properties in vivo, *Oncogene 15*, 3047-3057.
- 46. Clark, E. A., Golub, T. R., Lander, E. S., and Hynes, R. O. (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC, *Nature 406*, 532-535.
- 47. Ridley, A. J. (2004) Rho proteins and cancer, *Breast cancer research and treatment 84*, 13-19.
- 48. Riento, K., and Ridley, A. J. (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour, *Nat Rev Mol Cell Biol 4*, 446-456.
- 49. Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J. Y., Wei, S., and Sebti, S. (2004) Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis, *Mol Cell Biol 24*, 5565-5576.
- 50. Allal, C., Pradines, A., Hamilton, A. D., Sebti, S. M., and Favre, G. (2002) Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298, *Cell Cycle 1*, 430-437.
- 51. Lebowitz, P. F., Davide, J. P., and Prendergast, G. C. (1995) Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity, *Mol Cell Biol 15*, 6613-6622.
- 52. Jahner, D., and Hunter, T. (1991) The ras-related gene rhoB is an immediateearly gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts, *Mol Cell Biol 11*, 3682-3690.
- 53. Wherlock, M., Gampel, A., Futter, C., and Mellor, H. (2004) Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase, *J Cell Sci 117*, 3221-3231.
- 54. Gnad, R., Kaina, B., and Fritz, G. (2001) Rho GTPases are involved in the regulation of NF-kappaB by genotoxic stress, *Exp Cell Res 264*, 244-249.
- 55. Rodriguez, P. L., Sahay, S., Olabisi, O. O., and Whitehead, I. P. (2007) ROCK I-mediated activation of NF-kappaB by RhoB, *Cell Signal 19*, 2361-2369.
- 56. Sandilands, E., Akbarzadeh, S., Vecchione, A., McEwan, D. G., Frame, M. C., and Heath, J. K. (2007) Src kinase modulates the activation, transport and signalling dynamics of fibroblast growth factor receptors, *EMBO Rep 8*, 1162-1169.
- 57. Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S. M., and Munoz-Antonia, T. (2002) Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients, *Clin Cancer Res 8*, 2225-2232.

- 58. Liu, A. X., Rane, N., Liu, J. P., and Prendergast, G. C. (2001) RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells, *Mol Cell Biol 21*, 6906-6912.
- 59. Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J., and Sebti, S. M. (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice, *The Journal of biological chemistry* 275, 17974-17978.
- 60. Bousquet, E., Mazieres, J., Privat, M., Rizzati, V., Casanova, A., Ledoux, A., Mery, E., Couderc, B., Favre, G., and Pradines, A. (2009) Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1, *Cancer Res 69*, 6092-6099.
- 61. Sebti, S. M., and Hamilton, A. D. (2000) Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors in cancer therapy: important mechanistic and bench to bedside issues, *Expert Opin Investig Drugs 9*, 2767-2782.
- 62. Jiang, K., Delarue, F. L., and Sebti, S. M. (2004) EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation, *Oncogene 23*, 1136-1145.
- 63. Fritz, G., and Kaina, B. (2001) Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element, *Nucleic Acids Res 29*, 792-798.
- 64. Fritz, G., and Kaina, B. (1997) 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 272*, 30637-30644.
- 65. Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y. C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Bottinger, E. P. (2001) Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta, *Proc Natl Acad Sci U S A 98*, 6686-6691.
- 66. Xie, L., Law, B. K., Aakre, M. E., Edgerton, M., Shyr, Y., Bhowmick, N. A., and Moses, H. L. (2003) Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line, *Breast Cancer Res 5*, R187-198.
- 67. Coyle, B., Freathy, C., Gant, T. W., Roberts, R. A., and Cain, K. (2003) Characterization of the transforming growth factor-beta 1-induced apoptotic transcriptome in FaO hepatoma cells, *J Biol Chem* 278, 5920-5928.
- 68. Verrecchia, F., Chu, M. L., and Mauviel, A. (2001) Identification of novel TGFbeta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach, *J Biol Chem* 276, 17058-17062.
- 69. Liu, J. P., and Jessell, T. M. (1998) A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube, *Development 125*, 5055-5067.
- 70. Roberts, A. B., and Wakefield, L. M. (2003) The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A 100*, 8621-8623.
- 71. Wakefield, L. M., and Roberts, A. B. (2002) TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis, *Curr Opin Genet Dev 12*, 22-29.
- 72. Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003) Smad-dependent and Smadindependent pathways in TGF-beta family signalling, *Nature 425*, 577-584.
- 73. Massague, J. (1998) TGF-beta signal transduction, *Annu Rev Biochem* 67, 753-791.
- 74. Massague, J., and Wotton, D. (2000) Transcriptional control by the TGFbeta/Smad signaling system, *EMBO J 19*, 1745-1754.

- 75. Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature 390*, 465-471.
- 76. Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2008) Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton, *FEBS letters 582*, 2051-2065.
- 77. Massague, J. (2008) TGFbeta in Cancer, *Cell 134*, 215-230.
- 78. ten Dijke, P., and Hill, C. S. (2004) New insights into TGF-beta-Smad signalling, *Trends Biochem Sci* 29, 265-273.
- 79. Massague, J. (2000) How cells read TGF-beta signals, *Nat Rev Mol Cell Biol 1*, 169-178.
- Kardassis, D., Murphy, C., Fotsis, T., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2009) Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases, *FEBS J 276*, 2947-2965.
- 81. Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor, *Cell 95*, 779-791.
- 82. Xu, L., Chen, Y. G., and Massague, J. (2000) The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation, *Nat Cell Biol* 2, 559-562.
- 83. Shi, Y., Hata, A., Lo, R. S., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1997) A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4, *Nature 388*, 87-93.
- 84. Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X. H. (1998) Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses, *Cell 95*, 737-740.
- 85. Shi, Y. (2001) Structural insights on Smad function in TGFbeta signaling, *Bioessays* 23, 223-232.
- 86. Wu, J. W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D. J., Kyin, S., Muir, T. W., Fairman, R., Massague, J., and Shi, Y. (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling, *Mol Cell 8*, 1277-1289.
- Chai, J., Wu, J. W., Yan, N., Massague, J., Pavletich, N. P., and Shi, Y. (2003) Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding, *J Biol Chem 278*, 20327-20331.
- 88. Massague, J., and Gomis, R. R. (2006) The logic of TGFbeta signaling, *FEBS letters 580*, 2811-2820.
- 89. Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C. H. (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction, *J Cell Sci 114*, 4359-4369.
- 90. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., and Wrana, J. L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover, *Nat Cell Biol 5*, 410-421.
- 91. Funaba, M., Zimmerman, C. M., and Mathews, L. S. (2002) Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase, *J Biol Chem* 277, 41361-41368.
- 92. Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massague, J. (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras, *Genes Dev 13*, 804-816.
- 93. Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling, *Cell 94*, 585-594.
- 94. Chacko, B. M., Qin, B., Correia, J. J., Lam, S. S., de Caestecker, M. P., and Lin, K. (2001) The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization, *Nat Struct Biol* 8, 248-253.
- 95. de Caestecker, M. P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W. T., Huang, S., Hill, C. S., Shioda, T., Roberts, A. B., and Lechleider, R. J. (2000) The Smad4

- 96. Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C. H., ten Dijke, P., and Itoh, S. (2001) Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads, *EMBO J 20*, 4132-4142.
- 97. Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001) The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factor-beta signaling, *J Cell Biol 155*, 1017-1027.
- 98. Lee, M. K., Pardoux, C., Hall, M. C., Lee, P. S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S. M., and Derynck, R. (2007) TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA, *EMBO J 26*, 3957-3967.
- 99. Vardouli, L., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2005) LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta, *J Biol Chem 280*, 11448-11457.
- 100. Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2005) Non-Smad TGF-beta signals, *J Cell Sci 118*, 3573-3584.
- 101. Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., and Massague, J. (1996) Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways, *Nature 383*, 832-836.
- 102. Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996) MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling, *Cell* 87, 1215-1224.
- Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997) TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4, *EMBO J 16*, 5353-5362.
- 104. Zhang, Y., Musci, T., and Derynck, R. (1997) The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function, *Curr Biol 7*, 270-276.
- 105. Schmierer, B., and Hill, C. S. (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility, *Nat Rev Mol Cell Biol 8*, 970-982.
- 106. Reguly, T., and Wrana, J. L. (2003) In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling, *Trends Cell Biol 13*, 216-220.
- 107. Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking, *Nature 397*, 621-625.
- 108. Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2001) Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner, *Mol Biol Cell 12*, 1079-1091.
- 109. Gorlich, D., Seewald, M. J., and Ribbeck, K. (2003) Characterization of Randriven cargo transport and the RanGTPase system by kinetic measurements and computer simulation, *EMBO J 22*, 1088-1100.
- 110. Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell 112*, 453-465.
- 111. Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way, *Dev Biol 265*, 23-32.
- 112. Gourlay, C. W., and Ayscough, K. R. (2005) Identification of an upstream regulatory pathway controlling actin-mediated apoptosis in yeast, *J Cell Sci 118*, 2119-2132.
- 113. Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization, *Cancer Sci 96*, 379-386.

- 114. Thomas, S. G., Huang, S., Li, S., Staiger, C. J., and Franklin-Tong, V. E. (2006) Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen, *J Cell Biol 174*, 221-229.
- 115. Papakonstanti, E. A., and Stournaras, C. (2008) Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton, *FEBS letters 582*, 2120-2127.
- 116. Theriot, J. A. (1994) Regulation of the actin cytoskeleton in living cells, *Semin Cell Biol 5*, 193-199.
- 117. Papakonstanti, E. A., and Stournaras, C. (2002) Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization, *Mol Biol Cell 13*, 2946-2962.
- 118. Papakonstanti, E. A., and Stournaras, C. (2004) Tumor necrosis factor-alpha promotes survival of opossum kidney cells via Cdc42-induced phospholipase C-gamma1 activation and actin filament redistribution, *Mol Biol Cell 15*, 1273-1286.
- 119. Rivera, G. M., Antoku, S., Gelkop, S., Shin, N. Y., Hanks, S. K., Pawson, T., and Mayer, B. J. (2006) Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B, *Proc Natl Acad Sci U S A 103*, 9536-9541.
- 120. Papakonstanti, E. A., Kampa, M., Castanas, E., and Stournaras, C. (2003) A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors, *Mol Endocrinol 17*, 870-881.
- 121. Moustakas, A., and Stournaras, C. (1999) Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts, *J Cell Sci 112 (Pt 8)*, 1169-1179.
- 122. Vardouli, L., Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Kardassis, D., and Stournaras, C. (2008) A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases, *The FEBS journal 275*, 4074-4087.
- 123. Selman, M., and Pardo, A. (2002) Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder, *Respir Res 3*, 3.
- 124. Scotton, C. J., and Chambers, R. C. (2007) Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus, *Chest 132*, 1311-1321.
- 125. Darby, I. A., and Hewitson, T. D. (2007) Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis, *Int Rev Cytol 257*, 143-179.
- 126. Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2007) Signaling networks guiding epithelialmesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression, *Cancer Sci 98*, 1512-1520.
- 127. Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008) Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis, *Dev Cell 14*, 818-829.
- 128. Tavares, A. L., Mercado-Pimentel, M. E., Runyan, R. B., and Kitten, G. T. (2006) TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelialmesenchymal transition in the embryonic chick heart, *Dev Dyn 235*, 1589-1598.
- 129. Masszi, A., Di Ciano, C., Sirokmany, G., Arthur, W. T., Rotstein, O. D., Wang, J., McCulloch, C. A., Rosivall, L., Mucsi, I., and Kapus, A. (2003) Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition, *Am J Physiol Renal Physiol 284*, F911-924.
- 130. Lee, J., Ko, M., and Joo, C. K. (2008) Rho plays a key role in TGF-beta1induced cytoskeletal rearrangement in human retinal pigment epithelium, *J Cell Physiol* 216, 520-526.
- 131. Kang, Y., and Massague, J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis, *Cell 118*, 277-279.
- 132. Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H., and Aspenstrom, P. (2002) Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton
requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA, *Mol Biol Cell 13*, 902-914.

- 133. Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H., and Aspenstrom, P. (2004) Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42, *J Cell Sci 117*, 1835-1847.
- 134. Deaton, R. A., Su, C., Valencia, T. G., and Grant, S. R. (2005) Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK, *J Biol Chem 280*, 31172-31181.
- 135. Shi, Y., and Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, *Cell 113*, 685-700.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., and Moses, H. L. (2001) Transforming growth factorbeta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism, *Mol Biol Cell 12*, 27-36.
- 137. Engel, M. E., Datta, P. K., and Moses, H. L. (1998) RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation, *The Journal of biological chemistry* 273, 9921-9926.
- 138. Chen, S., Crawford, M., Day, R. M., Briones, V. R., Leader, J. E., Jose, P. A., and Lechleider, R. J. (2006) RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation, *J Biol Chem 281*, 1765-1770.
- 139. Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H. R., Zhang, Y., and Wrana, J. L. (2005) Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity, *Science (New York, N.Y 307*, 1603-1609.
- 140. Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J. J., Coppola, D., Dalton, W. S., and Cheng, J. Q. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA, *Mol Cell Biol 28*, 6773-6784.
- 141. Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998) Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members, *Proc Natl Acad Sci U S A 95*, 6733-6738.
- 142. Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000) Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta, *J Biol Chem* 275, 29244-29256.
- 143. He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses, *Proc Natl Acad Sci U S A 95*, 2509-2514.
- 144. Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J. M. (1998) 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 17*, 3091-3100.
- 145. Pannu, J., Nakerakanti, S., Smith, E., ten Dijke, P., and Trojanowska, M. (2007) Transforming growth factor-beta receptor type I-dependent fibrogenic gene program is mediated via activation of Smad1 and ERK1/2 pathways, *J Biol Chem* 282, 10405-10413.
- 146. Xiao, Y. Q., Liu, K., Shen, J. F., Xu, G. T., and Ye, W. (2009) SB-431542 inhibition of scar formation after filtration surgery and its potential mechanism, *Invest Ophthalmol Vis Sci 50*, 1698-1706.
- 147. Xu, G., Chakraborty, C., and Lala, P. K. (2001) Expression of TGF-beta signaling genes in the normal, premalignant, and malignant human trophoblast: loss of smad3 in choriocarcinoma cells, *Biochem Biophys Res Commun 287*, 47-55.

- 148. Moren, A., Itoh, S., Moustakas, A., Dijke, P., and Heldin, C. H. (2000) Functional consequences of tumorigenic missense mutations in the aminoterminal domain of Smad4, *Oncogene 19*, 4396-4404.
- 149. Sinha, S., Maity, S. N., Lu, J., and de Crombrugghe, B. (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3, *Proc Natl Acad Sci U S A 92*, 1624-1628.
- Alabert, C., Rogers, L., Kahn, L., Niellez, S., Fafet, P., Cerulis, S., Blanchard, J. M., Hipskind, R. A., and Vignais, M. L. (2006) Cell type-dependent control of NF-Y activity by TGF-beta, *Oncogene 25*, 3387-3396.
- 151. Cordenonsi, M., Montagner, M., Adorno, M., Zacchigna, L., Martello, G., Mamidi, A., Soligo, S., Dupont, S., and Piccolo, S. (2007) Integration of TGFbeta and Ras/MAPK signaling through p53 phosphorylation, *Science (New York, N.Y 315*, 840-843.
- 152. Adorno, M., Cordenonsi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M. B., Guzzardo, V., Parenti, A. R., Rosato, A., Bicciato, S., Balmain, A., and Piccolo, S. (2009) A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis, *Cell* 137, 87-98.
- 153. Lehman, T. A., Modali, R., Boukamp, P., Stanek, J., Bennett, W. P., Welsh, J. A., Metcalf, R. A., Stampfer, M. R., Fusenig, N., Rogan, E. M., and et al. (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines, *Carcinogenesis 14*, 833-839.
- 154. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2005) TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition, *Mol Biol Cell 16*, 1987-2002.
- 155. Hay, E. D., and Zuk, A. (1995) Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced, *Am J Kidney Dis 26*, 678-690.
- 156. Stahl, P. J., and Felsen, D. (2001) Transforming growth factor-beta, basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease, *Am J Pathol 159*, 1187-1192.
- 157. Cho, H. J., and Yoo, J. (2007) Rho activation is required for transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lens epithelial cells, *Cell Biol Int 31*, 1225-1230.
- 158. Hutchison, N., Hendry, B. M., and Sharpe, C. C. (2009) Rho isoforms have distinct and specific functions in the process of epithelial to mesenchymal transition in renal proximal tubular cells, *Cell Signal 21*, 1522-1531.
- 159. Siegel, P. M., and Massague, J. (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer, *Nat Rev Cancer 3*, 807-821.
- 160. Chen, C. R., Kang, Y., and Massague, J. (2001) Defective repression of cmyc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor beta growth arrest program, *Proc Natl Acad Sci U S A 98*, 992-999.
- 161. Feng, X. H., Lin, X., and Derynck, R. (2000) Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta, *EMBO J 19*, 5178-5193.
- 162. Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001) TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b, *Nat Cell Biol 3*, 400-408.
- 163. Claassen, G. F., and Hann, S. R. (2000) A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest, *Proc Natl Acad Sci U S A 97*, 9498-9503.

- 164. Zalcman, G., Closson, V., Linares-Cruz, G., Lerebours, F., Honore, N., Tavitian, A., and Olofsson, B. (1995) Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle, *Oncogene 10*, 1935-1945.
- 165. Zubiaga, A. M., Belasco, J. G., and Greenberg, M. E. (1995) The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation, *Mol Cell Biol* 15, 2219-2230.
- 166. Guzman-Ayala, M., Lee, K. L., Mavrakis, K. J., Goggolidou, P., Norris, D. P., and Episkopou, V. (2009) Graded Smad2/3 activation is converted directly into levels of target gene expression in embryonic stem cells, *PLoS One 4*, e4268.
- 167. Hu, P. P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., and Wang, X. F. (1999) The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta, *J Biol Chem* 274, 35381-35387.
- 168. Davies, M., Robinson, M., Smith, E., Huntley, S., Prime, S., and Paterson, I. (2005) Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways, *J Cell Biochem 95*, 918-931.
- 169. Mucsi, I., Skorecki, K. L., and Goldberg, H. J. (1996) Extracellular signalregulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression, *J Biol Chem* 271, 16567-16572.
- 170. Zhou, Q., Heinke, J., Vargas, A., Winnik, S., Krauss, T., Bode, C., Patterson, C., and Moser, M. (2007) ERK signaling is a central regulator for BMP-4 dependent capillary sprouting, *Cardiovasc Res 76*, 390-399.
- 171. Mantovani, R. (1998) A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes, *Nucleic Acids Res 26*, 1135-1143.
- 172. Dupont, S., Zacchigna, L., Adorno, M., Soligo, S., Volpin, D., Piccolo, S., and Cordenonsi, M. (2004) Convergence of p53 and TGF-beta signaling networks, *Cancer Lett 213*, 129-138.
- 173. Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. (2006) Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation, *Cancer Cell 10*, 191-202.
- 174. Padua, D., and Massague, J. (2009) Roles of TGFbeta in metastasis, *Cell Res 19*, 89-102.
- 175. Fong, Y. C., Hsu, S. F., Wu, C. L., Li, T. M., Kao, S. T., Tsai, F. J., Chen, W. C., Liu, S. C., Wu, C. M., and Tang, C. H. (2009) Transforming growth factorbeta1 increases cell migration and beta1 integrin up-regulation in human lung cancer cells, *Lung Cancer 64*, 13-21.
- 176. Kuo, Y. C., Su, C. H., Liu, C. Y., Chen, T. H., Chen, C. P., and Wang, H. S. (2009) Transforming growth factor-beta induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase, *Int J Cancer 124*, 2568-2576.
- 177. Wheeler, A. P., and Ridley, A. J. (2007) RhoB affects macrophage adhesion, integrin expression and migration, *Exp Cell Res 313*, 3505-3516.
- 178. Stasia, M. J., Jouan, A., Bourmeyster, N., Boquet, P., and Vignais, P. V. (1991) 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 180*, 615-622.
- 179. Nusrat, A., Giry, M., Turner, J. R., Colgan, S. P., Parkos, C. A., Carnes, D., Lemichez, E., Boquet, P., and Madara, J. L. (1995) Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia, *Proc Natl Acad Sci U S A 92*, 10629-10633.

- 180. Townsend, T. A., Wrana, J. L., Davis, G. E., and Barnett, J. V. (2008) Transforming growth factor-beta-stimulated endocardial cell transformation is dependent on Par6c regulation of RhoA, *J Biol Chem* 283, 13834-13841.
- 181. Valcourt, U., Thuault, S., Pardali, K., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2007) Functional role of Meox2 during the epithelial cytostatic response to TGFbeta, *Mol Oncol 1*, 55-71.
- 182. Massague, J. (2004) G1 cell-cycle control and cancer, *Nature 43*2, 298-306.
- 183. Pardali, K., and Moustakas, A. (2007) Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer, *Biochim Biophys Acta 1775*, 21-62.
- 184. Bachman, K. E., Blair, B. G., Brenner, K., Bardelli, A., Arena, S., Zhou, S., Hicks, J., De Marzo, A. M., Argani, P., and Park, B. H. (2004) p21(WAF1/CIP1) mediates the growth response to TGF-beta in human epithelial cells, *Cancer Biol Ther 3*, 221-225.
- 185. Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., and Wang, X. F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism, *Proc Natl Acad Sci U S A 92*, 5545-5549.
- 186. Nicolas, F. J., and Hill, C. S. (2003) Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest, *Oncogene 22*, 3698-3711.
- 187. Pardali, K., Kowanetz, M., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2005) Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1), *J Cell Physiol 204*, 260-272.
- 188. Seoane, J., Le, H. V., Shen, L., Anderson, S. A., and Massague, J. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation, *Cell 117*, 211-223.
- 189. Olson, M. F., Paterson, H. F., and Marshall, C. J. (1998) Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1, *Nature 394*, 295-299.
- 190. Penheiter, S. G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Dore, J. J., Jr., and Leof, E. B. (2002) Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway, *Mol Cell Biol* 22, 4750-4759.
- 191. Derynck, R., and Feng, X. H. (1997) TGF-beta receptor signaling, *Biochim Biophys Acta* 1333, F105-150.