

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ**  
**“ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΦΛΕΜΙΝΓΚ”**



**Η πρωτεΐνη Smyd3 δρα ως μεταγραφικός ενισχυτής γονιδίων που προάγουν την καρκινογένεση του ήπατος και του παχέως εντέρου.**

***ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ***

**Σαρρής Μιχάλης**

**Αθήνα 2015**



Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του ερευνητή Γιάννη Ταλιανίδη στο Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Ερευνών Αλέξανδρος Φλέμινγκ, υπό την επίβλεψη του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Επιβλέπων Ερευνητής : Ι. Ταλιανίδης, Ερευνητής Α΄ (Ε.ΚΕ.Β.Ε Αλ.Φλέμινγκ)

#### ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γ. Γουλιέλμος,	Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Δ. Μπούμπας,	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Ι. Ταλιανίδης,	Ερευνητής Α΄ (Ε.ΚΕ.Β.Ε Αλ.Φλέμινγκ)

#### ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γ. Γουλιέλμος,	Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Δ. Μπούμπας,	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Ι. Ταλιανίδης,	Ερευνητής Α΄ (Ι.Μ.Β.Γ, Ε.ΚΕ.Β.Ε Αλ.Φλέμινγκ)
Γ. Μαυροθαλασσίτης,	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Δ. Καρδάσης,	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Ιατρικής)
Γ. Χαλεπάκης	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)
Χ. Σπηλιανάκης	Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)





## Ευχαριστίες

Θα ήθελα πρωταρχικά να ευχαριστήσω βαθύτατα τον Γιάννη Ταλιανίδη που μου έδωσε την ευκαιρία να κάνω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριο του. Τον ευχαριστώ θερμά για τις συμβουλές του και τις κατευθύνσεις του, μα κυρίως για τον πολύτιμο τρόπο σκέψης και τις γνώσεις που μου μετέδωσε. Η προσπάθεια απλοποίησης των εξαιρετικά πολύπλοκων βιολογικών φαινομένων προκειμένου να κατανοηθούν και εν συνεχεία να τεθούν οι βάσεις για απόκτηση νέας γνώσης, είναι κάτι ιδιαίτερα δύσκολο και συνάμα πολύτιμο το οποίο απαιτεί πολλές γνώσεις και υψηλή αντίληψη της βιολογίας. Τον ευχαριστώ για την προσπάθεια του να μνηθώ αυτή τη συλλογιστική του. Η συνεργασία μας ήταν πολύ επαγγελματική, ορθολογική, αποδοτική και εποικοδομητική. Τον ευχαριστώ θερμότατα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συνεργάτες μου για αυτή τη μελέτη, τον Παναγιώτη Μούλο για την πραγματικά πολύτιμη βοήθειά του με την εφαρμογή βιοπληροφορικών μέσων στα ευρείας κλίμακας πειράματα για απόκτηση μαζικής πληροφορίας. Βοήθησε σημαντικά στο να εξαχθούν πολύτιμα συμπεράσματα και να διαμορφωθούν περαιτέρω σκέψεις και υποθέσεις για την ιστορία της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ επίσης τον Αντώνη Γιακούντη για τη συμβολή του στην εξαγωγή πληροφοριών από τράπεζες δεδομένων και τον Παντελή Χατζή για την κριτική εξέταση της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερα τον Κώστα για την πολύτιμη αλληλεπίδραση όλα αυτά τα χρόνια καθώς και τη Γιώτα και τη Δήμητρα για τις πολύτιμες βοήθειές τους.

Ευχαριστώ επίσης τα μέλη της τριμελούς και επταμελούς επιτροπής μου.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και τη γυναίκα μου, χωρίς την συμπαράσταση των οποίων δεν θα είχα φτάσει ως εδώ. Το αφιερώνω στη γυναίκα μου, στους γονείς μου, στην αδελφή μου και τη ξαδέλφη μου.



Αφιερωμένο στην οικογένειά μου.



## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	1
Περιεχόμενα	5
Περίληψη	9
Summary	9
Εισαγωγή	11
Φυσιολογία ήπατος και παχέως εντέρου.	11
Ήπαρ	11
Παχύ έντερο (κόλον)	14
Καρκινογένεση	16
Κατηγοριοποίηση και ονοματολογία καρκίνων.	16
Τα καρκινικά κύτταρα υποστηρίζουν τη συνεχή σηματοδότηση για πολλαπλασιασμό.	18
Τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν τους καταστολείς της ανάπτυξης.	19
Τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στον κυτταρικό θάνατο, ο ρόλος της αυτοφαγίας και ο καρκινοπροωθητικός ρόλος της νέκρωσης.	19
Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την αναπαραγωγική αθανασία.	20
Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την αγγειογένεση.	21
EMT, ενεργοποίηση της εξάπλωσης και Μετάσταση.	21
Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που προγραμματίζουν την καρκινογένεση.	24
Περαιτέρω χαρακτηριστικά γνωρίσματα της καρκινογένεσης	25
Ο διπρόσωπος ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην καρκινογένεση.	27
Η γενωμική αστάθεια και οι μεταλλαγές προσφέρουν στα καρκινικά κύτταρα πλεονεκτήματα.	28
Τα καρκινικά κύτταρα αναπροσαρμόζουν τον ενεργειακό τους μεταβολισμό.	29
Το καρκινικό μικροπεριβάλλον (Tumor microenvironment) και τα πολυδύναμα καρκινικά κύτταρα (Cancer Stem Cells).	30
Καρκινογένεση Ήπατος.	34
Αιτιολογίες	34
Καρκινογένεση Παχέως Εντέρου	38
Επιγενετική – Τροποποιήσεις χρωματίνης	40
Δομή χρωματίνης και κατηγορίες τροποποιήσεων.	41
Μεθυλίωση ιστονών.	44
Η ρύθμιση της μεθυλίωσης ιστονών.	45
Μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες.	45
Τρόπος στρατολόγησης στους γενωμικούς στόχους.	45
Τρόπος αναγνώρισης της μεθυλίωσης.	46
Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην διαδικασία της μεταγραφής.	47
Τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης εξαρτώνται από το μοριακό μικροπεριβάλλον που επικρατεί.	48
Επιγενετική και καρκινογένεση.	50

<b>Η πρωτεΐνη Smyd3.</b>	<b>53</b>
<b>Σκοπός της Εργασίας.</b>	<b>59</b>
<b>Αποτελέσματα</b>	<b>61</b>
<b>Η απενεργοποίηση της Smyd3 προστατεύει έναντι της ανάπτυξης των χημικά επαγόμενων καρκίνων του ήπατος (HCC) και του παχέως εντέρου (CRC).</b>	<b>61</b>
<b>Η Smyd3 δεν είναι απαραίτητη για τον επαγόμενο από το καρκινογόνο, κυτταρικό θάνατο και φλεγμονή, ωστόσο χρειάζεται για τον αντισταθμιστικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό (compensatory cell proliferation).</b>	<b>70</b>
<b>Η Smyd3 ρυθμίζει την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και γονιδίων που ενεργοποιούν την Επιθηλιακή σε Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition – EMT).</b>	<b>79</b>
<b>Η Smyd3 ενισχύει την μεσολαβούμενη από την RNA Πολυμεράση II μεταγραφή γονιδίων που προάγουν τον καρκίνο.</b>	<b>87</b>
<b>Ο μηχανισμός επιλογής του γονιδίου στόχου από την Smyd3 καθορίζεται από την άμεση και ειδική αλληλεπίδραση με τριμεθυλιωμένες H3K4 ουρές.</b>	<b>93</b>
<b>Συζήτηση</b>	<b>103</b>
<b>Η Smyd3 είναι ένας πλειοτροπικός ενισχυτής πολλών μονοπατιών που σχετίζονται με την καρκινογένεση.</b>	<b>103</b>
<b>Η Smyd3 δρα σαν ένας ενισχυτής της μεταγραφής των γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκινογένεσης.</b>	<b>105</b>
<b>Ο μηχανισμός εύρεσης των γονιδίων στόχων της Smyd3.</b>	<b>107</b>
<b>Ο ρόλος της ενεργότητας μεθυλάσης ιστονών στον μηχανισμό μεταγραφικής ενεργότητας.</b>	<b>108</b>
<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>111</b>
<b>Ποντίκια και αγωγές καρκινογένεσης.</b>	<b>111</b>
<b>Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρά ποντικού.</b>	<b>112</b>
<b>Απομόνωση ολικού RNA από ήπαρ.</b>	<b>112</b>
<b>Καθαρισμός ολικού RNA με DNAάση και αντίστροφη μεταγραφή.</b>	<b>113</b>
<b>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.</b>	<b>113</b>
<b>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).</b>	<b>114</b>
<b>Αλληλουχίες των RT-PCR εκκινητών στην παρούσα μελέτη</b>	<b>115</b>
<b>Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (WCE- Whole Cell Extract) από το ήπαρ.</b>	<b>116</b>
<b>Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα.</b>	<b>117</b>
<b>Παρασκευή πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ήπαρ.</b>	<b>117</b>
<b>Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot).</b>	<b>118</b>
<b>Τεχνικές ιστολογικής ανάλυσης.</b>	<b>118</b>
<b>Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης.</b>	<b>119</b>
<b>Ανοσοϊστολογία φθορισμού.</b>	<b>119</b>
<b>Ανοσοϊστολογία φθορισμού σε τομές παραφίνης.</b>	<b>119</b>
<b>Ανοσοϊστολογία φθορισμού σε κρυο-τομές.</b>	<b>120</b>

<b>Ανοσοκατακρήμιση Χρωματίνης για Q-PCR και για sequencing (ChIP-QPCR , ChIP-seq).</b>	<b>120</b>
<b>Αλληλουχίες των ChIP εκκινητών στην παρούσα μελέτη.</b>	<b>123</b>
<b>In vitro pull down πειράματα.</b>	<b>124</b>
<b>Κλωνοποίηση και βακτηριακή έκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων Smyd3 πρωτεϊνών.</b>	<b>125</b>
<b>Αλληλουχίες Εκκινητών.</b>	<b>126</b>
<b>Έκφραση και απομόνωση.</b>	<b>126</b>
<b>Ζυμογραφία αποικοδόμησης υποστρώματος ζελατίνης.</b>	<b>127</b>
<b>Πειράματα μέτρησης ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων με μέτρηση του γονιδίου αναφοράς Λουσιφεράσης (Luc-assays).</b>	<b>128</b>
<b>Κλωνοποίηση γονιδιωματικών περιοχών υποκινητών στο πλασμίδιο αναφοράς Luciferase, pGL4.10-Luc2.</b>	<b>129</b>
<b>Αλληλουχίες Εκκινητών.</b>	<b>130</b>
<b>Αντισώματα.</b>	<b>131</b>
<b>Βιβλιογραφία.</b>	<b>133</b>
<b>Δημοσίευση εργασίας στο περιοδικό Cancer Cell .</b>	<b>140</b>





## Περίληψη

Η Smyd3 πρωτεΐνη είναι μία μεθυλοτρανσφεράση η λειτουργία της οποίας εμπλέκεται στην καρκινογένεση. Στην παρούσα μελέτη δείχνουμε ότι η έκφραση της Smyd3 στα ποντίκια απαιτείται για την χημικά επαγόμενη ανάπτυξη καρκίνου του ήπατος και του παχέως εντέρου. Στα όργανα αυτά η Smyd3 λειτουργεί στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών ρυθμιστικών γονιδίων κλειδιών για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιθηλιακή σε μεσεγχυματική μετάβαση, το JAK/Stat3 ογκογόνο μονοπάτι καθώς και τα c-myc και β-catenin ογκογονίδια. Η Smyd3 αλληλεπιδρά με H3K4Me3-τροποποιημένες ουρές ιστονών, με την αλληλεπίδραση αυτή να συμβάλει στην στρατολόγησή της στον υποκινητή των περισσότερων μεταγραφικά ενεργών γονιδίων. Η πυκνότητα πρόσδεσης στα γονίδια στόχους συσχετίζεται θετικά με την αυξημένη πυκνότητα της RNA Πολυμεράσης II και τα αντίστοιχα ενεργοποιητικά μεταγραφικά αποτελέσματα. Παρά την ευρεία της γενωμική διανομή στους υποκινητές, η ενισχυτική μεταγραφική λειτουργία της Smyd3 περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο σύνολο γονιδίων των οποίων η έκφραση ενεργοποιείται ειδικά κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.

## Summary

Smyd3 is a protein methyltransferase implicated in cancer development. Here we show that Smyd3 expression in mice is required for chemically induced liver and colon cancer formation. In these organs Smyd3 functions in the nucleus stimulating the transcription of several key regulators involved in cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, JAK/Stat3 oncogenic pathway, as well as of the c-myc and β-catenin oncogenes. Smyd3 interacts with H3K4Me3-modified histone tails, which facilitates its recruitment to the core promoter regions of most active genes. Smyd3 binding density on target genes positively correlates with increased RNA Polymerase-II density and transcriptional outputs. Despite its widespread distribution, the transcription potentiating function of Smyd3 is restricted to a particular set of genes whose expression is induced specifically during carcinogenesis.



## Εισαγωγή

### Φυσιολογία ήπατος και παχέως εντέρου.

Τόσο το ήπαρ όσο και το παχύ έντερο, η καρκινογένεση των οποίων μελετάται στην παρούσα εργασία, αποτελούν μέρος του γαστρεντερικού συστήματος. Το τελευταίο περιλαμβάνει το γαστρεντερικό σωλήνα στον οποίο ανήκουν το στόμα, ο φάρυγγας, ο οισοφάγος, ο στόμαχος, το λεπτό έντερο, το παχύ έντερο και το ορθό καθώς και τα επικουρικά όργανα τα οποία είναι οι σιελογόνοι αδένες, το ήπαρ, η χοληδόχος κύστη και το πάγκρεας. Τα τελευταία δεν είναι μέρη του σωλήνα αλλά εκκρίνουν ουσίες σε αυτόν μέσω συνδετικών πόρων. Η κύρια λειτουργία του συστήματος αυτού είναι η επεξεργασία και μετατροπή της καταναλισκόμενης τροφής σε μόρια που δύναται να μεταφερθούν μαζί με άλατα και νερό από το εξωτερικό στο εσωτερικό του σώματος και να διατεθούν ακολούθως μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στα κύτταρα.

### Ήπαρ

Το ήπαρ είναι ένας μεγάλος αδένας που βρίσκεται στο άνω δεξί τμήμα της κοιλιακής χώρας στον άνθρωπο. Έχει πολλές βιολογικές λειτουργίες με τις εξωκρινείς του να αφορούν το γαστρεντερικό σύστημα και επομένως την πέψη. Συνολικά οι λειτουργίες του παρουσιάζονται παρακάτω υπό μορφή πίνακα (Πίνακας 1) προκειμένου να κατηγοριοποιηθούν καλύτερα.

#### **A. Εξωκρινείς (πεπτικές) λειτουργίες**

1. Σύνθεση και έκκριση χολικών αλάτων τα οποία είναι απαραίτητα για την επαρκή πέψη και απορρόφηση των λιπών.
2. Έκκριση στη χολή ανόργανων όξινων ανθρακικών ιόντων (διττανθρακικά) τα οποία συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των οξέων του δωδεκαδάκτυλου.

#### **B. Ενδοκρινείς λειτουργίες**

1. Σε απόκριση της αυξητικής ορμόνης, το ήπαρ εκκρίνει τον ινσουλινομιμητικό αυξητικό παράγοντα (IGF-1) που συμβάλλει στην ανάπτυξη σε διάφορους ιστούς ενεργοποιώντας τα κύτταρα για πολλαπλασιασμό.
2. Συμβάλλει στην ενεργοποίηση της βιταμίνης D.
3. Σχηματίζει τριϊωδοθυρονίνη (T3) από τη θυροξίνη (T4).
4. Εκκρίνει αγγειοτενσινογόνο, στο οποίο ενεργεί η ρενίνη για σχηματισμό αγγειοτενσίνης.
5. Μεταβολίζει ορμόνες.

#### **Γ. Πήξη**

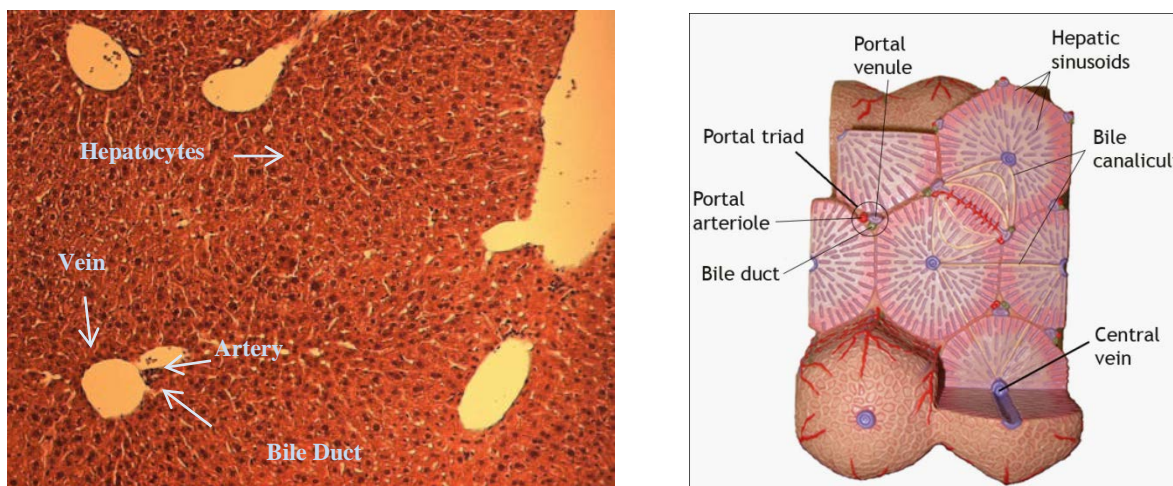
1. Παράγει πολλούς από τους παράγοντες πήξης του πλάσματος, όπως προθρομβίνη και ινωδογόνο.
2. Παράγει χολικά άλατα, τα οποία είναι απαραίτητα για τη γαστρεντερική απορρόφηση της βιταμίνης K, η οποία με τη σειρά της χρειάζεται για την παραγωγή αντιπηκτικών παραγόντων.

<p><b>Δ. Πρωτεΐνες πλάσματος</b></p> <p>1. Συνθέτει και εκκρίνει στο πλάσμα τη λευκωματίνη, τις πρωτεΐνες οξείας φάσεως (ανοσοποιητική δράση), προσδετικές πρωτεΐνες για στεροειδείς ορμόνες, ιχνοστοιχεία και λιποπρωτεΐνες.</p>
<p><b>Ε. Μεταβολισμός Οργανικών Ουσιών</b></p> <p>1. Μετατρέπει τη γλυκόζη του πλάσματος σε γλυκαγόνο και τριγλυκερίδια κατά την απορροφητική φάση των θρεπτικών συστατικών.</p> <p>2. Μετατρέπει τα αμινοξέα του πλάσματος σε λιπαρά οξέα, τα οποία μπορούν να ενσωματωθούν σε τριγλυκερίδια κατά την απορροφητική φάση.</p> <p>3. Συνθέτει τριγλυκερίδια και τα εκκρίνει ως λιποπρωτεΐνες κατά την απορροφητική φάση.</p> <p>4. Παράγει γλυκόζη από το γλυκογόνο (γλυκογονόλυση) και άλλες πηγές (γλυκονεογένεση) κατά την απορροφητική φάση. Απελευθερώνει τη γλυκόζη στο αίμα.</p> <p>5. Μετατρέπει τα λιπαρά οξέα σε κετόνες κατά τη νηστεία.</p> <p>6. Παράγει ουρία, το κύριο τελικό προϊόν του καταβολισμού των αμινοξέων την οποία απελευθερώνει στο αίμα.</p>
<p><b>Ζ. Μεταβολισμός Χοληστερόλης</b></p> <p>1. Συνθέτει χοληστερόλη και την ελευθερώνει στο αίμα.</p> <p>2. Εκκρίνει χοληστερόλη του πλάσματος στη χολή.</p> <p>3. Μετατρέπει τη χοληστερόλη του πλάσματος σε χολικά άλατα.</p>
<p><b>Η. Εξωκρινείς και διασπαστικές λειτουργίες</b></p> <p>1. Εκκρίνει χολερυθρίνη και άλλες χρωστικές ουσίες στη χολή.</p> <p>2. Αποβάλλει, μέσω της χολής, πολλά ενδογενή και ξένα προς το σώμα, οργανικά μόρια καθώς και ιχνοστοιχεία</p> <p>3. Μετατρέπει βιολογικά, πολλά ενδογενή και ξένα οργανικά μόρια.</p> <p>4. Καταστρέφει τα γηρασμένα ερυθροκύτταρα.</p>

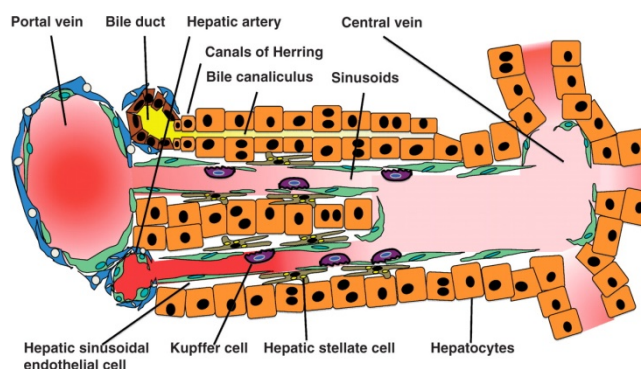
Πίνακας 1. Από ((Vander et al., 2001))

Όσον αφορά τη δομή του οργάνου, το ανθρώπινο ήπαρ αποτελείται από 2 λοβούς, το μεγαλύτερο σε μέγεθος δεξί και τον αριστερό. Στα ποντίκια το ήπαρ αποτελείται από 4-6 λοβούς. Οι λοβοί διαχωρίζονται σε χιλιάδες μικρές μονάδες, τα λοβίδια (lobules). Το λοβίδιο έχει εξαγωνικό σχήμα, με τις πυλαίες τριάδες (portal triads) να εντοπίζονται στις κορυφές και η κεντρική φλέβα στο κέντρο του λοβιδίου. Κάθε πυλαία τριάδα αποτελείται από μια πυλαία φλέβα, μια ηπατική αρτηρία και ένα χοληφόρο πόρο (Εικόνα 1).

Οι κυτταρικοί πληθυσμοί που αποτελούν το λοβίδιο, είναι κατά κύριο λόγο τα **ηπατοκύτταρα (hepatocytes)** και σε μικρότερο ποσοστά τα χολαγγειοκύτταρα, δηλαδή τα επιθηλιακά κύτταρα των χοληφόρων αγωγών (epithelial cells of bile ducts or cholangiocytes), τα μακροφάγα (Kuppfer cells), τα ηπατικά αστρικά κύτταρα (hepatic stellate cells, HSCs) και τα ενδοθηλιακά κύτταρα που δημιουργούν τα σινουσοειδή (Εικόνα 2) (Tanaka et al., 2011).

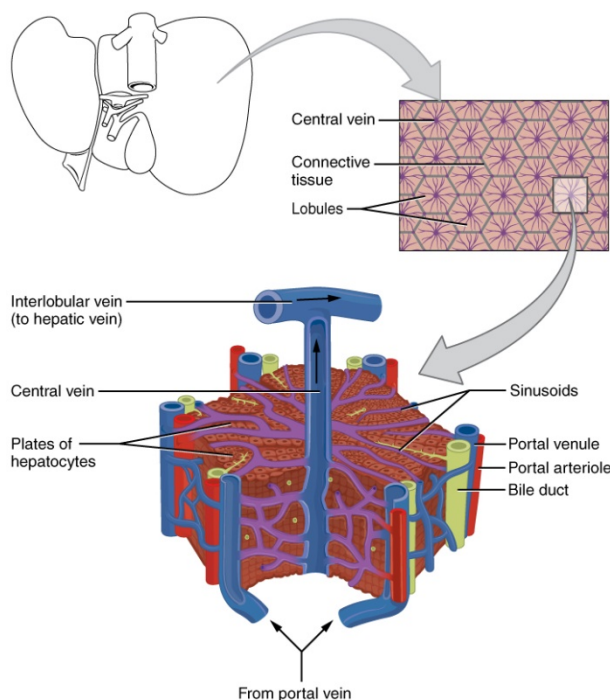


Εικόνα 1.



Εικόνα 2. Από (Tanaka et al., 2011)

Στο ήπαρ εισέρχονται η πυλαία φλέβα και η ηπατική αρτηρία, ενώ εξέρχεται ο χοληδόχος πόρος. Η ηπατική αρτηρία μεταφέρει αίμα από την αορτή, ενώ η πυλαία φλέβα μεταφέρει το αίμα από το έντερο, τη σπλήνα και το πάγκρεας. Τα αγγεία αυτά διαιρούνται σε τριχοειδή και καταλήγουν στα λοβίδια. Η πυλαία φλέβα παρέχει το 75% του συνολικού αίματος που παροχετεύεται στο ήπαρ, και μεταφέρει όλα τα θρεπτικά συστατικά και τα προϊόντα πέψης από το έντερο για να μεταβολιστούν ή να αποτοξινωθούν. Η ηπατική αρτηρία καλύπτει το υπόλοιπο 25% της παροχής και μεταφέρει αρτηριακό αίμα πλούσιο σε οξυγόνο. Παροχή οξυγόνου γίνεται και από την πυλαία φλέβα, σε μικρότερο όμως βαθμό. Το αίμα διαπερνά τα κολποειδή τριχοειδή (sinusoids) και διοχετεύεται στο κεντρικό φλεβίδιο του κάθε λοβιδίου. Τα κεντρικά φλεβίδια ενώνονται σε ηπατικές φλέβες και εξέρχονται από το ήπαρ. Το ήπαρ αποτελεί το κύριο όργανο παραγωγής χολής. Η χολή συλλέγεται στα χοληφόρα σωληνάρια (bile ducts) τα οποία ενώνονται και σχηματίζουν τον χοληδόχο πόρο. Η χολή διοχετεύεται είτε στον δωδεκαδάκτυλο μέσω του κοινού χοληδόχου πόρου, είτε αποθηκεύεται προσωρινά στη χοληδόχο κύστη (Εικόνα 3).



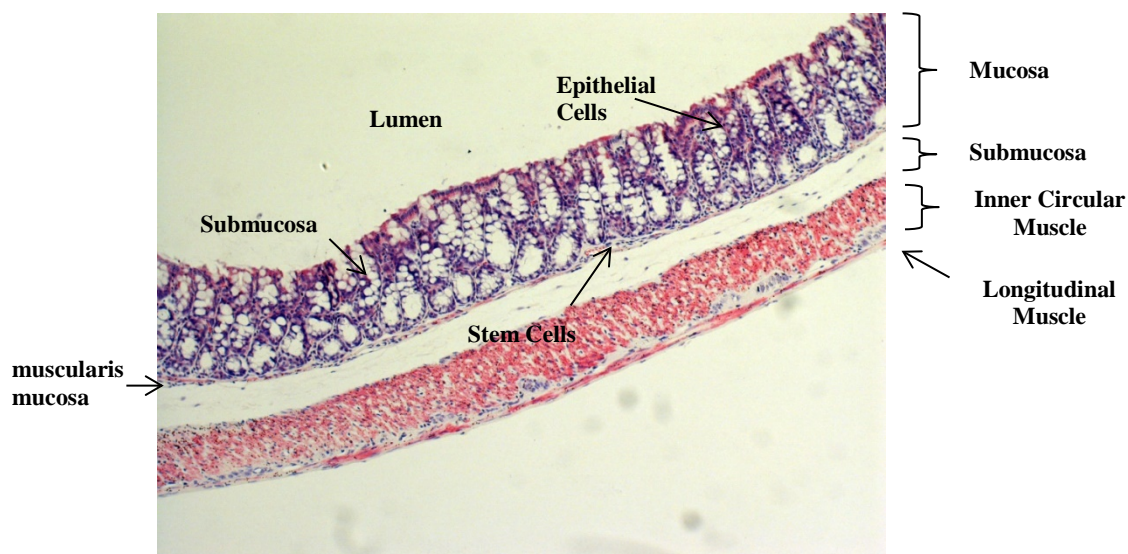
Εικόνα 3. Από Wikipedia (Illustration από Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013.)

### Παχύ έντερο (κόλον)

Το παχύ έντερο είναι ένας σωλήνας με μήκος 1,2 μέτρα και διάμετρο 5 cm στους ανθρώπους. Τμηματοποιείται στην αρχική του μοίρα το τυφλό, έπειτα το ανιόν κόλον, το κατιόν, το σιγμοειδές και τέλος το ορθό. Οι εκκρίσεις του είναι λιγοςτές ενώ δεν υπάρχουν ένζυμα πέψης. Περιέχει κυρίως βλέννα και υγρά που περιέχουν όξινα ανθρακικά ιόντα και αντίστοιχα καλίου. Κύρια λειτουργία του είναι η αποθήκευση και η συμπίκνωση των κοπράνων πριν την αφόδευση. Η απορρόφηση από το παχύ έντερο είναι ελάχιστη και αποτελεί μόλις το 4% των συνολικών τροφών που εισέρχονται. Η κύρια διεργασία απορρόφησης στο παχύ έντερο είναι η ενεργός μεταφορά νατρίου από τον αυλό προς την κυκλοφορία του αίματος καθώς και η συνακόλουθη της ώσμωσης μετακίνηση νερού. Τέλος απορροφά επίσης μερικά από τα προϊόντα που σχηματίζονται από τα βακτήρια που βρίσκονται στην περιοχή του παχέως. Συγκεκριμένα οι άπεπτοι πολυσακχαρίτες (φυτικές ίνες) μεταβολίζονται σε μικρές αλυσίδας λιπαρά οξέα από τα συμβιωτικά αυτά βακτήρια και ακολούθως απορροφώνται με παθητική διάχυση. Τα βακτήρια παράγουν επίσης μικρές ποσότητες βιταμινών, κυρίως βιταμίνης K, οι οποίες απορροφούνται από την κυκλοφορία του αίματος.

Όσον αφορά τη δομή χωρίζεται στα εξής μέρη: Το βλεννογόνο (mucosa), τον υποβλεννογόνο χιτώνα που περιέχει και νευρικό πλέγμα (submucosa), τον έξω μυϊκό χιτώνα (που αποτελείται από κυκλομερή μύς (Inner Circular Muscle), μυοεντερικό πλέγμα και επιμήκης μύς (Longitudinal

Muscle) και τον ορογόνο χιτώνα (Εικόνα 4). Όσον αφορά το βλεννογόνο (mucosa) είναι παχύς και στην περίπτωση του παχέως εντέρου έχει μόνο κρύπτες (σε αντίθεση με το λεπτό έντερο). Το επιθήλιο του βλεννογόνου αποτελείται από κινοειδή επιθηλιακά κύτταρα με γραμμωτό όριο, πολλά κύτταρα goblet, ενδοκρινή κύτταρα και πολυδύναμα κύτταρα (stem cells) στη βάση των κρυπτών. Τα επιθηλιακά έρχονται σε επαφή με τον αυλό (lumen) και πρέπει συνεχώς να ανανεώνονται. Εσωτερικά του επιθηλίου στο βλεννογόνο υπάρχει το χόριο (ίδιος υμένας- lamina propria) και ο βλεννογόσιος μυϊκός χιτώνας (muscularis mucosa). Οι δομές αυτές φαίνονται και στην παρακάτω εικόνα ιστολογίας με χρώση εωσίνης αιματοξυλίνης σε επιμήκη τομή παχέως εντέρου ποντικού. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4. Επιμήκη τομή φυσιολογικού παχέως εντέρου. Διακρίνονται τα δομικά στρώματα.

## Καρκινογένεση

Ο **καρκίνος (cancer)** ή αλλιώς νεοπλασία (κακοήθης νεοπλασία – όγκος - malignant neoplasm) περιλαμβάνει μία οικογένεια ασθενειών η οποίες χαρακτηρίζονται από μία μη φυσιολογική κυτταρική ανάπτυξη και έναν υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό ο οποίος μάλιστα έχει τη δυνατότητα να εξαπλωθεί και να εισβάλει σε γειτονικά ή απομακρυσμένα όργανα προκαλώντας **μετάσταση (metastasis)**. Διακρίνεται από τους καλοήθεις όγκους οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την περιορισμένη κυτταρική ανάπτυξη σε ένα σημείο του οργανισμού και η οποία μάλιστα δεν επηρεάζει θεμελιωδώς της οργανικές λειτουργίες και δε μπορεί να εξαπλωθεί σε άλλα σημεία του οργανισμού.

### Κατηγοριοποίηση και ονοματολογία καρκίνων.

Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο από τον οποίο προέρχονται (ή των προγονικών του εν λόγω κυτταρικού τύπου-σύμφωνα με την υπόθεση των πολυδύναμων καρκινικών κυττάρων - cancer stem cell hypothesis) ή αναπτύσσονται πλησίον του οι καρκίνοι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν στους ακόλουθους τύπους :

- **Καρκινώματα (Carcinoma)** : Είναι η καρκίνοι που προέρχονται από επιθηλιακά κύτταρα ή από επιθηλιακής προέλευσης πρόδρομα κύτταρα. Σε αυτή την οικογένεια ανήκουν οι περισσότεροι καρκίνοι οι οποίοι αναπτύσσονται σε ενήλικα και ηλικιωμένα άτομα και αναπτύσσονται μεταξύ άλλων στο στήθος, τον προστάτη, τον πνεύμονα, το πάγκρεας, το παχύ έντερο και το ήπαρ.
- **Σαρκώματα (Sarcoma)** : είναι οι καρκίνοι οι οποίοι αναπτύσσονται από συνδετικούς ιστούς (οστά, χόνδρους, λίπος, νεύρα) και από μεσεγγυματικά κύτταρα εκτός (χωρικά) του μυελού των οστών.
- **Λεμφώματα και Λευχαιμίες (Lymphoma and Leukemia)** : Αυτοί οι δύο τύποι αναπτύσσονται από αιματοποιητικά κύτταρα τα οποία μεταναστεύουν από τον μυελό και τείνουν να ωριμάζουν στους λεμφαδένες (lymph node) και στο αίμα, αντίστοιχα. Η λευχαιμία είναι ο πιο κοινός τύπος παιδικού καρκίνου και αφορά περίπου το 30%.
- **Γοναδικών κυτταρικών τύπων καρκίνος (Germ Cell Tumor)** : Οι καρκίνοι οι οποίοι προέρχονται από τα πολυδύναμα κύτταρα, και εμφανίζονται στους όρχεις ή τις ωοθήκες (seminoma and dysgerminoma, αντίστοιχα)
- **Βλαστώματα (Blastoma)** : Είναι οι καρκίνοι οι οποίοι προέρχονται από μη ώριμα πρόδρομα κύτταρα (immature precursor cells) ή εμβρυονικούς ιστούς. Συνεπώς τα βλαστώματα είναι πιο συνήθη στα παιδιά από ότι στους ενήλικες.



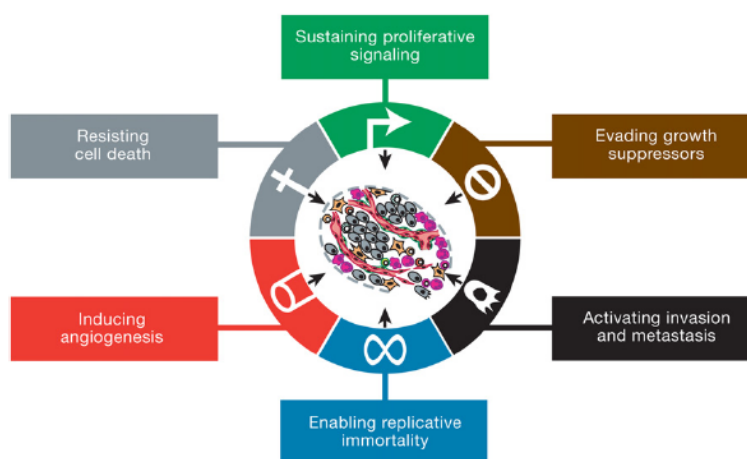
Οι καρκίνοι συνήθως, αλλά όχι πάντα, ονομάζονται χρησιμοποιώντας σαν πρόθεμα τη λατινική ή ελληνική λέξη του ιστού ή του οργάνου από το οποίο προέρχονται και σαν κατάληξη τις λέξεις : -καρκίνωμα, -σάρκωμα και -βλάστωμα. Έτσι για παράδειγμα οι καρκίνοι του παρεγχύματος του συκωτιού που προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα ονομάζονται ηπατοκαρκίνωμα ενώ όταν προέρχονται από πρόδρομα ηπατοκύτταρα ονομάζονται ηπατοβλάστωμα. Αντίστοιχα ο καρκίνος από τα λιποκύτταρα ονομάζεται λιποσάρκωμα. Άλλοι τύποι ονομάζονται από το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων κάτω από το μικροσκόπιο, όπως “giant cell carcinoma”, “spindle cell carcinoma” και “small-cell carcinoma”.

Ο καρκίνος χαρακτηρίζεται από μία αξιοσημείωτη ποικιλομορφία τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο. Τα φυσιολογικά κύτταρα μετασχηματίζονται και εξελίσσονται σε καρκινικά αποκτώντας σταδιακά πολλαπλά διακριτά «χτυπήματα» τα οποία δρουν αθροιστικά.

Ωστόσο ένας όγκος είναι κάτι πολύ περισσότερο από μία μάζα ίδιας φύσεως πολλαπλασιαζόμενων καρκινικών κυττάρων. Συνεπώς εκτός από τους **αυτόνομους μηχανισμούς** που επισυμβαίνουν εντός καρκινικού κυττάρου και οδηγούν στον μετασχηματισμό του (cell-autonomous) υπάρχουν και **μη-αυτόνομοι** (των καρκινικών κυττάρων) μηχανισμοί (non-cell autonomous). Υπό αυτή την οπτική, οι όγκοι είναι πολύπλοκοι ιστοί οι οποίοι αποτελούνται από πολλούς διακριτούς κυτταρικούς τύπους οι οποίοι συμμετέχουν σε ετερότυπες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους. Περαιτέρω συμμετέχουν ενεργά ακόμα και στρατολογημένα φυσιολογικά κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν το σχετιζόμενο με τον καρκίνο στρώμα (stroma).

Αυτές οι νέες ανακαλύψεις και παρατηρήσεις για τη φύση του καρκίνου έχουν οδηγήσει σε μία ταξινομική κατηγοριοποίηση των μηχανισμών που συμμετέχουν στην ανάπτυξη των καρκίνων και των γνωρισμάτων των τελευταίων.

Τα γνωρίσματα αυτά συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα 5 (Hanahan and Weinberg, 2011).



Εικόνα 5. Από (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Τα καρκινικά κύτταρα υποστηρίζουν τη συνεχή σηματοδότηση για πολλαπλασιασμό.**

Σαφέστατα το πλέον αυτόνομο χαρακτηριστικό γνώρισμα των καρκινικών κυττάρων είναι η ικανότητά τους να υποστηρίζουν το χρόνιο πολλαπλασιασμό. Έτσι ο αυστηρά ρυθμιζόμενος έλεγχος της παραγωγής και έκκρισης αυξητικών παραγόντων που συμβαίνει σε φυσιολογικούς ιστούς στα πλαίσια της ομοιόστασης του οργανισμού μετατρέπεται σε μία έλλειψη ελέγχου κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα γίνονται κυρίαρχοι των εαυτών τους. Ο χώρο-χρονικός έλεγχος χάνεται γιατί τα ίδια τα κύτταρα εκκρίνουν συνεχώς αυξητικούς παράγοντες, είτε για τους εαυτούς τους (αυτοκρινή δράση) είτε για τα παρακείμενα καρκινικά (παρακρινή δράση). Η υπερέκκριση μπορεί να οφείλεται σε μεταλλαγές σε υποκινητές γονιδίων όπως πχ αυξητικών παραγόντων. Περαιτέρω μεταλλαγές μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση των επιπέδων των υποδοχέων η οποία αύξηση τα καθιστά υπερευαίσθητα στα σήματα. Γονίδια τα οποία υπόκεινται σε τέτοιου είδους αλλαγές, δηλαδή υπερενεργοποίηση (gain of function), είτε με μεταλλαγές στον υποκινητή τους, είτε με μεταλλαγές στην κωδική περιοχή που τα καθιστούν υπερευαίσθητα ή υπερενεργά, ονομάζονται **ογκογονίδια (oncogenes)**. Περαιτέρω μηχανισμοί μετατροπής τέτοιων πρωτο-ογκογονιδίων σε ογκογονίδια αφορούν την αυξημένη πρωτεϊνική (ή του mRNA) σταθερότητα, το γονιδιακό διπλασιασμό (gene duplication) και τις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις με παραγωγή γονιδίων υβριδίων (πχ χρωμόσωμα Φιλαδέλφεια, BCR-ABL γονίδιο χίμαιρα). Τέλος η έκφραση των ογκογονιδίων μπορεί να ρυθμιστεί με microRNAs, μεταλλαγές των οποίων μπορούν να ενεργοποιήσουν ογκογονίδια. (Lodish, 2008)

Περαιτέρω, μεταλλαγές σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες κάτωθι των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων συνεισφέρουν στο διηνεκή πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων καθώς τα σηματοδοτικά αυτά μόρια γίνονται υπέρ-ενεργά και μετατρέπουν το μονοπάτι σε συνεχή πυροδότηση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η Raf πρωτεΐνη (MAPK-kinase μονοπάτι μεταγωγής σήματος) και η Akt/PKB (PI3 kinase μονοπάτι). Περαιτέρω, βλάβες σε ρυθμιστικούς μηχανισμούς ανάδρασης (negative-feedback loops) που σκοπός τους είναι να φρενάρουν την πολλαπλασιαστική σηματοδότηση οδηγούν επίσης σε καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η RAS ογκοπρωτεΐνη και η PTEN φωσφατάση, μεταλλαγές καταστολής της λειτουργίας (loss-of-function) της οποίας ενισχύουν το PI3K μονοπάτι σηματοδότησης. (Hanahan and Weinberg, 2011)

Χαρακτηριστικό πρωτο-ογκογονίδιο είναι μεταξύ άλλων και το MYC, η υπερέκφραση του οποίου σε πολλούς ιστούς όπως σε εμβρυονικά συκώτια προκαλεί κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε ενήλικα συκώτια προωθεί υπέρμετρη κυτταρική αύξηση χωρίς ενδιάμεση μίτωση οδηγώντας μεταξύ άλλων και σε πολυπλοειδία. Η ταυτόχρονη μάλιστα ενεργοποίηση του MYC και απώλεια λειτουργίας του p53 (παρακάτω) οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και καρκινογένεση σε ενήλικα ηπατοκύτταρα. Σε διαφορετικό μοριακό περιβάλλον το MYC προκαλεί καρκινογένεση προκαλώντας την αποφυγή πολλαπλών καρκινο-κατασταλτικών μηχανισμών, όπως παύση του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της κυτταρικής γήρανσης, μηχανισμών που περιγράφονται αμέσως παρακάτω. (Gabay et al., 2014)

### **Τα καρκινικά κύτταρα αποφεύγουν τους καταστολείς της ανάπτυξης.**

Τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν μόνο τη δυνατότητα να υποστηρίζουν και να προκαλούν την ενεργοποίηση σημάτων πολλαπλασιασμού, αλλά και να απενεργοποιούν προγράμματα τα οποία καταστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Πολλά από αυτά τα προγράμματα εκτελούνται υπό τη δράση **ογκοκατασταλτικών γονιδίων (tumor suppressor genes)** η δυσλειτουργία ή καταστολή των οποίων σε πολλά μοντέλα οδηγεί ή συνεισφέρει στην καρκινογένεση. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι πρωτεΐνες RB η οποία «αποφασίζει» εάν τα το κύτταρο πρέπει ή όχι να εισέλθει σε έναν κυτταρικό κύκλο διπλασιασμού-διαίρεσης, και η p53 (TP53) πρωτεΐνη, η οποία αναγνωρίζει βλάβες του γονιδιώματος καθώς και άλλα ερεθίσματα και αναλόγως με το βαθμό της σοβαρότητας τους μπορεί να οδηγήσει σε παύση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου μέχρι τα ερεθίσματα αυτά να επιστρέψουν στα φυσιολογικά επίπεδα, διαφορετικά οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση (apoptosis). (Sherr, 2004)

Ένας άλλος μηχανισμός αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ο οποίος απενεργοποιείται κατά τον καρκίνο είναι ο μηχανισμός της παρεμπόδισης εξ' επαφής (contact inhibition) η ύπαρξη του οποίου διασφαλίζει τη φυσιολογική ομοιόσταση του ιστού. Δύο εκφραστές αυτού του μηχανισμού είναι η πρωτεΐνη Merlin (NF2 gene) η οποία ενορχηστρώνει την παρεμπόδιση εξ' επαφής μέσω της διασύνδεσης των EGFR υποδοχέων με την E-cadherin, και η LKB1 η οποία οργανώνει την επιθηλιακή δομή. Απώλεια αυτών των γονιδίων συνεισφέρει στον υπέρμετρο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Τα καρκινικά κύτταρα αντιστέκονται στον κυτταρικό θάνατο, ο ρόλος της αυτοφαγίας και ο καρκινοπροωθητικός ρόλος της νέκρωσης.**

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος από την **απόπτωση** είναι ένας φυσιολογικός φραγμός στην ανάπτυξη του καρκίνου. Η απόπτωση ενεργοποιείται είτε από εξωκυτταρικής προέλευσης ερεθίσματα (Fas ligand/FasR) είτε από εσωτερικά, όπως βλάβες στο DNA. Η πραγματοποίηση γίνεται μέσω ενός κυκλώματος πρωτεολύσεων από κασπάσες καθώς ρυθμιστικές προ- και αντί-αποπτωτικές πρωτεΐνες (proapoptotic (Bax, Bak), antiapoptotic (Bcl-2)) συμβάλλουν στον έλεγχο του μηχανισμού που ως καθοριστικό γεγονός έχει την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c (cytochrome c) από την εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. (Lodish, 2008)

Σε μη φυσιολογικά περιβάλλοντα στα οποία υπάρχουν σπασίματα του DNA και χρωμοσωμικές ανωμαλίες, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη TP53 λειτουργεί ως ανιχνευτής των ανωμαλιών αυτών και ενεργοποιεί την απόπτωση μέσω των Noxa και Puma BH3-only πρωτεϊνών. Εναλλακτικά το σήμα για απόπτωση μπορεί να είναι η ανεπαρκής σηματοδότηση από τον παράγοντα επιβίωσης I3 για τα λεμφοκύτταρα και Igf1/2 για τα επιθηλιακά.

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός κυτταρικού θανάτου είναι η **αυτοφαγία** (autophagy) η οποία στα φυσιολογικά κύτταρα λειτουργεί σε πολύ χαμηλά επίπεδα και κύριο ερέθισμά της είναι η έλλειψη

θρεπτικών. Η αυτοφαγία επιτρέπει στα κύτταρα να αποικοδομήσουν οργανίδια και να ανακυκλώσουν έτσι καταβολίτες για βιοσύνθεση και μεταβολισμό. Το μονοπάτι PI3 kinase-Akt-mTOR το οποίο ενεργοποιείται από σήματα επιβίωσης για να μπλοκάρει την απόπτωση, λειτουργεί ομοίως για να μπλοκάρει και την αυτοφαγία. Έτσι εν απουσία σημάτων επιβίωσης το PI3K μονοπάτι «υπολειπεται» και η αυτοφαγία (ή η απόπτωση) ενεργοποιούνται. Για το ρόλο της αυτοφαγίας στην καρκινογένεση, τα δεδομένα από γενετικά μοντέλα ποντικών και από κυτταροκαλλιέργειες φαίνονται αντιφατικά και προτείνεται ότι η αυτοφαγία έχει ίσως έναν ογκοκατασταλτικό ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης και έναν προωθητικό στα μετέπειτα στάδια.

Σε αντίθεση με τους παραπάνω μηχανισμούς κυτταρικού θανάτου οι οποίοι είναι ρυθμιζόμενοι και ως εκ τούτου ελεγχόμενοι, ο πλέον “άτακτος” μηχανισμός, αυτός της **νέκρωσης**, ασκεί θετικό ρόλο στην καρκινογένεση. Ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών σημάτων (πχ IL-1a) στο γειτονικό μικροπεριβάλλον. Έτσι επιστρατεύονται φλεγμονώδη κύτταρα του ανοσοποιητικού τα οποία στο ειδικό πλαίσιο του καρκινικού περιβάλλοντος μπορεί να είναι καρκινοπροωθητικά, υπό την έννοια ότι αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την αγγειογένεση, τον **καρκινικό αντισταθμιστικό (compensatory) κυτταρικό πολλαπλασιασμό** και την εξάπλωση. (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την αναπαραγωγική αθανασία.**

Ένα γνώρισμα των φυσιολογικών κυττάρων είναι ο περιορισμένος αριθμός των κυτταρικών διαιρέσεων-πολλαπλασιασμού τον οποίο μπορούν να πραγματοποιήσουν. Το πλατό αυτό υφίσταται λόγω δύο καταστάσεων στις οποίες μπορεί να υπεισέλθει το κύτταρο και αποτελούν εμπόδιο στον απεριόριστο πολλαπλασιασμό: η μία κατάσταση είναι η κυτταρική γήρανση (senescence), μία μη αναστρέψιμη είσοδο σε μία μη πολλαπλασιαστική αλλά ζωτική κατάσταση και η δεύτερη η κυτταρική κρίση (crisis) η οποία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Όταν κάποια κύτταρα καταφέρνουν σε σπάνιες περιπτώσεις να αποφύγουν τις δύο παραπάνω καταστάσεις τότε αποκτούν ένα δυναμικό απεριόριστης αντιγραφής και η μετάβαση αυτή ορίζεται ως αθανατοποίηση (immortalization). Σημαντικό μηχανιστικό ρόλο στην αθανατοποίηση των κυττάρων έχει η προστασία των τελομερών, πολλαπλών επαναλαμβανόμενων εξανουκλεοτιδίων στις άκρες των χρωμοσωμάτων τα οποία φυσιολογικά υφίστανται αποδόμηση και ως εκ τούτου μικραίνουν σε μήκος με την γήρανση και χάνουν την ικανότητα να προστατεύουν τα χρωμοσώματα. Το ένζυμο που συντηρεί τα τελομερή, η τελομεράση, είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμο στα μη αθανατοποιημένα κύτταρα (φυσιολογικά) αλλά εκφράζεται έντονα στα αυθόρμητα (spontaneous) αθανατοποιημένα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των καρκινικών κυττάρων, τα οποία ανανεώνουν με αυτό τον τρόπο τα τελομερή τους. Σχετικά με το ρόλο της τελομεράσης στον καρκίνο έχει αρχίσει να διαφαίνεται η ιδέα ότι στην αρχή της καρκινογένεσης η τελομεράση είναι απύσχα και αυτό δίνει το χρονικό περιθώριο για απόκτηση καρκινικών μεταλλαγών, ενώ η περαιτέρω σε δεύτερο χρόνο ενεργοποίησή της σταθεροποιεί το

μεταλλαγμένο γονιδίωμα και προσφέρει την άνευ περιορισμού δυνατότητα πολλαπλασιασμού. Γενετικά μοντέλα καρκινογένεσης ποντικών στα οποία τους λείπει η τελομεράση έχουν δείξει ότι τα μετασχηματισμένα αυτά κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρική γήρανση (senescence), προσφέροντας την ιδέα ότι η κυτταρική γήρανση μπορεί να είναι ένας στόχος σαν ένα προστατευτικό εμπόδιο στην νεοπλασματική εξέλιξη. (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν την αγγειογένεση.**

Οι καρκινικοί ιστοί όπως και οι φυσιολογικοί χρειάζονται πρόσληψη θρεπτικών και οξυγόνου και αποβολή παραπροϊόντων και CO<sub>2</sub>, ανάγκες οι οποίες καλύπτονται με τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Ενώ η αγγειογένεση είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη σε φυσιολογικές διεργασίες όπως η εμβρυογένεση, η ανάπτυξη και ο τραυματισμός ιστών (wound healing), στην καρκινογένεση η διεργασία αυτή είναι μονίμως ενεργή (angiogenic switch).

Όπως και σε κάθε άλλη διεργασία, έτσι και στην αγγειογένεση υπάρχουν ενεργοποιητές (όπως VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor και FGF Fibroblast Growth Factor)) και καταστολείς (όπως TSP-1 (thrombospondin 1)) της διαδικασίας, πολλοί από τους οποίους είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες στην επιφάνεια των αγγειακών επιθηλιακών κυττάρων. Η ενεργοποίηση των VEGF γονιδίων γίνεται σε συνθήκες υποξίας (hypoxia) (κατάσταση που χαρακτηρίζει τους καρκινικούς ιστούς) αλλά και από σηματοδότηση ογκογονιδίων. Σημαντικά ογκογονίδια όπως το Ras και Myc τα οποία εκφράζονται στα καρκινικά συνεισφέρουν μεταξύ των άλλων γνωστών τους επιδράσεων και στην αγγειογένεση. Εναλλακτικός τρόπος είναι η έκκριση των VEGF προσδετών σε ανενεργές πρόδρομες μορφές και η ενζυμική ενεργοποίησή τους από εξωκυττάρια μεταλλοπρωτεϊνάσες της μήτρας (matrix metalloproteinases) όπως πχ η MMP-9. Καταστολείς της αγγειογένεσης όπως οι πρωτεΐνες TSP-1, Angiostatin και Endostatin έχουν υπερεκφραστεί σε γενετικά μοντέλα ποντικών με τα αποτελέσματα να δείχνουν πως η έκφρασή τους εμποδίζει την καρκινογένεση.

Για την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης χρειάζεται η συνεργασία των καρκινικών κυττάρων με το περιβαλλόμενο μικροπεριβάλλον του στρώματος (stroma microenvironment) και με κύτταρα της φλεγμονής. Τα περικύτταρα (pericytes) είναι σημαντικά κύτταρα στη δομή και τη φυσιολογία των αγγείων ενώ επιπλέον σημαντικά κύτταρα του γειτονικού στρώματος με ενεργό ρόλο στην παθολογική αγγειογένεση των όγκων είναι κυτταρικοί πληθυσμοί προερχόμενοι από το μυελό των οστών, όπως κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, μακροφάγα, ουδετερόφιλα, μαστικά κύτταρα και πρόδρομα μυελικά κύτταρα (myeloid progenitors) τα οποία στρατολογούνται σε πρόδρομες καρκινικές περιοχές αλλά και σε προχωρημένους όγκους (Potente et al., 2011).

### **EMT, ενεργοποίηση της εξάπλωσης και Μετάσταση.**

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των όγκων καθώς αναπτύσσονται είναι η **τοπική εξάπλωσή** τους (local invasion) και η συστηματική και απομακρυσμένη εξάπλωσή τους, η **μετάσταση (metastasis)**. Για να

γίνει αυτό, μεταξύ άλλων χρειάζεται αλλαγή στη μορφολογία και δομή των ίδιων των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων σε σχέση με την δομική τους σύνδεση με τα γειτονικά κύτταρα και την εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix). Από τα πρώτα καλά χαρακτηρισμένα μόρια κλειδιά σε αυτή τη διαδικασία είναι η E-cadherin. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα διαμεμβρανικό μόριο σύνδεσης των επιθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους, και η απώλειά της κάνει τα κύτταρα πιο «ευκίνητα» καθώς δεν σχηματίζουν σφικτούς δεσμούς με τα γειτονικά τους κύτταρα. Μείωση της E-cadherin (cdh1) παρατηρείται στα καρκινικά κύτταρα τα οποία έχουν την ανάγκη εξάπλωσης μέσω του πολλαπλασιασμού τους, καταρχήν τοπικά αλλά και σε απομακρυσμένους ιστούς. Ομοίως και άλλα γονίδια που εκφράζουν μόρια της ισχυρής διακυτταρικής σύνδεσης και της πρόσδεσης των κυττάρων με την εξωκυττάρια μήτρα (cell-to-ECM) υποεκφράζονται στα καρκινικά ενώ άλλα γονίδια χαρακτηριστικά των πιο ευκίνητων κυτταρικών πληθυσμών (φλεγμονώδη κύτταρα ή κύτταρα που μεταναστεύουν κατά την εμβρυογένεση ή τη φυσιολογική διεργασία της ανάπτυξης) υπερεκφράζονται (πχ N-Cadherin). Έτσι παρατηρείται μία διεργασία η οποία συχνά ονομάζεται αλληλουχία εξάπλωσης-μετάστασης (invasion-metastasis cascade), κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα καταρχήν εξαπλώνονται τοπικά (local invasion), έπειτα διεισδύουν στα αιμοφόρα και λεμφικά αγγεία (intravasation) και μεταφέρονται μέσω του λεμφικού και αιμοποιητικού συστήματος σε απομακρυσμένες περιοχές. Αφού διαπεράσουν εκ νέου και βγουν από τα αγγεία (extravasation) σχηματίζουν μικρούς σχηματισμούς καρκινικών κυττάρων (micrometastases) και εν τέλει τα τελευταία μετατρέπονται σε νέους μακροσκοπικούς όγκους (colonization). (Hanahan and Weinberg, 2011)

Η διεργασίες αυτές της εξάπλωσης, της αποφυγής απόπτωσης και μετανάστευσης των μετασχηματισμένων κυττάρων θυμίζουν ένα αυστηρά ρυθμιζόμενο αναπτυξιακό πρόγραμμα που συμβαίνει φυσιολογικά κατά την εμβρυογένεση και ανάπτυξη και το οποίο ονομάζεται **EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition)**. Για να γίνει αυτό τα μετασχηματισμένα κύτταρα, όπως περιγράφηκε συνοπτικά και παραπάνω, μεταβάλλουν κάποια δομικά τους γνωρίσματα, προσωρινά ή μόνιμα. Το γονιδιακό πρόγραμμα της δομικής αυτής μεταβολής ενορχηστρώνεται από ένα σετ πλειοτροπικών μεταγραφικών παραγόντων όπως το Snail, Slug, Twist, Zeb1/2 και Sox4. Τα κυτταρολογικά χαρακτηριστικά που αποκτούν τα μετασχηματισμένα EMT κύτταρα είναι η απώλεια των σφικτών δεσμών (adherent junctions) και η μετατροπή τους από πολυγωνικά επιθηλιακά κύτταρα σε ελλειψοειδή ινοβλαστικού τύπου κύτταρα. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από την έκφραση ενζύμων που αποικοδομούν την εξωκυττάρια μήτρα, αυξημένη κινητικότητα και αυξημένη αντίσταση στην απόπτωση, γνωρίσματα τα οποία όπως αναφέρθηκε σχετίζονται και με τις διεργασίες της εξάπλωσης και μετάστασης. Οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες μπορούν να ρυθμίζουν κοινούς στόχους ή και να ρυθμίζει ο ένας τον άλλον ενώ για την «υποβολή» των μετασχηματισμένων κυττάρων στο πρόγραμμα αυτό σημαντικό ρόλο παίζουν ετερότυπες αλληλεπιδράσεις των καρκινικών κυττάρων με τα περιβάλλοντα κύτταρα στρώματος. Αυτό διαφαίνεται μάλιστα και

από την συγκεκριμένη θέση των EMT μετασχηματισμένων κυττάρων στα υπό εξάπλωση περιθώρια (invasive margins) των καρκινωμάτων και όχι στον πυρήνα (core). (Zheng and Kang, 2014)

Τα εν λόγω περιβάλλοντα κύτταρα αφορούν διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς. Τα μεσενχυματικά εμβρυικά κύτταρα (Mesenchymal Stem Cells - MSCs) είναι ένας σημαντικός τέτοιος πληθυσμός τα οποία βρίσκονται στο περιβάλλον στρώμα και εκκρίνουν CCL5/RANTES ως απόκριση στα σήματα από τα καρκινικά κύτταρα. Το CCL5 με τη σειρά του ενεργοποιεί τα καρκινικά για περαιτέρω εξάπλωση. Τα μακροφάγα περαιτέρω, συνεισφέρουν στην εξάπλωση των καρκινικών προσφέροντας ένζυμα αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) και πρωτεάσες κυστεΐνης-καθεψίνης (Cysteine cathepsin proteases). Ανάλογο ρόλο έχει και η εκκρινόμενη από τα μακροφάγα IL-4, και η EGF που εκκρίνεται από τα TAMs (Tumor Associated Macrophages) και ενεργοποιούν την εξάπλωση των καρκινικών τα οποία με τη σειρά τους εκκρίνουν CSF-1. Περαιτέρω και η δημιουργούμενη υποξία που δημιουργείται και περιγράφεται παρακάτω συμβάλει μέσω των HIF μεταγραφικών παραγόντων στην ενεργοποίηση ενζύμων αποικοδόμησης της εξωκυττάριας μήτρας (Gilkes et al., 2014). Κατανοούμε λοιπόν ότι και σε αυτή τη διεργασία της καρκινογένεσης, ο καρκινικός φαινότυπος δεν αποκτάται μόνο από αυτόνομες των καρκινικών κυττάρων (cell autonomous) διεργασίες καθώς σημαντικότατο ρόλο παίζει και η αλληλεπίδραση με άλλους κυτταρικούς τύπους. Αυτό γίνεται ακόμα πιο κατανοητό αν περιγράψουμε περαιτέρω τα επόμενα στάδια της εξάπλωσης. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα που έχουν υποστεί EMT όταν φτάνουν στον «τελικό προορισμό» δέχονται εκ νέου νέα σήματα από τα κύτταρα της νέας τοποθεσίας και επανέρχονται κοντά στα αρχικά τους γνωρίσματα σε μία αντίστροφη διαδικασία η οποία ονομάζεται Mesenchymal-Epithelial Transition (MET), γεγονός που αποδεικνύει και ότι η διεργασία του μετασχηματισμού μπορούν να είναι αναστρέψιμες και προσωρινές ενώ ρυθμίζονται ενεργά και από το εκάστοτε κάθε φορά γειτονικό μικροπεριβάλλον. (Thiery et al., 2009)

Εξέχουσας σημασίας μόρια για την αυξημένη εξωκυτταρική πρωτεόλυση κατά τη διάρκεια των διεργασιών που μόλις περιγράφηκαν είναι οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Εκκρίνονται τόσο από μακροφάγα αλλά και από λεμφοκύτταρα και ουδετερόφιλα. Κύτταρα πέραν αυτών της φλεγμονής που τα παράγουν και τα εκκρίνουν είναι και τα δενδριτικά, τα ενδοθηλιακά, τα μαστικά, οι ινοβλάστες, τα πρόδρομα αιμοποιητικά καθώς και τα ίδια τα μετασχηματισμένα καρκινικά κύτταρα. Εκτός από τον ρόλο τους στην πρωτεόλυση της εξωκυττάριας μήτρας και την εξάπλωση, ρυθμίζουν επίσης τα σηματοδοτικά μονοπάτια της ανάπτυξης, της φλεγμονής και της αγγειογένεσης. (Kessenbrock et al., 2010)

Ωστόσο ο μετασχηματισμός μέσω EMT δεν είναι η μόνη μορφή εξάπλωσης. Ονομαστικά αναφέρονται και μορφές όπως η collective invasion κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται en masse και δεν είναι ιδιαίτερα μεταστατικοί τύποι και η αμοιβαδοειδής μορφή κατά την οποία τα καρκινικά κύτταρα μέσω αμοιβαδοειδών κινήσεων οφειλόμενες σε

κυτταροσκελετικές τους αλλαγές μπορούν να εξαπλώνονται. Ακόμα δεν είναι πλήρως κατανοητό αν αυτοί οι τρόποι είναι διακριτοί ή αν συμβαίνουν παράλληλα με το EMT.

Στην όλη διαδικασία του EMT σημαντικότατο ρόλο παίζουν και τα φλεγμονώδη κύτταρα τα οποία συναθροίζονται πολλές φορές στα όρια των όγκων και έλκονται από χημειοτακτικούς προσδέτες που εκκρίνονται από τα καρκινικά (chemoattractants) και εν συνεχεία τα ίδια εκκρίνουν σημαντικό ποσοστό των ενζύμων αποικοδόμησης της μήτρας.

Το τελικό στάδιο της επιθετικής καρκινογένεσης αφορά τη **μετάσταση**, η οποία μπορεί να περιγραφεί σε δύο στάδια: το πρώτο αφορά τη φυσική απομάκρυνση των καρκινικών κυττάρων από τον αρχικό όγκο σε απομακρυσμένους ιστούς, και το δεύτερο της προσαρμογής των μεταναστευμένων κυττάρων στο ξένο ιστικό μικροπεριβάλλον το οποίο θα οδηγήσει σε μία επιτυχή αποικία (*colonization*).

Η επιτυχής αποίκηση ωστόσο έχει χαμηλό ποσοστό επιτυχίας καθώς υπάρχουν αρκετά εμπόδια που αφορούν συστηματικούς κατασταλτικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από τον αρχικό όγκο και το “αφιλόξενο” νέο μικροπεριβάλλον που συναντούν τα μεταναστευμένα καρκινικά κύτταρα. Το πρώτο εμπόδιο καταδεικνύεται από την κλινική παρατήρηση ορισμένων καρκίνων στους οποίους όταν και μόνο αφαιρείται ο αρχικός όγκος αναπτύσσονται μεταστάσεις σε διάφορα σημεία, γεγονός που υπονοεί ότι μικρομεταστατικά σημεία προϋπήρχαν αλλά δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν εξαιτίας κατασταλτικών παραγόντων που εκκρίνονταν από τον αρχικό όγκο. Ωστόσο και στο νέο μικροπεριβάλλον υπάρχουν συνθήκες που πρέπει να καμφθούν όπως η αδυναμία να ενεργοποιηθεί η καρκινική αγγειογένεση και η έλλειψη θρεπτικών η οποία οδηγεί τα νεοεισερχόμενα καρκινικά κύτταρα σε αυτοφαγία και εν τέλει συρρίκνωση και μετατροπή σε μία κατάσταση μεταβλητής αδράνειας (*reversible dormancy*) μέχρι οι ικανοποιητικές συνθήκες να επιστρέψουν. Τέλος άλλοι μηχανισμοί που δυσκολεύουν τη μετάσταση είναι αντι-αναπτυξιακά σήματα που υπάρχουν στο φυσιολογικό εξωκυττάριο περιβάλλον της μήτρας και οι ογκο-κατασταλτικές λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Συνεπώς τα περισσότερα καρκινικά κύτταρα μετανάστες είναι δύσκολο να αναπτυχθούν στα νέα σημεία, τουλάχιστον αρχικά. Μόλις καμφθούν αυτές οι δυσκολίες τα καρκινικά κύτταρα μπορούν όχι μόνο να αποικήσουν τα νέα αυτά σημεία αλλά να αποικήσουν εκ νέου διακριτά σημεία ακόμα και να επιστρέψουν στον αρχικό όγκο. Τα τελευταία χρόνια γίνεται μεγάλη προσπάθεια ώστε να ανακαλυφθούν αυτά τα ρυθμιστικά προγράμματα που επιτρέπουν την εξάπλωση και την μετάσταση και να οριστούν τα γονίδια (μεταστατικές γονιδιακές υπογραφές) που επιτρέπουν την εφαρμογή ενός τέτοιου προγράμματος. (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που προγραμματίζουν την καρκινογένεση.**

Οι εκφάνσεις αυτές της καρκινογένεσης που περιγράφηκαν είναι αποτέλεσμα απορυθμισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών ή ακόμα καλύτερα σηματοδοτικών κυκλωμάτων. Έτσι σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα Hedgehog, Wnt, Transforming Growth factor- $\beta$ , Receptor Tyrosine Kinase,

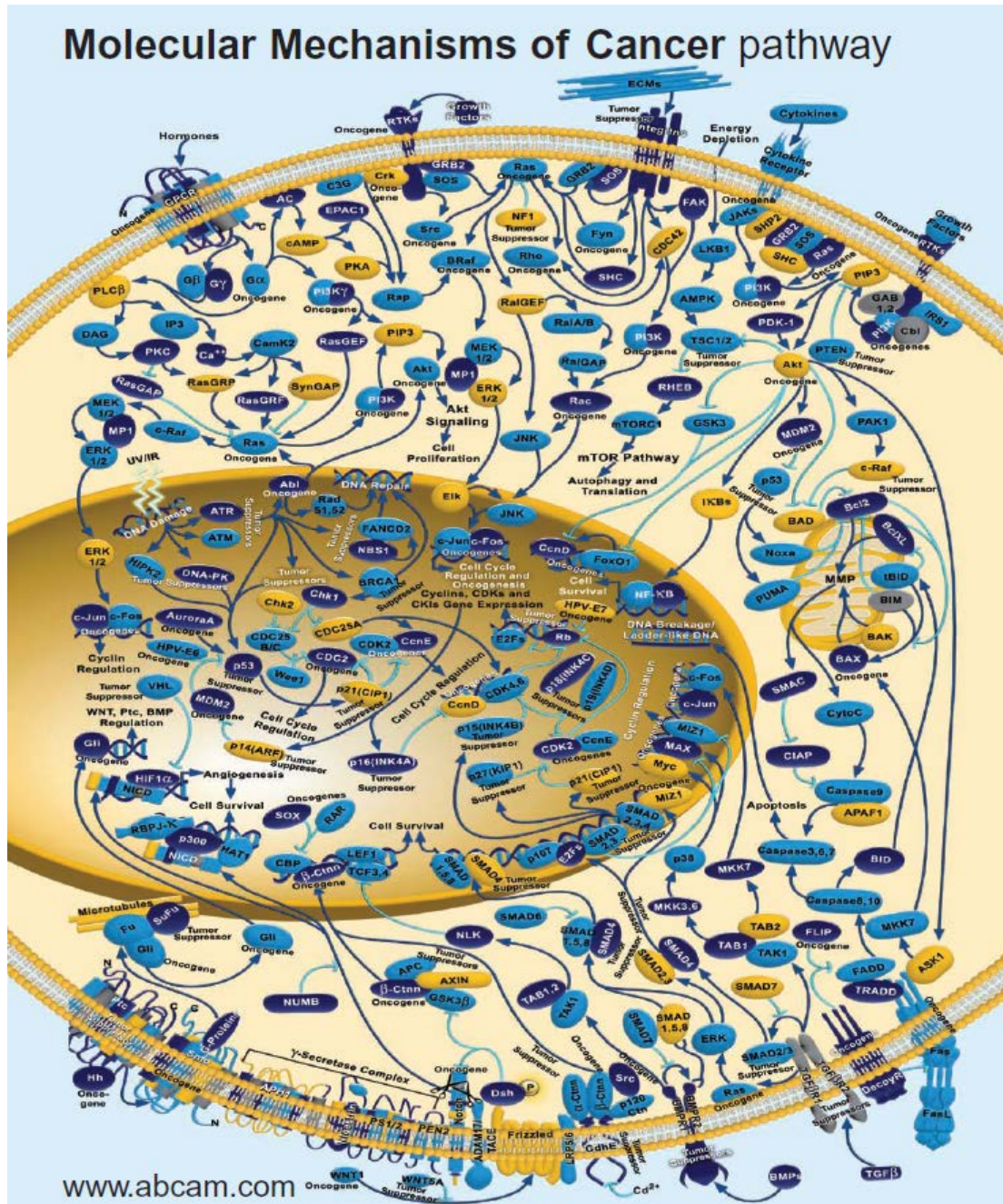


Notch, JAK/STAT, nuclear hormone και Hippo, τα οποία φυσιολογικά λειτουργούν και ενορχηστρώνουν τις κυτταρικές διεργασίες κατά την ανάπτυξη και ομοιόσταση του οργανισμού, απορρυθμίζονται στον καρκίνο. Στα αρχικά στάδια της έρευνας βάση των ανακαλύψεων υπήρχε η αντίληψη ότι τα εξωκυττάρια και παρακρινή σήματα αλλά και τα αυτοκρινή σήματα μεταβιβάζονται στο εσωτερικό του κυττάρου και εν τέλει στον πυρήνα για να εφαρμοστεί το εκάστοτε γονιδιακό πρόγραμμα μέσω μονόδρομων σηματοδοτικών καταρρακτών. Ωστόσο η περαιτέρω διαλεύκανση τους και στοιχεία όπως η διασύνδεση πολλών μονοπατιών σε πολλά επίπεδα (crosstalk) αλλά και οι αλληλεπικαλυπτόμενες τελικές κοινές λειτουργίες πολλών μονοπατιών αναθεωρούν την αντίληψη της έννοιας του μονοπατιού η οποία αντικαθίσταται από του κυκλώματος. Για παράδειγμα η σηματοδοτική ενεργοποίηση συγκεκριμένων ογκογονιδίων όπως του μεταλλαγμένου RAS και του υπερεκφρασμένου MYC μπορεί να έχει αντίκτυπο σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως πολλαπλασιασμό, ενεργειακό μεταβολισμό, αγγειογένεση, εξάπλωση και επιβίωση. (Hanahan and Weinberg, 2011)

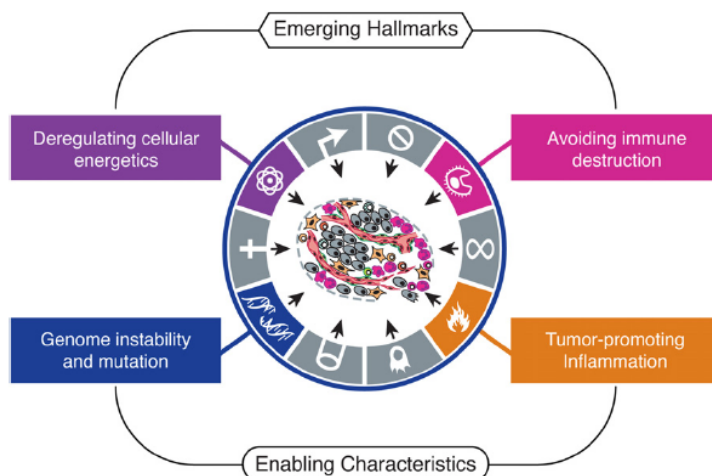
Οι κατηγορίες και η πολυπλοκότητα των σηματοδοτικών μονοπατιών καθώς και η μεταξύ τους επικοινωνία και αλληλοεπικάλυψη ως προς την τελική κοινή λειτουργία μπορεί να κατανοηθεί με την παρακάτω εικόνα 6.

### **Περαιτέρω χαρακτηριστικά γνωρίσματα της καρκινογένεσης**

Την τελευταία δεκαετία διαφαίνεται ο ρόλος δύο ακόμα χαρακτηριστικών του καρκίνου που επιτρέπουν την ανάπτυξη των προαναφερθέντων γνωρισμάτων. Τα ενεργοποιητικά αυτά χαρακτηριστικά αφορούν την γενετική αστάθεια (*genomic instability*) των καρκινικών κυττάρων η οποία αφορά τυχαίες γενετικές μεταλλαγές συμπεριλαμβανομένων και των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και τον *ενεργοποιητικό ρόλο της φλεγμονής* που αφορά την στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού σε προκαρκινικές και καρκινικές αλλοιώσεις τα οποία προάγουν την καρκινογένεση με πολλούς τρόπους. Περαιτέρω δύο αναδυόμενα χαρακτηριστικά της καρκινογένεσης είναι ο *αναπρογραμματισμός του κυτταρικού ενεργειακού μεταβολισμού* και η *αποφυγή της επίθεσης από το ανοσοποιητικό*. Το πρώτο χαρακτηριστικό στηρίζει τη συνεχόμενη κυτταρική αύξηση και πολλαπλασιασμό αντικαθιστώντας το φυσιολογικό μεταβολικό πρόγραμμα. Το δεύτερο χαρακτηριστικό αφορά την ενεργή αποφυγή των καρκινικών κυττάρων από την επίθεση των ανοσοποιητικών κυττάρων. Ο τελευταίος ρόλος του ανοσοποιητικού, λαμβάνοντας υπόψη και τον ενεργοποιητικό ρόλο που προαναφέρθηκε, τονίζει τον διπρόσωπο ρόλο του ανοσοποιητικού στην καρκινογένεση το οποίος άλλοτε ανταγωνίζεται και άλλοτε προωθεί την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου. (Εικόνα 7) (Hanahan and Weinberg, 2011)



Εικόνα 6 . Από <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11069>



Εικόνα 7 από (Hanahan and Weinberg, 2011)

### Ο διπρόσωπος ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην καρκινογένεση.

Την τελευταία δεκαετία έχει γίνει κατανοητό πως η σχετιζόμενη με τον καρκίνο φλεγμονώδη απόκριση έχει ένα παράδοξο αποτέλεσμα καθώς ενισχύει τον σχηματισμό αλλά και την πρόοδο του καρκίνου. Όλο και περισσότερο γίνεται κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο κύτταρα του ανοσοποιητικού - κυρίως της έμφυτης ανοσίας - ενισχύουν την καρκινογένεση, όπως μέσω της παροχής βιοενεργών μορίων στο καρκινικό μικροπεριβάλλον, συμπεριλαμβανομένων αυξητικών παραγόντων, παραγόντων επιβίωσης, προαγγειογόνων παραγόντων και εξωκυτταρικών ενζύμων τροποποίησης του εξωκυττάρου χώρου (extracellular matrix modifying enzymes) τα οποία διευκολύνουν την αγγειογένεση, την εξάπλωση και τη μετάσταση και περιλαμβάνουν σήματα που ενεργοποιούν την Επιθηλιακή σε Μεσεγχυματική Μετάβαση (EMT). Τέλος η συνεισφορά της φλεγμονής στην καρκινογένεση εκδηλώνεται και με την απελευθέρωση χημικών, κυρίως βιοενεργών μορίων οξυγόνου, τα οποία είναι μεταλλαξογόνα για τα γειτονικά καρκινικά κύτταρα και επιταχύνουν έτσι τη γενετική τους εξέλιξη προς καταστάσεις αυξημένης κακοήθειας. (Elinav et al., 2013)

Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος στην καρκινογένεση περιπλέκεται (λαμβάνοντας υπόψη τον ενεργοποιητικό ρόλο που αναφέρθηκε παραπάνω) από την υπόθεση της ανοσολογικής επίβλεψης που επικρατεί σύμφωνα με την οποία τα κύτταρα και οι ιστοί ελέγχονται διαρκώς από το ανοσοποιητικό, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση και τον τερματισμό της πλειοψηφίας των ανερχόμενων καρκινικών κυττάρων. Ο κατασταλτικός αυτός ρόλος του ανοσοποιητικού διαφαίνεται από την μεγάλη αύξηση που παρατηρείται σε συγκεκριμένους καρκίνους σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς. Ένα κομμάτι αυτών εξηγείται εύκολα καθώς ορισμένοι από αυτούς τους καρκίνους επάγονται από ιούς. Ωστόσο περαιτέρω δεδομένα από κλινική επιδημιολογία και από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια δείχνει ότι το ανοσοποιητικό σύστημα λειτουργεί ως ένα σημαντικό εμπόδιο στο σχηματισμό και την ανάπτυξη του καρκίνου και σε μορφές μη επαγόμενες

από ιούς. Έτσι όταν γενετικά τροποποιημένα ποντίκια με ελαττώματα σε συστατικά του ανοσοποιητικού υποβλήθηκαν σε χημειοεπαγόμενη καρκινογένεση παρατηρήθηκε ότι οι καρκίνοι αναπτύσσονταν πολλοί πιο γρήγορα στα ανοσοκατεσταλμένα αυτά ποντίκια σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Τα ανοσοποιητικά κύτταρα των οποίων ελαττώματα στην ανάπτυξη ή λειτουργία φέρουν τέτοιους φαινοτύπους αφορούν κυτταροτοξικά  $CD8^+$  λεμφοκύτταρα (CTLs),  $CD4^+$  Th1 βοηθητικά κύτταρα και κύτταρα φυσικούς φονοίς (natural killer cells - NK). Περαιτέρω σε πειράματα μεταμοσχεύσεων παρατηρήθηκε ότι καρκινικά κύτταρα τα οποία προήλθαν από ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια δεν μπόρεσαν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν σε φυσιολογικούς δέκτες. Περαιτέρω δεδομένα από κλινική επιδημιολογία υποστηρίζουν την ύπαρξη ανοσολογικής αντικαρκινικής απάντησης. Ασθενείς με καρκίνο του παχέους και καρκίνο των ωοθηκών που έχουν υψηλή στρατολόγηση/διείσδυση λεμφοκυττάρων έχουν καλύτερη πρόγνωση από αντίστοιχους με χαμηλή διείσδυση. Περαιτέρω, ανοσοκατεσταλμένοι δέκτες έχει παρατηρηθεί να αναπτύσσουν καρκίνους προερχόμενους από τα όργανα των δοτών, υποδηλώνοντας ότι στον δότη τα καρκινικά κύτταρα παρέμεναν σε μία αδρανή κατάσταση λόγω της δράσης της επιτήρησης του ανοσοποιητικού. Ως προς τον μηχανισμό με τον οποίο τα καρκινικά αδρανοποιούν το ανοσοποιητικό έχει βρεθεί ότι τα καρκινικά μπορούν να παραλύουν τα διεισδύοντα CTLs και NKs μέσω έκκρισης TGF- $\beta$  ή άλλων ανοσοκατασταλτικών παραγόντων. Εναλλακτικός μηχανισμός είναι η στρατολόγηση ανοσοποιητικών κυττάρων τα οποία είναι ενεργώς ανοσοκατασταλτικά όπως ρυθμιστικά T λεμφοκύτταρα (Tregs) και μυελοειδή κατασταλτικά κύτταρα. (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Η γενωμική αστάθεια και οι μεταλλαγές προσφέρουν στα καρκινικά κύτταρα πλεονεκτήματα.**

Η απόκτηση των παραπάνω γνωρισμάτων των καρκίνων στηρίζεται κατά μεγάλο ποσοστό στη σταδιακή αλλοίωση των γονιδιωμάτων των καρκινικών κυττάρων. Ένα μικρό ποσοστό των μεταλλαγμένων γονιδιωμάτων προσφέρει επιλεκτικό πλεονέκτημα στους συγκεκριμένους κλώνους επιτρέποντας την υπέρμετρη ανάπτυξη και τελική επικράτηση στο τοπικό μικροπεριβάλλον. Έτσι η πολλών βημάτων ανάπτυξη των καρκίνων αφορά μία διαδοχική επέκταση κλώνων (clonal expansion), κάθε μία από τις οποίες πυροδοτείται από την τυχαία απόκτηση ενός ενεργοποιητικού μεταλλαγμένου γονότυπου. Επειδή κληρονομήσιμοι φαινότυποι μπορούν να αποκτηθούν και μέσω επιγενετικών μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση του DNA και η τροποποιήσεις ιστονών, πολλές επεκτάσεις τέτοιων μετασχηματισμένων κλώνων μπορούν να πυροδοτηθούν εξίσου καλά από μη μεταλλάξιμες αλλαγές οι οποίες επηρεάζουν τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Τα συστήματα συντήρησης-διατήρησης του γονιδιώματος (genome maintenance systems) αναγνωρίζουν και επιδιορθώνουν ελαττώματα στο DNA και έτσι ο ρυθμός αυθόρμητων μεταλλαγών σε κάθε κυτταρική γενιά διατηρείται σε φυσιολογικά πολύ χαμηλά επίπεδα. Ωστόσο τα καρκινικά κύτταρα, προκειμένου να αποκτήσουν τις μεταλλαγές αυτές που ενορχηστρώνουν την καρκινογένεση, αυξάνουν το ρυθμό

των μεταλλαγών. Αυτό συμβαίνει είτε λόγω ελαττωμάτων σε ένα από τα συστατικά της μηχανής συντήρησης του γονιδιώματος είτε μέσω δυσλειτουργίας του συστήματος το οποίο επιβλέπει την ακεραιότητα του γονιδιώματος και καθοδηγεί εν συνεχεία τα γενετικά ελαττωματικά κύτταρα είτε στην κυτταρική γήρανση είτε στην απόπτωση. Εξέχουσα σημασία στην τελευταία αυτή λειτουργία έχει η πρωτεΐνη TP53 η οποία θεωρείται και ως ο «φύλακας άγγελος του γονιδιώματος». Συστατικά της μηχανής συντήρησης του DNA συχνά αποκαλούνται «φύλακες» του γονιδιώματος και τα γονίδια τέτοιων πρωτεϊνών εμπλέκονται στην ανίχνευση της ζημιάς, την επιδιόρθωση και την απενεργοποίηση των μεταλλαξογόνων μορίων. Από γενετικής πλευράς τα γονίδια αυτά λογίζονται ως **ογκοκατασταλτικά (tumor suppressor)** καθώς η λειτουργία τους διακόπτεται κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, είτε μέσω απενεργοποιητικών μεταλλαγών είτε μέσω επιγενετικής καταστολής. Ως συστατικό συντήρησης του γονιδιώματος μπορεί να λογιστεί και η τελομεράση καθώς η λειτουργία της αποτρέπει την καριοτυπική αστάθεια και την σχετιζόμενη πρόσθεση και αφαίρεση χρωσωμικών κομματιών. Τα ελαττώματα στην γονιδιωματική επίβλεψη και επιδιόρθωση προσδίδουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα στην καρκινογένεση καθώς επιταχύνουν το ρυθμό με τον οποίο τα αναπτυσσόμενα προκαρκινικά κύτταρα μπορούν να συσσωρεύουν ευνοϊκά γονιδιώματα. (Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Τα καρκινικά κύτταρα αναπροσαρμόζουν τον ενεργειακό τους μεταβολισμό.**

Προκειμένου να μπορέσουν να διατηρήσουν τον ενεργοβόρο συνεχή κυτταρικό πολλαπλασιασμό τα καρκινικά κύτταρα έχουν ρυθμίσει ανάλογα τον ενεργειακό τους μεταβολισμό. Υπό αερόβιες συνθήκες τα φυσιολογικά κύτταρα μεταβολίζουν γλυκόζη, πρώτον σε πυροφοσφορικό (pyruvate) μέσω γλυκόλυσης στο κυτταρόπλασμα και περαιτέρω σε διοξείδιο του άνθρακα στα μιτοχόνδρια. Υπό αναερόβιες συνθήκες, η γλυκόλυση ευνοείται και σχετικά λίγο πυροφοσφορικό αποστέλλεται στα μιτοχόνδρια τα οποία καταναλώνουν οξυγόνο. Στα καρκινικά δε κύτταρα, ακόμα και υπό την παρουσία οξυγόνου, ο μεταβολισμός αναπρογραμματίζεται και περιορίζουν τον ενεργειακό μεταβολισμό κυρίως στην γλυκόλυση, οδηγώντας σε μία κατάσταση η οποία ονομάζεται «αερόβια γλυκόλυση». Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **Warburg effect**. Δεδομένου ωστόσο της μικρότερης ενεργειακής ATP απόδοσης της γλυκόλυσης εν συγκρίσει της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, τα καρκινικά κύτταρα ανακάμπτουν αυτή τη «χασούρα» υπερεκφράζοντας μεταφορείς γλυκόζης, και συγκεκριμένα τον GLUT1. Περαιτέρω η εξάρτηση από τη γλυκόλυση μεγαλώνει περαιτέρω από τις υποξικές συνθήκες οι οποίες επικρατούν σε πολλούς καρκίνους. Το σύστημα υποξίας δρα εν συνεχεία πλειοτροπικά στο να υπερεκφράσει μεταφορείς γλυκόζης και ένζυμα του μονοπατιού γλυκόλυσης ενώ στην ίδια κατεύθυνση δρουν και πολλά ενεργοποιημένα ογκογονίδια (RAS, MYC). Τα ογκογονίδια και η υποξία μπορούν ανεξάρτητα να αυξήσουν τα επίπεδα των HIF1a και HIF2a μεταγραφικών παραγόντων, η οποίοι εν συνεχεία αυξάνουν τη γλυκόλυση. Ένα περαιτέρω στοιχείο το οποίο αντικρούει τον χαρακτηρισμό αντιφατικό για το

μεταβολικό πρόγραμμα των καρκινικών κυττάρων είναι το γεγονός ότι η αυξημένη γλυκόλυση επιτρέπει την «εκτροπή» γλυκολυτικών ενδιάμεσων σε πολλά βιοσυνθετικά μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένων αυτών που δημιουργούν νουκλεοτίδια και αμινοξέα, καλύπτοντας έτσι τις αυξημένες ανάγκες για βιοσύνθεση μακρομορίων και οργανιδίων στα νεοσχηματισμένα κύτταρα. Ανάλογο Warburg-like μεταβολικό πρόγραμμα έχει παρατηρηθεί και σε εμβρυονικούς ιστούς. (Cairns et al., 2011; Hanahan and Weinberg, 2011)

### **Το καρκινικό μικροπεριβάλλον (Tumor microenvironment) και τα πολυδύναμα καρκινικά κύτταρα (Cancer Stem Cells).**

Όπως έχει περιγραφεί και ανωτέρω, την τελευταία δεκαετία έχει αρχίσει να γίνεται κατανοητός και ο ρόλος των γειτονικών των καρκινικών κυττάρων. Οι καρκίνοι δεν είναι απλά μία μάζα ομοίων κυττάρων οι ιδιότητες των οποίων καθορίζονται από κύτταρο-αυτόνομους μηχανισμούς των κυττάρων της μάζας καθώς χωροχρονικά με τον μετασχηματισμό τους, διαμορφώνουν ένα καρκινικό μικροπεριβάλλον το οποίο περιλαμβάνει διάφορους κυτταρικούς πληθυσμούς και συμμετέχει ενεργά και αυτό στην πολύπλοκη διαδικασία. Οι περισσότερες από τις παρατηρήσεις αυτές προέρχονται από μελέτες καρκινωμάτων, στα οποία τα νεοπλασματικά επιθηλιακά κύτταρα αποτελούν ένα «διαμέρισμα», το παρέγχυμα το οποίο είναι ξεκάθαρα διακριτό από τα μεσενχυματικά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν το γύρω καρκινο-σχηματιζόμενο στρώμα.

Παραδοσιακά για πολλά χρόνια, τα καρκινικά κύτταρα ενός όγκου θεωρούνταν σαν ένας σχετικά ομοιογενής πληθυσμός ο οποίος μόνο σχετικά αργά κατά τη διάρκεια της εξέλιξής του, όταν ο υπερπολλαπλασιασμός συνδυαζόταν με την αυξημένη γενωμική αστάθεια δημιουργούσε διακριτούς υποπληθυσμούς κλώνους (clonal subpopulation). Η προερχόμενη από τους κλώνους αυτούς ετερογένεια αποτυπωνόταν και ιστοπαθολογικά, με περιοχές να διαφέρουν ως προς την διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό, την αγγειογένεση, την φλεγμονή και την επεκτατικότητα. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια διαφαίνεται ότι η ετερογένεια αυτή του όγκου οφείλεται σε μία υποκλάση καρκινικών κυττάρων, τα καρκινικά εμβρυονικά κύτταρα (Cancer Stem Cells – CSCs).

Αν και η άμεση απόδειξη και χαρακτηρισμός τους είναι ακόμα δύσκολος, αναπτύσσεται ταχέως η θεωρεία ύπαρξής τους ως κοινή πηγή προέλευσης των περισσότερων αν όχι όλων των όγκων. Τα καρκινικά εμβρυονικά κύτταρα ορίζονται λειτουργικά από την ικανότητά τους να αναπτύσσουν αποτελεσματικά νέους καρκίνους μετά από εμβολιασμό σε δέκτες ποντίκια. Πολλές φορές ο λειτουργικός τους ορισμός τους συμπληρώνεται από κάποιες πρωτεΐνες μάρτυρες (markers) (ή ακόμα και από συγκεκριμένα μεταγραφικά προφίλ – γονιδιακές ταυτότητες), οι οποίοι ωστόσο εκφράζονται και στα φυσιολογικά εμβρυονικά κύτταρα του ιστού προέλευσης.

Η προέλευση των CSCs σε έναν συμπαγή όγκο δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως και μάλιστα μπορεί να διαφέρει σε κάθε κατηγορία όγκου. Σε μερικούς όγκους τα φυσιολογικά ιστικά εμβρυονικά κύτταρα μπορούν να είναι τα αρχικά κύτταρα τα οποία θα υποστούν ογκογόνο μετασχηματισμό και θα



οδηγήσουν σε CSCs. Σε άλλους όγκους, μερικώς διαφοροποιημένα (transit amplifying cells), πρόδρομα κύτταρα (progenitor), είναι αυτά που υπόκεινται στον αρχικό ογκογόνο μετασχηματισμό και αποκτούν έναν εντονότερο εμβρυονικού τύπου χαρακτήρα.

Τελευταία έχει αρχίσει επίσης να διαφαίνεται και η αλληλοσύνδεση της απόκτησης χαρακτηριστικών CSCs με το EMT διαφοροποίησης πρόγραμμα. Η επαγωγή ενός τέτοιου προγράμματος σε διάφορα συστήματα μοντέλα μπορεί να ενεργοποιήσει πολλά από τα χαρακτηριστικά τα οποία περιγράφουν ένα εμβρυονικό κύτταρο, όπως η αυτόνομη αναπαραγωγή (self-renewal) και αντιγονικούς φαινοτύπους οι οποίοι συσχετίζονται με φυσιολογικά και καρκινικά εμβρυονικά κύτταρα. Αυτή η συμφωνία υποδηλώνει ότι το EMT πρόγραμμα στο οποίο υπόκεινται τα καρκινικά κύτταρα όχι μόνο τους δίνει τη δυνατότητα να αποκολλώνται από τον αρχικό όγκο και να εξαπλώνονται αλλά επίσης τους προσδίδει και την ικανότητα για αυτόνομη αναπαραγωγή (self-renewal) που είναι απαραίτητη για την περαιτέρω κλωνική επέκτασή τους (clonal expansion) στα σημεία εξάπλωσής τους. Έτσι λοιπόν μπορεί να ισχύει η υπόθεση ότι τα ετερότυπα σήματα τα οποία πυροδοτούν το EMT μπορεί να είναι επίσης σημαντικά στο να δημιουργούν και να συντηρούν τα CSCs.

Αυτή η νέα διάσταση που δίνεται με την περιγραφή των παραπάνω γνωρισμάτων του καρκίνου δίνει ακόμα περισσότερο έμφαση στο θέμα της ετερογένειας του καρκίνου και αφήνει υπαινιγμούς για αποτελεσματικές θεραπείες. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι τα κύτταρα με χαρακτηριστικά CSCs είναι τα πλέον ανθεκτικά στα ευρέως χρησιμοποιούμενα χημειοθεραπευτικά η οποία εξηγεί και την (αναπόφευκτη) επανεμφάνιση του καρκίνου σε δεύτερο ύστερο χρόνο μετά την επιτυχή αφαίρεσή του αρχικού συμπαγή όγκου με χημειοθεραπεία ή ακτινοβολία. Έτσι φαίνεται ότι τα χαρακτηριστικά των CSCs τα καθιστούν διπλή απειλή καθώς και είναι τα πλέον ανθεκτικά και συγχρόνως επαναγεννούν τον καρκίνο μόλις αυτός φαινομενικά είχε αρχικά καταπολεμηθεί. Τέλος αυτή η φαινοτυπική πλαστικότητα έχει επίσης σημαντικό ρόλο και στη δημιουργία του κατάλληλου καρκινικού μικροπεριβάλλοντος από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Μέσω της πλαστικότητας τα CSCs μπορούν να δημιουργήσουν πολλούς διακριτούς υποπληθυσμούς, οι οποίοι συνεισφέρουν στην πολύπλοκη αυτή διαδικασία. Έτσι για παράδειγμα μέσω EMT τα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα μπορούν να γίνουν μεσεγχυματικά ινοβλαστικού τύπου καρκινικά κύτταρα. Συνεπώς η πλαστικότητα αυτή απαλλάσσει τα κύτταρα από την εξάρτηση στρατολόγησης άλλων πληθυσμών.

Περιγράφοντας το καρκινικό μικροπεριβάλλον και το στρώμα αναφέρουμε ακόμα πληθυσμούς όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα περικύτταρα, φλεγμονώδη κύτταρα του ανοσοποιητικού, καρκινοεξαρτώμενους ινοβλάστες. Τα ενδοθηλιακά αποτελούν τον κύριο πληθυσμό των νεοσχηματιζόμενων τριχοειδών αγγείων, και λαμβάνοντας υπόψη την έξαρση αγγειογένεσης που συμβαίνει κατά την καρκινογένεση, προσδέτες όπως VEGF, angiopoietin και FGF οδηγούν τα αδρανή ενδοθηλιακά κύτταρα σε πολλαπλασιασμό για την κατασκευή νέων αρτηριών και φλεβών, ενώ κατά ανάλογο τρόπο δημιουργούνται και τα τριχοειδή του λεμφικού συστήματος. Στη δημιουργία τριχοειδών σημαντικό ρόλο παίζουν και τα περικύτταρα (pericytes) τα οποία αποτελούν

ένα τύπο μεσεγχυματικών κυττάρων που τυλίγονται γύρω από τα ενδοθηλιακά και στηρίζουν τα ενδοθηλιακά τόσο δομικά όσο και παρακρινώς με προσδέτες όπως Ang-1 και VEGF.

Τα φλεγμονώδη κύτταρα όπως περιγράφηκε συμμετέχουν σε δύο αντιφατικούς δρόμους. Υπάρχουν τόσο τα ανταγωνιζόμενα του καρκίνου λευκοκύτταρα, όσο και τα καρκινο-«προωθούμενα» λευκοκύτταρα. Έτσι από τη μία υπάρχουν τα καρκινοανταγωνιζόμενα CTLs και NK κύτταρα, και από την άλλη λευκοκύτταρα τα οποία ενισχύουν την διαδικασία της καρκινογένεσης. Σημαντικό γεγονός σε αυτό τον προωθητικό μηχανισμό είναι η φύση και η διάρκεια παραμονής των κυττάρων αυτών σε προκαρκινικές περιοχές καθώς η χρόνια φλεγμονή είναι αυτή που υποβοηθά καταρχήν παθήσεις όπως ίνωση, παρεκκλίνουσα αγγειογένεση και καρκινογένεση. Τα καρκινοπροωθούμενα φλεγμονώδη είναι συχνά τύποι μακροφάγων, μαστικά κύτταρα, ουδετερόφιλα καθώς και T και B λεμφοκύτταρα. Τα σηματοδοτικά μόρια τα οποία εκκρίνονται από το παραπάνω ρεπερτόριο αφορούν τον καρκινικό αυξητικό παράγοντα EGF, τον αγγειογόνο VEGF και FGF2, χημειοκίνες και κυτταροκίνες οι οποίες ενισχύουν περαιτέρω τη φλεγμονώδη αντίδραση, προ-αγγειογόνοι και/ή ένζυμα αποδόμησης της εξωκυττάρια μήτρας (MMPs) όπως η MMP9 και άλλες μεταλλοπρωτεϊνάσες, πρωτεάσες κυστεΐνης-καθεψίνης καθώς και ηπαρινάση (heparanase) που προωθούν την επέκταση. Τέλος το ρεπερτόριο των κυττάρων του ανοσοποιητικού αφορά και κύτταρα μερικώς διαφοροποιημένα όπως τα πρόδρομα μυελοειδή κύτταρα (myeloid progenitors) τα οποία και αυτά έχουν καρκινοπροωθητική δράση, με αξιοσημείωτη περίπτωση τα καρκινο-εισχωρόντα μυελοειδή κύτταρα τα οποία εκφράζουν τους μάρτυρες CD11b και Gr1, και η δράση τους καταστέλλει αυτή των καρκινο ανταγωνιστικών CTLs και NK.

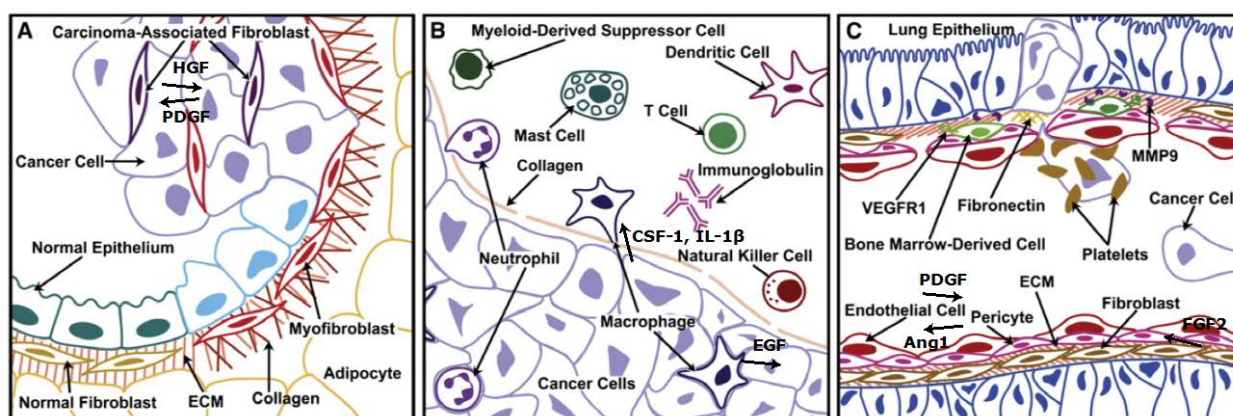
Τέλος τα πλέον πολυπληθή κύτταρα στο περίξ καρκινικό στρώμα είναι οι ινοβλάστες. Ο όρος καρκινο-εξαρτώμενοι ινοβλάστες (cancer-associated fibroblasts - CAFs) αφορά δύο πληθυσμούς : 1) κύτταρα με πολλές ομοιότητες με τους ινοβλάστες που δημιουργούν το στρώμα το οποίο υποστηρίζει τα επιθηλιακά και 2) του μυοινοβλάστες (myofibroblasts) με διακριτές βιολογικές ιδιότητες. Τα τελευταία χαρακτηρίζονται από την έκφραση του SMA αντιγόνου, είναι σπάνια σε φυσιολογικούς επιθηλιακούς ιστούς, αν και μερικοί ιστοί όπως το ήπαρ και το πάγκρεας διαθέτουν ένα μικρό ποσοστό. Αν και είναι ευεργετικοί στην επιδιόρθωση του ιστού σε καταστάσεις όπως τραύματα, είναι προβληματικοί σε περιοχές χρόνιας φλεγμονής όπου συνεισφέρουν σε παθολογική ίνωση σε ιστούς όπως το ήπαρ, ο πνεύμονας και τα νεφρά, ενισχύοντας τον καρκινικό φαινότυπο. (Sirica, 2012)

Τέλος ο μυελός των οστών αποτελεί μία συνεχή πηγή καρκινο-σχετιζόμενων στρωματικών (stromal) κυττάρων. Μεσεγχυματικά κύτταρα και πρόδρομα κύτταρα έχει βρεθεί να μεταναστεύουν από τον μυελό στον καρκίνο, όπου μπορεί είτε να διαφοροποιούνται σε καλά χαρακτηρισμένους στρωματικούς κυτταρικούς τύπους, ή να παραμένουν σε μία πιο αδιαφοροποίητη κατάσταση. Πέρα ωστόσο από το μυελό των οστών στρωματικά κύτταρα μπορεί να προέρχονται και από πιο προφανείς θέσεις όπως πολλαπλασιασμό των προ-υπαρχόντων στρωματικών κυττάρων ή από διαφοροποίηση



των τοπικών εμβρυονικών/προδρομικών κυττάρων τα οποία προέρχονται από τους γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς.

Ετερότυπες σηματοδοτήσεις ενορχηστρώνουν κύτταρα του καρκινικού μικροπεριβάλλοντος. Εκτός από τα πολύπλοκα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται στα καρκινικά κύτταρα, εξίσου πολύπλοκες και δαιδαλώδεις είναι και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των κυττάρων του στρώματος. Είναι πολύ δύσκολο να περιγραφούν και να απεικονιστούν οι σχέσεις αυτές. Μία προσπάθεια απεικόνισης γίνεται στην εικόνα 8 (τροποποιημένο από (Egeblad et al., 2010)). Το κύριο χαρακτηριστικό αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι ότι είναι δυναμικές ως προς το χώρο και το χρόνο και αλληλένδετες. Τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν μόρια προς τα κύτταρα του στρώματος και εκείνα με τη σειρά τους νέα μόρια προσδέτες παρακρινώς τα οποία προάγουν τον περαιτέρω μετασχηματισμό των καρκινικών κυττάρων. Τα τελευταία όντας μετασχηματισμένα από την χρονικά και χωρικά προηγούμενη υπόστασή τους μπορεί να παράγουν και να εκκρίνουν νέο ρεπερτόριο χημειοτακτικών προσδετών προς τα ίδια ή διαφορετικά κύτταρα του μικροπεριβάλλοντός τους, όπως κύτταρα του στρώματος ή του ανοσοποιητικού. Η διαδικασία είναι διηλεκτικής και αμοιβαία και εξελίσσει το μετασχηματισμό, τη διεισδυτικότητα και φυσικά την ετερογένεια των καρκίνων. Ανάλογες ετερότυπες αλληλεπιδράσεις βοηθούν τα καρκινικά κύτταρα και τα CSCs μετανάστες στο να εγκαθιδρυθούν και να αποικίσουν το νέο τους μικροπεριβάλλον κατά την μετάσταση. (Egeblad et al., 2010; Hanahan and Weinberg, 2011)



Εικόνα 8. τροποποιημένο από (Egeblad et al., 2010)

## Καρκινογένεση Ήπατος

Ο καρκίνος του ήπατος αφορά πολλούς τύπους, όμως ένας, το **ηπατοκαρκίνωμα (Hepatocellular Carcinoma-HCC)** είναι με διαφορά ο πιο κοινός τύπος παγκοσμίως και αφορά το 78%. Το ηπατοκαρκίνωμα ονομάζεται από τα ομώνυμα κύτταρα τα οποία τον αναπτύσσουν, τα ηπατοκύτταρα. Ένας δεύτερος τύπος καρκίνου του ήπατος που αφορά ένα 15% περίπου των περιπτώσεων αφορά τον καρκίνο των χοληφόρων αγωγών του συκωτιού (bile-duct cancer) ή αλλιώς χολανγκιοκαρκίνωμα (cholangiocarcinoma). Τέλος ένα εναπομείναν 7% περίπου αφορά ηπατοβλαστώματα (hepatoblastoma) και διάφορα σαρκώματα και καρκινώματα του συκωτιού που σχετίζονται κυρίως με παιδικούς ηπατικούς καρκίνους.

Το ηπατοκαρκίνωμα είναι μία ασθένεια με γρήγορη εκδήλωση και βαριά συμπτώματα. Αν και οι δείκτες επιβίωσης μεταξύ χωρών διαφέρουν, στο Ηνωμένο Βασίλειο ενδεικτικά μόλις το 20% των ανθρώπων επιζούν ένα χρόνο μετά τη διάγνωση κατατάσσοντάς τον 2<sup>ο</sup> σε σειρά θνησιμότητας μετά από αυτόν του πνεύμονα. Είναι ο 6<sup>ος</sup> σε σειρά πιο κοινός καρκίνος παγκοσμίως με περίπου 800,000 ασθενείς να καταγράφονται το έτος 2012. (Laurson, 2014)

### Αιτιολογίες

Πολλές αιτιολογίες έχουν συσχετιστεί με το ηπατοκαρκίνωμα (HCC) με τις πλέον συχνές να είναι η χρόνια ιϊκή μόλυνση από ηπατίτιδα Β (HBV) και C (HBC), χρόνια κατανάλωση αλκοόλ και η κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με αφλατοξίνη Β1 (aflatoxinB1). Σχεδόν όλες οι καταστάσεις που περιλαμβάνουν κίρρωση μπορούν να προκαλέσουν ηπατοκαρκίνωμα.

Η επαγόμενη από τον HBV ηπατοκαρκινογένεση μπορεί να περιλαμβάνει μία αλληλουχία διεργασιών που περιλαμβάνουν αλληλεπίδραση του οργάνου δέκτη με τον ιό, παρατεταμένους επαναληπτικούς κύκλους νέκρωσης-φλεγμονής (λόγω στρατολόγησης T λεμφοκυττάρων για την εξουδετέρωση του ιού) και αναγέννησης που ενεργοποιούν και πολλαπλασιάζουν γενωμικά σφάλματα οδηγώντας το μετασχηματισμό των κυττάρων. Αλληλεπιδράσεις του ιού με το ενδοπλασματικό δίκτυο έχουν ως αποτέλεσμα εκτεταμένο οξειδωτικό στρες με συνέπεια μεταλλαγές και γενετική αστάθεια, ενώ επιπλέον η αλληλεπίδραση του ιού με το γονιδίωμα του δέκτη έχει ως αποτέλεσμα τόσο μικροελλείψεις DNA (microdeletions) οι οποίες στοχεύουν καρκινοεξαρτώμενα γονίδια όπως TERT, PDGFRβ και MAPK1 όσο και την στοχευμένη ενεργοποίηση ογκογόνων μονοπατιών από διάφορες ιϊκές πρωτεΐνες όπως ενεργοποίηση των γονιδίων SRC, Ras, Raf, MAPK, ERK και JNK. Όμοιες βιολογικές διεργασίες προκαλεί και η μόλυνση από τον HCV με την διαφορά ότι η μόλυνση αυτή σχετίζεται επιπλέον με τη ροπή του ιού να αποφεύγει την ανοσολογική απόκριση του δέκτη και να προκαλεί εν τέλει κίρρωση μετά από αλληπάλληλους κύκλους κυτταρικού θανάτου-φλεγμονής και αναγέννησης.

Η επαγόμενη από το αλκοόλ ηπατοκαρκινογένεση σχετίζεται επίσης με την επαγωγή φλεγμονής και συνεπώς κύκλους νέκρωσης ηπατοκυττάρων και αναγέννησης, οξειδωτικό στρες και κίρρωση.

Η επαγόμενη από την αφλατοξίνη ηπατοκαρκινογένεση στερείται (τουλάχιστον εκτεταμένης) αντίδρασης φλεγμονής και προκαλείται από καρκινογενείς μεταλλάξεις σε γονίδια όπως το TP53 και το HRAS.

Όσον αφορά τις γενετικές αιτιολογίες, πολλά γενετικά γεγονότα έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη του καρκίνου αυτού, όπως η απενεργοποίηση του ογκοκατασταλτικού *TP53* η οποία συμβάλλει τόσο στην έναρξη όσο και την εξέλιξη του ηπατοκαρκινώματος, υπερέκφραση και μεταλλάξεις στην  $\beta$ -κατενίνη ( *$\beta$ -catenin*), υπερέκφραση διαφόρων υποδοχέων της οικογένειας *ErbB* με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης και υπερέκφραση υποδοχέων *MET*. Επιπλέον διάφορα καρκινοεξαρτώμενα γονίδια φαίνεται να στοχεύονται σε επιγενετικό επίπεδο καθώς παρεκκλίνουσα υπερ-μεθυλίωση DNA έχει παρατηρηθεί στα γονίδια *p16(INK4a)*, *E-cadherin*, *COX2*, *ASC* και *DLC1* με λειτουργίες στην καρκινογένεση. Δυνητικά “οδηγές” μεταλλάξεις που επισυμβαίνουν στο ηπατοκαρκίνωμα όπως έχουν προκύψει από αναλύσεις ολικής αλληλούχισης DNA καρκινικών δειγμάτων ασθενών φαίνονται στον πίνακα 2 (Llovet et al., 2015). Περαιτέρω το μονοπάτι *mTOR* είναι ένα σημαντικότερο μονοπάτι έναρξης του καρκίνου στο ηπατοκαρκίνωμα όπως προκύπτει από γενετικά μοντέλα ποντικών και από το γεγονός ότι το μονοπάτι υπερεκφράζεται σε ένα ποσοστό άνω του 50% σε ανθρώπινους ηπατικούς καρκίνους. (Bhat et al., 2013)

Table 1   Recurrent mutations in HCC based on deep-sequencing analyses <sup>32,37,157</sup>		
Pathway	Target	Prevalence of alteration (%)
Telomere stability	<i>TERT</i> promoter	432/774 (55.8)
p53/cell cycle control	<i>TP53</i>	251/928 (27)
	<i>CDKN2A</i>	13/928 (1.4)
	<i>ATM</i>	30/928 (3.2)
	<i>RB1</i>	28/928 (3)
Wnt/ $\beta$ -catenin signalling	<i>CTNNB1</i>	244/928 (26.3)*
	<i>AXIN1</i>	45/928 (4.8)*
	<i>APC</i>	15/928 (1.6)
Chromatin remodeling	<i>ARID1A</i>	54/928 (5.8)*
	<i>ARID2</i>	62/928 (6.7)
	<i>KMT2A</i>	27/928 (2.9)
	<i>KMT2C</i>	28/928 (3)
	<i>KMT2B</i>	12/928 (1.3)
Ras/PI3K/mTOR pathway	<i>RPS6KA3</i>	30/928 (3.2)
	<i>PTEN</i>	9/928 (1)
	<i>PIK3CA</i>	14/928 (1.5)
	<i>RAS</i> <sup>†</sup>	12/928 (1.3)
Oxidative stress	<i>NFE2L2</i>	32/928 (3.4)
	<i>KEAP1</i>	29/928 (3.1)
JAK/STAT signalling	<i>JAK1</i>	14/928 (1.5)
PDGFR signalling	<i>PDGFRA</i>	9/928 (1)
IGF signalling	<i>IGF2R</i>	10/928 (1.1)

Πίνακας 2 από (Llovet et al., 2015)

Η γενωμική αστάθεια (genomic instability) είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό του ανθρώπινου ηπατοκαρκινώματος. Πολλοί μηχανισμοί συνεισφέρουν στη γενωμική αστάθεια όπως η φθορά των τελομερών, ελαττώματα διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων και ελαττώματα στα μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA μετά από βλάβη. Η φθορά (κόντεμα) των τελομερών σχετίζεται με χρόνια ηπατική ασθένεια και σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό αναπλήρωσης των υπό μετασχηματισμό ηπατοκυττάρων που συνοδεύουν την χρόνια ηπατική ασθένεια οδηγεί την καρκινογένεση. Παράλληλα ωστόσο, το 90% των ανθρώπινων καρκίνων του ήπατος υπερεκφράζει την τελομεράση TERT, κάτι το οποίο φαίνεται αντιφατικό. Ωστόσο το μοντέλο που πιθανόν να εξηγεί το μηχανισμό υποδεικνύει ότι η ύστερη επανα-ενεργοποίηση είναι απαραίτητη για την καρκινική εξέλιξη ώστε να αποκαταστήσει την γενωμική αστάθεια και να βοηθήσει τα καρκινικά κύτταρα να επιζήσουν και να πολλαπλασιαστούν.

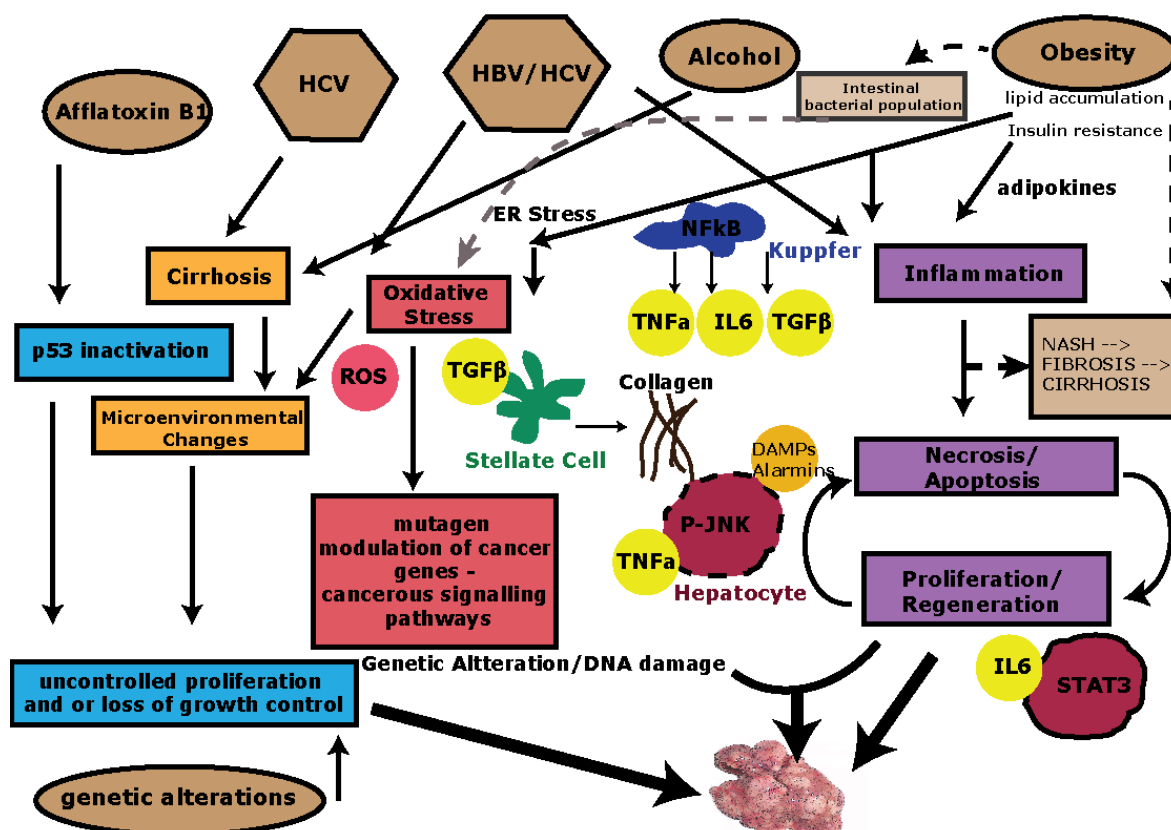
Περαιτέρω, έχουν βρεθεί και χαρακτηριστεί πολλές χρωμοσωμικές δομικές ανωμαλίες ως αίτια του ηπατοκαρκινώματος. Πειράματα συγκριτικής γενωμικής υβριδοποίησης έχουν επιδείξει χρωμοσωμικές προσθέσεις στα 1q, 6p, 8q, 11q και 17q, και χρωμοσωμικές απώλειες στα 1p, 4q, 8p, 13q και 17q.

Αξιοσημείωτος είναι και ο παράγοντας του φύλου, με τα αρσενικά να έχουν πολύ πιο αυξημένη πιθανότητα έναντι των θηλυκών (Farazi and DePinho, 2006). Ένας πιθανός λόγος είναι η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ έναντι των θηλυκών. Επιπλέον ορμονολογικές διαφορές, οι οποίες επαληθεύονται και σε γενετικά μοντέλα ποντικών, ευθύνονται για αυτή τη διαφορά. Ο υποδοχέας ανδρογόνων (AR) στα αρσενικά, ο υποδοχέας οιστρογόνων στα θηλυκά (ER) ο οποίος παρεμποδίζει την αντιγραφή ιών, ενώ περαιτέρω καταστέλλει την έκκριση IL-6 και αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες FOXA1 και FOXA2 και τέλος η προλακτίνη (prolactin) η οποία καταστέλλει τη φλεγμονή εξηγούν τις διαφορές αυτές. (Humphries, 2014)

Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να διαφαίνεται και ο ρόλος της παχυσαρκίας στην ανάπτυξη ηπατοκαρκινώματος. Σε παχύσαρκους ασθενείς, η συσσώρευση λιπιδίων στο συκώτι καθώς και ενδοκρινολογικές ασθένειες όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, οδηγούν σε ενεργοποίηση φλεγμονώδους απόκρισης και πολλοί άνθρωποι αναπτύσσουν μία κατάσταση που ονομάζεται NASH (non-alcoholic steatohepatitis, στεατοηπατίτιδα μη προερχόμενη από αλκοόλ) η εξέλιξη της οποίας οδηγεί σε ίνωση, εν συνεχεία κίρρωση και τέλος ηπατοκαρκίνωμα. Τα λιποκύτταρα παράγουν μία ποικιλία κυταροκινών, οι οποίες ονομάζονται adipokines (adiponectin, leptin, IL1) και συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση μονοπατιών φλεγμονής. Την ίδια στιγμή, η συσσώρευση λιπιδίων αυξάνει τις ανάγκες στο ενδοπλασματικό δίκτυο, οδηγώντας την παραγωγή ενεργών σωματιδίων οξυγόνου (ROS). Τα τελευταία ενισχύουν περαιτέρω τα σήματα φλεγμονής και προκαλούν οξειδωτικές βλάβες, όπως σπασίματα της έλικας και τροποποιήσεις νουκλεοτιδίων. Αναφορές από πειραματικά μοντέλα σε ποντίκια δείχνουν ότι η παχυσαρκία προκαλεί την παραγωγή IL-6 και TNF κυταροκινών, οι οποίες χρειάζονται για την έναρξη και εξέλιξη του ηπατοκαρκινώματος. Οι IL6 και

TNF ενεργοποιούν τις STAT3 και NF- $\kappa$ B πρωτεΐνες αντίστοιχα, οι οποίες προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των χαλασμένων κυττάρων μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων που συμμετέχουν στην κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό. Η συσσώρευση μοριακών αλλαγών και η ενεργοποίηση μονοπατιών στα ελαττωματικά ηπατοκύτταρα συνεισφέρει στην ανάπτυξη του ηπατοκαρκινώματος. (Park et al., 2010; Toffanin et al., 2010). Περαιτέρω σηματοδοτικά μόρια που καθορίζουν αν η παρατεταμένη έκθεση των ηπατοκυττάρων σε ελεύθερα λιπαρά οξέα θα γίνει τοξική, προέρχονται ακόμα και από άλλα όργανα όπως τα βακτήρια του εντέρου που εκκρίνουν μόρια τα οποία φτάνουν στο συκώτι μέσω αίματος αλλά και λιποκύτταρα κάτω από το δέρμα και άλλους περίξ ιστούς. Τα μόρια αυτά δεν στοχεύουν μόνο τα ηπατοκύτταρα, αλλά και τα ηπατικά αστρικά κύτταρα τα οποία όταν υπερ-ενεργοποιούνται εκκρίνουν υπέρογκες ποσότητες κολλαγόνου. (Morgan, 2014). Το έντερο και το συκώτι είναι αλληλοσυνδεδεμένα. Βακτηριακοί πληθυσμοί που ζουν στο έντερο μπορούν να αλλάξουν την σύνθεση τους σε απόκριση της διαίτας και μία παράταιρη βακτηριακή δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει τις προϋποθέσεις για ηπατοκαρκίνωμα. Έτσι μέσω της χοληδόχου κύστης το ήπαρ εκκρίνει χολικά οξέα για την πέψη των λιπιδίων στο έντερο. Ωστόσο η συσσώρευση υψηλών συγκεντρώσεων λιπαρών στο έντερο ευνοεί πληθυσμούς βακτηρίων που εκκρίνουν LPS και δευτερογενή παραπροϊόντα χολικών οξέων, όπως το τοξικό για τα ηπατοκύτταρα DCA. Χρόνια έκθεση του DCA στα ηπατοκύτταρα, το οποίο δημιουργεί βλάβες στο DNA, με ταυτόχρονη συσσώρευση κυττάρων φλεγμονής λόγω του LPS, οδηγούν την ηπατοκαρκινογένεση. (Bourzac, 2014; Yoshimoto et al., 2013).

Οι παραπάνω αιτιολογίες συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα 9.



Αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης ηπατοκαρκινωμάτων ιδιαίτερα μέσω καθολικών τεχνικών (high throughput) για ολόκληρο το γονιδίωμα έχουν οδηγήσει σε επιτυχείς μοριακούς χαρακτηρισμούς - γενετικές ταυτότητες των ηπατοκαρκινωμάτων με βάση την γενετική αιτιολογία. (Pinyol et al., 2014) (Nam et al., 2005), αν και προς το παρόν δεν υπάρχει σαφής προγνωστική αξία των μοριακών προφίλ.

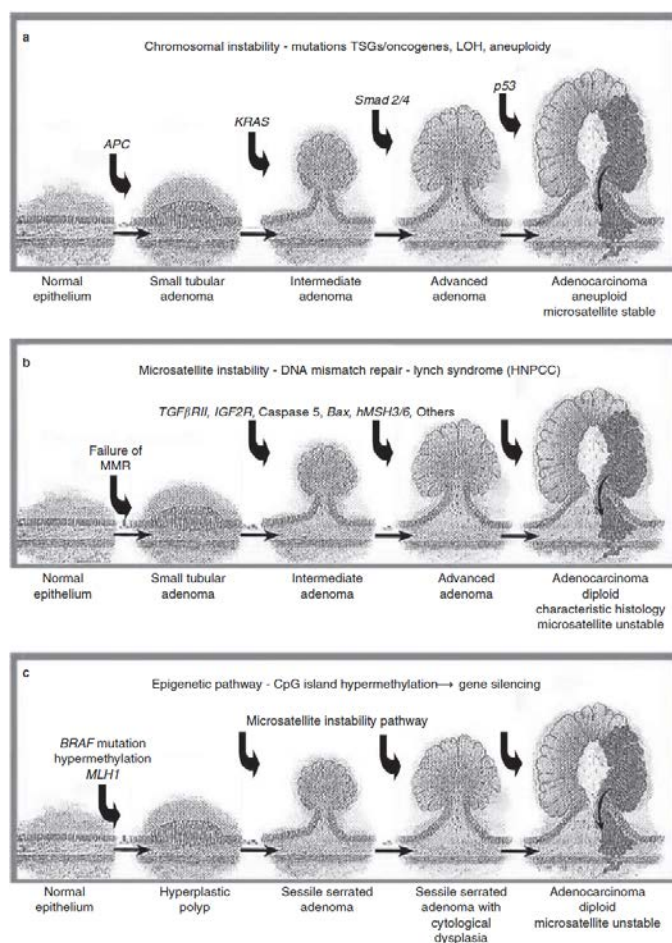
## Καρκινογένεση Παχέως Εντέρου

Τα περιστατικά και η θνησιμότητα του καρκίνου του παχέως εντέρου (**Colorectal cancer – CRC**) μειώνονται σταθερά στις ΗΠΑ, ωστόσο παραμένει η 4<sup>η</sup> πιο επικρατούσα μορφή καρκίνου και η 2<sup>η</sup> πιο συχνή καρκινική αιτία θανάτου (Ahnep, 2011). Ο καρκίνος του παχέως εντέρου είναι αποτέλεσμα συσσώρευσης τόσο επίκτητων γενετικών όσο και επιγενετικών αλλαγών οι οποίες μετασχηματίζουν το φυσιολογικό αδενικό επιθήλιο σε αδενοκαρκίνωμα. Τα βήματα τα οποία περιλαμβάνονται στη διαδικασία αυτή περιγράφηκαν πρώτα στο κλασικό μοντέλο εξέλιξης του αδενώματος σε καρκίνωμα το οποίο προτάθηκε από τον Fearon και Vogelstein το 1990. Από τότε το μοντέλο αυτό έχει εμπλουτισθεί, οδηγώντας σε αναθεώρηση του. Το αρχικό μοντέλο στηριζόταν στην υπόθεση ότι τα σωληνωτά και σωληνολαχνωτά αδενώματα ήταν τα προκαρκινικά νεοπλάσματα τα οποία θα εξελιχθούν σε αδενοκαρκινώματα. Ωστόσο, πλέον είναι γνωστό ότι επιπλέον τύποι από προκαρκινικούς πολύποδες, όπως οδοντωτοί πολύποδες έχουν επίσης σημαντική συνεισφορά στον καρκινικό μετασχηματισμό. Περαιτέρω το αρχικό αυτό μοντέλο πρότεινε ένα περιορισμένο ρεπερτόριο γενετικών αλλαγών οι οποίες καθοδηγούν τον σχηματισμό του καρκίνου. Σήμερα ωστόσο το μοντέλο έχει εμπλουτισθεί με πολλά μοριακά μονοπάτια τα οποία περιλαμβάνουν τόσο μεταλλαγές όσο και επιγενετικές αλλαγές και έτσι είναι κατανοητό ότι υπάρχουν τουλάχιστον 3, και ίσως περισσότερα, μοντέλα εξέλιξης πολύποδων σε καρκίνο τα οποία προκύπτουν μέσω διαφορετικών μοριακών γεγονότων. (Εικόνα 10 από (Lao and Grady, 2011))

Το πρώτο μοντέλο είναι το The Chromosomal INstability pathway (CIN). Στο μοντέλο αυτό η καρκινογένεση οδηγείται κυρίως από μεταλλαγές σε ογκογονίδια και ογκοκατασταλτικά γονίδια, ακολουθούμενο από εξάπλωση των μεταλλαγμένων κλώνων τα οποία απέκτησαν αυξητικό πλεονέκτημα. Αναλύσεις ταυτοποίησαν μεταλλαγές στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο APC το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού (β-catenin) και ενεργοποιητικές μεταλλαγές στο KRAS ογκογονίδιο στα αρχικά στάδια και μεταλλαγές στο p53 και άλλα ογκοκατασταλτικά στα τελικά στάδια του αδενώματος οι οποίες συνοδεύονταν και από πολλαπλές άλλες μεταλλαγές απώλειας της ετεροζυγωτίας. Το μοριακό αυτό μονοπάτι θεωρείται ότι τυπικά οδηγεί σε CRC ανευπλοϊδίας.

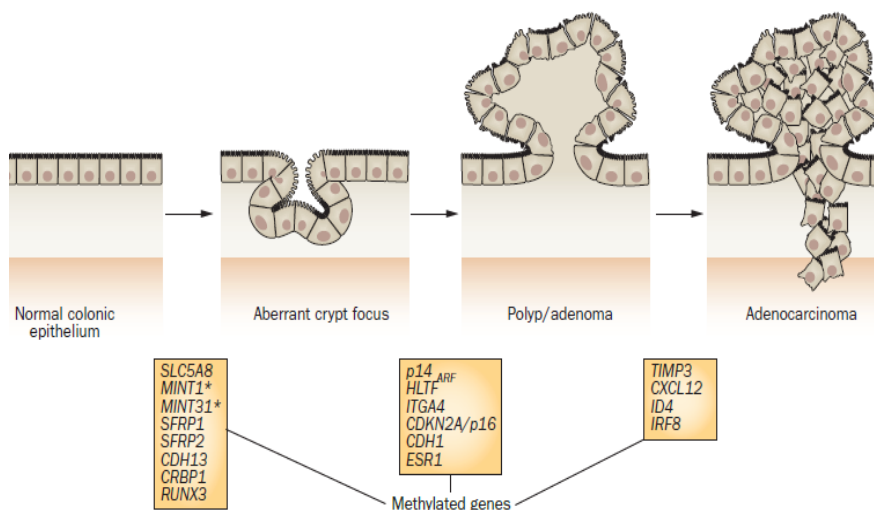
Το δεύτερο μονοπάτι έγινε κατανοητό από τις ιστολογικές διαφορές και τη διαφορετική γενετική ταυτότητα των καρκίνων παχέως εντέρου σε ασθενείς με **Lynch σύνδρομο**. Το τελευταίο είναι ένα κληρονομικό μη-πολυποδιασικού σύνδρομο καρκίνου του παχέως εντέρου και αφορά το 3% των

CRCs. Κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και σχετίζεται με μία πολύ μεγάλη πιθανότητα για CRC (~70%) και αυξημένη πιθανότητα για άλλους καρκίνους και έχει καλύτερη πρόγνωση από το CIS-CRC. Γενετικά τα καρκινώματα με όμοιο με Lynch φαινότυπο που ανήκουν στο δεύτερο μονοπάτι είναι διπλοειδή και χαρακτηρίζονται από εξάπλωση επαναληπτικών DNA αλληλουχιών το οποίο ονομάζεται μικροδορυφορική αστάθεια (microsatellite instability). Στο μονοπάτι αυτό γενετικές αλλαγές σχετίζονται συχνά με ελαττώματα στο μονοπάτι επιδιόρθωσης DNA (MMR, MisMatch Repair) που προκύπτουν από απενεργοποιητικές μεταλλάξεις στο γονίδιο επιδιόρθωσης. Το μονοπάτι αυτό της MicroSatelity Instability (MSI) αφορά το 15% όλων των CRC. Από το 15% των καρκίνων με MSI, μόνο το 5% αφορά ασθενείς και με Lynch syndrome. Συνεπώς προκύπτει και ένα τύπου MSI-non-Lynch ποσοστό, το οποίο έχει τα ιστολογικά κριτήρια του Lynch ωστόσο δεν έχει ισχυρό κληρονομικό χαρακτήρα και δεν αφορά νεαρής ηλικίας ασθενείς. Το υποσύνολο αυτό ονομάζεται Sporadic MSI ή αλλιώς επιγενετικό μονοπάτι. Συχνό μοριακό γεγονός του μονοπατιού αυτού είναι η απενεργοποίηση των MLH-1 γονιδίων, επιγενετικά με υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου. Παρότι ονομάζεται επιγενετικό, τουλάχιστον ένα μεταλλακτικό γεγονός έχει χαρακτηριστεί και σε αυτό το μονοπάτι και αφορά την απενεργοποιητική μεταλλαγή του BRAF γονιδίου, στο 80% των ασθενών του μονοπατιού αυτού (Ahnén, 2011). Τα μονοπάτια αυτά συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα (Ahnén, 2011).



Εικόνα 10 από (Ahnén, 2011).





Εικόνα 11. Από (Lao and Grady, 2011)

Επικουρικά στα παραπάνω μοντέλα επιδρούν και μεταλλαγές ή επιγενετικές βλάβες σε άλλα γονίδια. Αξιοσημείωτο είναι το TGFβ1-Smad μονοπάτι, καθώς μεταλλαγές στο TGFBR2 γονίδιο έχουν ανιχνευτεί σε ένα ποσοστό 30% των CRCs, και επιπλέον μεταλλαγές αλλά και επιγενετικές αλλαγές ταυτοποιήθηκαν και για τα γονίδια SMAD2, SMAD4, RUNX3 και TSP1 του ίδιου σηματοδοτικού μονοπατιού (Lao and Grady, 2011). Περαιτέρω επιγενετικές αλλαγές έχουν ταυτοποιηθεί τα τελευταία χρόνια και αφορούν είτε την καθολική του γονιδιώματος υπομεθυλίωση που σχετίζεται με τη γήρανση είτε την ειδική υπερμεθυλίωση υποκινητών όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση του MLH-1. Στην κατηγορία της ειδικής των γονιδίων υπερμεθυλίωσης υποκινητών, η παρακάτω Εικόνα 11, αναφέρει επιπλέον ταυτοποιημένα γονίδια καθώς και το στάδιο στο οποίο έχει παρατηρηθεί η επιγενετική μεθυλίωσή τους. (Lao and Grady, 2011)

## Επιγενετική – Τροποποιήσεις χρωματίνης

Ως **επιγενετική** ορίζεται ο τομέας της μελέτης των κληρονομήσιμων αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση οι οποίες δεν οφείλονται σε αλλαγές στην αλληλουχία του DNA. Οι βιολογικές διαδικασίες και χαρακτηριστικά που επηρεάζονται από επιγενετικούς μηχανισμούς είναι ποικίλα. Ο σημαντικός ρόλος των επιγενετικών μηχανισμών γίνεται ακόμα πιο κατανοητός από τη σημαντικότητά τους για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των διαφόρων τύπων κυττάρων σε έναν οργανισμό. Το ζυγωτό έχει το ίδιο ακριβώς γονιδίωμα με ένα ενήλικο νευρικό κύτταρο. Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση όμως από το πολυδύναμο εμβρυικό κύτταρο (ES, Embryonic Stem cell) μέχρι και ένα διακριτό ενήλικο κύτταρο, συντελείται μέσω ενός χώρο-χρονικού γονιδιακού προγράμματος το οποίο καθορίζεται σημαντικά από επιγενετικούς μηχανισμούς. Περαιτέρω παραδείγματα επιγενετικών μηχανισμών



αφορούν την απενεργοποίηση του ενός από τα δύο X χρωμοσώματα στα θηλυκά των θηλαστικών και σιώπηση του γενετικού τόπου του ζευγαρώματος στη μονοκύτταρη ζύμη. Ωστόσο η επιγενετική φυσιολογική κατάσταση-ομοιότητα μπορεί να αλλοιωθεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες ή κατά τη διάρκεια της γήρανσης, ενώ η σημαντικότητα της επιγενετικών αλλαγών στην εμφάνιση και ανάπτυξη του καρκίνου γίνεται ολοένα και πιο κατανοητή. Οι επιγενετικές διεργασίες περιλαμβάνουν τις χημικές τροποποιήσεις του DNA και συγκεκριμένα **μεθυλίωση του DNA**, τις χημικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών οι οποίες είναι χωροταξικά και ενζυμικά συνδεδεμένες με το DNA δηλαδή τις ιστόνες (histones), άρα μιλάμε για **τροποποίηση ιστονών**, οι οποίες αποτελούν τον δομικό πυρήνα του «χρωματινικού πακεταρίσματος» και τέλος ποικιλόμορφα μόρια RNA των οποίων ο ρόλος στην επιγενετική ρύθμιση γίνεται ολοένα και πιο κατανοητός. (Bird, 2007)

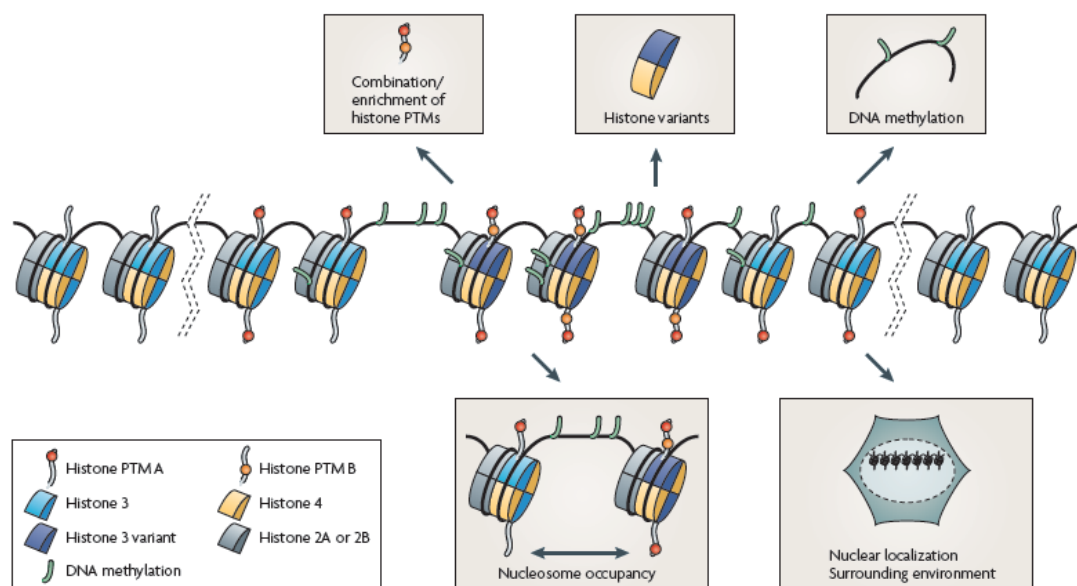
### **Δομή χρωματίνης και κατηγορίες τροποποιήσεων.**

Η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από ένα σύμπλεγμα οκτώ ιστονών και πιο συγκεκριμένα δύο αντιγράφων H<sub>A</sub> και H<sub>B</sub> και από ένα αντίγραφο H<sub>3</sub> και H<sub>4</sub>, μαζί με ένα κομμάτι DNA 146 βάσεων «τυλιγμένο» γύρω από τα μόρια ιστονών. Τα τελικά σχηματισμένα νουκλεοσώματα πακετάρονται περαιτέρω στο χώρο (τρισιδιάστατα) ώστε να σχηματίσουν χρωμοσωμικές δομές ανώτερης χωροταξικής κλίμακας των οποίων η λειτουργική σημασία αποτελεί αντικείμενο έρευνας. Η χρωματίνη δεν έχει μόνο δομικές ιδιότητες καθώς είναι μία δυναμική υπερ-οργάνωση που παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση επηρεάζοντας την πρόσβαση και ως εκ τούτου τη λειτουργία της μεταγραφικής μηχανής. Η δυναμική αυτή δομή ρυθμίζει όχι μόνο τη μεταγραφή αλλά όλες τις DNA εξαρτώμενες διεργασίες συμπεριλαμβανομένων της αντιγραφής και της επιδιόρθωσης.

Συγκεκριμένα κάθε ιστόνη του πυρήνα (core) έχει ένα αμινοτελικό άκρο «ουρά» (tail) η οποία προεξέχει από τη βασική δομή του πυρήνα και υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMs) όπως **ακετυλίωση** (acetylation) σε κατάλοιπα λυσίνης, **μεθυλίωση** (methylation) σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης, **φωσφορυλίωση** (phosphorylation) σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης, **μονο-ουβικιτινυλίωση** (ubiquitylation) σε κατάλοιπα λυσίνης, **σουμουιλίωση** (Sumoylation) σε κατάλοιπα λυσίνης, **ADP ριβοζυλίωση** (ADP ribosylation) σε κατάλοιπα γλουταμικού οξέος, **απαμίνωση** (Deamination) μετατροπή αργινίνης σε κιτρουλίνη, **ισομερισμός προλίνης** (Proline Isomerization) και **κροτονουλίωση**. (Πίνακας 2, Εικόνα 12) (Kouzarides, 2007) (Tan et al., 2011)

Περαιτέρω επίπεδο ρύθμισης είναι η ύπαρξη εναλλακτικών ιστονών (**histone variants**), η απόσταση μεταξύ των νουκλεοσωμάτων (**nucleosome occupancy**) καθώς και η θέση της χρωματίνης αυτής καθ' αυτής μέσα στον πυρήνα (nuclear architecture) (Εικόνα 12) (Margueron and Reinberg, 2010). Οι τροποποιήσεις αυτές συμβαίνουν από **ένζυμα τροποποίησης των ιστονών (histone modifying**

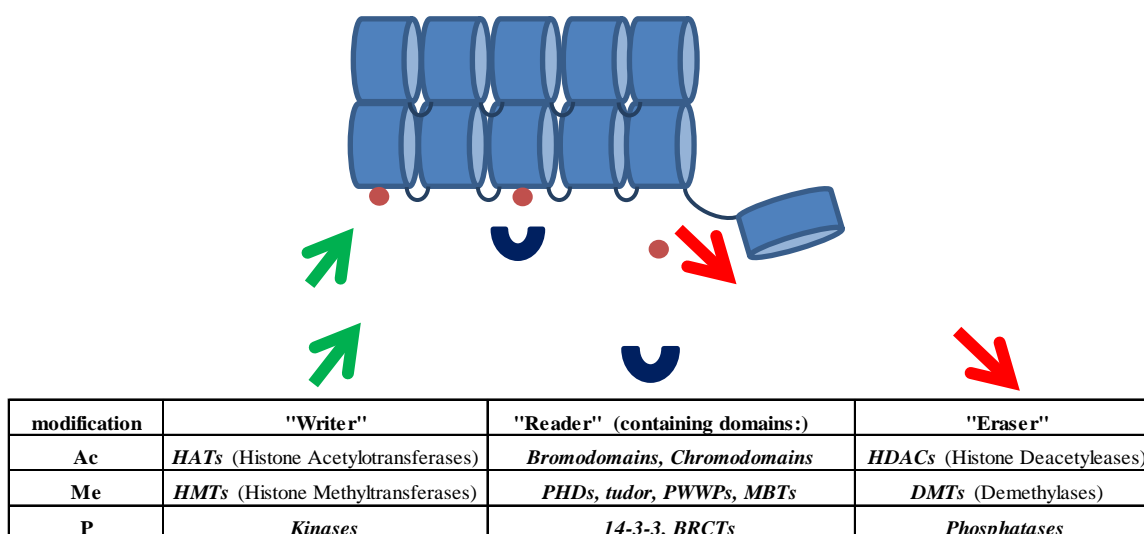
**enzymes**) τα οποία συχνά περιγράφονται ως “writers” και “erasers” και περιλαμβάνουν συμπλέγματα τύπου συν-ενεργοποιητή / συν-καταστολέα που διαθέτουν ενζυματική ενεργότητα. Τα ένζυμα αυτά αφορούν ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (histone acetyl-transferases), αποακετυλάσες (deacetylases), μεθυλάσες (methylases), απομεθυλάσες (demethylases), λιγάσες ουβικιτίνης (ubiquitin ligases) καθώς και εξαρτώμενες από ATP αναδιαμορφωτές χρωματίνης (ATP-dependent chromatin remodeling), όλα εκ των οποίων μπορούν να επηρεάσουν τη διαμόρφωση αλλά και την τοποθέτηση της χρωματίνης. (Εικόνα 13)



Εικόνα 12. Από (Margueron, 2010 #2)

Η συντονισμένη δράση των συμπλεγμάτων αυτών πάνω σε cis ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων οδηγεί στη δημιουργία ενεργών ή ανενεργών μεταγραφικών καταστάσεων. Οι λειτουργικές συνέπειες της δράσης τέτοιων συμπλεγμάτων με αποτέλεσμα τις **μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (PTMS)** είναι είτε άμεσες και αφορούν δομικές αλλαγές στην χρωματίνη (άρα αύξηση ή μείωση στην προσβασιμότητα μεταγραφικών παραγόντων) είτε έμμεσες και αφορούν την περαιτέρω στρατολόγηση των πρωτεϊνών ανάγνωσης (reader ή effector). Η ανάλυση μάλιστα των λειτουργικών ρόλων αυτών των τροποποιήσεων οδήγησε την περασμένη δεκαετία σε καινοτόμες ιδέες περί ύπαρξης ενός κώδικα ιστονών («**histone code**») ο οποίος διαβάζεται από πρωτεΐνες ανάγνωσης οι οποίες εν συνεχεία ρυθμίζουν τη μετάβαση μεταξύ ανοιχτής (άρα και προσβάσιμης άρα και μεταγραφικά ενεργής) και κλειστής κατάστασης της χρωματίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές οι οποίες διαβάζουν τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις διαθέτουν διακριτά πρωτεϊνικά μοτίβα αναγνώρισης και κατηγοριοποιούνται ως : πρωτεΐνες που διαθέτουν μοτίβα chromo και bromo και αναγνωρίζουν τροποποιήσεις ακετυλίωσης, πρωτεΐνες που διαθέτουν μοτίβα PHD (plant homeodomains), tudor και MBT μοτίβα (malignant brain tumour) και αναγνωρίζουν κατάλοιπα

μεθυλίωσης και τέλος πρωτεΐνες που διαθέτουν πρωτεΐνες της οικογένειας 4-3-3 και μοτίβα BRCT (carboxy-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein) και αναγνωρίζουν κατάλοιπα φωσφορυλίωσης. (Εικόνα 13)



Εικόνα 13.

Ο συνδυασμός διαφορετικών τροποποιήσεων των νουκλεοσωμάτων μαζί με τη δυναμική και ρυθμιζόμενη εναπόθεση εναλλακτικών μορφών ιστονών (histone variants) και τη μεθυλίωση του DNA σε νησίδες πλούσιες σε G και C (CpG islands) επηρεάζει τα επιγενετικά σήματα στο γονιδίωμα ώστε να δημιουργήσουν και να διατηρήσουν συγκεκριμένα μοτίβα (patterns) γονιδιακής έκφρασης, να εξασφαλίσουν το σωστό έλεγχο της αντιγραφής και της χρωμοσωμικής ακεραιότητας (chromosome stability). (Margueron and Reinberg, 2010) (Kouzarides, 2007) (Filippakopoulos and Knapp, 2014) (Sarris et al., 2014). Οι διαφορετικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και ο ρόλος τους στις λειτουργίες του πυρήνα (πίνακας 3) και στην μεταγραφή (γονιδιακή ρύθμιση) πιο ειδικά (πίνακας 4) συνοψίζονται παρακάτω.

Table 1. Different Classes of Modifications Identified on Histones		
Chromatin Modifications	Residues Modified	Functions Regulated
Acetylation	K-ac	Transcription, Repair, Replication, Condensation
Methylation (lysines)	K-me1 K-me2 K-me3	Transcription, Repair
Methylation (arginines)	R-me1 R-me2a R-me2s	Transcription
Phosphorylation	S-ph T-ph	Transcription, Repair, Condensation
Ubiquitylation	K-ub	Transcription, Repair
Sumoylation	K-su	Transcription
ADP ribosylation	E-ar	Transcription
Deimination	R > Cit	Transcription
Proline Isomerization	P-cis > P-trans	Transcription

Πίνακας 3. Από (Kouzarides, 2007). Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και λειτουργίες.

Table 1   Chromatin modifications		
Mark*	Transcriptionally relevant sites†	Transcriptional role‡
<b>DNA methylation</b>		
Methylated cytosine (meC)	CpG islands	Repression
<b>Histone PTMs</b>		
Acetylated lysine (Kac)	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 8, 13, 16), H2A, H2B	Activation
Phosphorylated serine/threonine (S/Tph)	H3 (3, 10, 28), H2A, H2B	Activation
Methylated arginine (Rme)	H3 (17, 23), H4 (3)	Activation
Methylated lysine (Kme)	H3 (4, 36, 79), H3 (9, 27), H4 (20)	Activation Repression
Ubiquitylated lysine (Kub)	H2B (123 <sup>§</sup> /120 <sup>¶</sup> ), H2A (119 <sup>¶</sup> )	Activation Repression
Sumoylated lysine (Ksu)	H2B (6/7), H2A (126)	Repression
Isomerized proline (Pisom)	H3 (30-38)	Activation/ repression

\*The modification on either DNA or a histone.  
†Well-characterized sites with regard to genomic location for DNA methylation or residues within histones for PTMs.  
‡Whether the epigenetic mark is associated with activation or repression.  
§Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*).  
¶Mammals.

Πίνακας 4. Από (Berger, 2007). Μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και λειτουργίες στη μεταγραφή.

## Μεθυλίωση ιστονών.

Η μεθυλίωση των ιστονών συμβαίνει σε όλα τα βασικά κατάλοιπα των μορίων τους, τις αργινίνες, τις λυσίνες και τις ιστιδίνες. Οι λυσίνες μπορούν να μονο-μεθυλιωθούν (me1), δι-μεθυλιωθούν (me2) και να τρι-μεθυλιωθούν (me3) στα ε-αμινικά τους άκρα (groups), οι αργινίνες μπορούν να μονο-μεθυλιωθούν (me1), δι-μεθυλιωθούν συμμετρικά (me2s) ή ασύμμετρα (me2a) στα γουανιδιλικά άκρα τους, ενώ οι ιστιδίνες έχει αναφερθεί ότι μονο-μεθυλιώνονται. Οι πλέον εκτενώς μελετημένες μεθυλίωσεις ιστονών είναι αυτές της μεθυλίωσης της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 (H3K4), και των H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 και H4K20. Οι θέσεις μεθυλίωσης της αργινίνης (R) περιλαμβάνουν τα κατάλοιπα H3R2, H3R8, H3R17, H3R26 και H4R3.

Έχουν χαρακτηριστεί πληθώρα μεθυλο-τρανσφερασών και απομεθυλασών οι οποίες έχουν απόλυτη ή μερική εξειδίκευση ως προς το κατάλοιπο που μεθυλιώνουν πάνω στις ιστόνες. Αναλόγως το βιολογικό περιβάλλον, μερικές μεθυλίωσεις είναι απαραίτητο να παραμείνουν σταθερά (πχ η μεθυλίωση που εμπλέκεται στην κληρονομηση κατά τη διάρκεια της μείωσης μίας ετεροχρωματινικής κατάστασης), ενώ άλλες πρέπει να είναι ευάλωτες στην αλλαγή (πχ όταν τα κύτταρα διαφοροποιούνται). Έτσι έχει αποδειχθεί πλέον ότι η μεθυλίωση στα διάφορα κατάλοιπα λυσίνης ιστονών έχει ποικίλους ρυθμούς προσθαφαίρεσης. Μάλιστα η πληθώρα προτύπων μεθυλίωσης προσδίδει εκλεπτυσμένη ρυθμιστική δυνατότητα. Το παρόν μοντέλο (όπως αναφέρθηκε και παραπάνω για το πλήθος των PTMs) υποδεικνύει ότι οι μεθυλιωμένες ιστόνες είτε άμεσα αλλάζουν τη δομή (άρα και προσβασιμότητα) της χρωματίνης είτε αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες ανάγνωσης (readers-effectors), τα οποία προκαλούν την στρατολόγηση άλλων μορίων τα οποία μεταβάλλουν την χρωματίνη ή/και την κατάσταση μεταγραφικής ενεργότητας (Greer and Shi, 2012) .

## Η ρύθμιση της μεθυλίωσης ιστονών.

### Μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες.

Τρεις οικογένειες ένζυμων έχουν χαρακτηριστεί που καταλύουν την προσθήκη μεθυλομάδων από την *S*-adenosylmethionine στις ιστόνες. Πρώτον πρωτεΐνες που διαθέτουν το μοτίβο SET, δεύτερον οι DOT1-like πρωτεΐνες, με τις ομάδες αυτές να μεθυλιώνουν λυσίνες και τρίτον πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών N-μεθυλοτρανσφεράσης αργινίνης (protein arginine *N*-methyltransferase (PRMT)) που μεθυλιώνουν αργινίνες. Οι στόχοι αυτών των ενζύμων μπορεί να είναι ιστόνες ενσωματωμένες στην χρωματίνη, ελεύθερες ιστόνες και τέλος πρωτεΐνες που δεν είναι ιστόνες (non-histone substrates). (Kouzarides, 2007)

Όσον αφορά τις απομεθυλάσες, δύο οικογένειες έχουν χαρακτηριστεί. Η οξειδάσες αμινών (amine oxidases ή LSD1/BHC110) που αφαιρούν κατάλοιπα μεθυλίωσης από H3K4 και H3K9 και οι jumonji C (JmjC)-domain-containing, iron-dependent dioxygenases που αφαιρούν H3K9me2 και me3 και H3K36me2 και me3. Αυτά τα ένζυμα είναι πολύ συντηρημένα από τη ζύμη μέχρι τον άνθρωπο και απομεθυλιώνουν τόσο ιστόνες όσο και μη ιστόνες. Απομεθυλάσες αργινίνης δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα με σαφήνεια αν και ενδείξεις ασαφής υπάρχουν για δυο μόρια την JMJD6 και την PADI4. (Kooistra and Helin, 2012)

### Τρόπος στρατολόγησης στους γενωμικούς στόχους

Υπάρχουν πολλοί τρόποι στρατολόγησης των μεθυλοτρανσφερασών και απομεθυλασών στους στόχους τους. Ένας τρόπος είναι τα cis DNA στοιχεία. Συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες έχουν χαρακτηριστεί οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη στρατολόγηση. Ένα καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα αφορά στη *Drosophila* τη στρατολόγηση των TRX (H3K4 μεθυλοτρανσφεράσες) και PcG πρωτεϊνών από τα στοιχεία trithorax group (TrxG) response elements (TREs) και Polycomb group (PcG) response elements (PREs) αντίστοιχα, εν μέσω DNA-binding μεταγραφικών παραγόντων τα οποία αναγνωρίζουν αυτά τα cis στοιχεία. Σημειωτέον ότι το PcG αφορά το Polycomb repressive complex 2 (PRC2), σύμπλεγμα το οποίο καταλύει την τριμεθυλίωση της H3K27. Περαιτέρω Long non-coding RNAs (lncRNAs) αλλά και small non-coding RNAs έχειδει να έχουν ρόλο στην στόχευση σε συγκεκριμένες γενετικές περιοχές. Τέλος η μεθυλίωση του DNA φαίνεται να έχει ενεργό ρόλο στην καθοδήγηση της μεθυλίωσης ιστονών, ενώ υπάρχουν και αναφορές για το αντίστροφο, ότι δηλαδή η μεθυλίωση ιστονών επηρεάζει την DNA μεθυλίωση και ότι αυτά τα δύο σήματα-τροποποιήσεις ενισχύουν το ένα το άλλο στην δημιουργία ανασταλτικού χρωματινικού περιβάλλοντος.

Η τελευταία παρατήρηση μάλιστα εντάσσεται σε έναν γενικότερο μηχανισμό κατά τον οποίο διακριτές PTMs επηρεάζουν η μία την άλλη είτε προς την ίδια κατεύθυνση είτε προς αντίθετη, ενώ

η μία πολλές φορές αποτελεί έναυσμα για την άλλη. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται γενικότερα chromatin crosstalk. Έτσι η μεθυλίωση μπορεί να συμβεί ταυτόχρονα σε πολλαπλά διακριτά κατάλοιπα στην ίδια ιστόνη, αλλά είναι δυνατόν και κάποιες τροποποιήσεις να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες. Για παράδειγμα να αναφέρουμε ότι τόσο στα θηλαστικά όσο και στη ζύμη, η δι-μεθυλίωση της H3R2 (από την PRMT6) αποτρέπεται από την H3K4me3. Αντίστροφα, η H3R2me2a εμποδίζει την H3K4 μεθυλίωση. Περαιτέρω συνδυαστικές τροποποιήσεις ιστονών μπορούν να μεταβάλλουν την αναγνώριση και την πρόσδεση μεθυλο-προσδεδόμενων πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση της H3S10 κατά τη διάρκεια της M φάσης του κυτταρικού κύκλου αποτρέπει την H3K9me3 προσδένουσα πρωτεΐνη HP1 (heterochromatin binding protein 1) από το να προσδεθεί σε διπλά τροποποιημένες ουρές ιστονών. Μερικές PTMs στις ουρές των ιστονών μπορούν να στρατολογήσουν τροποποιητικές των μεθυλομάδων πρωτεΐνες και να επηρεάσουν έτσι τον καθορισμό των της εξειδίκευσης υποστρωμάτων. Για παράδειγμα η απομεθυλάση PHF8 προσδέεται στο H3K4me2 η/και H3K4me3 και από-μεθυλιώνει H3K9me2, αλλά το σχετικό ένζυμο JHDM1D (KDM7A) καθοδηγείται στο να από-μεθυλιώσει H3K27me2 μόνο μετά από πρόσδεση σε H3K4me2 ή/και H3K4me3. Τέλος μία ακόμα κατηγορία αλληλεξάρτησης των PTMs είναι και το γεγονός ότι PTMs σε μία ουρά ιστονών μπορούν να επηρεάσουν άλλες ουρές ιστονών in trans με χαρακτηριστικό παράδειγμα την μονο-ουβικιτινίωση της H2B η οποία είναι απαραίτητη για την μεθυλίωση H3K4 και H3K79. (Greer and Shi, 2012)

### **Τρόπος αναγνώρισης της μεθυλίωσης**

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αναγνώριση των μεθυλιωμένων ιστονών επιτυγχάνεται από άλλες πρωτεΐνες με μοτίβα πρόσδεσης μεθυλομάδων, συμπεριλαμβανομένων των PHD δακτύλων, WD40 επαναλήψεις, CW μοτίβα, PWWP μοτίβα, ankyrin επαναλήψεις και πρωτεΐνες της υπερ-οικογένειας Royal. Αυτή η υπερ-οικογένεια περιλαμβάνει πρωτεΐνες με μονά ή διπλά chromodomains, chromobarrels, Tudor μοτίβα, διπλά ή επαναλαμβανόμενα εν σειρά Tudor μοτίβα και πρωτεΐνες με MBT επαναλήψεις. Πολλές πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν αυτά τα μοτίβα - συμπεριλαμβανομένων των PHF21A (BHC80), TIF1a (TRIM24) και UHRF1- αναγνωρίζουν επίσης μη μεθυλιωμένες λυσίνες και αργινίνες και η μεθυλίωση αποτρέπει την αλληλεπίδρασή τους με ιστόνες. Η προσθήκη μεθυλομάδων αυξάνει τα θετικά φορτία και την υδροφοβικότητα των λυσινών και αργινινών, καθιστώντας εφικτή την αλληλεπίδραση τους με τις υδροφοβικές ιδιότητες των πρωτεϊνών. Πράγματι, αρωματικές ομάδες έχουν βρεθεί σε πολλές μεθυλοπροσδένουσες πρωτεΐνες, οι οποίες καθιστούν εφικτή την άμεση αλληλεπίδραση με μεθυλιωμένες αργινίνες και λυσίνες. (Greer and Shi, 2012)

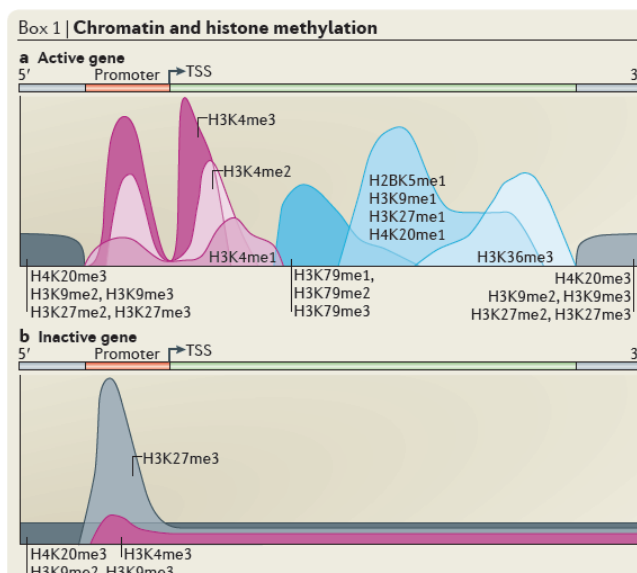


### **Ο ρόλος της μεθυλίωσης στην διαδικασία της μεταγραφής.**

Οι περισσότεροι συσχετισμοί μεταξύ του είδους της μεθυλίωσης και του αποτελέσματος στη μεταγραφή στηρίζονται σε παράλληλες συγκρίσεις μεταξύ επιπέδων γονιδιακής έκφρασης και καθολικές (genome-wide) ή στοχευμένες μελέτες (gene-specific) με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ιστονών (ChIP). Έτσι έχει διαλευκανθεί ο ρόλος συγκεκριμένων τροποποιήσεων ιστονών σε συγκεκριμένα στάδια τις μεταγραφής.

Όπως αναφέρθηκε, ο τρόπος που το DNA είναι τυλιγμένο γύρω από τις ιστόνες για να σχηματίσει τη χρωματίνη δεν είναι ένα απλό παθητικό σύστημα πακεταρίσματος με δομικό ρόλο. Τα γονίδια, οι υποκινητές (promoters) και άλλα γενετικά στοιχεία (enhancers, insulators) πρέπει να είναι προσβάσιμα σε διαφορετικά στάδια κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ή σε απόκριση συγκεκριμένων ερεθισμάτων. Είναι λοιπόν η ειδική σύνθεση της χρωματίνης η οποία ενορχηστρώνει τις διαφορετικές γενωμικές λειτουργίες και δεδομένου ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών είναι σημαντικοί καθοριστές της χρωμοσωμικής δομής, συνεισφέρουν εν τέλει σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Παρότι η αιτιοκρατία των τροποποιήσεων ως προς το βιολογικό τους αντίκτυπο είναι ακόμα υπό διερεύνηση, για ορισμένες συγκεκριμένες περιοχές του DNA έχουν χαρακτηριστεί κάποια μοτίβα τροποποιήσεων ιστονών συναρτήσει του βιολογικού αποτελέσματος. Έτσι σε γενικές γραμμές η μεθυλίωση των H3K4, H3K36 και H3K79 συσχετίζεται με ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια ενώ η μεθυλίωση των H3K27, H3K9 και H4K20 με ανενεργά γονίδια. Στα κατεσταλμένα γονίδια, τα H3K9 και H4K20 είναι σχετικά ομοιογενώς κατανεμημένα, ενώ η H3K27me3 είναι εμπλουτισμένη στους υποκινητές, αν και όχι αποκλειστικά. Μεταξύ των ενεργών μεταγραφικά γονιδίων μερικές μεθυλιώσεις όπως η H3K4me3 βρίσκεται κυρίως στους υποκινητές ή τριγύρω των σημείων έναρξης της μεταγραφής (Transcription Start Site TSS), ενώ άλλα όπως η H3K36me3 βρίσκονται downstream του TSS στο κυρίως σώμα των γονιδίων (gene bodies). Στο παρακάτω σχήμα (Εικόνα 14) φαίνονται σχηματικά αναπαραστάσεις των μοτίβων των μεθυλιώσεων ιστονών σε ενεργά και ανενεργά γονίδια. Η ακριβής θέση των τροποποιήσεων έχει συσχετιστεί με τη λειτουργία τους, και έτσι τα ένζυμα τα οποία προσθέτουν ή αφαιρούν τις μεθυλιώσεις εμπλέκονται στη ρύθμιση συγκεκριμένων λειτουργιών όπως μεταγραφική ενεργοποίηση, μεταγραφική επιμήκυνση της RNA πολυμεράσης (elongation) ή μεταγραφική σίγαση. (Kooistra and Helin, 2012)

Έτσι λοιπόν διαφαίνεται ότι η μεθυλίωση των ιστονών έχει ρόλο σε πολλά επίπεδα της μεταγραφικής ρύθμισης, από την χρωματινική αρχιτεκτονική μέχρι την ρύθμιση συγκεκριμένων γενετικών τόπων, μέσω της στρατολόγησης κυτταροειδικών μεταγραφικών παραγόντων και την αλληλεπίδραση με παράγοντες έναρξης και επιμήκυνσης.



Εικόνα 14. Από (Kooistra and Helin, 2012)

**Τα αποτελέσματα της μεθυλίωσης εξαρτώνται από το μοριακό μικροπεριβάλλον που επικρατεί.**

Τα τελευταία χρόνια με την μαζική λήψη πληροφοριών από ευρείας κλίμακας (high throughput) πειράματα σε πολλαπλά κυτταρικά συστήματα (διαφορετικά όργανα, διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, απόκριση σε διαφορετικά εξωτερικά ερεθίσματα κτλ) γίνεται κατανοητό ότι η ρύθμιση από τις τροποποιήσεις ιστονών είναι ένα φαινόμενο δυναμικό και η παρουσία συγκεκριμένων τροποποιήσεων δεν υποδηλώνει πάντα ένα μοναδικό ρυθμιστικό αποτέλεσμα τύπου “on-off”. Το ακριβές κατάλοιπο της λυσίνης που μεθυλιώνεται στην ουρά των ιστονών αλλά και ο βαθμός της μεθυλίωσης (me1, me2, me3) έχει συσχετιστεί με διαφορετική σε κάθε περίπτωση κατάσταση γονιδιακής έκφρασης. Έτσι σε κάποιες περιπτώσεις η κατάσταση είναι πιο ευθύς, όπως το ότι η ακετυλίωση είναι ενεργοποιητική και η σουμοϋλίωση (SUMOylation) είναι γενικά κατασταλτική. Ομοίως η H3K4me3 συσχετίζεται γενικά με ενεργή μεταγραφή ή με γονίδια που είναι σε παύση (poise) προς ενεργοποίηση και συμβαίνει στα 5' άκρα των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης, ενώ η H3K27me3 και η H3K9me3 (ιδιαίτερα στην συμπαγή περικεντρομερική χρωματίνη) συσχετίζεται με κατασταλτική χρωματίνη. Η H3K4me1 συχνά συσχετίζεται με λειτουργία ενισχυτή ενώ η H3K4me3 είναι συνδεδεμένη με ενεργότητα υποκινητή. Ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σαφές ότι η κατάσταση δεν είναι πάντα τόσο απλή και δεν υπάρχει ξεκάθαρη σχέση μεταξύ τροποποιήσεων ιστονών και μεταγραφικού αποτελέσματος. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η ίδια η τροποποίηση μπορεί να συσχετίζεται είτε με ενεργοποίηση είτε με καταστολή με τις H3K4me2 και H3K4me3 να είναι αντιπροσωπευτικές αυτής της κατηγορίας. Πιθανόν η επιλογή να αποδίδεται από τις προσδένουσες πρωτεΐνες ανάγνωσης (readers-effectors). Έτσι στην πρώτη περίπτωση έχει δειχθεί στη ζύμη ότι όταν η H3K4me3 προσδένεται από την Chd1, η οποία στρατολογεί το σύμπλεγμα



SAGA (που εμπεριέχει την GCN5 H3 ακετυλοτρανσφεράση), είναι ενεργοποιητική, ενώ περαιτέρω παραδείγματα προς την ίδια κατεύθυνση είναι και η πρόσδεση της H3K4me2 από το COMPASS και της H3K4me3 από τα NURF και NuA3, συμπλέγματα πρωτεϊνών ανάγνωσης που οδηγούν στην μεταγραφική ενεργοποίηση. Στον αντίποδα υπάρχουν περιπτώσεις όπου συμπλέγματα που προσδένονται στην H3K4me3 συσχετίζονται με μεταγραφική καταστολή. Για παράδειγμα, ως απόκριση σε βλάβη του DNA, η H3K4me2 ή me3 έχει παρατηρηθεί να προσδένονται από την PHD-μοτίβου συν-καταστολέα πρωτεΐνη ING2 (INhibitor of Growth family member 2) με αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή μέσω της πρόσδεσης ενός συμπλέγματος από-ακετυλάσης ιστονών (Sin3a-Hdac1). Περαιτέρω παράδειγμα αποτελεί η JMJD2A πρωτεΐνη, μία απομεθυλάση λυσίνης που στοχεύει H3K9me3 και H3K36me3 και είναι μέρος στο σύμπλεγμα συν-καταστολέα N-CoR (nuclear hormone co-repressor complex) και της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb). Μέσω των εν σειρά tudor μοτίβων, η JMJD2A αλληλεπιδρά με H3K4me3 και H4K20me3. Κατά αυτόν τον τρόπο φαίνεται η H3K4me3 και πιθανόν και η H4K20me3 να στρατολογεί την JMJD2A για να απομεθυλώσει την H3K9 και H3K36. Επειδή η JMJD2 αλληλεπιδρά με συμπλέγματα συν-καταστολέα, αυτή η στρατολόγηση οδηγεί σε γονιδιακή καταστολή. Εδώ βέβαια προκύπτει ένα βασικό βιολογικό ερώτημα και αφορά το γιατί μία συγκεκριμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση στρατολογεί πρωτεΐνες ανάγνωσης, οι οποίες άλλοτε είναι είτε ενεργοποιητές και άλλοτε κατασταλτικές. Διαφαίνεται ο μείζονος σημασίας ρόλος των DNA-προσδεδόμενων μεταγραφικών παραγόντων στην επιλογή και διάκριση μεταξύ ενεργοποίησης και καταστολής κατά τη διάρκεια της αρχικής πρόσδεσης. (Greer and Shi, 2012) (Berger, 2007)

Στην ίδια λογική συνδυαστικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να έχουν διακριτούς ρόλους σε σύγκριση με το όταν οι ίδιες τροποποιήσεις βρίσκονται μόνες τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η συνύπαρξη των H3K4me3 και H3K27me3 η οποία έχει ρόλο παύσης για την μεταγραφή. Η συνδυαστικές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες με πολλαπλά μοτίβα για να επηρεάσουν συγκεκριμένα αποτελέσματα. Έτσι ο ρυθμιστής TRIM24 έχει ένα PHD μοτίβο και ένα bromodomain μοτίβο τα οποία αναγνωρίζουν μεθυλιωμένη H3K4 και ακετυλιωμένη H3K23 στην ίδια ουρά ιστόνης. Αυτό υποδεικνύει ότι πρωτεΐνες με πολλαπλά μοτίβα αναγνώρισης ιστονών είναι τα κατεξοχήν υποψήφια μόρια για την ενσωμάτωση της πληροφορίας από πολλαπλές τροποποιήσεις ώστε να μεταφράσουν συγκεκριμένα βιολογικά αποτελέσματα. Στην περίπτωση της TRIM24 η πρόσδεση αυτή οδηγεί σε γονιδιακή ενεργοποίηση εξαρτώμενη από οιστρογόνα.

Η συνδυαστική δράση των μεθυλο-τροποποιητικών ενζύμων είναι επίσης σχετιζόμενη με το μοριακό περιβάλλον (context specific). Έχει παρατηρηθεί να συμβαίνει ταυτόχρονη προσθήκη ενεργοποιητικών μεθυλομάδων και αφαίρεση κατασταλτικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στα θηλαστικά είναι η H3K27 απομεθυλάση UTX η οποία έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με το H3K4 σύμπλεγμα μεθυλο-τρανσφεράσης MLL2-MLL3. Πιθανόν ο τρόπος δράσης να είναι το γεγονός ότι η

προσθήκη της ενεργοποιητικής H3K4me3 και η ταυτόχρονη αφαίρεση του κατασταλτικού H3K27me3 να επιτυγχάνει το βέλτιστο μεταγραφικό αποτέλεσμα. Κατά τον ίδιο τρόπο οι μεταγραφικοί παράγοντες που διαθέτουν T box μπορούν να φέρουν ταυτόχρονα την υπομονάδα του συμπλέγματος H3K4 μεθυλοτρανσφεράσης RBBP5 (RetinoBlastoma-Binding Protein 5) και της H3K27 από-μεθυλάσης JKJD3. Για επαρκή καταστολή, οι H3K4me3 απομεθυλάσες έχει δειχθεί να αλληλεπιδρούν με κατασταλτικές PcG πρωτεΐνες (οι οποίες δημιουργούν και προσδένονται σε H3K27me3) και με H3K9 μεθυλοτρανσφεράσες. Τέλος κάποια από αυτά τα κατασταλτικά συμπλέγματα διαθέτουν επίσης από-ακετυλάσες ιστονών, υποδηλώνοντας ότι η συντονισμένη και ταυτόχρονη μεθυλίωση και από-ακετυλίωση συμβαίνουν με στόχο την βέλτιστη αποδοτική καταστολή των γονιδίων στόχων. (Greer and Shi, 2012)

## **Επιγενετική και καρκινογένεση**

Όπως περιγράφηκε η έννοια της επιγενετικής, κατανοούμε ότι εάν ένας συγκεκριμένος συνδυασμός τροποποιήσεων της χρωματίνης πάνω στο γονιδίωμα χρησιμοποιείται για να καθορίσει και να διατηρήσει την εκάστοτε διαφοροποιημένη κατάσταση. Είναι λογικό επακόλουθο η απώλεια ή υπερ-παρουσία μίας τροποποίησης να προκαλέσει την από-διαφοροποίηση και τη δημιουργία ενός πλαστικού φαινοτύπου χαρακτηριστικού πολλών καρκίνων. Πράγματι τα τελευταία χρόνια διαφαίνεται ολοένα και περισσότερο ότι σχεδόν όλοι οι καρκίνοι έχουν επιγενετικές ανωμαλίες οι οποίες «συνεργάζονται» με τις γενετικές αλλαγές για να οδηγήσουν την καρκινογένεση. Αυτές οι ανωμαλίες παρουσιάζονται σαν μη φυσιολογικά μοτίβα τροποποιήσεων ιστονών και DNA μεθυλίωσης. Οι ανώμαλοι επιγενετικοί μηχανισμοί μπορούν να αφορούν τόσο καθολικές (global) αλλαγές στο πακετάρισμα της χρωματίνης όσο και αλλαγές σε τοπικό επίπεδο γονιδίων (gene specific) επηρεάζοντας την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων σε συγκεκριμένους υποκινητές. Ως αποτέλεσμα τα “καρκινο-ειδικά” επιγενετικά τοπία που προκύπτουν είναι σε αιτιολογική σχέση με τα αλλοιωμένα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης, το διαταραγμένο μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA, τη γενωμική αστάθεια (genomic instability) ή με τις αλλαγές στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, το οποίο τελικά οδηγεί σε ογκογόνο μετασχηματισμό (oncogenic transformation) και ανάπτυξη καρκίνου. Καρκινο-ειδικές αλλοιώσεις στα επιγενετικά πρότυπα χρωματινικών τροποποιήσεων έχουν αποδοθεί σε αλλοιωμένη έκφραση ή ενεργότητα (λόγω μεταλλαγών) πολλών χρωματο-τροποποιητικών ενζύμων, μεταξύ άλλων μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες. Περαιτέρω, αξίζει να σημειωθεί ότι τα τελευταία χρόνια διαφαίνεται ότι η ογκογόνος δράση της αλλοιωμένης έκφρασης ή ενεργότητας μεθυλοτρανσφερασών και απομεθυλασών δεν περιορίζεται μόνο στη δράση τους σε χρωματινικούς στόχους, αλλά και σε υποστρώματα που πολλές φορές δεν είναι ιστόνες, όπως μεταγραφικοί ρυθμιστές που παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού.

Παρακάτω συνοψίζονται σε τρεις πίνακες, Πίνακας 5, 6, 7 από (Sarris et al., 2014), οι μεθυλοτρανσφεράσες και απομεθυλάσες που αλλαγές στην έκφραση ή μεταλλαγές των οποίων έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται σε συγκεκριμένο τύπο καρκινογένεσης ο οποίος και αναφέρεται επίσης στον πίνακα.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον γεγονός σχετικά με το ρόλο των μεθυλοτρανσφερασών και απομεθυλασών είναι η κατανόηση έκφρασης του μηχανισμού με τον οποίο δρουν. Για πολλά από αυτά τα ένζυμα έχει παρατηρηθεί μία διττή και βιολογικά αντίθετη λειτουργία στην καρκινογένεση, η επιλογή της οποίας από τις δύο λειτουργίες στον καρκίνο καθορίζεται από το μοριακό περιβάλλον στο οποίο δρα εκάστοτε η πρωτεΐνη ένζυμο ή γενικότερα από τον κυτταρικό τύπο. Έτσι σε διαφορετικούς καρκίνους μία συγκεκριμένη μεθυλοτρανσφεράση μπορεί άλλοτε να δρα ως ογκογονική (oncogenic) ή ως ογκοκατασταλτική (tumor-suppressive).

gene	Histone target	Cancer type	abberation
<b>LSD1 (KDM1A)</b>	H3K4me1/2 H3K9me1/2	Breast cancer	downregulation
		Breast cancer	overexpression
		Bladder cancer	overexpression
		Prostate cancer	overexpression
		Colorectal cancer	overexpression
		small cell lung cancer	overexpression
		Neuroblastoma	overexpression
		Hepatocellular carcinoma (HCC)	low levels
<b>JHDM1B (KDM2B)</b>	H3K36me1/2 H3K4me3	brain glioblastomas multiform	downregulation
		lymphomas	overexpression
<b>JHDM1A (KDM2A)</b>	H3K36me2	Prostate cancer	downregulation
<b>JMJD1A (KDM3A)</b>	H3K9me1/2	Bladder & Lung cancer	overexpression
<b>JMJD2B (KDM4B)</b>	H3K36me2/3 H3K9me2/3	Gastric cancer	overexpression
<b>JMJD2C (KDM4C)</b>	H3K36me2/3 H3K9me2/3	Primary mediastinal B cell Lymphoma (PMBL), Hodgkin Lymphoma (HL)	amplification in 9p24 chromosomal band
		Prostate cancer	overexpression
		Desmoplastic Medulloblastomas (DMB)	genomic amplification
		Lung Sarcomatoid Carcinoma (LSC)	genomic amplification
<b>RBP2 (KDM5A)</b>	H3K4me2/3	Gastric cancer	overexpression
<b>JARID1B (KDM5B)</b>	H3K4me1/2/3	Prostate cancer	overexpression
		Breast cancer	overexpression
<b>JARID1C (KDM5C)</b>	H3K4me2/3	Renal cell carcinoma (ccRCC) ccRCC	inactivating mutations inactivating mutations
<b>UTX (KDM6A)</b>	H3K27me2/3	Multiple myeloma	inactivating mutations
		Esophageal squamous cell carcinomas	inactivating mutations
		ccRCC	inactivating mutations
<b>JMJD3 (KDM6B)</b>	H3K27me2/3	multiple tumors	inactivating mutations
		Prostate cancer	overexpression
		Hodgkin's Lymphoma	overexpression
		Lymphomas Leukemias and other cancers	downregulation

Πίνακας 5. Από (Sarris et al., 2014)

<b>TABLE1 Histone Methyltransferases (HMTs)</b>			
<b>gene</b>	<b>Histone target</b>	<b>Cancer type</b>	<b>aberration</b>
<b>MLL (KMT2A)</b>	H3K4me1/2/3	Leukemia (AML, ALL) AML	More than 50 MLL-fusions(:AF10, AF4, ELL, ENL among those) MLL-PTD (partial tandem duplications)
<b>MLL2 (KMT2D)</b>	H3K4me1/2/3	Medulloblastoma non Hodgkin lymphoma (NHL)	inactivating mutations inactivating mutations
<b>MLL3 (KMT2C)</b>	H3K4me1/2/3	Medulloblastoma	inactivating mutations
<b>EZH2 (KMT6)</b>	H3K27me2/3	B-cell lymphomas diffuse large B-cell lymphoma Myelo-neoplasms & myelofibrosis aggressive breast cancer Bladder tumor Prostate cancer  Melanoma Lymphomas Gastric cancer Hepatocellular carcinoma (HCC)	mutation A677 mutation Y641 mutations  overexpression overexpression overexpression; loss of miR101 ; gene amplification overexpression overexpression : loss of miR26a overexpression overexpression
<b>NSD1 (KMT3B)</b>	H3K36me1/2/3	AML Sotos syndrome Neuroblastoma & Gliomas cell lines	Nup98-NSD1 fusion and/or amplification Mutations downregulation : promoter CpG methylation
<b>NSD2 (MMSET)</b>	H3K36me1/2/3	colon lung bladder skin ovary prostate multiple myeloma multiple myeloma	Overexpression  translocation IgH-MMSET fusion
<b>NSD3</b>	H3K36me1/2	AML t(8;11)(p11.2;p15) Breast cancer	Nup98-NSD3 fusion loci amplification
<b>SETD2 (KMT3A)</b>	H3K36me1/2/3	Renal cell carcinoma (ccRCC)	inactivating mutations
<b>Suv39H2 (KMT1B)</b>	H3K9me2/3	B cell Lymphomas	knockout mice develop tumors
<b>GLP1 (KMT1D/ EHMT1)</b>	H3K9me1/2	Medulloblastoma	deletion ; downregulation
<b>G9a (KMT1C)</b>	H3K9me1/2	HCC	Overexpression
<b>SETDB1 (KMT1E)</b>	H3K9me2/3	Melanoma	amplification ; overexpression
<b>Smyd2 (KMT3C)</b>	H3K36me2 H3K4me	HCC , primary esophageal squamous cell carcinomas	Overexpression
<b>Smyd3 (KMT3E)</b>	H3K4me2/3 H4K20me3	HCC , colon cancer Breast cancer	Overexpression Overexpression
<b>Smyd4</b>		Medulloblastoma Breast cancer	Downregulation Downregulation
<b>PR-SET7 (KMT5A)</b>	H4K20me1	non-small cell lung carcinoma , small cell lung carcinoma	Overexpression
<b>DOT1L (KMT4)</b>	H3K79me1/2/3	Leukemia (AML,ALL) Leukemia (AML,ALL) T-ALL, AML	MLL-AF10 fusions : aberrant DOTL1 activity MLL-AF4 fusions : aberrant DOTL1 activity CALM-AF10 fusion : aberrant DOTL1 activity
<b>PRDM1</b>		Lymphoma	inactivating mutations & miR silencing
<b>PRDM2 (KMT8/RIZ1)</b>	H3K9me1/2/3	Breast cancer  Colorectal cancer Diffuse B-cell Lymphoma Gastric cancer HCC Lung Cancer Neuroblastoma	downregulation ; promoter methylation  frameshift mutations in PRDM2 gene KO mice ; missense mutations Frameshift mutations ; promoter methylation downregulation; promoter methylation downregulation downregulation
<b>PRDM5 (PFM2)</b>		Breast cancer Colorectal & gastric cancer HCC	downregulation ; promoter methylation downregulation ; promoter methylation downregulation ; promoter methylation
<b>PRDM12</b>		Chronic Myeloid Leukemia	9q microdeletions encompassing RRP14 & PRDM12
<b>PRDM14</b>		Breast cancer	overexpression

Πίνακας 6. Από (Sarris et al., 2014)

**TABLE 3** *Transcription factor methylases and demethylases*

HMT	HDM	Substrate	Effect	
Set9 (KMT7)		TAF10	Pol-II association, transcription activation	
		p53	Protein stabilization	
		NFκB	Protein degradation Promoter binding, activation	
		LSD1 (KDM1A)	Stat3	Repression of transcriptional activity
		LSD1	E2F1	Protein degradation
			Rb	HP1 interaction, transcription repression Prevention of Cdk-mediated phosphorylation
			ERα	Protein stabilization
			AR	Interdomain interaction, transcription activation
		LSD1	DNMT1	Protein degradation
			Sirt1	Unknown
	Foxo3		Inhibition of DNA binding, transactivation Protein degradation	
PR-SET7 (KMT5A)		P53	Repression of transcriptional activity	
Smyd2 (KMT3C)	LSD1	P53	Repression of transcriptional activity	
		Rb	LMBTL1 interaction, repression	
SetD6		NFκB	GLP interaction	
NSD1 (KMT3B)	FBXL11 (KDM2A)	NFκB	Increased transcriptional activity	
G9a (KMT1C)		MyoD	Repression of transcriptional activity	
		C/EBPβ	Repression of transcriptional activity	
		G9a	Interaction with HP1	
		P53	Inactivation of P53	
Suv39H1 (KMT1A)		PC2	ncRNA interaction, subnuclear repositioning	
EZH2 (KMT6)		RoRα	Protein degradation	

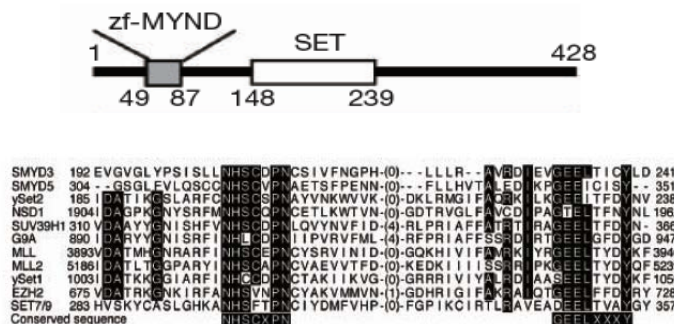
Πίνακας 7. Από (Sarris et al., 2014)

### Η πρωτεΐνη Smyd3

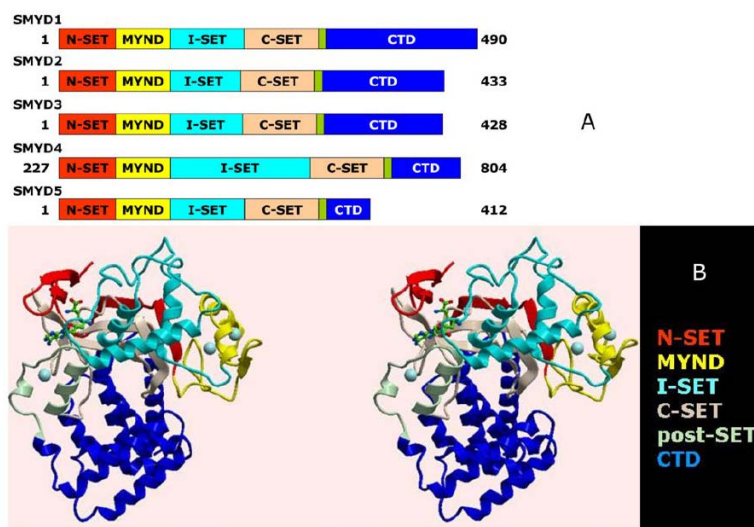
Το γονίδιο Smyd3 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1 τόσο στον άνθρωπο (*Homo sapiens*) όσο και στον ποντικό (*Mus musculus*). Σύμφωνα με τη βάση δεδομένων RefSeq στον άνθρωπο το γονίδιο αποτελείται από 12 εξώνια και έχουν χαρακτηριστεί 2 μεταγραφικές παραλλαγές (transcript variants), την επικρατούσα παραλλαγή που είναι και η μακρύτερη ισομορφή 1641 βάσεων (isoform 1) το οποίο κωδικοποιεί για την ολικού μήκους πρωτεΐνη (full length) των 428 αμινοξέων και την ισομορφή 2 η οποία λόγω ενός κάτωθι (downstream) TSS κωδικοποιεί για 369 αμινοξέων πρωτεΐνη η οποία είναι 100% όμοια με τα 60-428 αμινοξέα της ισομορφής 1. Στον ποντικό το γονίδιο αποτελείται από 12

εξώνια και δεν έχουν χαρακτηριστεί μεταγραφικές παραλλαγές σύμφωνα με βάση δεδομένων RefSeq. Το γονίδιο κωδικοποιεί για πρωτεΐνη 428 αμινοξέων.

Η πρωτεΐνη Smyd3 περιέχει ένα zf-MYND πρωτεϊνικό μοτίβο και ένα SET μοτίβο το οποίο είναι συντηρημένο σε πολλές μεθυλοτρανσφεράσες (MLL, EZH2, SET7/9, Smyd5 κ.α) και είναι το θεωρούμενο μοτίβο με ενεργότητα μεθυλίωσης. (Εικόνα 15). Η κρυσταλλική δομή της ανθρώπινης SMYD3 έχει χαρακτηριστεί (Εικόνα 16) (Foreman et al., 2011).



Εικόνα 15. Από (Hamamoto et al., 2004)



Εικόνα 16. Από (Foreman et al., 2011).

Η δομή της Smyd3 και τα μοτίβα της. A) Γραμμική αναπαράσταση των δομικών μοτίβων των Smyd1-5. B) Αναπαράσταση σε δομή μορφής κορδέλας της Smyd3 σε 1,85<sup>Å</sup> ανάλυση.

Η Smyd3 αναφέρθηκε πρώτη φορά σε μία δημοσίευση του 2004 στο περιοδικό Nature Cell Biology ως μία μεθυλοτρανσφεράση η οποία μεθυλιώνει την H3K4 παρουσία της πρωτεΐνης HSP90A (heat shock 90kDa protein 1) όπως έδειξαν σε πειράματα in vitro methylation με την οποία HSP90 και

αλληλεπιδρά σε HCT116 κύτταρα όπως δείχθηκε σε πειράματα συν-ανοσοκατακρήμισης. Σε ανεξάρτητη μάλιστα πιο πρόσφατη δημοσίευση, δείχθηκε ότι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με την HSP90 είναι το καρβοξυτελικό άκρο της Smyd3 και μάλιστα η αλληλεπίδραση αυτή βοηθά και τον υποκυτταρικό εντοπισμό της Smyd3 στον πυρήνα, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο ενισχύει την ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης (Brown et al., 2015). Παρουσιάζει ογκογόνο δράση σε πειράματα σχηματισμού αποικιών (colony formation assays) μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων (πειράματα μέτρησης πλασμιδίου αναφοράς Luciferase παρουσία και απουσία ενδογενούς Smyd3) μετά από πρόσδεση σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA στους υποκινητές των γονιδίων μαζί με την RNA Pol-II με την οποία και αλληλεπιδρά σε HCT116 κύτταρα. Σημαντικός είναι επίσης και ο υποκυτταρικός της εντοπισμός, όπου φέρεται να είναι κυτταροπλασματική κατά την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και εισέρχεται στον πυρήνα μόλις τα κύτταρα έμπαιναν στην S φάση. Όλα τα παραπάνω δείχθηκαν σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων ηπατοκαρκινικών κυττάρων Huh7 και HepG2 ενώ για τα πειράματα σχηματισμού αποικιών χρησιμοποιήθηκαν και κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων καρκίνου παχέως εντέρου .

Πέραν του HSP90 ως συνοδό-αλληλεπιδρούσα πρωτεΐνη της Smyd3 στις πυρηνικές και δη μεταγραφικές λειτουργίες, υπάρχει αναφορά ότι για τη μεταγραφική ενεργοποίηση καρκινικών γονιδίων (κυτταρικού πολλαπλασιασμού και εξάπλωσης) είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση του Smyd3 με τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή PC4 σε πειράματα συν-ανοσοκατακρήμισης σε κυτταροκαλλιέργειες (Kim et al., 2015).

Όσον αφορά το μηχανισμό ενεργοποίησης του Smyd3 στον καρκίνο υπάρχει αναφορά για αλληλόμορφο του γονίδιο αυτού στο οποίο ο υποκινητής περιέχει τρεις εν σειρά επαναλήψεις ενός E2F1-προσδεδεμένου στοιχείου και προσδίδει υψηλό κίνδυνο για καρκίνο. Έτσι αν και φαίνεται ότι το Smyd3 είναι στόχος κάτωθι του RB-E2F σηματοδοτικού μονοπατιού ο μηχανισμός αυτός αναφέρεται σε ένα μόνο συγκεκριμένο αλληλόμορφο του Smyd3 που εμφανίζεται σε κάποιους καρκίνους και δεν μπορεί να θεωρηθεί καθολικός. (Tsuge et al., 2005)

Περαιτέρω μελέτες ωστόσο προτείνουν ως στόχο της Smyd3 τη μεθυλίωση στο κατάλοιπο H4K5. Σε πειράματα *in vitro* μεθυλίωσης και αυτοραδιογραφίας ανεξάρτητης εργασίας, η Smyd3 μεθυλιώνει την ανασυνδυασμένη H4 ενώ τρεις καταλυτικά μεταλλαγμένες μορφές της Smyd3 (Smyd3F183A, Smyd3N205A και Smyd3Y239A) δεν κατάφεραν να τη μεθυλιώσουν. Όταν αναδιεταγμένα νουκλεοσώματα χρησιμοποιήθηκαν σαν υπόστρωμα, η Smyd3 μεθυλίωσε την ιστόνη H4 όπως ο θετικό μάρτυρας (SET8/PR-Set7) αλλά όχι άλλες ιστόνες (Van Aller et al., 2012), ενώ σε άλλη εργασία γίνεται αναφορά ότι η Smyd3 τρι-μεθυλιώνει την H4K20 (Foreman et al., 2011).

Η συσχέτιση της Smyd3 με την καρκινογένεση προέρχεται από αναφορές κατά τις οποίες η Smyd3 υπερ-εκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου στους ανθρώπους όπως ο καρκίνος του παχέως

εντέρου, το ηπατοκαρκίνωμα, ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του παγκρέατος. (Hamamoto, 2004 #11; Hamamoto, 2006 #13; Mazur, 2014 #14).

Περαιτέρω έχειδειχθεί ότι σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, η Smyd3 είναι απαραίτητη για την ρυθμιζόμενη από ER (Estrogen Receptor, μέλος της οικογένειας των nuclear receptors μεταγραφικών παραγόντων στους οποίους προσδένεται απευθείας ο προσδέτης (ligand)) μεταγραφή στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος από οιστρογόνα (Estrogen) και μάλιστα δρα σαν ένας συν-ενεργοποιητής της ER-επαγόμενης μεταγραφής, αλληλεπιδρώντας με τον ER και μεθυλιώνοντας ιστόνες στους πλησίον υποκινητές (proximal promoters) των ER στόχων γονιδίων (Kim, 2009 #15).

Περαιτέρω, σε ανάλογο ρόλο της Smyd3 στην μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω μεθυλίωσης ιστονών σε υποκινητές, έχει αναφερθεί και η ενεργοποίηση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP9 μετά από πρόσδεση της Smyd3 στον υποδοχέα της MMP9 σε HT1080 κύτταρα. Η ενζυμική δράση της MMP9 στον εξωκυττάριο χώρο συνεισφέρει τόσο στην ανάπτυξη καρκινωμάτων αυξάνοντας την κινητικότητα-διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων, όσο και στην μετάσταση (Cock-Rada et al., 2012).

Στον ρόλο της Smyd3 στην καρκινογένεση εκτός πυρηνικών δραστηριοτήτων έχει αναφερθεί η ενζυμική της δράση στην πρωτεΐνη VEGFR1, και συγκεκριμένα στο κατάλοιπο λυσίνης 831, χωρίς ωστόσο να δίνονται περισσότερες μηχανιστικές πληροφορίες για τον αντίκτυπο της μεθυλίωσης αυτής στην καρκινογένεση, παρά μόνο ότι η μεθυλίωση αυτή ενισχύει την ενεργότητα κινάσης της VEGFR1. (Kunizaki et al., 2007)

Σε αντίθεση με τις παραπάνω αναφορές, η πρώτη *in vivo* αναφορά για αιτιολογική σχέση της Smyd3 στην ανάπτυξη καρκίνου έγινε πρόσφατα σε δύο RAS-οδηγούμενους (το RAS θεωρείται πρωτο-ογκογονίδιο η υπερ-έκφραση του οποίου ως ογκογονίδιο είναι ικανή να δημιουργήσει όγκους σε μοντέλα ποντικών) καρκίνους του πνεύμονα και του παγκρέατος (Mazur et al., 2014). Στους καρκίνους αυτούς, η Smyd3 εντοπίζεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα των καρκινικών πνευμονικών και παγκρεατικών κυττάρων. Η κινάση MAP3K2 (η οποία αποτελεί σηματοδοτική πρωτεΐνη μονοπατιών μεταγωγής σήματος από αυξητικούς παράγοντες, τα οποία μονοπάτια είναι υπερ-ενεργά στον καρκίνο) χαρακτηρίστηκε ως η πρωταρχική κυτταροπλασματική πρωτεΐνη στόχος-υπόστρωμα μεθυλίωσης από την Smyd3, η οποία μεθυλίωση μπλόκαρε επίσης την αλληλεπίδραση με τη φωσφατάση PP2A. Η εξαρτώμενη από την Smyd3 «εξασθένιση» της παρεμποδιστικής από-φωσφορυλίωσης της MAP3K2 κινάσης έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος από το Kras στην ERK1/2 πρωτεΐνη (Mazur et al., 2014) εξηγώντας έτσι μοριακά τον μηχανισμό δράσης της Smyd3 στους συγκεκριμένους δύο τύπους καρκίνου.



Παρότι το παραπάνω μοντέλο παρείχε την πρώτη μηχανιστική ένδειξη σχετικά με τη λειτουργία της Smyd3 πρωτεΐνης στην καρκινογένεση, πολλά ευρήματα σε άλλους κυτταρικούς τύπους προτείνουν ότι η Smyd3 μπορεί επίσης να δρα μέσω ρύθμισης πυρηνικών διεργασιών. Πρώτον πέρα από το καταλυτικό SET μοτίβο της, η Smyd3 περιέχει ένα εξελικτικά συντηρημένο μοτίβο δάκτυλου ψευδαργύρου MYND, το οποίο μπορεί να προσδένει σε μία ειδική αλληλουχία DNA (Hamamoto et al., 2004). Δεύτερον, πειράματα προσωρινών επιμολύνσεων DNA σε HT1080 κυτταρική σειρά ινοσάρκωματος έδειξε ότι η Smyd3 στρατολογείται και ενεργοποιεί ανασυνδυασμένα πλασμίδια λουσιφεράσης υπό τον υποκινητή του MMP9 γονιδίου τα οποία έχουν ενθεθεί στο γονιδίωμα (Cock-Rada et al., 2012). Στρατολόγηση ομοίως έχει αναφερθεί και στον Nkx2.8 υποκινητή σε HEK293 κύτταρα και στον υποκινητή της μυστατίνης σε C2C12 μυοβλάστες (Hamamoto et al., 2004) (Proserpio et al., 2013). Περαιτέρω, η Smyd3 συν-ανοσοκατακρημνίζεται με πυρηνικές πρωτεΐνες όπως RNA πολυμεράση, RNA ελικάση και τον προσδεδεμένο υποδοχέα οιστρογόνου (ER) σε επιμολυσμένα HEK293 ή MC7 κύτταρα (Hamamoto et al., 2004), (Proserpio et al., 2013), (Kim et al., 2009). Αν και οι παραπάνω μηχανισμοί υποδεικνύουν ότι στις κυτταροκαλλιέργειες η Smyd3 μπορεί να δρα και στον πυρήνα, η συνεισφορά της πυρηνικής Smyd3 και η δυναμική αιτιολογική σχέση μεταξύ της αυξημένης πυρηνικής Smyd3 και της εξέλιξης του καρκίνου παραμένει να διευκρινιστεί.



## Σκοπός της Εργασίας

Προκειμένου να κατανοήσουμε το ρόλο της Smyd3 και να αποκτήσουμε περισσότερες πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης της πυρηνικής πρωτεΐνης στην καρκινογένεση *in vivo*, δημιουργήσαμε και μελετήσαμε ανασυνδυασμένα ποντίκια τα οποία τους λείπει η έκφραση του γονιδίου Smyd3 (Smyd3-KO (Knock Out)), τα οποία υποβλήθηκαν σε χημικά επαγόμενο καρκίνο του ήπατος και του παχέως εντέρου. Προκειμένου να αναγνωριστούν άμεσοι και έμμεσοι στόχοι δράσης του Smyd3, μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν φαινοτυπικές αλλαγές, καθολικά (global) μεταγραφικά προφίλ και χάρτες πρόσδεσης της Smyd3 καθολικά του γονιδιώματος.

Πιο αναλυτικά αρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

A) Ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός ποντικών με συστηματική έλλειψη έκφρασης του Smyd3 (Smyd3 Knock Out) και ποντικών που η Smyd3 υπερεκφράζεται ειδικά στο ήπαρ (Transgenic Smyd3) τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε συνθήκες επαγωγής χημικής καρκινογένεσης, προκειμένου να προσδιορισθεί με γενετική απόδειξη (genetic evidence) ο ρόλος του Smyd3 γονιδίου τόσο στην ανάπτυξη και φυσιολογία όσο και στην καρκινογένεση αντίστοιχα.

B) Η εύρεση μέσω βιολογικών υποθέσεων του βιολογικού μηχανισμού με τον οποίο η πρωτεΐνη Smyd3 συμμετέχει στην καρκινογένεση και πιο χαρακτηριστικό γνώρισμα της καρκινογένεσης (hallmark of cancer) επηρεάζει η λειτουργία της.

Γ) Ο πλήρης μοριακός χαρακτηρισμός των καρκινικών συκωτιών απουσία και παρουσία Smyd3 : i) σε επίπεδο μεταγραφώματος με μεθοδολογία RNA-seq και ii) σε επίπεδο καθολικής του γονιδιώματος (genome wide) εύρεσης της στρατολόγησης της Smyd3 σε γονίδια στόχους με ChIP-Seq (Chromatin Immunoprecipitation and Sequencing) ανάλυση.

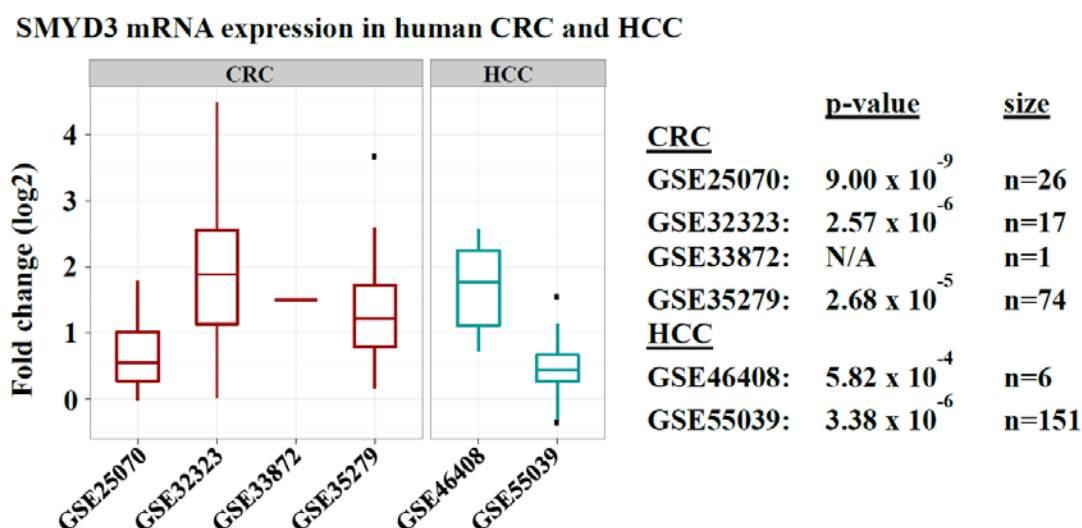
Δ) Οι μηχανιστικές μελέτες για κατανόηση του τρόπου επιλογής των γονιδίων στόχων από τη Smyd3.



## Αποτελέσματα

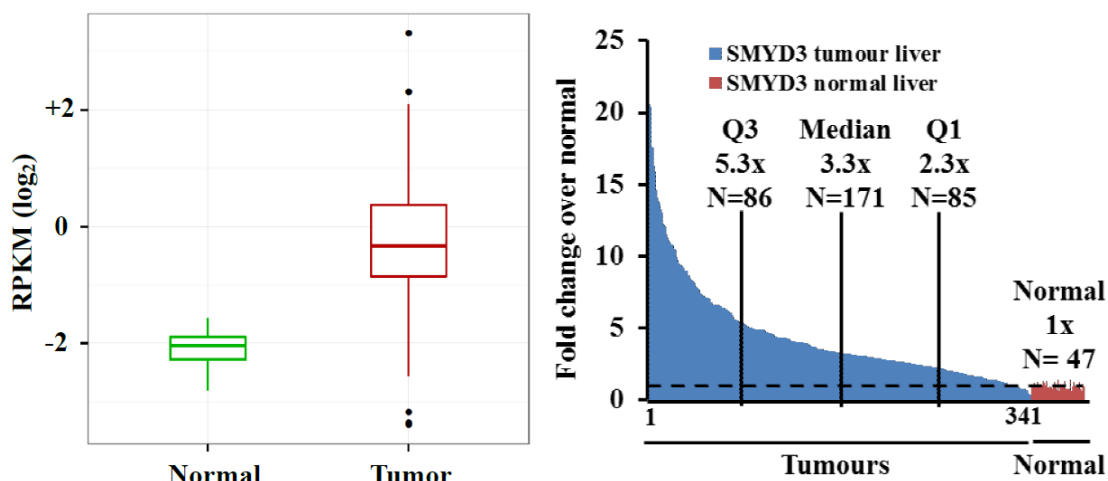
**Η απενεργοποίηση της Smyd3 προστατεύει έναντι της ανάπτυξης των χημικά επαγόμενων καρκίνων του ήπατος (HCC) και του παχέως εντέρου (CRC).**

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε προηγούμενες προτεινόμενες συσχετίσεις της έκφρασης της Smyd3 με το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα (HCC) και τον καρκίνο του παχέως εντέρου (CRC) (Hamamoto et al., 2004), αναλύσαμε τα mRNA επίπεδα της Smyd3 σε δημόσια διαθέσιμες τράπεζες δεδομένων από δύο γκρουπ γονιδιακής έκφρασης για ηπατοκαρκίνωμα και τέσσερα για καρκίνους του παχέως εντέρου, αντίστοιχα. Η δική μας μετα-ανάλυση έδειξε μία σημαντική αντιστοιχία μεταξύ της αυξημένης έκφρασης της Smyd3 και της εμφάνισης τόσο ηπατοκαρκινώματος όσο και καρκίνου του παχέως εντέρου (εικόνα 17).



Εικόνα 17 : Περίληψη των αλλαγών έκφρασης της Smyd3 σε έξι δημόσια διαθέσιμα γκρουπ δεδομένων από ασθενείς με καρκίνο του παχέως εντέρου (CRC) και ηπατοκαρκινώματος (HCC). Τα μεγέθη των δειγμάτων και τα p-values αναγράφονται στα δεξιά.

Περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων από βάσεις δεδομένων του The Cancer Genome Atlas (TCGA) επιβεβαίωσε τη θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της Smyd3 και της ανάπτυξης ηπατοκαρκινώματος. (Εικόνα 18)

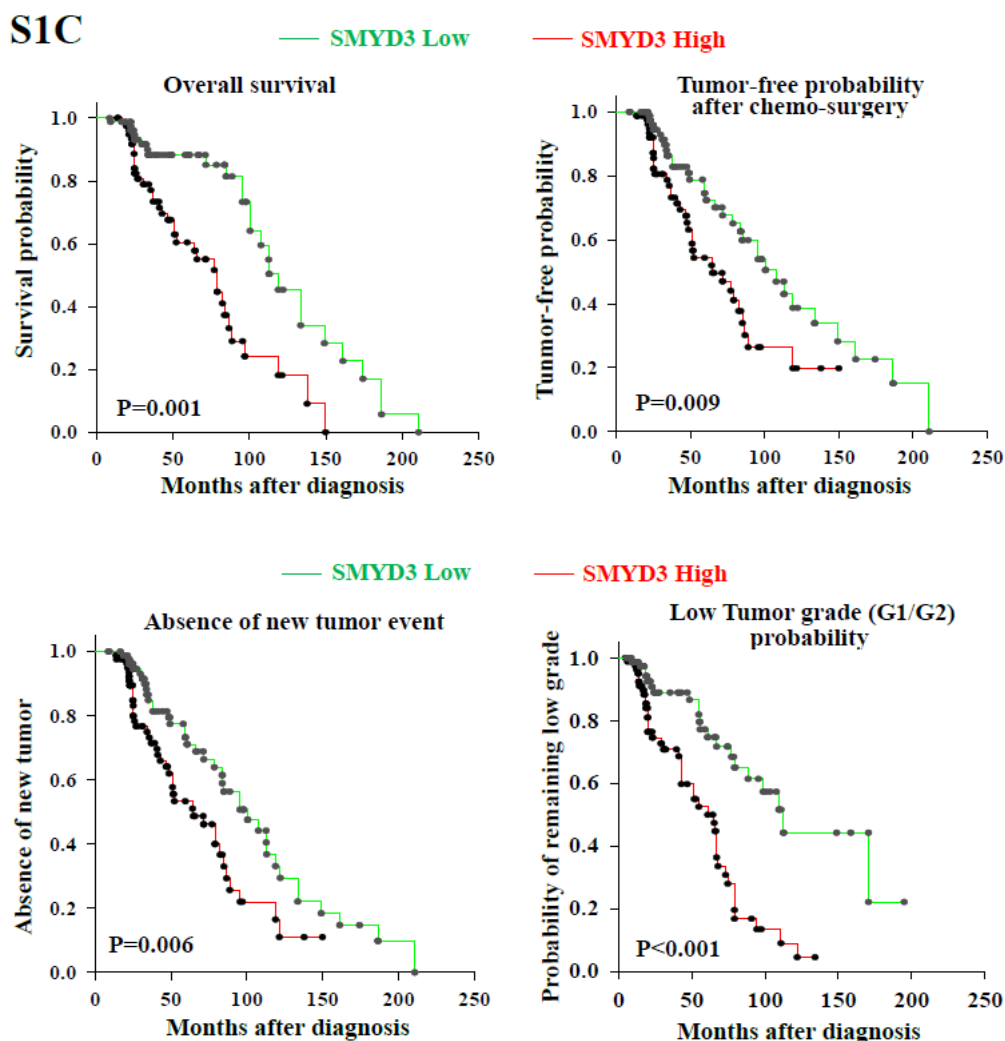


Εικόνα 18 . Η έκφραση της *Smyd3* σε ασθενείς με ηπατοκαρκίνωμα από την TCGA (The Cancer Genome Atlas) βάση δεδομένων.

Αριστερά : Σχετική έκφραση της *Smyd3* από βιοψίες με καρκίνους του ήπατος (κόκκινο,  $N=341$ ) και φυσιολογικούς ιστούς (πράσινο,  $N=47$ ). Τα mRNA δεδομένα έχουν εξαχθεί από RNA-seq μεθοδολογία και εκφράζονται σαν Reads Per Kilobase of Exons per Mbp (RPKM).

Δεξιά : Οι αλλαγές στην έκφραση της *Smyd3* υπολογίστηκαν βάση του μέσου όρου των 47 φυσιολογικών ιστών. Η ολική μέση διαφορά μεταξύ καρκινικών και φυσιολογικών δειγμάτων ήταν 3,3 φορές μεγαλύτερη όπως προκύπτει από την εφαρμογή τριών στατιστικών τεστ για RNA-seq δεδομένα (DESeq:  $p$ -value 0.00082, FDR: 0.00669, edgeR:  $p$ -value  $4.932 \times 10^{-33}$ , FDR:  $3.188 \times 10^{-31}$  και voom:  $p$ -value  $1.410 \times 10^{-23}$ , FDR  $5.772 \times 10^{-23}$ ). Για περαιτέρω ανάλυση χωρίσαμε τους ασθενείς σε 2 γκρουπ, ένα με υψηλή (Q3) και ένα με χαμηλή (Q1) *Smyd3* έκφραση. Οι 3 ομάδες (Q1, median, Q3) αναγράφονται μαζί με τις σχετικές διαφορές πάνω από τη μέση τιμή (διακεκομμένη γραμμή) των φυσιολογικών.

Ακόμα πιο σημαντική από την απλή συσχέτιση έκφρασης και εμφάνισης καρκίνου, ήταν η ανάλυση τύπου Kaplan-Meier για τα TCGA δεδομένα, η οποία αποκάλυψε ότι σε καρκίνους οι οποίοι εκφράζουν υψηλά επίπεδα *Smyd3* mRNA, η πιθανότητα της ολικής επιβίωσης μειώνεται και η πιθανότητα της επιβίωσης ως ασθενής χωρίς καρκίνο μετά από χημειοθεραπεία για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα μειώνεται επίσης (Εικόνα 19). Περαιτέρω η έκφραση της *Smyd3* συνδέεται με την πιθανότητα εμφάνισης νέων όγκων και την πιθανότητα μετάβασης σε υψηλής-διαφοροποίησης (high-grade) (G3/G4) καρκίνους σε ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. (Εικόνα 19).

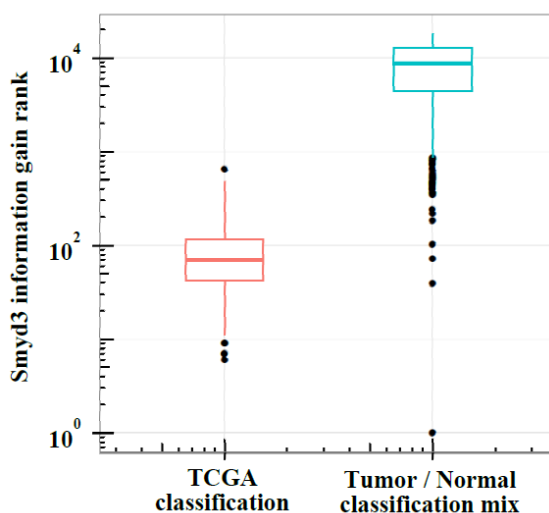


Εικόνα 19 : Αντιστοιχία της έκφρασης της *Smyd3* με κλινική πρόγνωση ηπατοκαρκινώματος.

Kaplan-Meier ανάλυση η οποία συγκρίνει τους ασθενείς με ηπατοκαρκίνωμα που έχουν υψηλή (γκρουπ Q3) και χαμηλή (γκρουπ Q1) έκφραση *Smyd3*. Το πάνω αριστερά γράφημα αποτυπώνει σημαντική διαφορά στην πιθανότητα ολικής επιβίωσης μεταξύ των δύο γκρουπ. Το πάνω δεξιά δείχνει ότι η πιθανότητα επιβίωσης ασθενών χωρίς καρκίνο (*tumor free*) για τον αντίστοιχο χρόνο μετά από χημειοθεραπεία και/η χειρουργείο είναι σημαντικά λιγότερη στο γκρουπ υψηλής έκφρασης (Q3) συγκρινόμενο με το γκρουπ χαμηλής έκφρασης. Στο κάτω αριστερά φαίνεται ότι η πιθανότητα της μη ανάπτυξης νέων όγκων εκτός του κυρίου όγκου είναι σημαντικά μεγαλύτερη στο γκρουπ χαμηλής έκφρασης (Q1). Κάτω δεξιά φαίνεται ότι η πιθανότητα παραμονής στο γκρουπ των ασθενών G1 η G2 grade και μη μετάβασης στο G3-G4 είναι πολύ μεγαλύτερη στο *Smyd3*-low γκρουπ.

Τα ευρήματα αυτά προτείνουν ότι η έκφραση της *Smyd3* στο ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα έχει προγνωστική αξία, η οποία περαιτέρω επιβεβαιώθηκε με την εξέταση της κατάταξης πληροφοριακού κέρδους (Information Gain Rank) της *Smyd3*. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 20, η διαχωριστική δύναμη της έκφρασης της *Smyd3* είναι δύο τάξεις μεγέθους ψηλότερη στην TCGA κατηγοριοποίηση συγκρινόμενη με την τυχαία καρκινική/φυσιολογική ανάμικτη κατηγοριοποίηση. Η ανάλυση απέδωσε μία μέση σειρά κατάταξης 69,5 +/- 49,5 για τη *Smyd3*, η οποία αντιστοιχεί στην κατάταξη

πληροφοριακού κέρδους της *Smyd3* (Information Gain value) για κατηγοριοποίηση του ηπατοκαρκινώματος σε ένα σύνολο 18000 ανθρώπινων γονιδίων.



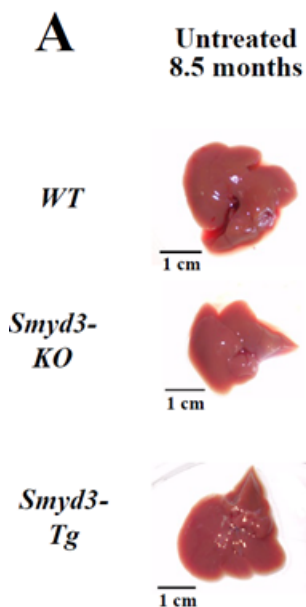
Εικόνα 20 : Εκτίμηση της διαχωριστικής δύναμης της έκφρασης της *Smyd3* σε καρκίνο του ήπατος. Γραφήματα τετραγώνων της κατάταξης της *Smyd3* σε κατάταξης πληροφοριακού κέρδους (Information Gain ( $\log_2$ )) με τις γνήσιες-τυχαίες και τις κατευθυνόμενες καρκινικές/φυσιολογικές TCGA κατηγοριοποιήσεις. Η μέτρηση της κατάταξης πληροφοριακού κέρδους (Information Gain) υπολογίστηκε σαν ένα σετ περίπου 18000 ανθρώπινων γονιδίων τα οποία φιλτραρίστηκαν για χαμηλή έκφραση και χαμηλή μεταβλητότητα μεταξύ ανθρώπινων δειγμάτων με ηπατοκαρκίνωμα και για φυσιολογικά, από το The Cancer Genome Atlas. Ο υπολογισμός πραγματοποιήθηκε 1000 φορές χρησιμοποιώντας τα 47 φυσιολογικά δείγματα και τυχαία υποδείγματα 100 δειγμάτων με καρκίνο, αποδίδοντας μία κατανομή των *Smyd3* κατατάξεων από το 6 μέχρι το 641 με μία μέση  $\pm$  MAD 69.5  $\pm$  49.7 (αριστερό τετράγωνο). Η κατάταξη βάση γονιδίων είναι απλά η θέση του κάθε γονιδίου όταν οι τιμές της κατάταξης πληροφοριακού κέρδους ταξινομούνται από το μεγαλύτερο στο μικρότερο, αποτυπώνοντας τη συνεισφορά κάθε γονιδίου στο διαχωρισμό του καρκινικού έναντι του φυσιολογικού δείγματος. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε 10 φορές ανταλλάσσοντας την φυσιολογική/καρκινική αντιστοιχία με τα TCGA προφίλ γονιδιακής έκφρασης ώστε να αξιολογηθεί η σημασία της *Smyd3* κατάταξης στη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών δειγμάτων. Στην τυχαία (φυσιολογική/καρκινική ανταλλαγή) περίπτωση, η κατάταξη της *Smyd3* (ως μέσο όρο 10 επαναλήψεων) ποικίλε από το 1 μέχρι το 18018 με μέσο  $\pm$  MAD rank of 8699  $\pm$  6334.4 (δεξιό τετράγωνο). Οι δύο κατανομές διαφέρουν σημαντικά με την *Smyd3* να κατατάσσεται στα πιο υψηλά γονίδια στην αρχική TCGA κατηγοριοποίηση (Mann-Whitney και Kolmogorov-Smirnov tests  $p$ -values  $< 10^{-9}$ ).

Προκειμένου να διερευνήσουμε μία δυναμική αιτιολογική σχέση μεταξύ της *Smyd3* υπερέκφρασης και του καρκίνου του ήπατος και του παχέως εντέρου, αναλύσαμε την ανάπτυξη χημειοεπαγόμενων καρκίνων σε ποντίκια φυσιολογικού τύπου (wild type – **WT**), ποντίκια στα οποία η έκφραση του *Smyd3* γονιδίου απουσιάζει (*Smyd3* Knock Out – ***Smyd3-KO***) καθώς και σε ποντίκια στα οποία η *Smyd3* υπερεκφράζεται στο ήπαρ (Transgenic *Smyd3* – ***TgSmyd3***). Ο μηχανισμός ανάπτυξης

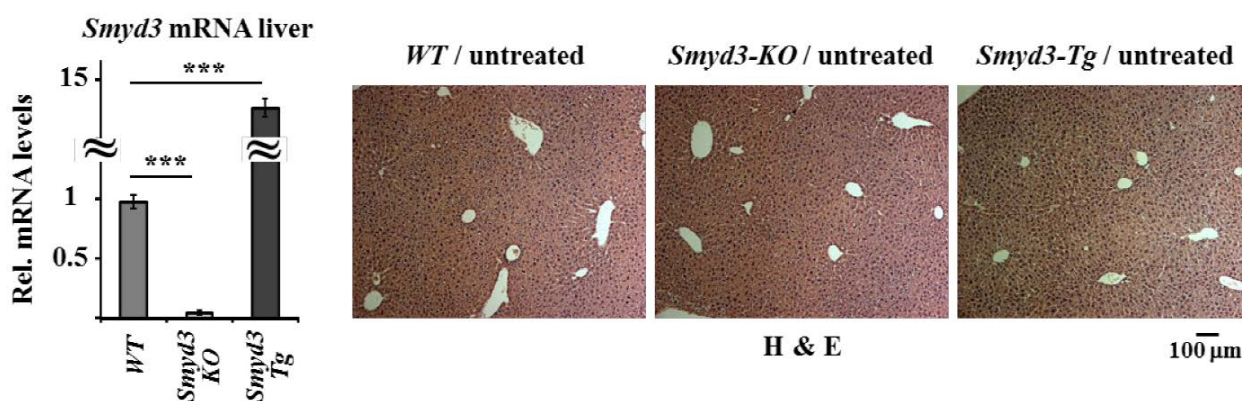


καρκινωμάτων με τα χημειοεπαγόμενα αυτά μοντέλα προσομοιάζει τους μηχανισμούς ανάπτυξης του ανθρώπινου καρκίνου του ήπατος και του παχέως εντέρου.

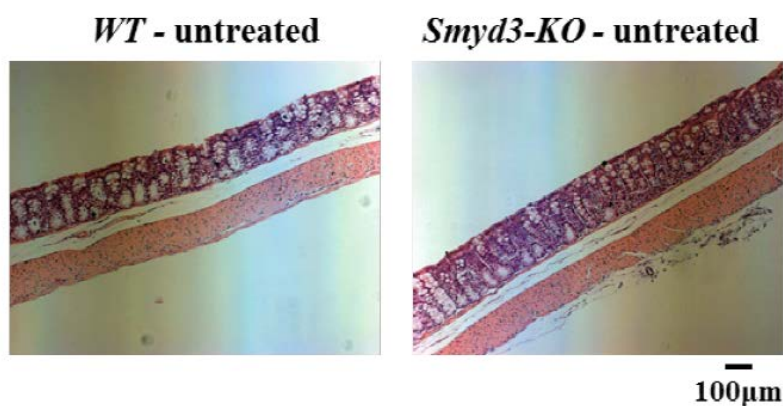
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, δεν μπορέσαμε να διακρίνουμε καμία μακροσκοπική ή ιστολογική διαφορά, υποδηλώνοντας ότι η *Smyd3* δεν είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του ήπατος και του παχέως εντέρου. (εικόνες 21, 22, 23)



Εικόνα 21 : Μακροσκοπική εμφάνιση των συκωτιών *WT*, *Smyd3-KO* και *Smyd3-Tg* ποντικών υπό φυσιολογικές συνθήκες.

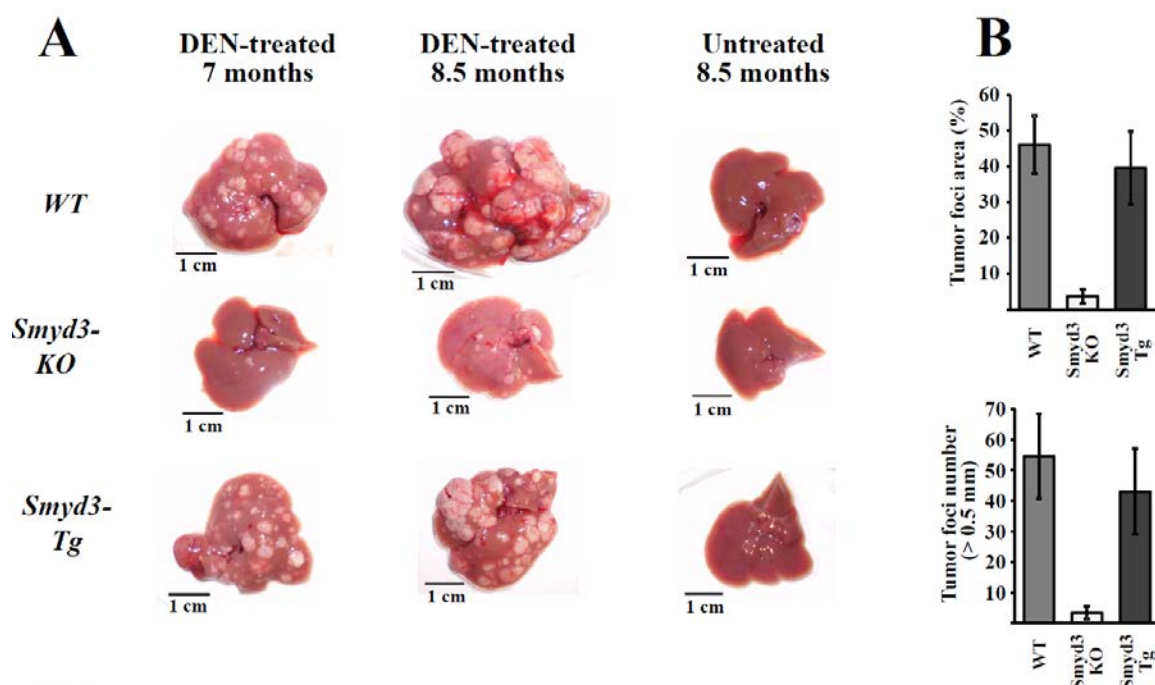


Εικόνα 22 : Επίπεδα του *Smyd3* mRNA σε *WT*, *Smyd3-KO* και *Tg-Smyd3* ποντίκια. Αντιπροσωπευτική χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης συκωτιών σε φυσιολογικά ποντίκια 8,5 μηνών από *WT*, *Smyd3-KO* και *Smyd3-Tg* γονότυπο.

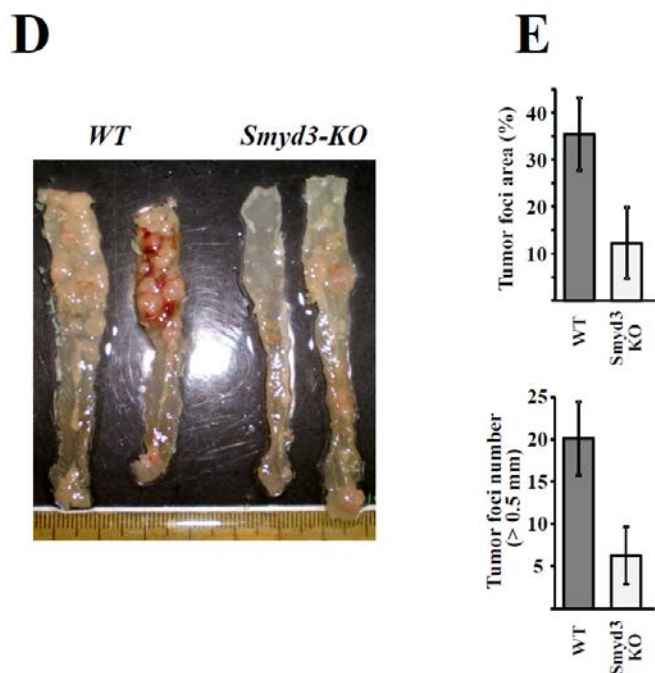


Εικόνα 23 : Αντιπροσωπευτική χρώση εωσίνης-αιματοξυλίνης παχέως εντέρου σε φυσιολογικά ποντίκια 2 μηνών από WT και Smyd3-KO γονότυπο.

Ωστόσο όταν τα ποντίκια υποβλήθηκαν σε αγωγή με diethylnitrosamine (DEN) ή 1,2-dimethylhydrazine/dextran sodium sulfate (DMH/DSS) προκειμένου να προκληθεί καρκίνος του ήπατος ή παχέως εντέρου αντίστοιχα, παρατηρήσαμε μία δραματική διαφορά στην ικανότητα ανάπτυξης καρκίνου. Μακροσκοπική εξέταση αποκάλυψε μία σημαντική μείωση στον αριθμό και το μέγεθος των καρκινικών εστιών στα Smyd3-KO συκώτια και παχέα έντερα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα αγρίου τύπου (WT) (Εικόνες 24, 25) .

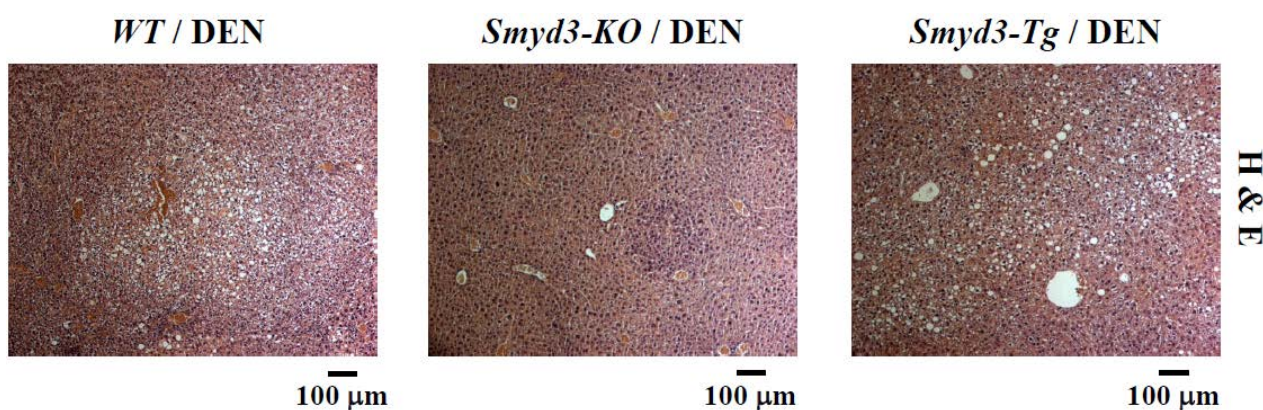


Εικόνα 24 : Μακροσκοπική εμφάνιση συκωτιών 7 και 8,5 μηνών από ποντίκια (WT), Smyd3-KO και Smyd3-Tg που έχουν υποβληθεί σε DEN. Δεξιά φαίνεται η ποσοτικοποίηση του αριθμού και του μεγέθους των καρκινικών εστιών με τα τυπικά σφάλματα όπως παρατηρήθηκαν από 12 ποντίκια.



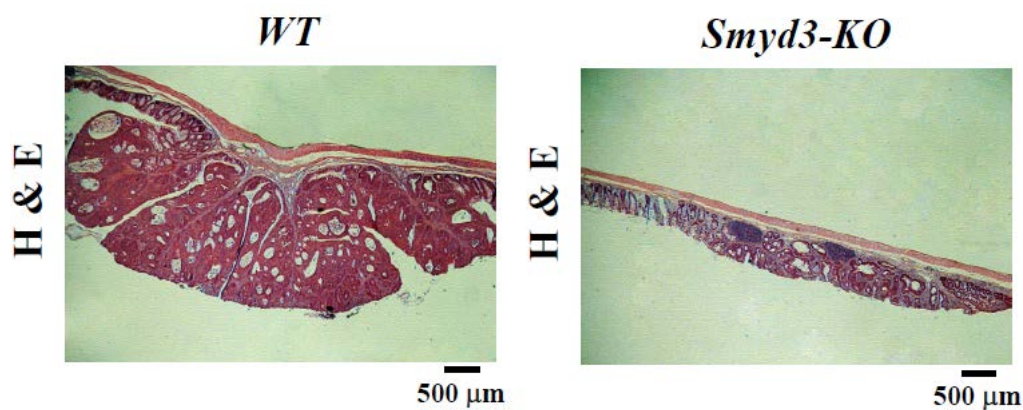
Εικόνα 25 : Μακροσκοπική εμφάνιση παχέων εντέρων από ποντίκια *WT* και *Smyd3-KO* που έχουν υποβληθεί σε *DMH/DSS* αγωγή. Δεξιά φαίνεται η ποσοτικοποίηση του αριθμού και του μεγέθους των καρκινικών εστιών με τα τυπικά σφάλματα όπως παρατηρήθηκαν από 9 ποντίκια.

Μόνο μερικές εστιακές κομβώδεις υπερπλαστικές περιοχές παρατηρήθηκαν σε ιστολογικές τομές συκωτιών από τα *DEN* επαγόμενα *Smyd3-KO* ποντίκια. Σε αντίθεση, τα συκώτια των *DEN* επαγόμενων *WT* ποντικών είχαν αναπτύξει πολλά και μεγάλα καρκινικά foci με γνωρίσματα ηπατοκαρκινώματος όπως κατεστραμμένους πυλαίους αγωγούς, μη φυσιολογικές δοκκίδες (irregular trabeculae), συχνές μιτωτικές ατράκτους (frequent mitotic figures) και κύτταρα με μη τυπικούς πυρήνες (nuclear atypia), κυτταροπλασματική διαφάνεια (cytoplasmic clearance) και αυξημένη συσσώρευση ιοσινόφιλων (Εικόνα 26).



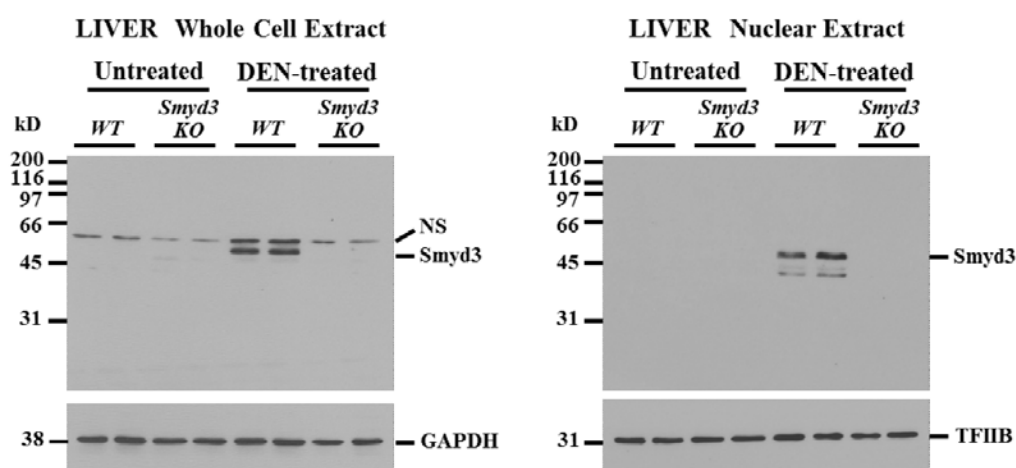
Εικόνα 26 : Αντιπροσωπευτικές χρώσεις εωσίνης-αιματοξυλίνης σε τομές συκωτιών από επαγόμενα με *DEN* 8,5 μγρών *WT*, *Smyd3-KO* και *Smyd3-Tg* ποντίκια.

Στα έντερα των DMH/DSS επαγόμενων *Smyd3*-KO ποντικών ανιχνεύτηκαν κυρίως μικρές εστίες με γνωρίσματα σωληνοειδών αδενωμάτων, ενώ τα αντίστοιχα έντερα των WT είχαν πολλά υψηλής βαθμίδας δυσπλαστικά καρκινικά σημεία, τα οποία συχνά μάλιστα εισέβαλαν το βλεννογόνο στρώμα, κάτι το οποίο χαρακτηρίζει τα μέτρια διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα. (Εικόνα 27)



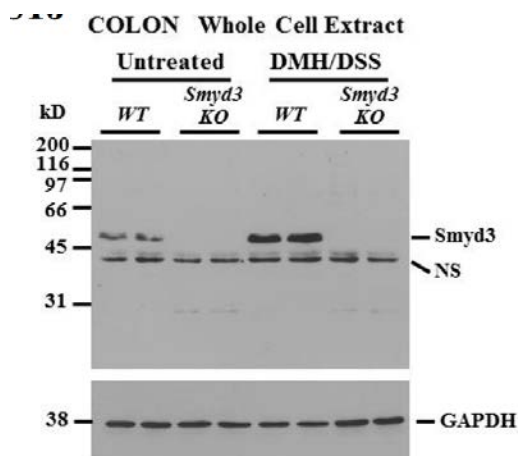
Εικόνα 27 : Αντιπροσωπευτικές χρώσεις εωσίνης-αιματοξυλίνης παχέων εντέρων WT και *Smyd3*-KO ποντικών που υποβλήθηκαν σε DMH/DSS .

Όπως αναμενόταν, η έκφραση της *Smyd3* αυξάνεται τόσο στους υπό μελέτη καρκίνους του ήπατος όσο και του εντέρου (Εικόνες 28, 29) . Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της *Smyd3* δεν είναι ανιχνεύσιμα με το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα στο συκώτι, ωστόσο αυξήθηκαν στο καρκινικό DEN-επαγόμενο ήπαρ σε επίπεδα που το έκαναν ανιχνεύσιμο τόσο σε εκχυλίσματα ολικών κυττάρων όσο και σε πυρηνικά εκχυλίσματα, υποδεικνύοντας μάλιστα για ρόλους της *Smyd3* εντός του πυρήνα (Εικόνες 28, 30).

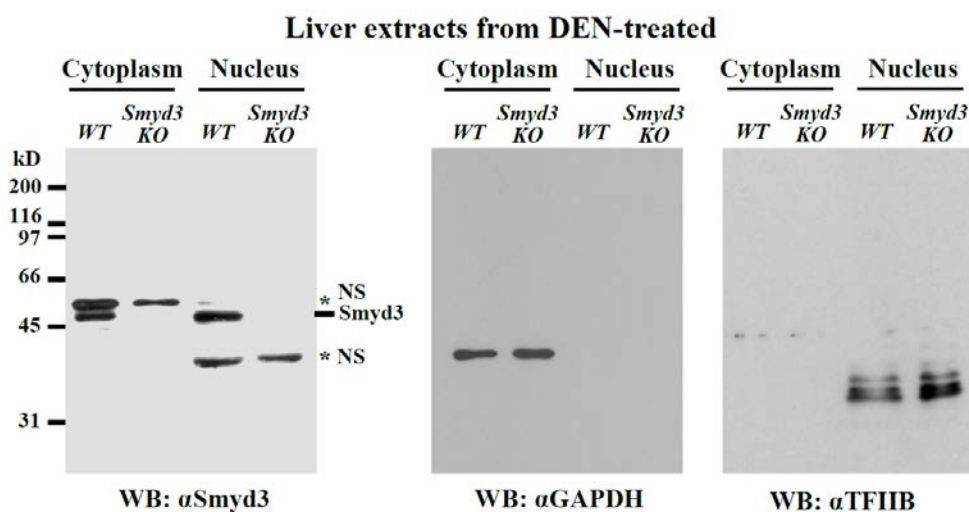


Εικόνα 28 : Western Blot ανάλυση ολικών κυτταρικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από συκώτια 8,5 μηνών από WT και *Smyd3*-KO ποντίκια με *Smyd3* αντίσωμα. Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι των GAPDH και TFIIIB. NS: μη ειδική μπάντα





Εικόνα 29 : Western Blot ανάλυση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από το έντερο φυσιολογικών και DMH/DSS επαγόμενων ποντικών με Smyd3 και GAPDH αντισώματα. NS: μη-ειδική μπάντα.



Εικόνα 30 : Western Blot ανάλυση κυτταροπλασματικών και πυρηνικών εκχυλισμάτων από συκώτια DEN επαγόμενων ποντικών, με το Smyd3 αντίσωμα. Σαν μάρτυρες, αντισώματα έναντι των GAPDH και TFIIIB χρησιμοποιήθηκαν. NS: μη-ειδική μπάντα.

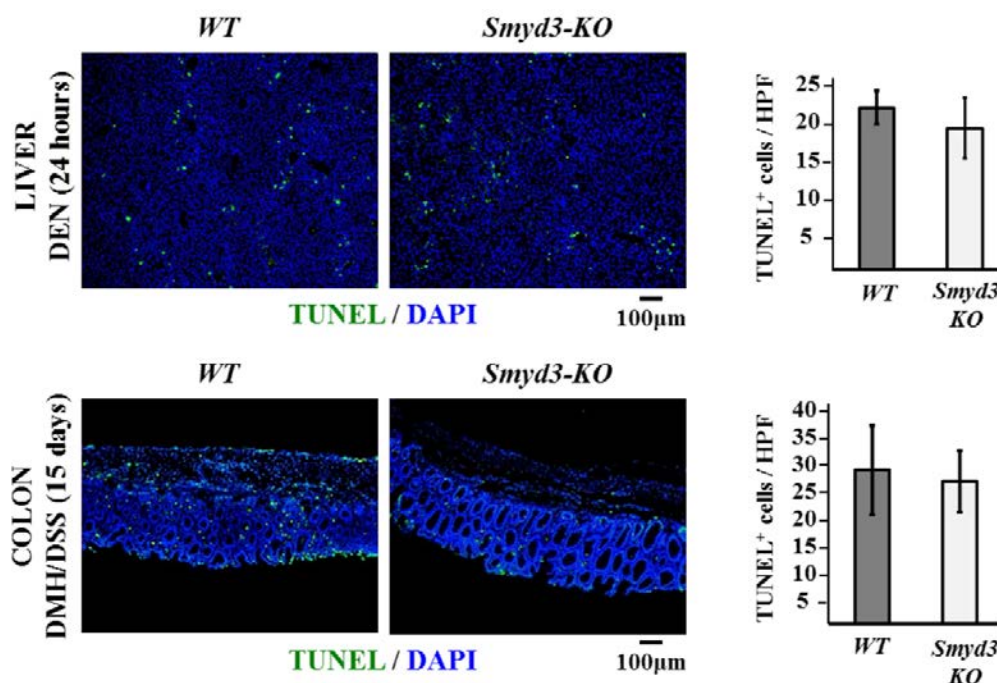
Η αύξηση στην έκφραση της Smyd3 και στους δύο καρκινικούς ιστούς και η ανάγκη της λειτουργίας της για την καρκινογένεση, γέννησε το ερώτημα εάν η Smyd3 δρα σαν ένα αυτόνομο ογκογονίδιο το οποίο μπορεί από μόνο του να προκαλέσει καρκινογένεση. Η αρνητική απάντηση στο σενάριο αυτό έρχεται από το γεγονός ότι τα διαγονιδιακά ποντίκια (Tg-Smyd3), τα οποία υπερ-εκφράζουν το Smyd3 συνεχώς στα ηπατοκύτταρα, δεν αναπτύσσουν «αυθόρμητα» (spontaneous) καρκινώματα στο ήπαρ (Εικόνες 21, 22 παραπάνω).

Περαιτέρω, δεν μπορούσαμε να ανιχνεύσουμε σημαντικές διαφορές μεταξύ των DEN επαγόμενων WT και Smyd3-Tg ποντικών, στον αριθμό των καρκινικών εστιών καθώς και στο μέγεθός τους, υποδηλώνοντας ότι η χρόνια υπερέκφραση της Smyd3 δεν ευαισθητοποιεί τα κύτταρα για την DEN-επαγόμενη ηπατοκαρκινογένεση (Εικόνες 24, 26 παραπάνω).

Συνοπτικά λοιπόν, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η έκφραση της *Smyd3* είναι απολύτως απαραίτητη για τη χημειοεπαγόμενη καρκινογένεση του ήπατος και του παχέως εντέρου αλλά δεν είναι ικανή να τις επάγει.

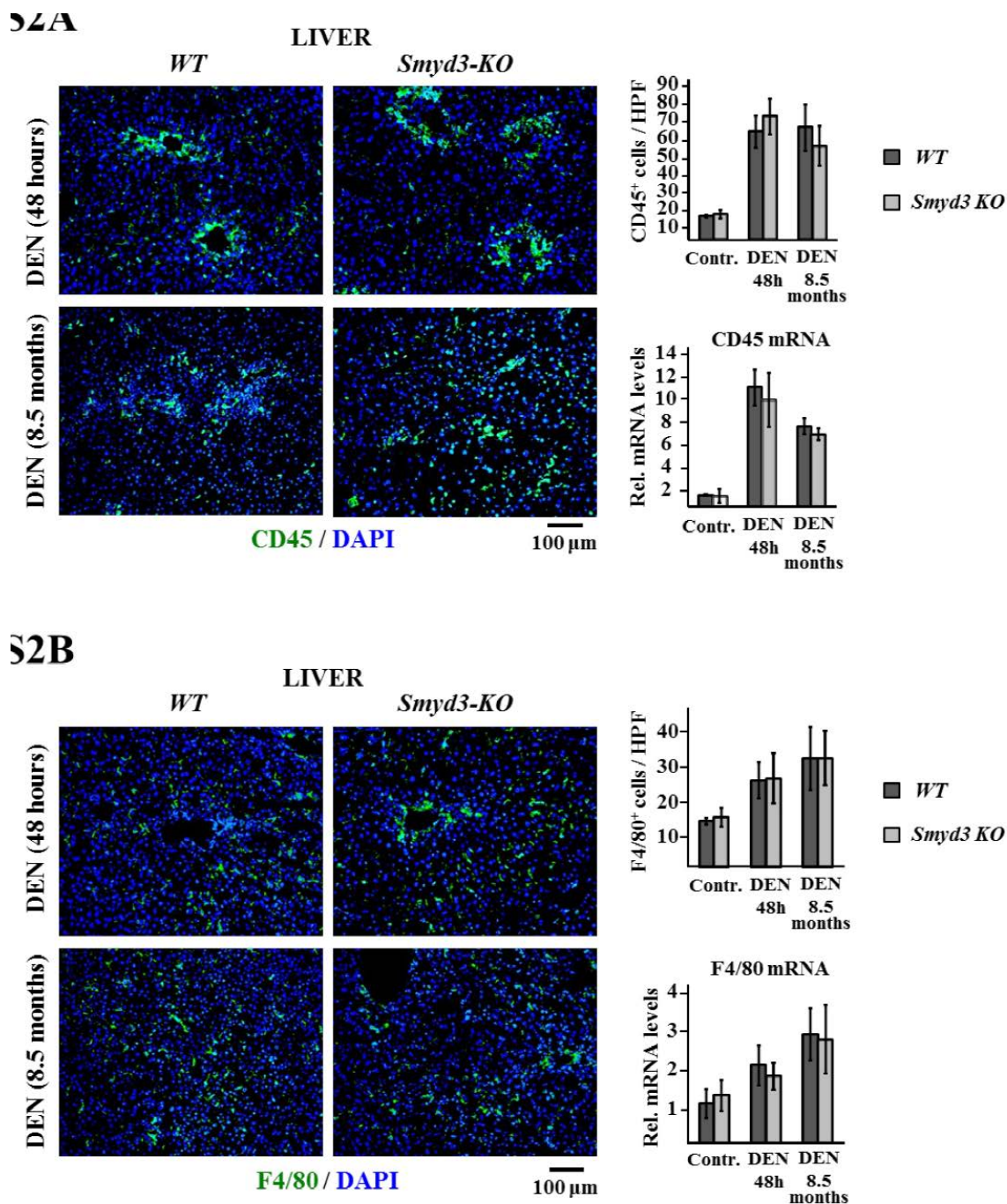
**Η *Smyd3* δεν είναι απαραίτητη για τον επαγόμενο από το καρκινογόνο, κυτταρικό θάνατο και φλεγμονή, ωστόσο χρειάζεται για τον αντισταθμιστικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό (compensatory cell proliferation).**

Η παθογένεση τόσο του DEN-επαγόμενου όσο και του DMH/DSS επαγόμενου καρκίνου, ξεκινά με πρόκληση βλαβών στο DNA οι οποίες βλάβες οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, ο οποίος οδηγεί σε στρατολόγηση κυττάρων του ανοσοποιητικού ως απόκριση και ως εκ τούτου χρόνια φλεγμονή. Ακολουθεί αντισταθμιστικός κυτταρικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων που απέφυγαν την απόπτωση ως απόκριση στα αυξητικά σήματα που παράγονται από το μικροπεριβάλλον (Maeda et al., 2005; Verna et al., 1996) (Kohno et al., 2005). Υποθέσαμε ότι η παρεμπόδιση αυτών των πρώτων βιολογικών γεγονότων, θα μπορούσε να εξηγήσει την μεγάλη μείωση στην καρκινογένεση τόσο του ήπατος όσο και του εντέρου στα *Smyd3*-KO ποντίκια. Ωστόσο όπως βλέπουμε στην Εικόνα 31 ανιχνεύσαμε έναν παρόμοιο αριθμό αποπτωτικών κυττάρων στα DEN-επαγόμενα συκώτια και τα DMH/DSS επαγόμενα έντερα των WT και *Smyd3*-KO ποντικών (Εικόνα 31).



Εικόνα 31 : Δύο μηνών WT και *Smyd3*-KO ποντίκια υποβλήθηκαν σε 100mg/kg DEN ή DMH/DSS όπως περιγράφονται στις Μεθόδους, και θυσιάστηκαν μετά από 24 ώρες (DEN) ή 15 μέρες (DMH/DSS). Τα αποπτωτικά κύτταρα τόσο στο ήπαρ όσο και στο έντερο εκτιμήθηκαν με χρώση TUNEL. Η ποσοτικοποίηση έγινε μετρώντας 10 πεδία σε 3 διαφορετικά ποντίκια.

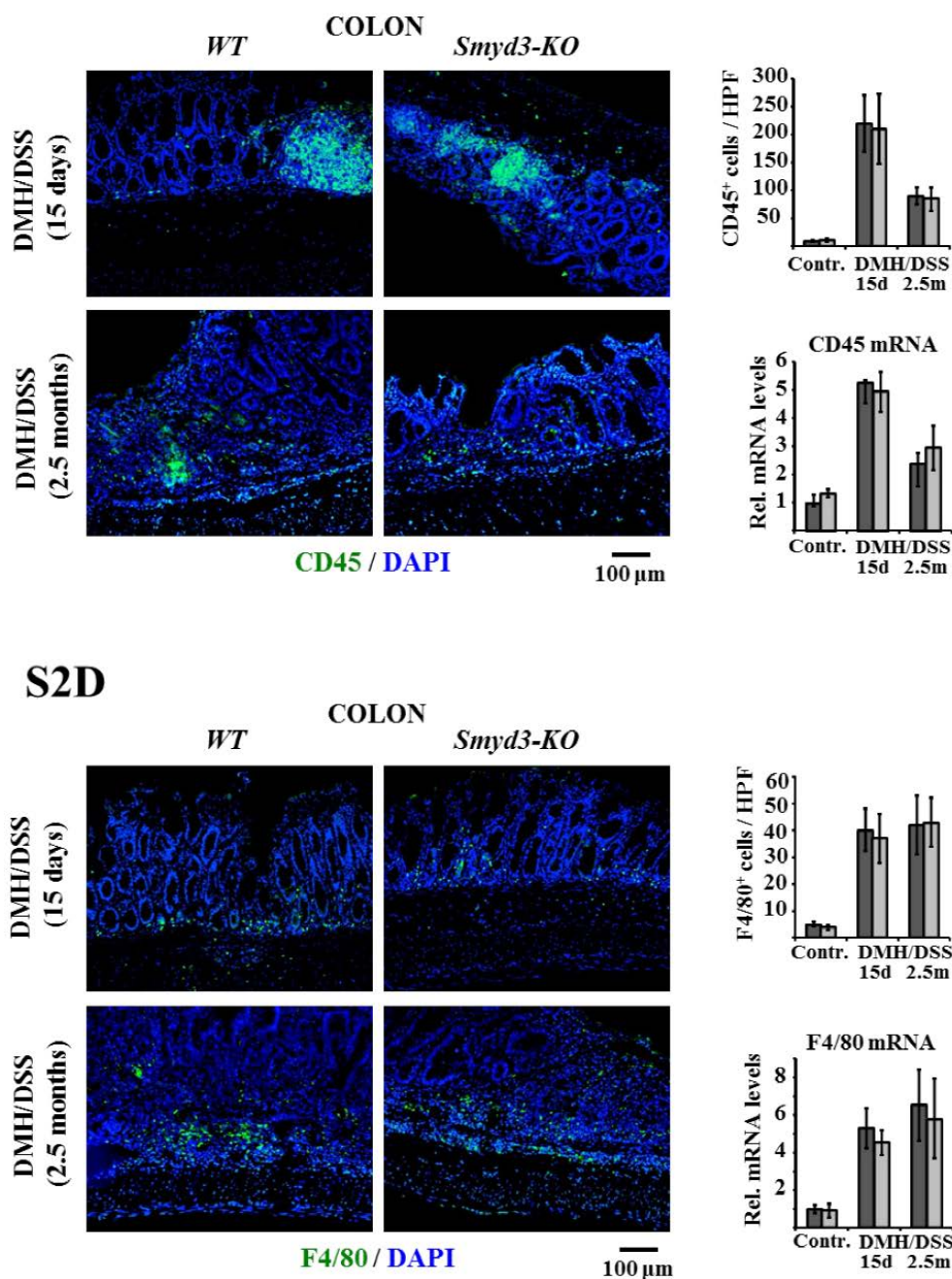
Περαιτέρω ανοσοϊστολογική ανάλυση φθορισμού για μακροφάγα (F4/80) και λεμφοκύτταρα (CD45) καθώς και ανάλυση των mRNA επιπέδων τους, αποκάλυψε έναν παρόμοιο βαθμό διεύσδυσης κυττάρων φλεγμονής στα συκώτια και τα έντερα των WT και των *Smyd3*-KO ποντικών τα οποία υποβλήθηκαν σε DEN για 48 ώρες και 8,5 μήνες ή DMH/DSS για 15 μέρες και 2,5 μήνες αντίστοιχα (Εικόνες 32, 33).



Εικόνα 32 : 2 μηνών WT και *Smyd3*-KO ποντίκια υποβλήθηκαν σε 100mg/kg DEN και θυσιαστήκαν 48 ώρες αργότερα όταν πλήρη οξεία φλεγμονή μπορεί να παρατηρηθεί. Παράλληλα, 2 εβδομάδων ποντίκια υποβλήθηκαν σε DEN και θυσιάστηκαν 8.5 μήνες αργότερα (χρόνια φλεγμονή). Τομές ήπατος και από τα δύο πρωτόκολλα βάφτηκαν με ανοσοϊστοχημεία φθορισμού για CD45 και F4/80. Η ποσοτικοποίηση έγινε μετρώντας 10 πεδία σε 3 διαφορετικά



ποντίκια. Τα επίπεδα mRNA των CD45 και F4/80 καθορίστηκαν επίσης με RT-PCR. Δεδομένα από 5 ποντίκια παρουσιάζονται στο γράφημα.

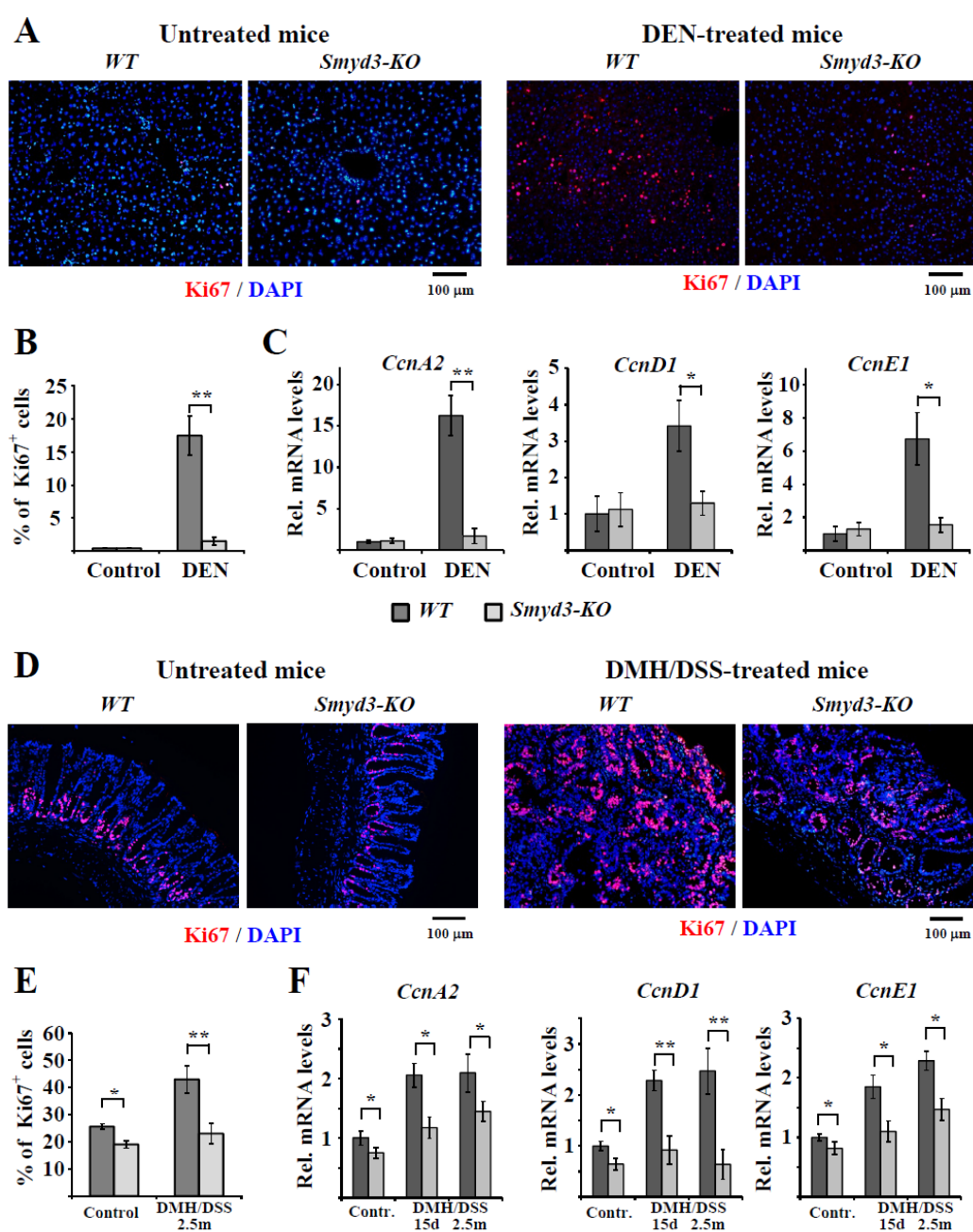


Εικόνα 33 : 2 μηνών *WT* και *Smyd3-KO* ποντίκια υποβλήθηκαν σε *DMH/DSS* και θυσιαστήκαν 15 μέρες αργότερα (οξεία φλεγμονή) και 2,5μήνες αργότερα (χρόνια φλεγμονή). Τομές εντέρου βάφτηκαν με ανοσοϊστοχημεία φορισμού για *CD45* και *F4/80*. Η ποσοτικοποίηση έγινε μετρώντας 10 πεδία σε 3 διαφορετικά ποντίκια. Τα επίπεδα mRNA των *CD45* και *F4/80* καθορίστηκαν επίσης με *RT-PCR*. Δεδομένα από 5 ποντίκια παρουσιάζονται στο γράφημα.

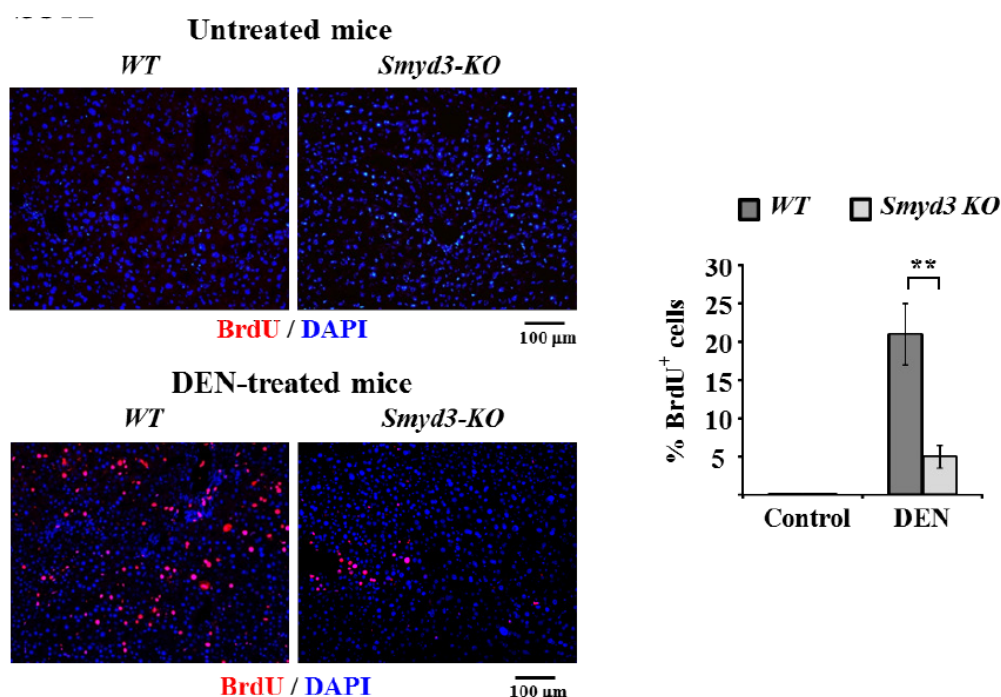


Συνεπώς προκύπτει ότι η μεγάλη μείωση στο σχηματισμό καρκίνων στα συκώτια και το έντερο των *Smyd3*-KO ποντικών, δεν οφείλεται σε κάποια επίδραση της *Smyd3* στον κυτταρικό θάνατο ή/και στην συσχετιζόμενη οξεία ή χρόνια φλεγμονή.

Σε συμφωνία με την μεγάλη μείωση στην εμφάνιση καρκινωμάτων στα DEN- και DMH/DSS-επαγόμενα συκώτια και παχέα έντερα αντίστοιχα *Smyd3*-KO ποντικών, παρατηρήσαμε σημαντικά μειωμένους αριθμούς πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων με χρώση ανοσοϊστοχημείας φθορισμού για Ki67 (μάρτυρας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού) ή και BrdU χρώσης (Εικόνα 34, 35) . Περαιτέρω, τα mRNA επίπεδα γονιδίων κυκλινών, *CcnA2*, *CcnD1* και *CcnE1* στα WT ποντίκια αυξήθηκαν σημαντικά και στους δύο ιστούς μετά από την επαγωγή της καρκινογένεσης, σε αντίθεση με τα *Smyd3*-KO ποντίκια, όπου μόνο πολύ μικρές διαφορές ανιχνεύτηκαν (Εικόνα 34).



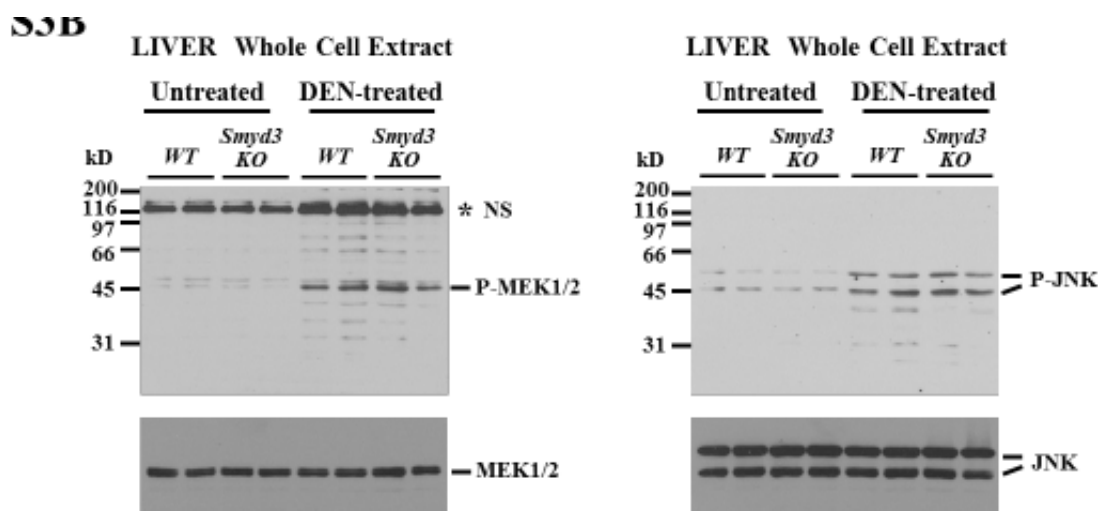
Εικόνα 34 : Η *Smyd3* είναι απαραίτητη για την κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα DEN-επαγόμενα συκώτια και τα DMH/DSS επαγόμενα έντερα. Α) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστολογίας φθορισμού τομών συκωτιών από 8,5 μηνών φυσιολογικά και DEN-επαγόμενα WT και *Smyd3*-KO ποντίκια με Ki67 αντίσωμα. Β) Ποσοτικοποίηση των Ki67 θετικών κυττάρων. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τα μέσα ποσοστά και τα SEM των κυττάρων που είναι θετικά για τα Ki67 έναντι όλων των κυττάρων (βάση DAPI). Η ποσοτικοποίηση έγινε μετρώντας 10 πεδία σε 3 διαφορετικά ποντίκια. Γ) Ανάλυση RT-PCR των *Cyclin A2* (*CcnA2*), *Cyclin D1* (*CcnD1*) και *Cyclin E1* (*CcnE1*) mRNA επιπέδων στα συκώτια 8.5 μηνών φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων ποντικών. Οι μπάρες αναπαριστούν τα μέσα mRNA επίπεδα ομαλοποιημένων με τα *GABDH* mRNA επίπεδα και SEM από δείγματα 5 ξεχωριστών ποντικών. ( $n=5$ ) \*  $p$ -value  $<0.01$ ; \*\*  $p$ -value  $<0.001$ . Δ) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ανοσοϊστολογίας φθορισμού τομών εντέρων από 2,5 μηνών φυσιολογικά και DMH/DSS επαγόμενα WT και *Smyd3*-KO ποντίκια με Ki67 αντίσωμα. Ε) Ποσοτικοποίηση των Ki67 θετικών κυττάρων όπως το Β. Ε) Ανάλυση RT-PCR των *Cyclin A2* (*CcnA2*), *Cyclin D1* (*CcnD1*) και *Cyclin E1* (*CcnE1*) mRNA επιπέδων στα έντερα φυσιολογικών και DMH/DSS επαγόμενων ποντικών. Οι μπάρες αναπαριστούν τα μέσα mRNA επίπεδα ομαλοποιημένων με τα *GABDH* mRNA επίπεδα και SEM από δείγματα 5 ξεχωριστών ποντικών. ( $n=5$ ) \*  $p$ -value  $<0.01$ ; \*\*  $p$ -value  $<0.001$ .



Εικόνα 35 : 8.5 μηνών φυσιολογικά και DEN-επαγόμενα WT και *Smyd3*-KO ποντίκια ενέθηκαν ενδοπεριτοναϊκά με 1mg/kg 5' Bromo-2' deoxyuridine (BrdU) 2 ώρες πριν θυσιαστούν. Η ενσωματωμένη BrdU ανιχνεύτηκε με ανοσοϊστοχημεία φθορισμού σε κρυστομές χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα για την against BrdU. Η ποσοτικοποίηση των BrdU-θετικών κυττάρων σε 10 HPFs τομών από 3 ποντίκια φαίνεται στα δεξιά.

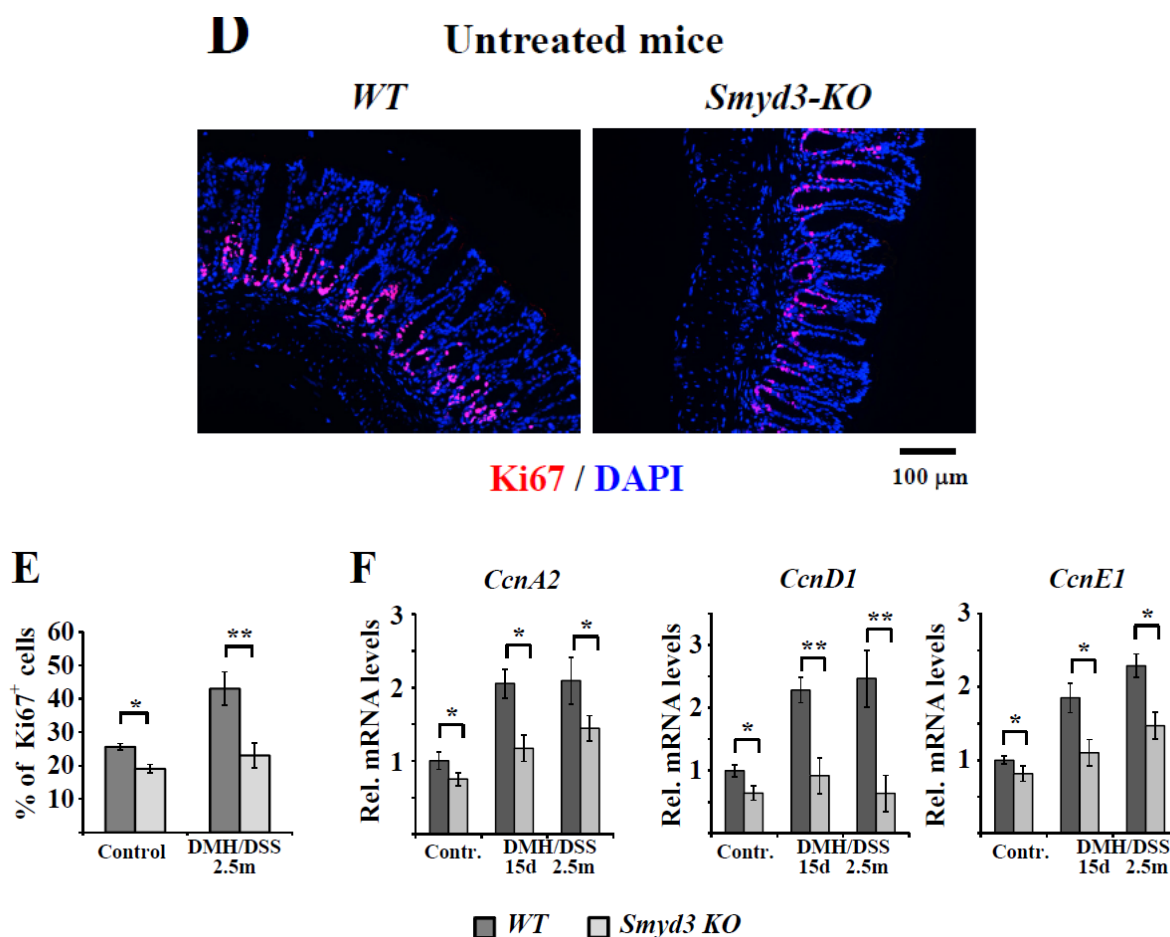
Για να κατανοήσουμε τον μηχανισμό του ελαττωματικού πολλαπλασιαστικού φαινοτύπου, σε πρώτη φάση εξετάσαμε την ενεργοποίηση των MEK1/2 και JNK, δύο κάτωθι στόχων του MAP3K2 για μοντέλα καρκινογένεσης του παγκρέατος και του πνεύμονα όπως περιγράφηκε και στην εισαγωγή (Mazur et al., 2014). Ανάλυση Western Blot με αντισώματα για phospho-MEK1/2 και phospho-JNK

(τις ενεργές σηματοδοτικά μορφές των πρωτεϊνών αυτών) αποκάλυψε παρόμοια επίπεδα ενεργοποίησης και για τις δύο κινάσες στα συκώτια τόσο των DEN-επαγόμενων WT όσο και των DEN-επαγόμενων *Smyd3*-KO ποντικών (Εικόνα 36), υποδεικνύοντας ότι η προστατευτική δράση της έλλειψης της *Smyd3* στην καρκινογένεση των συκωτιών δεν δρομολογείται μέσω της ρύθμισης της λειτουργίας της MAP3K2.



Εικόνα 36 : Western blot ανάλυση σε εκχυλίσματα συκωτιού από φυσιολογικά και DEN-επαγόμενα WT και *Smyd3*-KO ποντίκια, χρησιμοποιώντας αντισώματα για MEK1/2, JNK, phospho-MEK1/2 (P-MEK1/2) και phospho-JNK (P-JNK) αντισώματα. NS: μη-ειδική μάλιστα

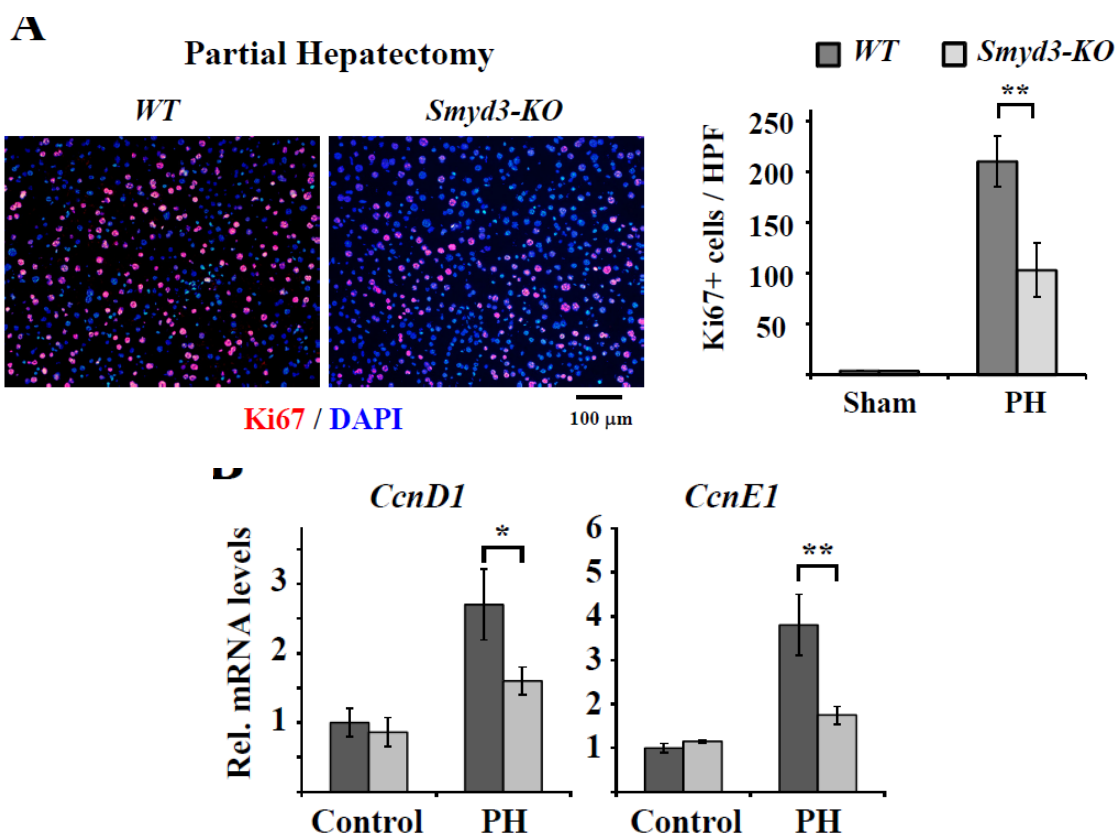
Οι διαφορετικές αποκρίσεις στην ικανότητα καρκινογένεσης οι οποίες παρατηρούνται στα WT και *Smyd3*-KO ποντίκια μπορεί να είναι λόγω μίας «έμφυτης» ανάγκης της λειτουργίας της *Smyd3* στο φυσιολογικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ένδειξη αυτής της υπόθεσης αποτελεί η παρατήρηση σημαντικά μειωμένων Ki67 θετικών κυττάρων και μειωμένων *CcnA2*, *CcnD1* και *CcnE1* mRNA επιπέδων στα έντερα των φυσιολογικών *Smyd3*-KO ποντικών, τα οποία έντερα περιέχουν έναν ενεργά πολλαπλασιαζόμενο πληθυσμό κυττάρων στη βάση των κρυπτών (crypts). (Εικόνα 37).



Εικόνα 37. Πάνω: Αντιπροσωπευτική ανοσοϊστολογική χρώση φθορισμού τομών παχέως εντέρου από φυσιολογικά *WT* και *Smyd3-KO* ποντίκια με αντίσωμα για Ki67.

Κάτω: Ποσοτικοποίηση των θετικών Ki67 κυττάρων και RT-PCR ανάλυση των *Cyclin A2* (*CcnA2*), *Cyclin D1* (*CcnD1*) και *Cyclin E1* (*CcnE1*) mRNA επιπέδων αντίστοιχων ποντικών ( $n=5$ ).

Περαιτέρω συλλέχθηκαν στοιχεία από δεδομένα δύο διαφορετικών μοντέλων αναγέννησης του ήπατος. Τα κύρια κύτταρα του ήπατος, τα ηπατοκύτταρα, δεν πολλαπλασιάζονται και είναι «παγωμένα» στη Go φάση του κυτταρικού κύκλου. Κατόπιν ωστόσο, είτε αφαίρεσης του σημαντικότερου μέρους του ήπατος, είτε τραυματισμού αυτού με χημικό τρόπο, το συκώτι έχει τη δυνατότητα ανάπλασης μέσω έναρξης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ηπατοκυττάρων και ως εκ τούτου εξόδου από την Go φάση. Έτσι λοιπόν 48 ώρες μετά από ηπατεκτομή των 2/3 του ήπατος, όταν η πλειοψηφία των ηπατοκυττάρων έχουν εισέλθει στην S-φάση, τα συκώτια των *Smyd3-KO* ποντικών περιείχαν σημαντικά λιγότερα Ki67 θετικά κύτταρα από τα αντίστοιχα *WT* (Εικόνα 38). Επιπλέον τα mRNA επίπεδα των *CcnD1* και *CcnE1* στα *Smyd3-KO* ποντίκια δεν αυξήθηκαν στον ίδιο βαθμό με τα αναπλασμένα συκώτια των *WT* ποντικών (Εικόνα 38).

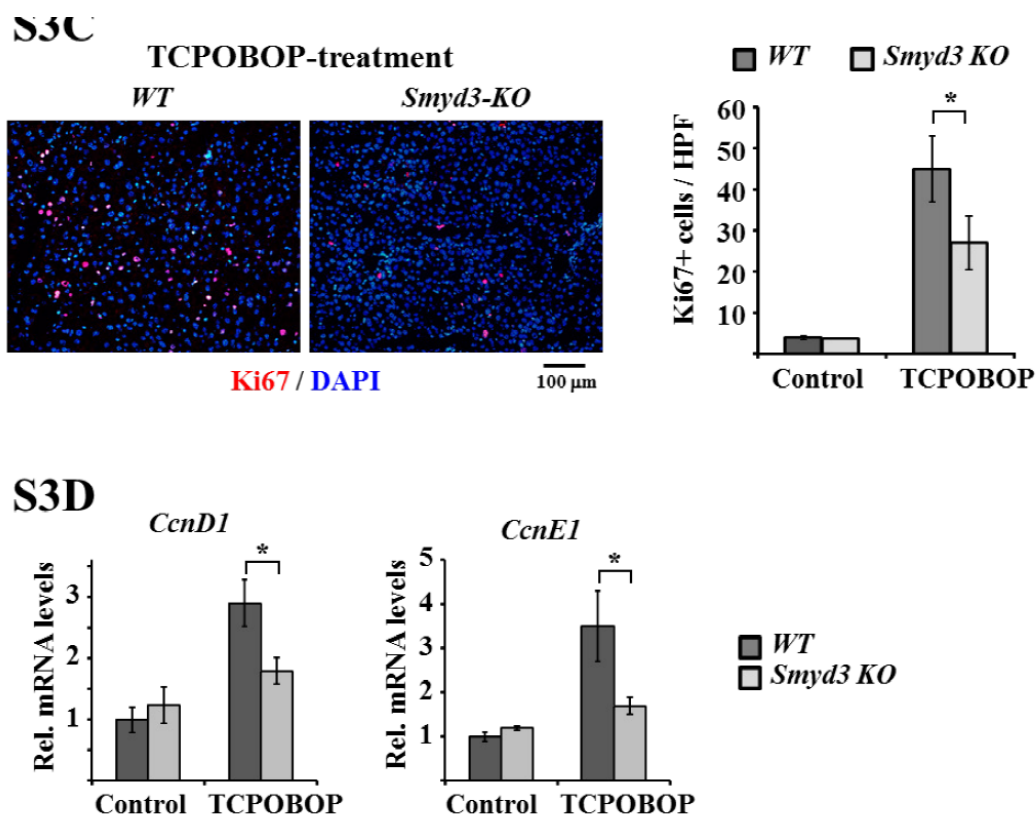


Εικόνα 38. Πάνω: Αντιπροσωπευτική ανοσοϊστολογική χρώση φθορισμού τομών ήπατος μετά από 48 ώρες από 2/3 ηπατεκτομής (PH) σε WT και *Smyd3-KO* ποντίκια με αντίσωμα για Ki67. Ποσοτικοποίηση των θετικών Ki67 κυττάρων. Κάτω: RT-PCR ανάλυση των *Cyclin D1* (*CcnD1*) και *Cyclin E1* (*CcnE1*) mRNA επιπέδων αντίστοιχων ποντικών ( $n=4$ )

Παρόμοιες διαφορές παρατηρήθηκαν και όταν ο πολλαπλασιασμός των ηπατοκυττάρων προκλήθηκε με επαγωγή με το μιτογόνο 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene (TCPOBOP), αγωνιστή του υποδοχέα androstane (Qatanani et al., 2005) (Εικόνα 39).

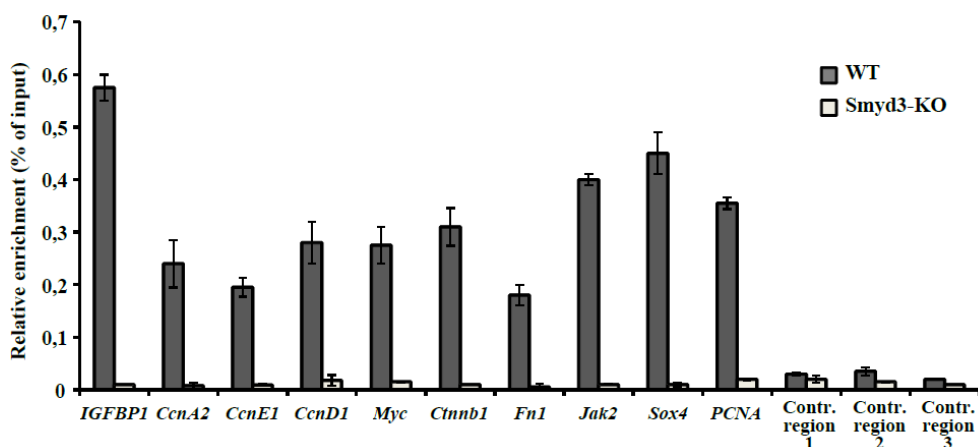
Η ανίχνευση της *Smyd3* πρωτεΐνης στον πυρήνα των DEN-επαγόμενων καρκινικών ηπατοκυττάρων, γέννησε την ιδέα ότι η *Smyd3* μπορεί να δρα σαν ένας άμεσος ρυθμιστής των γονιδίων που ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η ανάλυση με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) για τη *Smyd3* αποκάλυψε ότι στα DEN-επαγόμενα ηπατοκαρκινώματα η *Smyd3* στρατολογείται στην περιοχή των υποκινητών (promoter) πολλών γονιδίων ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου όπως *CcnA2*, *CcnE1*, *CcnD1*, *PCNA* και *IGFBP1* (Εικόνες 40, 41). Η παρατήρηση αυτή παράλληλα με το γεγονός ότι στα συκώτια με έλλειψη *Smyd3* τα mRNA αυτών των γονιδίων στόχων δεν ενεργοποιούνται κατόπιν επαγωγής με DEN, προτείνει ότι η λειτουργία της *Smyd3* είναι σημαντική για την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης.



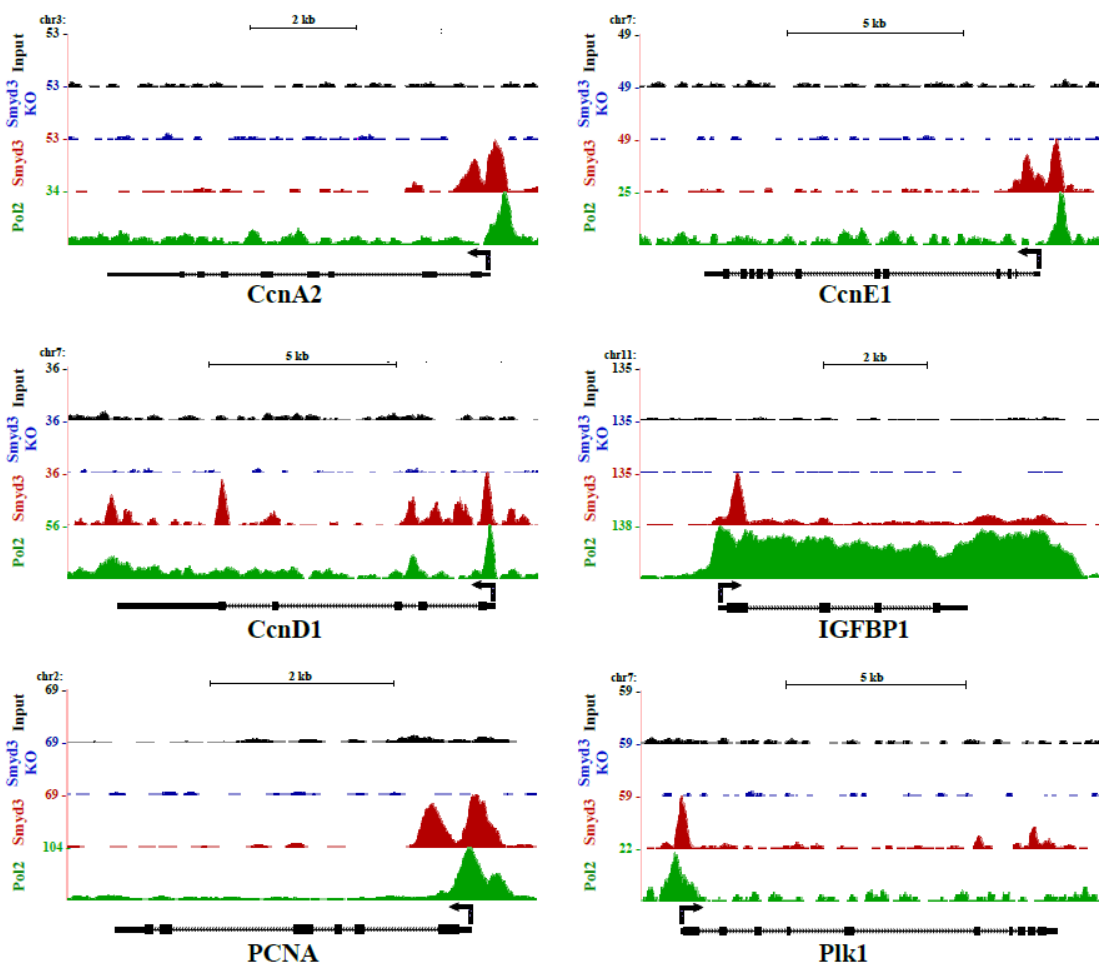


Εικόνα 39. Πάνω: Σε 2 μηνών WT και *Smyd3-KO* ποντίκια χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 3 mg/kg TCPOBOP. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν 7 μέρες μετά και κρυστομές συκωτιού βάρφηταν με ανοσοϊστοχημεία φορισμού για Ki67. Το γράφημα στα δεξιά απεικονίζει την ποσοτικοποίηση των Ki67 θετικών κυττάρων ( $n=3$  ποντίκια).

Κάτω: RT-PCR ανάλυση των *Cyclin D1* (*CcnD1*) και *Cyclin E1* (*CcnE1*) mRNA επιπέδων αντίστοιχων ποντικών ( $n=5$ ) \* $p < 0.01$ .



Εικόνα 40: Διερεύνηση και επιβεβαίωση της πρόσδεσης της *Smyd3* με ChIP-QPCR στα συκώτια 8.5 μηνών DEN-επαγόμενων WT και *Smyd3-KO* ποντικών. Οι τιμές της QPCR του ChIP με *Smyd3* αντίσωμα και τα standard errors από 3 βιολογικά αντίγραφα εκφράζονται ως ποσοστό των τιμών που προέκυψαν από το αντίστοιχο Input χρωματίνης. Οι PCR αντιδράσεις έγιναν με εκκινητές (primers) οι οποίοι καλύπτουν περιοχές υποδοχέων (promoter) των ενδεδειγμένων γονιδίων και 3 περιοχές σαν μάρτυρες. Οι εκκινητές αναγράφονται στις μεθόδους.

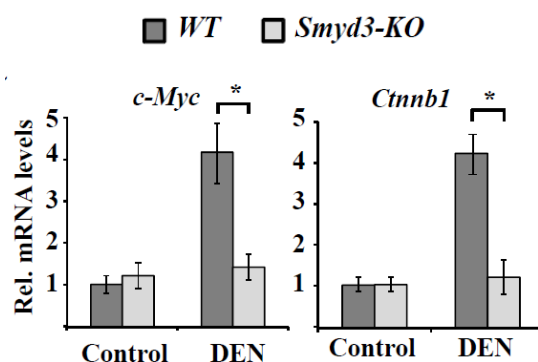


Εικόνα 41: UCSC Genome Browser tracks εικόνες που δείχνουν την πρόσδεση της Smyd3 και της Pol2 (RNA Pol2) σε επιλεγμένα γονίδια σχετιζόμενα με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στα συκώτια των DEN-επαγόμενων 8.5 μηνών WT ποντικών. Με μαύρο απεικονίζεται το input και με μπλε το Smyd3 ChIP σε DEN-Smyd3-KO ποντίκια. Τα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία έναρξης της μεταγραφής (Transcriptional Start Sites (TSS)).

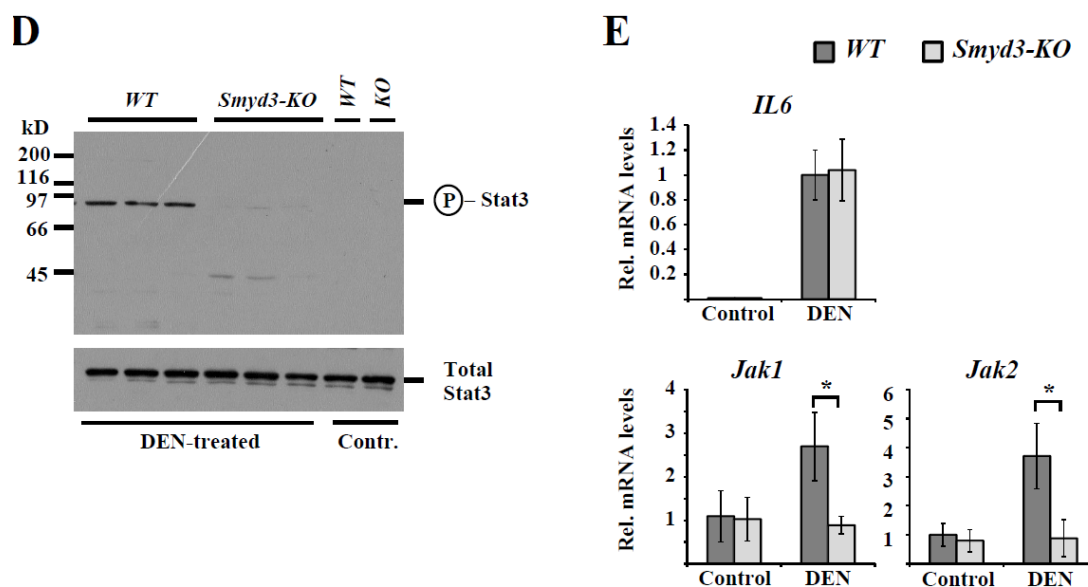
## Η Smyd3 ρυθμίζει την ενεργοποίηση ογκογονιδίων και γονιδίων που ενεργοποιούν την Επιθηλιακή σε Μεσεγχυματική Μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition - EMT)

Αν και η άμεση ρυθμιστική λειτουργία της Smyd3 στην έκφραση των γονιδίων κυτταρικού πολλαπλασιασμού, μπορεί από μόνης της να εξηγήσει τους σχετιζόμενους με τη μειωμένη αύξηση φαινοτύπους των Smyd3-KO ποντικών, παρατηρήσαμε ότι η επίδραση της έλλειψης της Smyd3 στην DEN-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των σχετιζόμενων με τον πολλαπλασιασμό γονιδίων ήταν πολύ πιο έντονη συγκρινόμενη με την επίδραση στα μοντέλα της ηπατικής αναγέννησης. Το γεγονός αυτό μας ώθησε να διερευνήσουμε επιπλέον ογκογόνα μονοπάτια σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια. Η ενεργοποίηση πολλών ογκογονιδίων, όπως *c-myc*, *β-catenin (Ctnnb1)* και *Stat3* είναι σημαντική για τον ογκογόνο μετασχηματισμό των ηπατοκυττάρων και τα επίπεδά τους είναι πολύ αυξημένα στα DEN-επαγόμενα WT συκώτια (Εικόνα 42). Τέτοια αύξηση δεν παρατηρήθηκε στα συκώτια των

DEN-επαγόμενων Smyd3-KO ποντικών, υποδεικνύοντας ότι η Smyd3 χρειάζεται απόλυτα για την ενεργοποίηση αυτών των ογκογονιδίων (Εικόνα 42). Συνάμα παρατηρήθηκε πρόσδεση της Smyd3 στις ρυθμιστικές περιοχές τόσο του *c-myc* όσο και του *Ctnnb1* γονιδίων με μεθόδους ChIP για τη Smyd3 (Εικόνες 40, 44).



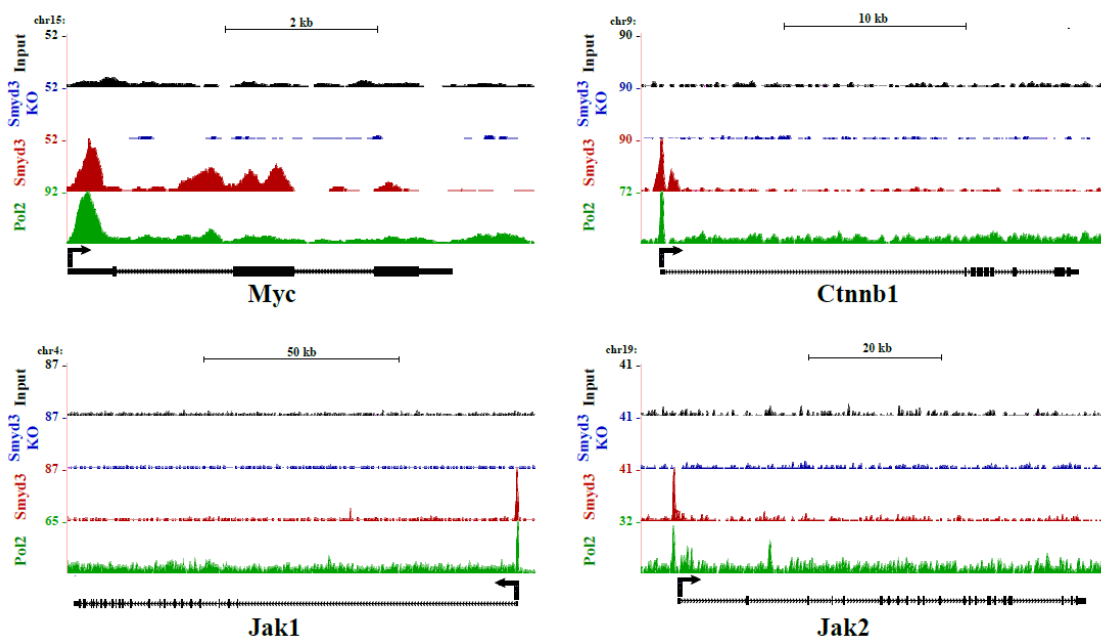
Εικόνα 42 : mRNA επίπεδα των *c-Myc* και  $\beta$ -catenin (*Ctnnb1*) σε συκώτια φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων 8.5 μηνών WT και Smyd3-KO ποντικών ( $n=5$ ).



Εικόνα 43. Ενεργοποίηση της Stat3. Αριστερά : Ανάλυση Western Blot σε κυτταρικά εκχυλίσματα συκωτιών από 8.5 μηνών φυσιολογικά και DEN-επαγόμενα WT και Smyd3-KO ποντίκια με αντισώματα για Stat3 (ολική) και την ενεργοποιημένη Phospho-Stat3 (P-Stat3).

Δεξιά : mRNA επίπεδα των *IL6*, *Jak1* και *Jak2* σε συκώτια φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων 8.5 μηνών WT και Smyd3-KO ποντικών ( $n=5$ ).

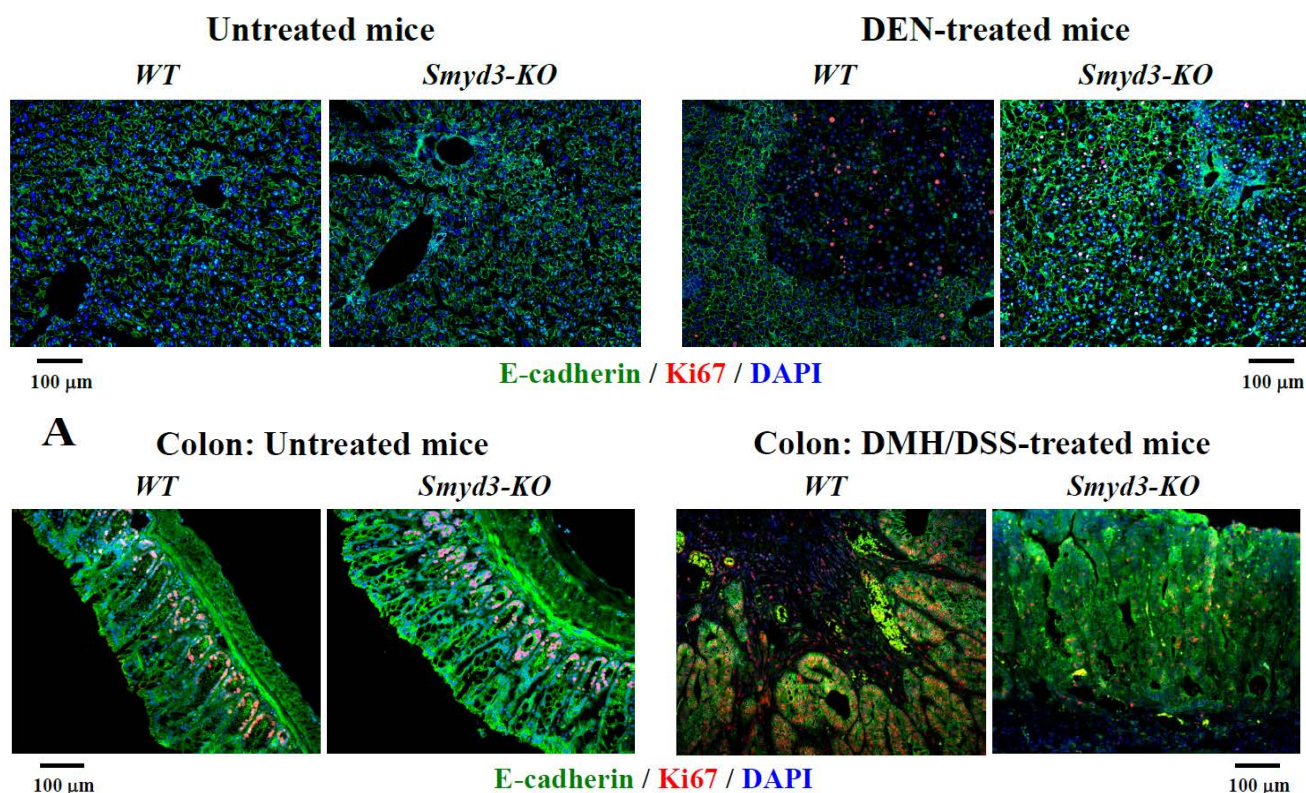




Εικόνα 44 : UCSC Genome Browser tracks εικόνες που δείχνουν την πρόσδεση της Smyd3 και της Pol2 (RNA Pol2) σε επιλεγμένα γονίδια σχετιζόμενα με τον ογκογόνο μετασχηματισμό στα συκώτια των DEN-επαγόμενων 8.5 μηνών WT ποντικών. Με μαύρο απεικονίζεται το input και με μπλε το Smyd3 ChIP σε DEN-Smyd3-KO ποντίκια. Τα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία έναρξης της μεταγραφής (Transcriptional Start Sites (TSS)).

Σε ακολουθία με τον όμοιο βαθμό στρατολόγησης κυττάρων της φλεγμονής στα συκώτια των DEN-επαγόμενων WT και Smyd3-KO ποντικών, ανιχνεύσαμε και όμοια επίπεδα IL6 mRNA, τον κύριο προσδέτη-ενεργοποιητή του Jak-Stat3 ογκογόνου σηματοδοτικού μονοπατιού (Εικόνα 43). Ωστόσο, η DEN-επαγόμενη ενεργοποίηση της STAT3 φωσφορύλιωσης και η έκφραση των Jak1 και Jak2 ήταν πολύ περιορισμένη στα συκώτια με έλλειψη της Smyd3 (Εικόνα 43). Παράλληλα, εντοπίσαμε στρατολόγηση της Smyd3 στους υποκινητές των Jak1 και Jak2 γονιδίων στα DEN-επαγόμενα καρκινικά συκώτια (Εικόνες 44, 40), υποδηλώνοντας ότι η Smyd3 ρυθμίζει το Jak-Stat3 ογκογόνο μονοπάτι μέσω άμεσης μεταγραφικής ενεργοποίησης των Jak1 και Jak2 γονιδίων.

Ο σημαντικά μικρότερος βαθμός καρκινικού φαινοτύπου και οι ιστολογικά μικρότερες και πιο χωριοθετημένες καρκινικές περιοχές (Εικόνα 26) οι οποίες ανιχνεύτηκαν στα DEN-επαγόμενα συκώτια και τα DMH/DSS-επαγόμενα έντερα των Smyd3-KO ποντικών, υποδηλώνει ότι η καρκινοεξαρτώμενη απώλεια της αναστολής από επαφή (contact inhibition) μεταξύ των ηπατοκυττάρων και την εντερικών επιθηλιακών κυττάρων μειώνεται υπό την έλλειψη της Smyd3. Σε συμφωνία με αυτή τη διαπίστωση, παρατηρήσαμε δραματική μείωση της E-cadherin σε επίπεδο χρώσης ανοσοϊστοχημείας φθορισμού, σε καρκινικές περιοχές των συκωτιών και των εντέρων των WT αλλά όχι των Smyd3-KO ποντικών (Εικόνα 45).

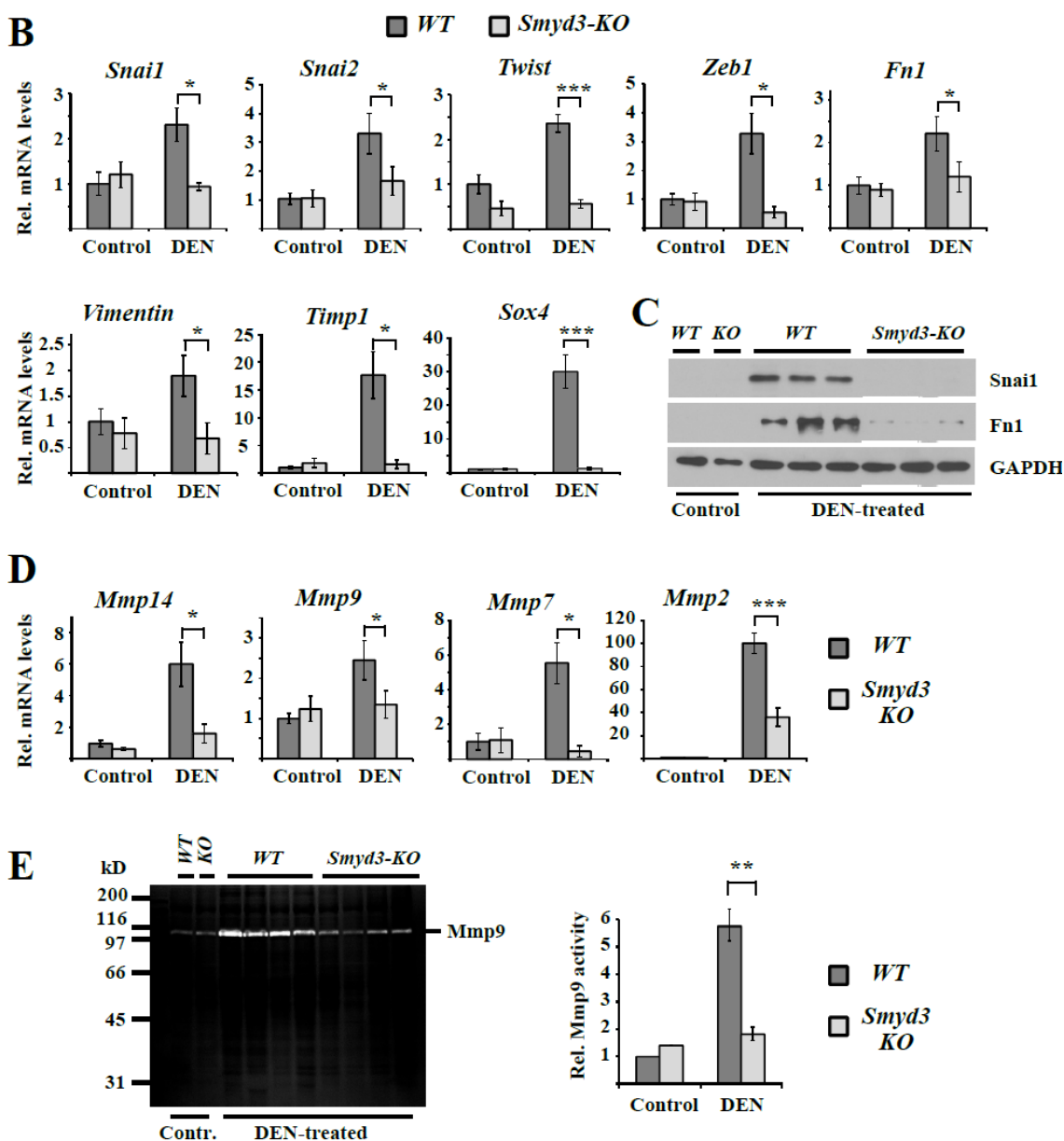


Εικόνα 45 . Η *Smyd3* χρειάζεται για την Επιθηλιακή προς Μεσεγγυματική Μετάβαση (EMT) στον καρκίνο του ήπατος και του εντέρου.

Πάνω : Αντιπροσωπευτικές εικόνες από ανοσοϊστολογική χρώση φθορισμού σε τομές συκωτιών από 8.5 μηνών φυσιολογικά και DEN-επαγόμενα *WT* και *Smyd3-KO* ποντίκια, με αντίσωμα για *E-cadherin* και *Ki67*.

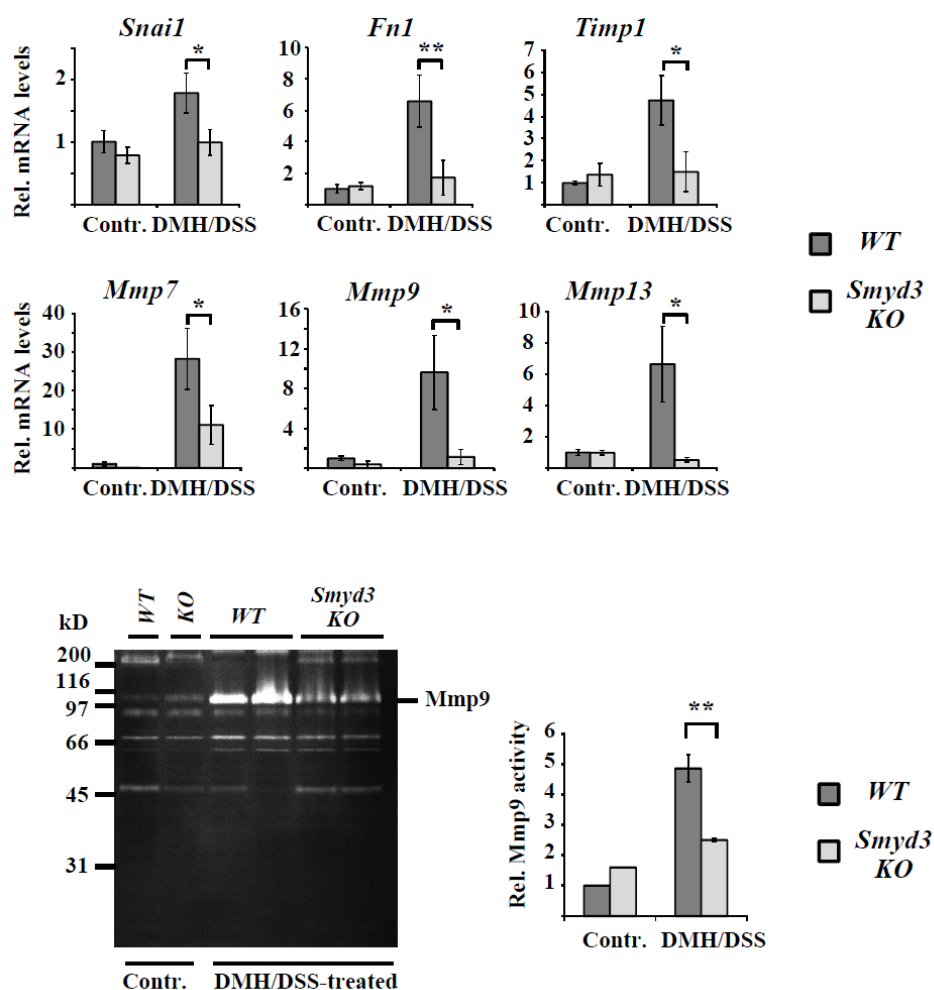
Κάτω : Αντιπροσωπευτικές εικόνες από ανοσοϊστολογική χρώση φθορισμού σε τομές παχέων εντέρων από 2.5 μηνών φυσιολογικά και *DMH/DSS*-επαγόμενα *WT* και *Smyd3-KO* ποντίκια, με αντισώματα για *E-cadherin* και *Ki67*.

Η απώλεια έκφρασης της *E-cadherin* και η ταυτόχρονη απώλεια της κυτταρικής πολικότητας ή επαφής μεταξύ των κυττάρων και μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας μήτρας είναι χαρακτηριστικά γνωρίσματα της Επιθηλιακής σε Μεσεγγυματικής Μετάβασης (EMT), μίας διαδικασίας η οποία όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή συμμετέχει ενεργά στην έναρξη της καρκινογένεσης και την μεταστατική εξάπλωση. Για αυτό το λόγο αναλύσαμε την έκφραση των κύριων ρυθμιστών της EMT στα μοντέλα μας. Τα επίπεδα mRNA των *Snai1*, *Snai2*, *Twist*, *Zeb1* και *Sox4* μεταγραφικών ρυθμιστών και των *Fn1*, *Vimentin*, *Timp1*, *Mmp2*, *Mmp7*, *Mmp9* και *Mmp14* δεικτών EMT γονιδίων ήταν σημαντικά αυξημένα στα συκώτια των DEN-επαγόμενων *WT* αλλά όχι των *Smyd3-KO* ποντικών (Εικόνα 46). Επιπλέον επιβεβαιώσαμε την έλλειψη επαγωγής των *Snai1* και *Fn1* σε πρωτεϊνικό επίπεδο, καθώς και την έλλειψη ενζυματικής ενεργότητας της *MMP9* στα συκώτια των DEN-επαγόμενων *Smyd3-KO* ποντικών, με ανάλυση Western Blot και μεθόδους ζυμογραφίας αντίστοιχα (Εικόνα 46).



Εικόνα 46 : B) mRNA επίπεδα κύριων ρυθμιστών της EMT στα συκώτια 8,5 μηνών φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων WT και *Smyd3-KO* ποντικών (n=5). C) Western Blot ανάλυση των *Snai1* και *Fn1* πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα από συκώτια 8,5 μηνών φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων WT και *Smyd3-KO* ποντικών. D) mRNA επίπεδα μεταλλοπρωτεϊνάσων μήτρας (matrix metalloproteases (Mmp)) στα συκώτια 8,5 μηνών φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων WT και *Smyd3-KO* ποντικών (n=5). E) Ζυμογράφημα στο οποίο φαίνεται ότι η ενεργότητα της MMP9 στα εκχυλίσματα συκωτιών από 8.5 μηνών φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων WT και *Smyd3-KO* ποντικών. Δεξιά η ποσοτικοποίηση των επιπέδων τους.

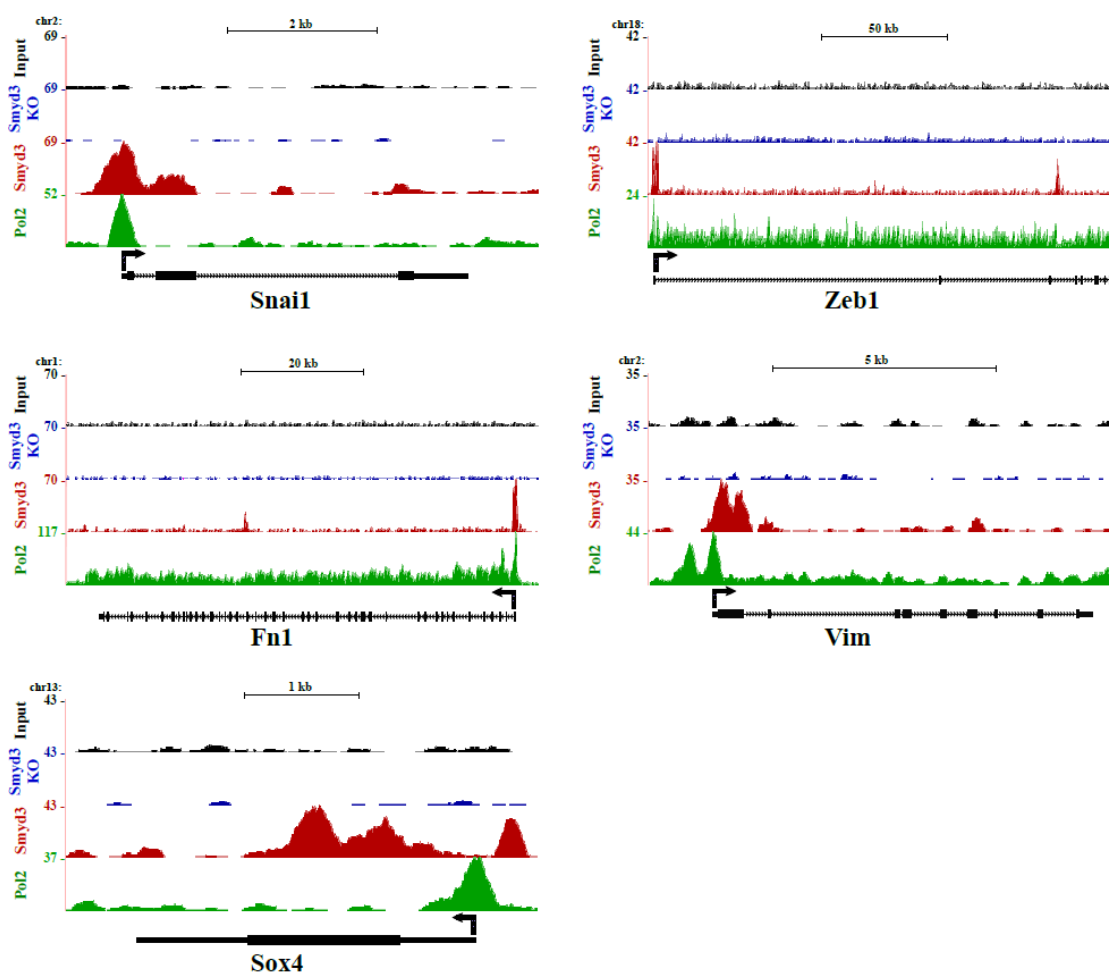
Ομοίως, ανιχνεύσαμε αυξημένα επίπεδα mRNA *Snai1*, *Fn1*, *Timp1*, *Mmp7*, *Mmp9*, *Mmp13* και αυξημένη ενεργότητα *Mmp9* στα καρκινικά έντερα των DMH/DSS-επαγόμενων WT αλλά όχι των *Smyd3-KO* ποντικών (Εικόνα 47).



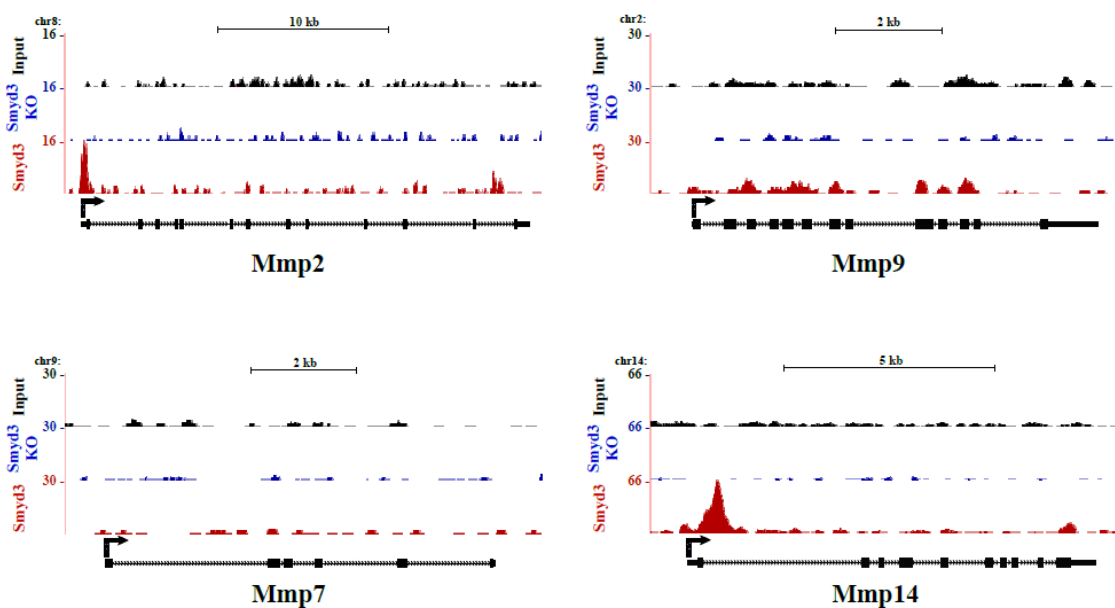
Εικόνα 47: mRNA επίπεδα των κύριων ρυθμιστών της EMT στα έντερα 2,5 μηνών φυσιολογικών και DMH/DSS-επαγόμενων WT και *Smyd3*-KO ποντικών (n=5) mRNA επίπεδα μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (matrix metalloproteases (*Mmp*)) στα έντερα 2,5 μηνών φυσιολογικών και DMH/DSS-επαγόμενων WT και *Smyd3*-KO ποντικών (n=5). Ζυμογράφημα στο οποίο φαίνεται ότι η ενεργότητα της MMP9 στα εκχυλίσματα εντέρων από 2,5 μηνών φυσιολογικών και DMH/DSS-επαγόμενων WT και *Smyd3*-KO ποντικών. Δεξιά η ποσοτικοποίηση των επιπέδων τους.

Παράλληλα με τα παραπάνω, ανιχνεύτηκε στρατολόγηση της *Smyd3* σε περιοχές υποκινητών των περισσότερων των εν λόγω γονιδίων (*Mmp2*, *Mmp14*, *Vimentin*, *Sox4*, *Zeb1*, *Snai1* και *Fn1*), υποδηλώνοντας τον άμεσο ρόλο της *Smyd3* στη μεταγραφική ενεργοποίησή τους (Εικόνες 40, 48). Σε αντίθεση, η μη στρατολόγηση της *Smyd3* στους υποκινητές των *MMP7* και *MMP9*, υποδηλώνει ότι η *Smyd3* εξαρτώμενη ενεργοποίηση των συγκεκριμένων γονιδίων περιλαμβάνει έμμεσους μηχανισμούς (Εικόνα 49).

Συνολικά, όλα τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η λειτουργία της *Smyd3* είναι σημαντική για τη μεταγραφική ρύθμιση πολλών ογκογονιδίων και γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της EMT κατά τη διάρκεια της ηπατικής και εντερικής χημειοεπαγόμενης καρκινογένεσης.



Εικόνα 48 : UCSC Genome Browser tracks εικόνες που δείχνουν την πρόσδεση της Smyd3 και της Pol2 (RNA Pol2) σε επιλεγμένα γονίδια σχετιζόμενα με την EMT διεργασία στα συκώτια των DEN-επαγόμενων 8,5 μηνών WT ποντικών. Με μαύρο απεικονίζεται το input και με μπλε το Smyd3 ChIP σε DEN-Smyd3-KO ποντίκια. Τα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία έναρξης της μεταγραφής (TSS).





Εικόνα 49 : UCSC Genome Browser tracks εικόνες που δείχνουν την πρόσδεση (*MMP2*, *MMP14*) και τη μη πρόσδεση (*MMP7*, *MMP9*) της *Smyd3* και της *Pol2* (*RNA Pol2*) σε επιλεγμένα γονίδια *MMPs* στα συκώτια των *DEN*-επαγόμενων 8,5 μηνών *WT* ποντικών. Με μαύρο απεικονίζεται το input και με μπλε το *Smyd3* ChIP σε *DEN-Smyd3-KO* ποντίκια. Τα βέλη υποδηλώνουν τα σημεία έναρξης της μεταγραφής (*TSS*).

Η σημασία και η συσχέτιση της *Smyd3* εξαρτώμενης γονιδιακής ενεργοποίησης των παραπάνω γονιδίων με το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα (*HCC*), παρουσιάζεται με τη σύγκριση των ενεργοποιήσεων τους σε ανθρώπινους καρκίνους ήπατος που εκφράζουν υψηλά (>2 φορές), μέτρια (μεταξύ 1-2 φορές) και χαμηλά (λιγότερο της 1 φοράς) επίπεδα της *Smyd3* συγκρινόμενα με φυσιολογικά συκώτια. Από ένα σετ 341 ασθενών, ο αριθμός των ασθενών που εκφράζουν *SNAI1*, *TWIST*, *ZEB1*, *SOX4*, *PCNA*, *CCNE1*, *CCNA2* ή *JAK2* mRNA μεγαλύτερο από 2 φορές πάνω από το φυσιολογικό ήταν 63, 136, 84, 185, 252, 318, 293 και 45 αντίστοιχα (Πίνακας 8). Η πλειονότητα αυτών εξέφραζε επίσης υψηλά (μεγαλύτερο από 2 φορές από το φυσιολογικό) επίπεδα *Smyd3*, ενώ κανένας από τους ασθενείς που υπερέκφραζαν *SNAI1*, *TWIST*, *ZEB1*, *SOX4*, *PCNA*, *CCNE1*, *CCNA2* ή *JAK2* mRNA είχε ταυτόχρονα χαμηλά επίπεδα *Smyd3* (Πίνακας 8).

	<b>SNAI “High” (&gt;2x) 63 patients</b>	<b>TWIST “High” (&gt;2x) 136 patients</b>	<b>ZEB1 “High” (&gt;2x) 84 patients</b>	<b>SOX4 “High” (&gt;2x) 185 patients</b>	<b>PCNA “High” (&gt;2x) 252 patients</b>	<b>CCNE1 “High” (&gt;2x) 318 patients</b>	<b>CCNA2 “High” (&gt;2x) 293 patients</b>	<b>JAK2 “High” (&gt;2x) 45 patients</b>
<b>SMYD3 “High” (&gt;2-fold) 272 patients</b>	<b>54</b>	<b>121</b>	<b>72</b>	<b>168</b>	<b>214</b>	<b>264</b>	<b>247</b>	<b>42</b>
<b>SMYD3 “Medium” (1-2-fold) 55 patients</b>	<b>9</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>38</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>3</b>
<b>SMYD3 “Normal” (&lt;1-fold) 14 patients</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>p-value</b>	<b>0.0658</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0393</b>	<b>4x10<sup>-8</sup></b>	<b>3x10<sup>-5</sup></b>	<b>1x10<sup>-6</sup></b>	<b>4x10<sup>-6</sup></b>	<b>0.0017</b>

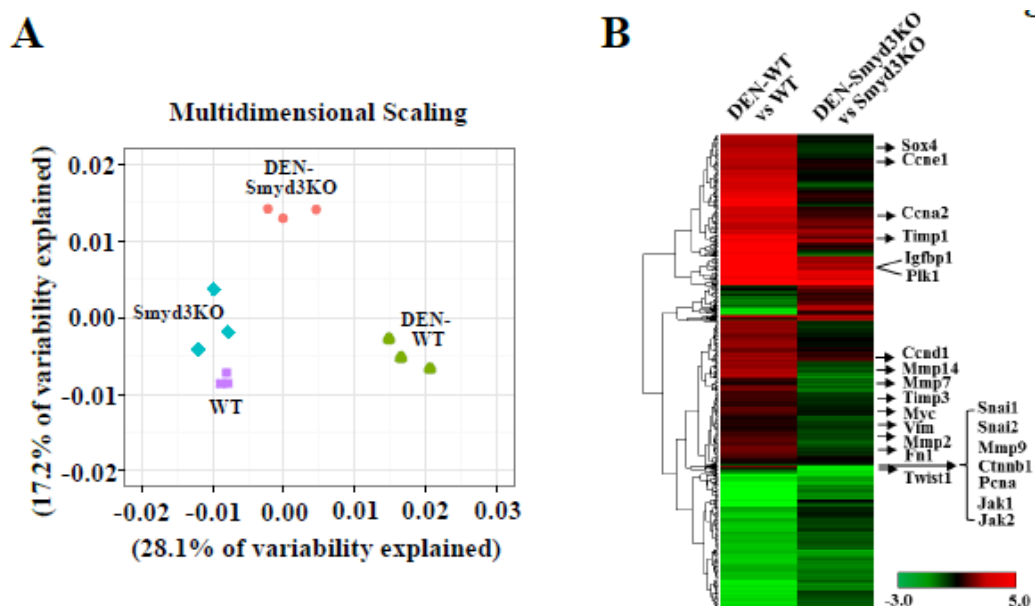
Πίνακας 8: Συσχέτιση της έκφρασης της *Smyd3* με την αυξημένη έκφραση των *SNAI*, *TWIST*, *ZEB1*, *PCNA*, *CCNE1*, *CCNA2* και *JAK2* επιπέδων mRNA στα δείγματα ασθενών με ηπατοκαρκίνωμα από τη βάση δεδομένων “The Cancer Genome Atlas” (*TCGA*). Οι 341 ασθενείς με *HCC* χωρίστηκαν σε 3 γκρουπ σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης της *Smyd3*. Ασθενείς στο γκρουπ υψηλής έκφρασης εκφράζουν *Smyd3* στο συκώτι τους περισσότερο από 2 φορές πάνω από το μέσο των φυσιολογικών (41 δείγματα). Το γκρουπ «μεσαίο» περιέχει τους ασθενείς με έκφραση *Smyd3* μεταξύ 1 και 2 φορές πάνω από το μέσο των φυσιολογικών, ενώ τέλος το φυσιολογικό γκρουπ περιέχει ασθενείς με έκφραση ίση ή μικρότερη συγκρινόμενη πάλι με το μέσο των φυσιολογικών μη ασθενών. Η υπερέκφραση (πάνω από 2 φορές από το μάρτυρα-φυσιολογικό) των *SNAI*, *TWIST*, *ZEB1*, *PCNA*, *CCNE1*, *CCNA2* και *JAK2* ήταν εμφανής σε ποικίλους

αριθμούς των δειγμάτων των ασθενών όπως αναγράφεται και στην πάνω σειρά. Η πλειοψηφία αυτών (αριθμοί στη 2<sup>η</sup> σειρά), ανήκουν στην κατηγορία υψηλής έκφρασης *Smyd3*, ενώ οι υπόλοιποι από τους ασθενείς που υπερεκφράζουν αυτά τα γονίδια στο συκώτι ανήκουν στο μέτριας έκφρασης *Smyd3* γκρουπ (3<sup>η</sup> σειρά). Πολύ μεγάλης σημασίας είναι το γεγονός ότι κανένας από τους ασθενείς που υπερεκφράζουν τα *SNAI*, *TWIST*, *ZEB1*, *PCNA*, *CCNE1*, *CCNA2* ή *JAK2* δεν ανήκει στην κατηγορία με φυσιολογική έκφραση *Smyd3* (τέταρτη σειρά). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υπερ-έκφρασης της *Smyd3* και υπερ-έκφρασης των παραπάνω γονιδίων στο ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα. Η στατιστική σημαντικότητα εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το υπεργεωμετρικό τεστ (*p* τιμές στην κάτω σειρά) για να ελέγξουμε αν ο αριθμός των ασθενών που υπερεκφράζουν τόσο *Smyd3* όσο και κάθε ένα από τα υπό εξέταση γονίδια συνέβη από τύχη.

Τα γονίδια τα οποία δεν περιλαμβάνονται στον πίνακα είναι τα *MYC*, *IGFBP1* και *JAK1*, τα οποία υπερεκφράζονται (<2-φορές πάνω από τα φυσιολογικά) μόνο σε ένα μικρό αριθμό δειγμάτων ασθενών και συνεπώς δεν μπορούν να αναφερθούν λόγω έλλειψης στατιστικής ανάλυσης. Ωστόσο παρατηρήσαμε ότι 12 από τους 15 ασθενείς που υπερεκφράζουν *MYC*, 10 από τους 11 που υπερεκφράζουν *IGFBP1* και 19 από τους 22 που υπερεκφράζουν *JAK1*, υπερέκφραζαν επίσης *SMYD3* (*SMYD3* “High” γκρουπ), ενώ οι εναπομείναντες ασθενείς ανήκουν στο *SMYD3* “Medium” γκρουπ.

### **Η *Smyd3* ενισχύει την μεσολαβούμενη από την RNA Πολυμεράση II μεταγραφή γονιδίων που προάγουν τον καρκίνο.**

Προκειμένου να κατανοήσουμε το ρόλο της λειτουργίας της *Smyd3* στη ρύθμιση του καρκινοειδικού μεταγραφικού προγράμματος, συγκρίναμε καθολικές μεταγραφικές αλλαγές (αλλαγές του μεταγραφώματος - global transcriptome changes) και την «ευρέως καθόλου του γονιδιώματος» (genome wide) πρόσδεση του *Smyd3* στα καρκινικά συκώτια των DEN-επαγόμενων WT και *Smyd3*-KO ποντικών. Τα δεδομένα της αλληλούχισης του RNA (RNA-sequencing) χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των ανά δύο δειγμάτων συγκρίσεων και για να πραγματοποιήσουμε πολυδιάστατη κλιμάκωση των δειγμάτων (multidimensional scaling). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 50, οι διαφορές μεταξύ των WT, *Smyd3*-KO και DEN-επαγόμενων *Smyd3*-KO δειγμάτων ήταν μικρές, σε αντίθεση με το μεγάλο βαθμό διαφοράς μεταξύ οποιουδήποτε από αυτά με τα DEN-επαγόμενα WT συκώτια. Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων στα DEN-επαγόμενα WT και *Smyd3*-KO ποντίκια, φανέρωσε ένα υψηλά ποικίλο-διαφορικό πρότυπο (Εικόνα 50).



Εικόνα 50. Συγκριτική ανάλυση των μεταγραφωμάτων με ανάλυση των RNAseq στο DEN-επαγόμενο καρκίνωμα μεταξύ WT και Smyd3-KO.

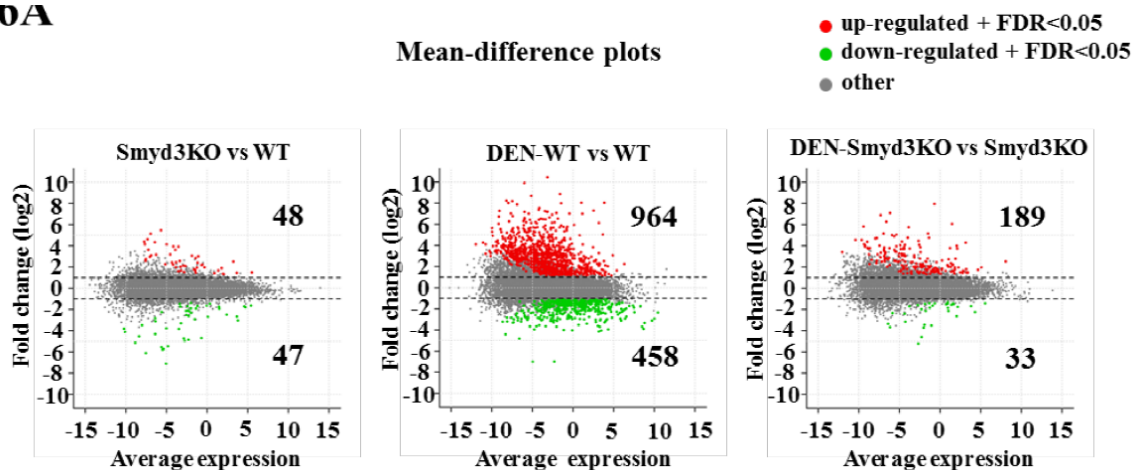
Αριστερά : Γράφημα πολυδιάστατης κλιμάκωσης των δειγμάτων (multidimensional scaling) (Principal Coordinate Ανάλυση) των επιπέδων έκφρασης mRNA στα σκώτια 8,5 μηνών φυσιολογικών και DEN-επαγόμενων WT και Smyd3-KO ποντικών. Η αναλογία της ποικιλίας (ή ομοιότητας) η οποία εξηγείται από την κάθε κυρίαρχη συντεταγμένη θέση αναγράφεται στην παρένθεση.

Δεξιά : Ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης και ο αντίστοιχος χάρτης θερμότητας των διαφορικά εκφραζόμενων γονιδίων στα σκώτια των DEN-επαγόμενων έναντι των φυσιολογικών 8,5 μηνών WT και Smyd3-KO ποντικών. Η χρωματική κλίμακα αναφέρει τα εύρη φορών διαφοράς για τις συγκρίσεις (λόγους) που αναγράφονται στο πάνω μέρος του χάρτη. Αντιπροσωπευτικά γονίδια των οποίων η έκφραση ελέγχθηκε με RT-PCR αναγράφονται στα δεξιά.

Η ανάλυση της διαφορετικής έκφρασης αποκάλυψε ότι ο αριθμός των γονιδίων των οποίων η έκφραση άλλαξε σημαντικά με την DEN-επαγωγή ήταν 1422 (964 υπερ- και 458 υπο-εκφραζόμενα) στα WT ποντίκια και μόλις 222 (189 υπερ- και 33 υπο-εκφραζόμενα) στα Smyd3-KO ποντίκια (Εικόνα 51). Μόλις 99 από τα 964 υπερεκφραζόμενα και 9 από τα 458 υποεκφραζόμενα γονίδια στα DEN- WT ποντίκια ήταν επίσης υπερ- και υπό- αντίστοιχα και στα DEN-επαγόμενα Smyd3-KO ποντίκια, υποστηρίζοντας ότι η Smyd3 είναι απαραίτητη για την διαφορετική έκφραση της πλειονότητας των γονιδίων της DEN-επαγόμενης καρκινογένεσης (Εικόνα 52).

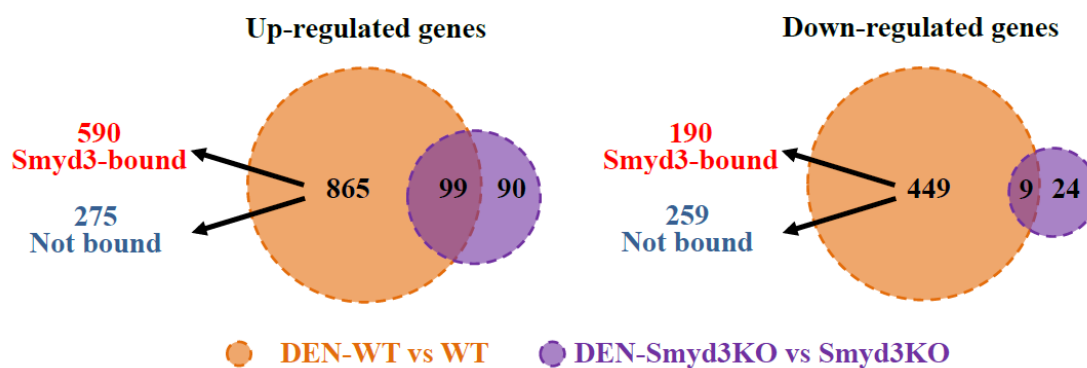


10A



Εικόνα 51 : Γραφήματα μέσης διαφοράς (Mean-Difference plots) τα οποία απεικονίζουν τις συγκρίσεις των αλλαγών της γονιδιακής έκφρασης στα συκώτια 8,5 μηνών φυσιολογικών WT και Smyd3-KO και DEN-επαγόμενων WT και Smyd3-KO ποντικών. Οι κόκκινες κουκκίδες αντιστοιχούν στα υπερ-εκφρασμένα (τουλάχιστον 2 φορές) γονίδια με FDR <0.05. Οι πράσινες κουκκίδες αντιστοιχούν στα υπό-εκφρασμένα γονίδια (τουλάχιστον 2 φορές) γονίδια με FDR <0.05. Οι γκρι κουκκίδες αντιστοιχούν σε όλα τα άλλα γονίδια εκτός των δύο παραπάνω κατηγοριών. Οι αριθμοί των υπέρ- και υπό-εκφραζόμενων γονιδίων βάση των παραπάνω κριτηρίων απεικονίζονται. Οι κάθετοι άξονες αντιπροσωπεύουν τις φορές αλλαγών σε log2 κλίμακα για κάθε σύγκριση : Smyd3-KO vs WT (αριστερά), DEN-WT vs WT (μέση) και DEN-Smyd3KO vs Smyd3KO (δεξιά). Οι οριζόντιοι άξονες απεικονίζουν τη μέση έκφραση των συνθηκών που περιλαμβάνονται σε κάθε σύγκριση. (DESeq normalized reads per sum of exon lengths in log2 scale).

Όπως αναμενόταν και από τις μικρές αποκλίσεις στα MDS γραφήματα και την έλλειψη φαινοτύπου στα φυσιολογικά Smyd3-KO ποντίκια, ανιχνεύσαμε μόνο 95 διαφορετικά εκφρασμένα γονίδια στα φυσιολογικά μη επαγόμενα ποντίκια, τα περισσότερα από τα οποία ήταν μη-πρωτεϊνικά κωδικοποιημένα μετάγραφα (Εικόνα 51). Στη συνέχεια, ερμηνεύσαμε τα ChIP-seq δεδομένα για την πρόσδεση του Smyd3 στους υποκινητές των 865 Smyd3-εξαρτώμενων υπερ-εκφραζόμενων και 449 Smyd3-εξαρτώμενων υπο-εκφραζόμενων γονιδίων. Η πλειονότητα (590) των Smyd3-εξαρτώμενων DEN-επαγόμενων υποκινητών γονιδίων ήταν προσδεδεμένοι από Smyd3, ενώ 275 δεν ήταν (Εικόνα 52 αριστερά). Μία αντίστροφη αναλογία και μικρότερη εμφανή πρόσδεση παρατηρήθηκε στην περίπτωση των υποεκφραζόμενων γονιδίων (Εικόνα 52 δεξιά).



Εικόνα 52 : Διαγράμματα Venn τα οποία δείχνουν την επικάλυψη μεταξύ των υπερ-εκφρασμένων και των υπό-εκφρασμένων γονιδίων στα WT και Smyd3-KO ποντίκια ως απόκριση στην DEN επαγωγή. Οι αριθμοί των γονιδίων τα οποία προσδένονται ή δεν προσδένονται από την Smyd3, 1kb upstream και downstream από τα TSS (-1kb μέχρι +1kb) των αντίστοιχων γονιδίων, απεικονίζονται επίσης.

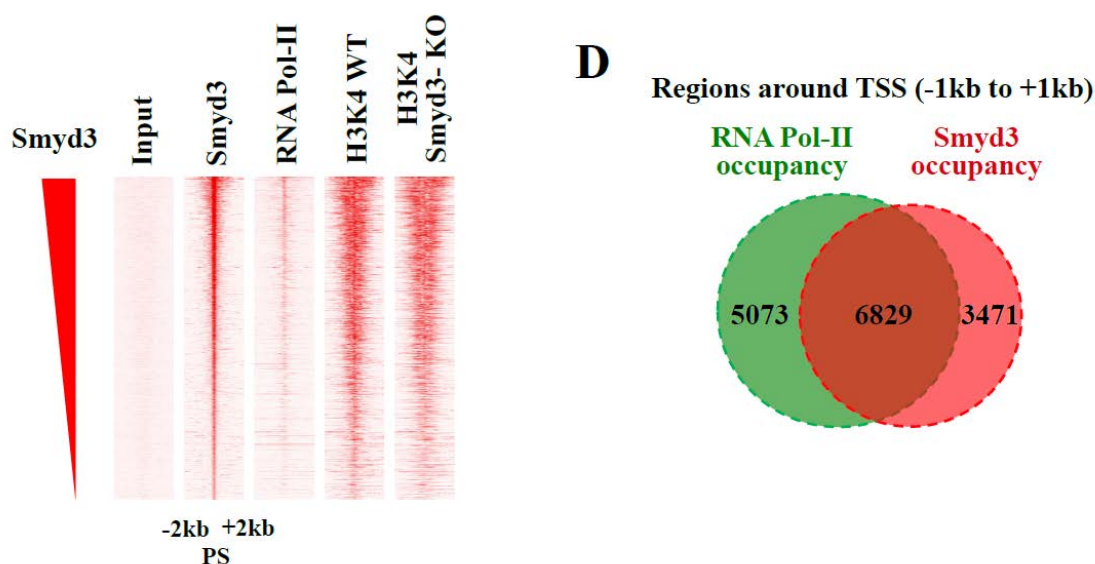
Τα Smyd3-προσδεδεμένα και Smyd3-εξαρτώμενα DEN-επαγόμενα γονίδια (590 στην Εικόνα 52) ήταν πολύ «εμπλουτισμένα» σε γονίδια σχετικά με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σχετικές με τον καρκίνο βιολογικές λειτουργίες και κατηγορίες KEGG μονοπατιών, ενισχύοντας τον κεντρικό ρόλο της Smyd3 στην ηπατοκαρκινογένεση. (Πίνακας 9)

Biological Process	# Support Genes	Enrichment	FDR
cell cycle	35	0.06567	2.87363E-11
apoptotic process	30	0.05952	1.28976E-08
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	30	0.04666	1.18945E-06
multicellular organismal development	29	0.03326	0.000535194
protein phosphorylation	28	0.04921	1.08389E-06
phosphorylation	26	0.03774	0.000218905
cell division	22	0.07586	3.62368E-08
cell adhesion	21	0.04667	9.81687E-05
ion transport	21	0.03797	0.00110906
oxidation-reduction process	20	0.03241	0.00720581
positive regulation of cell proliferation	19	0.05460	3.77188E-05

KEGG Pathway description	# Support Genes	Enrichment	FDR
Pathways in cancer	21	0.06542	1.90642E-07
Cytokine-cytokine receptor interaction	18	0.07377	2.94092E-07
Cell cycle	17	0.13821	1.5384E-10
MAPK signaling pathway	17	0.06464	3.50219E-06
Axon guidance	15	0.11538	2.30719E-08
Focal adhesion	15	0.07538	3.16849E-06
Regulation of actin cytoskeleton	15	0.07075	5.15897E-06
Endocytosis	14	0.06573	2.75058E-05
Jak-STAT signaling pathway	10	0.06536	0.000435403

Πίνακας 9 : Οι κορυφαίες Βιολογικές Διεργασίες (Top Biological Process terms) οι οποίες προκύπτουν από την Gene Ontology ανάλυση και η κορυφαία λίστα των βιοχημικών μονοπατιών όπως προκύπτουν από την αντίστοιχη KEGG pathway ανάλυση, των 590 DEN επαγόμενων, Smyd3-εξαρτώμενων και Smyd3 προσδεδεμένων γονιδίων. Οι βιολογικές διεργασίες ταξινομούνται από τον αριθμό των εν λόγω γονιδίων τα οποία συνδέονται με την αντίστοιχη διεργασία στην Gene Ontology ιεραρχία.

Η σχέση μεταξύ της Smyd3 πρόσδεσης και της DEN-επαγόμενης γονιδιακής ενεργοποίησης επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με τον υπολογισμό των επιπέδων της RNA Pol-II πρόσδεσης στα Smyd3-προσδεδεμένα γονίδια. Χάρτης θερμότητας βαθμονομημένος από την ένταση της Smyd3 πρόσδεσης αποκάλυψε έναν ισχυρό συσχετισμό μεταξύ της Smyd3 και της RNA Pol-II πρόσδεσης (Εικόνα 53). Περίπου τα 2/3 των Smyd3 προσδεδεμένων υποκινητών ήταν επίσης προσδεδεμένοι από την RNA πολυμεράση II (Εικόνα 53).

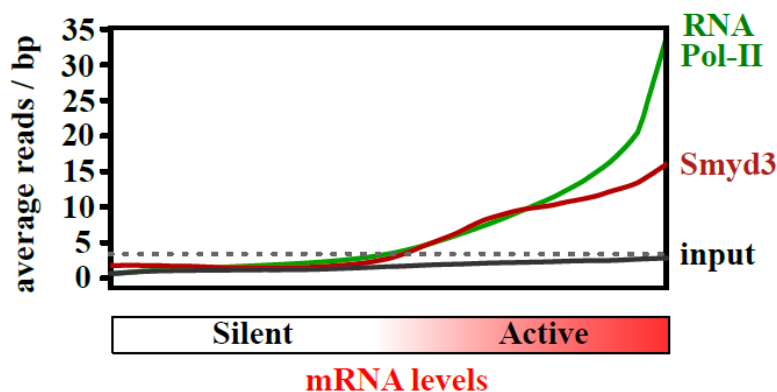


Εικόνα 53 . Αριστερά : Χάρτες θερμοκρασίας της έντασης πρόσδεσης που δείχνουν την κατανομή πρόσδεσης καθόλο το γονιδίωμα των Smyd3, RNA Pol-II και H3K4me3 από 2kb downstream μέχρι 2kb upstream από τις κορυφές των Smyd3 κορυφών (PS, η βάση κατά την οποία συμβαίνει το υψηλότερο διάβασμα της Smyd3) των Smyd3 προσδεδεμένων γονιδίων στα συκώτια 8,5 μηνών DEN-επαγόμενων WT (4 πρώτα) και DEN-επαγόμενων Smyd3-KO (δεξιά) ποντικών.

Δεξιά : Διάγραμμα Venn το οποίο δείχνει την επικάλυψη μεταξύ της RNA Pol-II και Smyd3 πρόσδεσης στους υποκινητές των γονιδίων στα συκώτια 8,5 μηνών DEN-επαγόμενων WT ποντικών.

Αυτό το υψηλό ποσοστό ταυτόχρονης πρόσδεσης της Smyd3 με την RNA πολυμεράση II, μας ώθησε στο να συγκρίνουμε την πυκνότητα της Smyd3 και RNA Pol-II πρόσδεσης στα γονιδιακά ρυθμιστικά στοιχεία με τα ολικά mRNA επίπεδα στα DEN-επαγόμενα καρκινικά συκώτια . Όπως αναμενόταν η πυκνότητα πρόσδεσης της RNA Pol-II (διάβασματα ανά bp) συσχετίζεται θετικά με τα πραγματικά

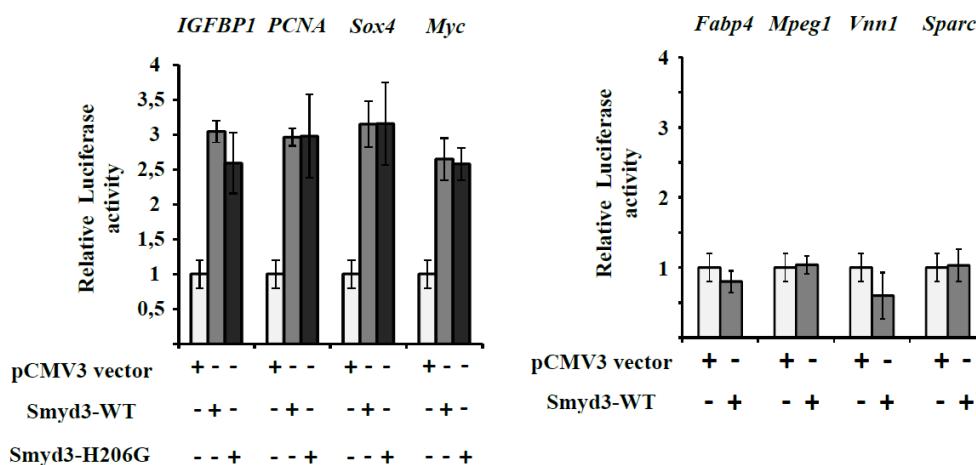
mRNA επίπεδα των αντίστοιχων γονιδίων (Εικόνα 54). Αξιοσημείωτη είναι η παρόμοια θετική συσχέτιση της πυκνότητας πρόσδεσης της Smyd3 με την αντίστοιχη της RNA Pol-II (Εικόνα 54). Αυτή η συσχέτιση και οι αλλαγές που προκύπτουν στα μεταγραφικά αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η Smyd3 λειτουργεί σαν ένας ενισχυτής (“potentiator” ή “amplifier”) της μεταγραφής.



Εικόνα 54 : Συσχέτιση μεταξύ RNA Pol-II και Smyd3 επικάλυψης στα συκώτια 8,5 μηνών DEN-επαγόμενων WT ποντικών. Οι πυκνότητες πρόσδεσης των RNA Pol-II και Smyd3 υπολογίστηκαν σε μία μέση γενωμική περιοχή κανονικοποιημένης βάσης κάλυψης (μέσα χαρτογραφημένα διαβάσματα ανά νουκλεοτιδική βάση από -1kb μέχρι +1kb από το TSS των Smyd3-προσδεσμένων γονιδίων και ταξινομημένα από τις τιμές των mRNA επιπέδων τους (χρωματική μπάρα στη βάση). Οι μετρήσεις διαβασμάτων του input δείγματος αναφέρονται επίσης (μαύρη γραμμή). Η διακεκομμένη γραμμή παριστάνει τη μέση κανονικοποιημένη RNA Pol-II επικάλυψη, η οποία επιλέχθηκε σαν μία cut-off τιμή διαχωρισμού της RNA Pol-II πρόσδεσης για σιωπηλά και ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια.

Σε συμφωνία με αυτό, βρήκαμε ότι η υπερέκφραση της Smyd3 είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική trans-ενεργοποίηση των *Igfbp1*, *PCNA*, *Sox4* και *Myc* υποκινητών σε πειράματα έκφρασης με αναφορά τη λουσιφεράση (Εικόνα 55). Επιπλέον, η υπερέκφραση ενός μεταλλαγμένου Smyd3 με ελλειμματική ικανότητα μεθυλίωσης, ενεργοποίησε τους υποκινητές σε έναν παρόμοιο βαθμό με αυτόν που παρατηρήθηκε για την αγρίου τύπου φυσιολογική πρωτεΐνη, υποδηλώνοντας ότι η ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης δεν είναι απολύτως απαραίτητη για την ενεργοποιητική λειτουργία της Smyd3 στην μεταγραφή (Εικόνα 55).

Τα *Igfbp1*, *PCNA*, *Sox4* και *Myc* είναι αντιπροσωπευτικά των 590 γονιδίων, των οποίων οι υποκινητές είναι προσδεσμένοι από την Smyd3 και τα mRNA τους είναι υπερ-εκφρασμένα στα DEN-επαγόμενα αλλά όχι στα Smyd3-KO ποντίκια. Σαν μάρτυρες, ελέγξαμε την επίδραση της ενεργότητας της Smyd3 υπερέκφρασης στους υποκινητές των *Fabp4*, *Mpeg1*, *Vnn1* και *Sparc* γονιδίων, τα οποία ανήκουν στο γκρουπ των DEN-επαγόμενων, Smyd3 εξαρτώμενων, αλλά όχι Smyd3 προσδεσμένων γονιδίων (275 γονίδια μη προσδεδεμένα, Εικόνα 52). Τα πλασμίδια αναφοράς λουσιφεράσης με τους υποκινητές αυτούς δεν ενεργοποιήθηκαν από την Smyd3, υποδηλώνοντας την ενεργοποίηση τους από έμμεσους ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Εικόνα 55).

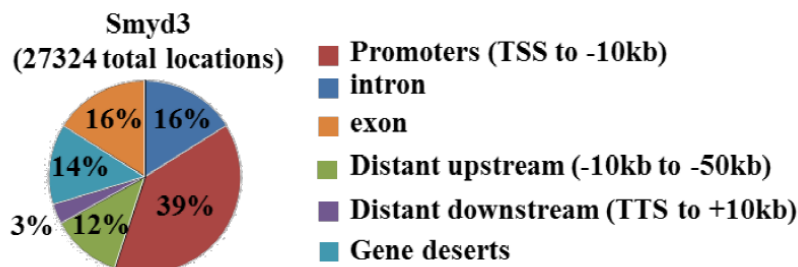


Εικόνα 55 : Πειράματα παροδικής επιμόλυνσης σε *HerG2* κύτταρα χρησιμοποιώντας *IGFBP1*, *PCNA*, *Sox4*, *Myc*, *Fabp4*, *Mpeg1*, *Vnn1* και *Sparc* υποκινητές κλωνοποιημένους σε *pCMV* πλασμίδια έκφρασης της λουσιφεράσης, χρησιμοποιώντας αγρίου τύπου *Smyd3* και *H206G* μεταλλαγμένη *Smyd3*. Οι μπάρες αναπαριστούν τις διαφορές σε πολλαπλάσια των κανονικοποιημένων ενεργησιμότητας λουσιφεράσης και τα SEM από 3 ανεξάρτητα πειράματα. Οι υποκινητές επιλέχθηκαν από τη λίστα των 865 υπερεκφρασμένων γονιδίων (Εικόνα 52) στα συκώτια των *DEN*-επαγόμενων ποντικών, τα οποία προσδέονται από την *Smyd3* (*IGFBP1*, *PCNA*, *Sox4*, *Myc*) ή δεν προσδέονται (*Fabp4*, *Mpeg1*, *Vnn1*, *Sparc*).

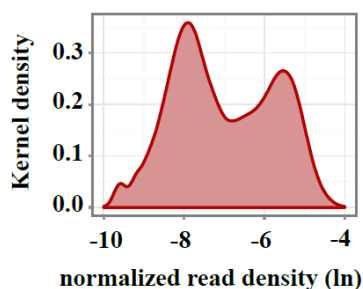
### Ο μηχανισμός επιλογής του γονιδίου στόχου από την *Smyd3* καθορίζεται από την άμεση και ειδική αλληλεπίδραση με τριμεθυλιωμένες **H3K4** ουρές.

Η πλειονότητα των *Smyd3* προσδεσμένων περιοχών στο γονιδίωμα βρίσκονται σε φερόμενες ρυθμιστικές περιοχές (-10kb μέχρι TSS) και σώματα γονιδίων (gene bodies) (εξώνια και εσώνια) (Εικόνα 56). Η εκτίμηση κατανομής πυκνότητας πιθανότητας με τη μέθοδο των Πυρήνων (Kernel Density Estimation) της κανονικοποιημένης *Smyd3* κάλυψης διαβάσματος στις περιοχές των υποκινητών δημιούργησαν ένα διφασικό προφίλ πυκνότητας (Εικόνα 57), χαρακτηριστικό μεταγραφικών παραγόντων που προσδέονται στο γονιδίωμα τόσο με υψηλή όσο και με χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης (Nie et al., 2012). Προκειμένου να χαρτογραφήσουμε το προφίλ πρόσδεσης με μεγαλύτερη ακρίβεια, καθορίσαμε τη μέση κάλυψη της πυκνότητας πρόσδεσης της *Smyd3* κατά μήκος ενός υποθετικού μέσου γονιδίου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 58, η πρόσδεση της *Smyd3* ήταν ενισχυμένη γύρω από το TSS (Transcription Start Site) στα γονίδια στόχους, φτάνοντας στο μέγιστο στη +75 νουκλεοτιδική βάση κάτωθι (downstream) του TSS. Το μέγιστο της διανομής πρόσδεσης της *Smyd3* επικαλύπτεται με αυτό της RNA Pol-II και το πρώτο νουκλεόσωμα downstream του TSS (Εικόνα 58). Ενώ η μέση κατανομή προσδίδει μία καλή γενική εκτίμηση της πρόσδεσης της *Smyd3* στις θέσεις που είναι εμπλουτισμένη, όταν εικόνες από διακριτά γονίδια από

το ChIP seq πείραμα παρατηρήθηκαν, συχνά παρατηρήσαμε μοναδικές ή διπλές κορυφές (peaks) στις δύο πλευρές των TSS και σε ορισμένες περιπτώσεις μία προέκταση της Smyd3 πρόσδεσης στα γονιδιακά σώματα (gene bodies) (Εικόνες 41, 44, 48).

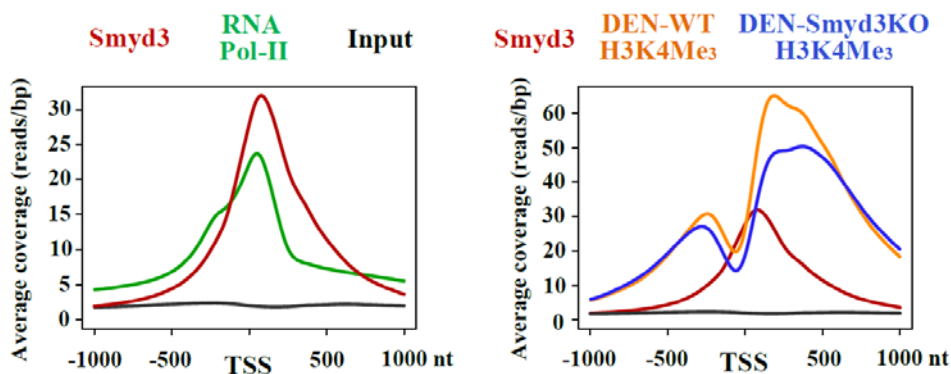


Εικόνα 56 : Γενωμική κατανομή των ChIP-seq κορυφών όπως προέκυψαν με αντίσωμα της Smyd3 σε συκώτια 8,5 μηνών DEN-επαγόμενων WT ποντικών. Τα ποσοστά αναγράφουν την αναλογία από τις ολικές κορυφές (27324) τα οποία ανήκουν στην εκάστοτε κατηγορία.



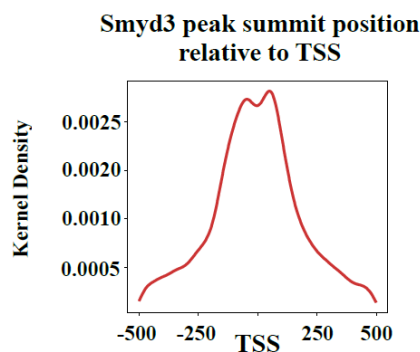
Εικόνα 57 : Γκαουσιανή εκτίμηση κατανομής πυκνότητας πιθανότητας με τη μέθοδο των Πυρήνων (Gaussian Kernel Density Estimation) των Smyd3 διαβασμάτων ανά kb ανά εκατομμύρια διαβάσματα (reads per kb per million reads RPKM) γύρω από το TSS (-1 kb μέχρι + 1kb) σε κλίμακα φυσικού λογαρίθμου (ln). Η διαστικότητα της εκτίμησης πυκνότητας Kernel είναι ενδεικτική των προσδέσεων της Smyd3 με υψηλότερες (δεξιά) και χαμηλότερες (αριστερά) συγγένειες.



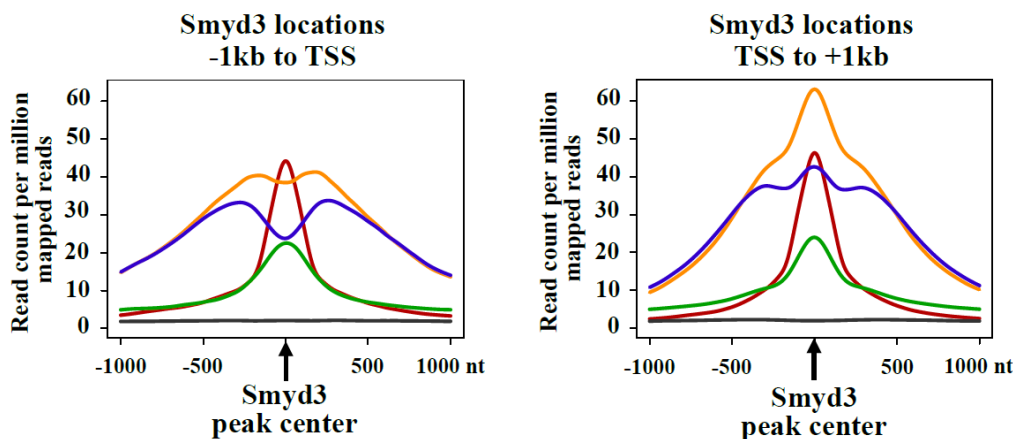


Εικόνα 58 : Προφίλ των μέσων προσδέσεων της *Smyd3*, *RNA Pol-II* και *H3K4me3* γύρω από το TSS των *Smyd3* προσδεμένων γονιδίων σε 8,5 μηνών *DEN*-επαγόμενα WT ποντίκια και σε *Smyd3-KO* ποντίκια. Τα προφίλ υπολογίστηκαν στη βάση της μέσης κανονικοποιημένης κάλυψης (reads per bp).

Προκειμένου λοιπόν να αποκτήσουμε μία πιο αναλυτική εικόνα της κατανομής της *Smyd3*, αναπαραστήσαμε την εκτίμηση κατανομής πυκνότητας πιθανότητας με τη μέθοδο των Πυρήνων των μεγίστων σημάτων πρόσδεσης (peak summit) των περιοχών αντί του μέσου αριθμού διαβασμάτων στις ολικές κορυφές (peaks), κατά μήκος των περιοχών των υποκινητών. Από αυτό προέκυψε μία μερικώς διφασική κατανομή των ακριβών *Smyd3* θέσεων πρόσδεσης, με πιο έντονη παρουσία στα αριστερά και στα δεξιά του TSS (Εικόνα 59) και μας ώθησε στο να αναλύσουμε την κάλυψη της *Smyd3* γύρω από τα κέντρα των κορυφών (peak) του *Smyd3* ChIP-seq, ξεχωριστά για την περιοχή -1kb μέχρι το TSS και από το TSS μέχρι το +1kb. Το άνωθεν του TSS μέγιστο σήμα προσδέσεων (peak summit) συνέπεσε τέλεια με την κοιλάδα της *H3K4me3* καμπύλης η οποία μαρκάρει την περιοχή του υποκινητή που στερείται νουκλεοσωμάτων (Εικόνα 60 αριστερά), ενώ το κάτωθεν του TSS μέγιστο σήμα προσδέσεων όχι μόνο συνέπεσε τέλεια με το μέγιστο πρόσδεσης των *H3K4me3* καμπυλών, αλλά μία επιπλέον κεντραρισμένη προεξοχή του τελευταίου παρατηρήθηκε (Εικόνα 60 δεξιά).

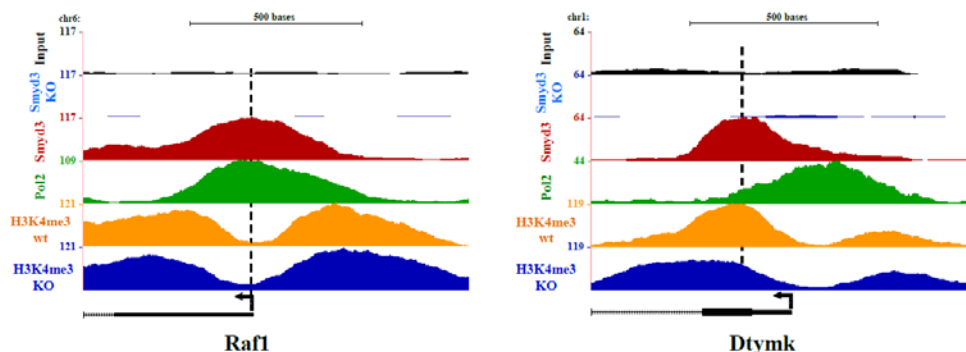


Εικόνα 59 : Γκαουσιανή εκτίμηση κατανομής πυκνότητας πιθανότητας με τη μέθοδο των Πυρήνων των ακριβών θέσεων των *Smyd3* μεγίστου πρόσδεσης (νουκλεοσιδική βάση με την υψηλότερη πρόσδεση *Smyd3*) γύρω από τα TSS.



Εικόνα 60 : Προφίλ της μέσης πρόσδεσης των Smyd3, RNA Pol-II και H3K4me3 των Smyd3 μεγίστων σημάτων πρόσδεσης (peak summits) για τις Smyd3 κορυφές (peaks) οι οποίες βρίσκονται στις : -1kb μέχρι TSS (αριστερά) και TSS μέχρι +1kb (δεξιά) περιοχές

Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει μία θετική σχέση μεταξύ της Smyd3 πρόσδεσης και της ποσότητας της συχνότητας της H3K4me3 τροποποίησης στο πρώτο νουκλεόσωμα του γονιδιακού σώματος. Παραδείγματα των δύο τύπων προσδέσεων σε διακριτά γονίδια φαίνονται στην εικόνα 61.

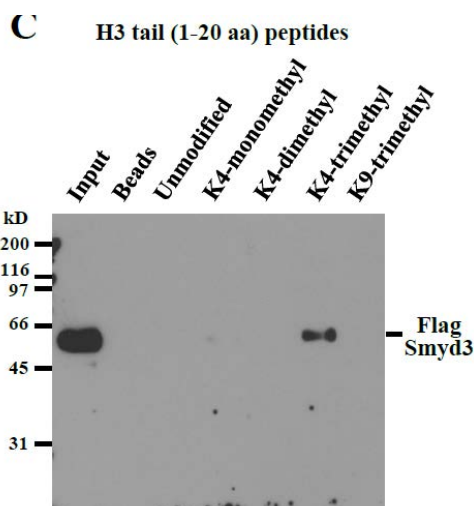


Εικόνα 61 : Εικόνες Genome Browser στα γονίδια από τα tracks των Smyd3, RNA Pol-II (Pol2) και H3K4me3 προσδεμένων περιοχών γύρω από το TSS των Raf1 και Dtymk γονιδίων. Τα Smyd3 μέγιστα σήματα πρόσδεσης (peak summits) συμπίπτουν είτε με τα RNA Pol-II είτε με τα H3K4me3 μέγιστα πρόσδεσης.

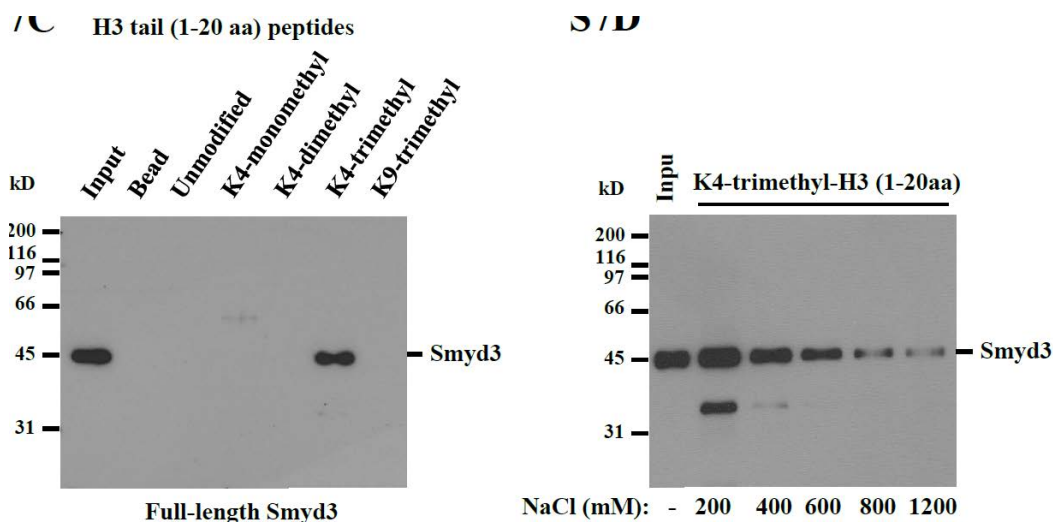
Σε ακολουθία με αυτήν την παρατήρηση, ακόμα πιο σημαντικά είναι τα δεδομένα από πειράματα in vitro αλληλεπίδρασης, τα οποία πραγματοποιήθηκαν με πεπτίδια τροποποιημένων ουρών ιστονών και απέδειξαν ότι η Smyd3 αλληλεπιδρά αποτελεσματικά με την τριμεθυλιωμένη H3K4 ουρά αλλά όχι με τη μη τροποποιημένη, τη μονο- και δι- μεθυλιωμένη H3K4 και την τριμεθυλιωμένη H3K9, πεπτίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες (Εικόνα 62). Η άμεση και υψηλής πρόσδεσης αλληλεπίδραση μεταξύ της Smyd3 και των τριμεθυλιωμένων ουρών ιστονών H3K4 επιβεβαιώθηκε επίσης με πειράματα pull-down τα οποία πραγματοποιήθηκαν με καθαρισμένη, ανασυνδυασμένη



Smyd3 πρωτεΐνη (Εικόνες 63, 64, 65). Τέλος pull-down πειράματα με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οι οποίες περιείχαν διακριτές δομικές περιοχές (domains) της Smyd3 πρωτεΐνης, απέδειξαν ότι το καρβοξυτελικό άκρο-μοτίβο (C-terminal domain) της Smyd3 είναι απαραίτητο και ικανό για την ειδική πρόσδεση με τα τριμεθυλιωμένα H3K4 πεπτίδια (Εικόνες 64,65).



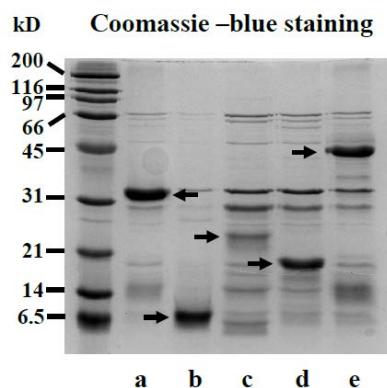
Εικόνα 62 : *In vitro* αλληλεπίδραση της Smyd3 με τροποποιημένα πεπτίδια ουρών ιστονών. Εκχυλίσματα από CMV-Flag-Smyd3-επιμολυσμένα HEK-293 κύτταρα επωάσθησαν με τα αντίστοιχα αναγραφόμενα πεπτίδια ουρών ιστόνης H3, τα οποία είχαν προσδεθεί σε σφαιρίδια αραρόζης-στρεπταβιδίνης. Η αλληλεπίδραση με τη Smyd3 εκτιμήθηκε με Western Blot ανάλυση χρησιμοποιώντας anti-Flag αντίσωμα.



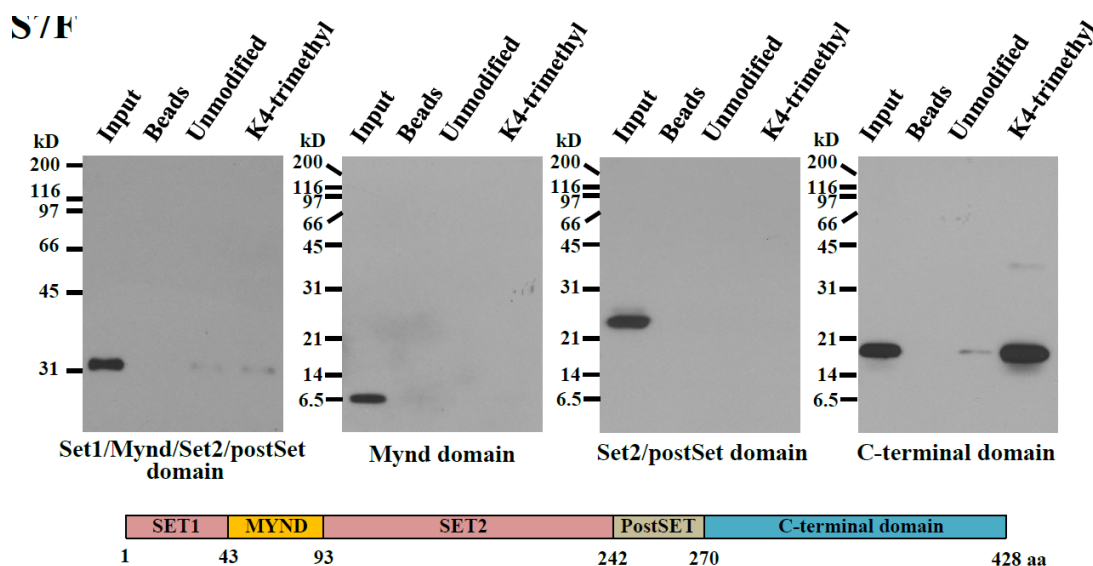
Εικόνα 63 . Αριστερά : *In vitro* αλληλεπίδραση της ανασυνδυασμένης Smyd3 με τροποποιημένα πεπτίδια ουρών ιστονών. Βακτηριακά εκφραζόμενη ολικού μεγέθους (full length 1-428αμινοξέα) His6-Smyd3 επωάσθησε με τα αντίστοιχα αναγραφόμενα πεπτίδια ουρών ιστόνης H3, τα οποία είχαν προσδεθεί σε σφαιρίδια αραρόζης-στρεπταβιδίνης. Η αλληλεπίδραση με τη Smyd3 εκτιμήθηκε με Western Blot ανάλυση χρησιμοποιώντας anti-His-tag

αντίσωμα. Το Input αντιπροσωπεύει 20ng καθαρής πρωτεΐνης η οποία αντιστοιχεί στο 5% της ολικής πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε για τα pull down. Η αλληλεπίδραση και το διάλυμα πλύσης περιείχε 600μM NaCl.

Δεξιά: In vitro αλληλεπίδραση της ανασυνδασμένης ολικού μεγέθους (full length 1-428 αμινοξέα) His6-Smyd3 με πεπτίδια ουρών ιστονών τριμεθυλιωμένης λυσίνης 4 (K4-trimethylated histone-3) σε αυστηρές συνθήκες αλατότητας. Η αλληλεπίδραση και το διάλυμα πλύσης περιείχε την αναγραφόμενη συγκέντρωση NaCl.



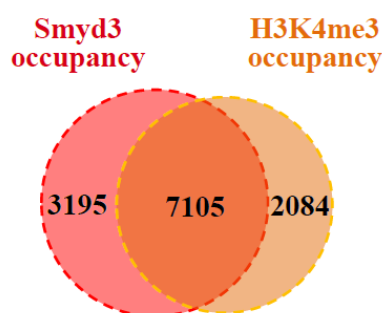
Εικόνα 64 : Πήκτωμα ακρυλαμίδης βαμμένο με τη χρωστική Coomassie-blue το οποίο δείχνει τις καθαρισμένες ανασυνδασμένες πρωτεΐνες με επίτοπο His6-tag, οι οποίες αντιπροσωπεύουν διαφορετικά δομικά μοτίβα (domains) της Smyd3 τα οποία εν συνεχεία (Εικόνα 65) χρησιμοποιούνται σε pull down πειράματα. a) Set1/Mynd/Set2/postSet μοτίβο (aa 1- 270); b) Mynd μοτίβο (aa 43-93); c) Set2/postSet μοτίβο (aa 93-270); d) C-terminal μοτίβο (aa 270-428) e) full length Smyd3.



Εικόνα 65 : In vitro αλληλεπίδραση των ανασυνδασμένων His6-tagged πρωτεϊνών που αντιπροσωπεύουν τα μοτίβα (domains) της Smyd3 με μη τροποποιημένα και τριμεθυλιωμένα στην λυσίνη 4 πεπτίδια ουρών ιστόνης 3. Η αλληλεπίδραση και το διάλυμα πλύσης περιείχε 600μM NaCl.

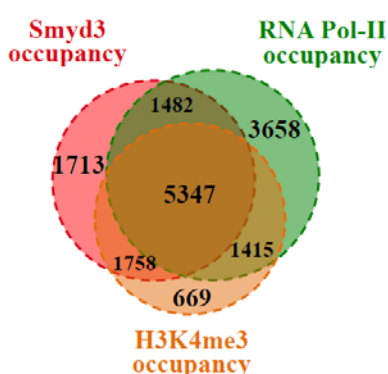
Η ειδική αλληλεπίδραση της Smyd3 με την H3K4me3 ουρά, αποτελεί ένα θεμελιώδη μηχανισμό αναγνώρισης των στόχων, υπεύθυνο για την ισχυρή προτίμηση της Smyd3 για πρόσδεση σε μεταγραφικά ενεργές περιοχές, όπως προκύπτει από την ισχυρή συσχέτιση της πρόσδεσης της Smyd3 με την H3K4me3 τροποποίηση (Εικόνες 62, 63, 65) και από το γεγονός ότι περίπου το 77% των περιοχών υποκινητών που περιέχουν την H3K4me3 τροποποίηση είναι επίσης προσδεμένες από Smyd3 (Εικόνες 66, 67). Ο επιπλέον εμπλουτισμός του H3K4me3 σήματος στο μέγιστο σήμα πρόσδεσης (peak summit) της κανονικής H3K4me3 κορυφής (peak) στις Smyd3 προσδεμένες περιοχές downstream του TSS (Εικόνα 60) αποδεικνύει περαιτέρω την λειτουργική σημασία αυτής της αλληλεπίδρασης.

#### Regions around TSS (-1kb to +1kb)



Εικόνα 66 : Διάγραμμα Venn το οποίο δείχνει την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της H3K4me3 τροποποίησης και της πρόσδεσης της Smyd3 στις περιοχές υποκινητών στα συκώτια 8,5 μηνών DEN-επαγόμενων WT ποντικών.

#### Regions around TSS (-1kb to +1kb)



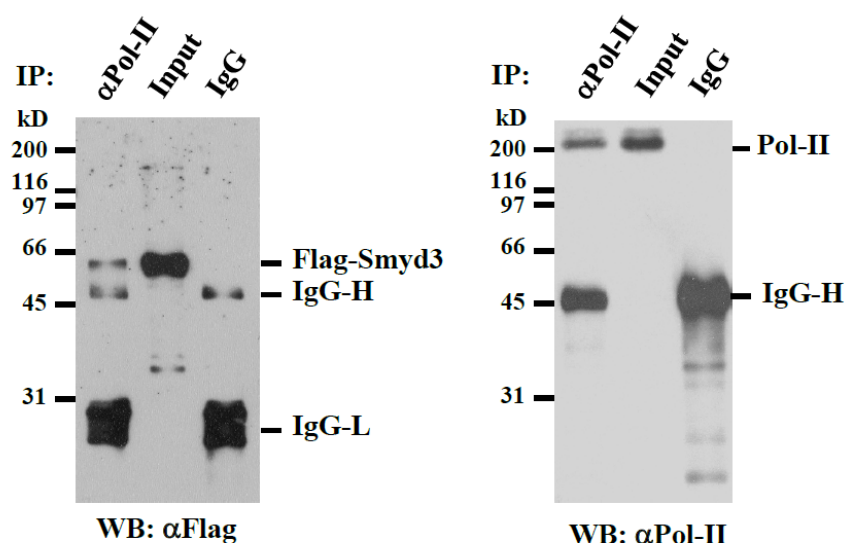
	Smyd3	RNA Pol-II	H3K4Me3
Smyd3	10300	6829 (66%)	7105 (69%)
RNA Pol-II	6829 (57%)	11902	6762 (57%)
H3K4Me3	7105 (77%)	6762 (73%)	9189

Εικόνα 67 : Διάγραμμα Venn το οποίο δείχνει την αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της H3K4me3 τροποποίησης και της πρόσδεσης της Smyd3 και της RNA Pol-II στις περιοχές υποκινητών στα συκώτια 8,5 μηνών DEN-επαγόμενων WT ποντικών.

Σε συμφωνία με την ιδέα ότι η στρατολόγηση της Smyd3 συσχετίζεται με την γονιδιακή ενεργοποίηση, η ChIP-seq ανάλυση στα συκώτια από DEN-επαγόμενα Smyd3-KO ποντίκια έδειξε

σημαντικά μειωμένα H3K4me3 διαβάσματα συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα του WT (Εικόνες 58, 60).

Η δικόρυφη διανομή της Smyd3 άνωθεν (upstream) και κάτωθεν (downstream) του TSS θέσεων, γέννησε την ιδέα της πιθανότητας της στρατολόγησης της Smyd3 στα διαφορετικά γονίδια μέσω πολλαπλών μηχανισμών. Πιθανοί μηχανισμοί, διαφορετικοί από την αλληλεπίδραση με τις H3K4me3 ουρές περιλαμβάνουν την άμεση πρόσδεση με DNA ή με άλλες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένης της RNA Pol-II. Στοιχεία για την αλληλεπίδραση μεταξύ Smyd3 και RNA Pol-II σε HeLa κύτταρα είχαν ήδη αναφερθεί (Hamamoto et al., 2004). Τα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης σε συκώτια ποντικών επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση αυτή (Εικόνα 68).

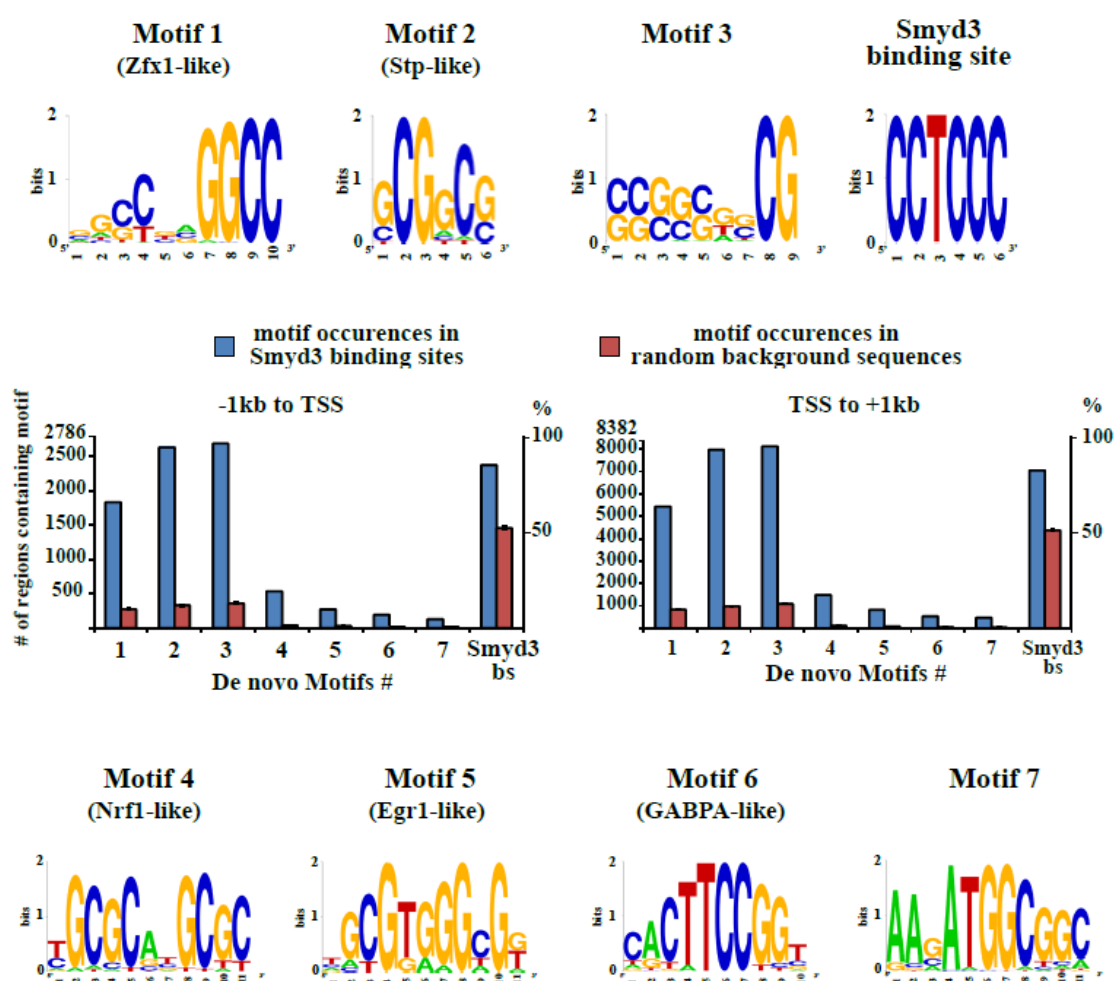


Εικόνα 68: Πυρηνικά εκχυλίσματα από DEN-επαγόμενα συκώτια 8,5 μηνών *TgSmyd3* ποντικών ανοσοκατακρημνίστηκαν με RNA Pol-II αντίσωμα ή με control IgG. Η συν-ανοσοκατακρημνισμένες Smyd3 και RNA Pol-II ανιχνεύτηκαν με ανάλυση Western Blot χρησιμοποιώντας anti-Flag (αριστερά) ή anti-Pol-II αντισώματα (δεξιά).

Επειδή η Smyd3 αρχικά περιγράφηκε να έχει τη δυνατότητα για ειδική με αλληλουχία (sequence-specific) πρόσδεση με το DNA (Hamamoto et al., 2004), εφαρμόσαμε εξ αρχής (de novo) αναζήτηση εύρεσης αντίστοιχου μοτίβου στις περιοχές πρόσδεσης της Smyd3. Η de novo χωρίς a priori γνώση έρευνά μας χαρακτήρισε 7 διαφορετικές στατιστικά σημαντικές αλληλουχίες, 3 από τις οποίες (Μοτίβα 1, 2 και 3) ήταν παρόντα σε ποσοστά 65%, 94% και 96 % των σημείων πρόσδεσης της Smyd3 αντίστοιχα. Αυτές η αναλογίες ήταν πολύ υψηλότερες (6 με 8 φορές) από τις αντίστοιχες που αναμένονταν για τυχαίες θέσεις υποκινητών (Εικόνα 69). Ενδιαφέρον είναι ότι το προηγούμενα χαρακτηρισμένο μοτίβο-αλληλουχία πρόσδεσης CCTCCC ήταν παρών στο 85% των Smyd3 προσδεμένων περιοχών, αλλά αυτό το ποσοστό ήταν μόλις 1,6 φορά μεγαλύτερο από αυτό που

βρέθηκε για τυχαίες περιοχές υποκινητών (Εικόνα 69). Όλα τα μοτίβα αλληλουχιών βρέθηκαν τόσο upstream του TSS όσο και downstream του TSS περιοχών πρόσδεσης της Smyd3.

Συγκεντρωτικά, όλα τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η Smyd3 μπορεί να στρατολογηθεί στους στόχους της μέσω πολλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένων της αλληλεπίδραση με τριμεθυλιωμένες H3K4 ουρές, με την RNA Pol-II και άλλους αλληλουχιο-ειδικούς πρωτεϊνικούς παράγοντες οι οποίοι μπορούν να αναγνωρίσουν τις αλληλουχίες που ανακαλύφθηκαν.



Εικόνα 69 : Λογότυπα αλληλουχιών των μοτίβων που βρέθηκαν κάτω από τις Smyd3 κορυφές μέσω de novo έρευνας μοτίβων. Οι μπάρες απεικονίζουν τον αριθμό των Smyd3-προσδεσμένων περιοχών (μπλε) ή των τυχαίων γενομικών περιοχών (κόκκινα), που περιέχουν την αντίστοιχη αλληλουχία μοτίβο. Οι Smyd3-προσδεσμένες και τυχαίες γενομικές περιοχές αναζητήθηκαν για τα μοτίβα 1-7 και για το προηγούμενα ανιχνευμένο μοτίβο πρόσδεσης της Smyd3 (5'-CCTCCC-3'), το οποίο δεν ανιχνεύθηκε με de novo έρευνα.



## Συζήτηση

Τα αποτελέσματα τα οποία παρουσιάζονται σε αυτή τη μελέτη δείχνουν ότι η Smyd3 έχει έναν πυρηνικό ρόλο, ο οποίος είναι απαραίτητος για την χημικά επαγόμενη καρκινογένεση του ήπατος και του παχέως εντέρου στα ποντίκια. Η Smyd3 άμεσα και ειδικά αλληλεπιδρά με τις τριμεθυλιωμένες H3K4 ουρές ιστονών, γεγονός που συνεισφέρει στην ευρεία γενωμικά επιλογή των στόχων και προτίμηση των ενεργών μεταγραφικά ρυθμιστικών περιοχών. Αν και στις περισσότερες περιοχές που υπάρχει είναι λειτουργικά ουδέτερη, σε ένα συγκεκριμένο υποσύνολο γονιδίων τα οποία προάγουν την καρκινογένεση, η Smyd3 δρα σαν ένας απαραίτητος μεταγραφικός ενισχυτής.

**Η Smyd3 είναι ένας πλειοτροπικός ενισχυτής πολλών μονοπατιών που σχετίζονται με την καρκινογένεση.**

Μία άμεσα λειτουργική σχέση μεταξύ της έκφρασης της Smyd3 των Kras<sup>G12D</sup>-εξαρτώμενων οδηγούμενων από οξεία παγκρεατίτιδα αδenoκαρκινωμάτων του παγκρέατος, και επαγόμενα από αδenoϊούς αδenoκαρκινώματα του πνεύμονα, αναφέρθηκαν πρόσφατα στα ποντίκια (Mazur et al., 2014). Μία σειρά πειραμάτων έδειξε ότι οι πρωταρχικοί ενζυματικοί στόχοι της Smyd3 είναι η κυτταροπλασματική κινάση MAP3K2, της οποίας η μεθυλίωση στη λυσίνη K260 εμποδίζει την αλληλεπίδρασή της με την PP2A φωσφατάση, εμποδίζοντας έτσι την παρεμποδιστική δράση στη Ras-ERK ογκογόνα αλληλουχία μεταγωγής σήματος (Mazur et al., 2014).

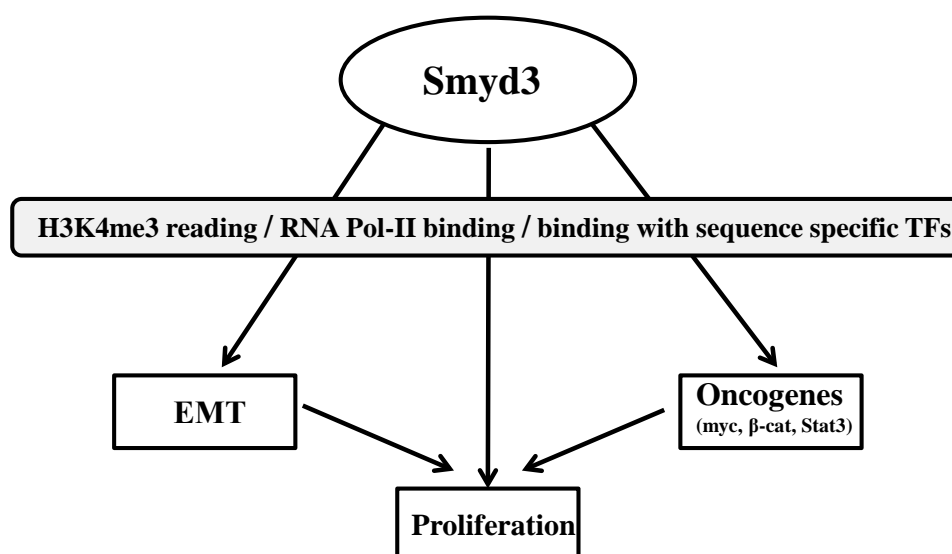
Στην παρούσα εργασία βρίσκουμε ότι η ανάπτυξη της χημικά επαγόμενης καρκινογένεσης στο ήπαρ και στο παχύ έντερο παρεμποδίζεται δραματικά στα Smyd3-ελλειμματικά ποντίκια, αναπτύσσοντας μία αιτιολογική σχέση μεταξύ της έκφρασης της Smyd3 και της εξέλιξης του καρκίνου. Στο ήπαρ, η έλλειψη της Smyd3 δεν επηρέασε την DEN-εξαρτώμενη ενεργοποίηση των δύο κάτωθι της MAP3K2 κινασών (MEK1/2 και JNK1), υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός της μεθυλίωσης της κυτταροπλασματικής MAP3K2 δεν λειτουργεί σε όλους τους ιστούς. Σε αντίθεση με τα καρκινώματα στους πνεύμονες και το πάγκρεας, ιστούς στους οποίους η Smyd3 είναι αποκλειστικά εκφραζόμενη στο κυτταρόπλασμα (Mazur et al., 2014), ανιχνεύσαμε την Smyd3 πρωτεΐνη στον πυρήνα των DEN-επαγόμενων καρκινικών κυττάρων του ήπατος, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν να ρυθμίζει καρκινο-εξαρτώμενες πυρηνικές λειτουργίες.

Τόσο η DEN-επαγόμενη ηπατοκαρκινογένεση όσο και η DMH/DSS-επαγόμενη καρκινογένεση παχέως εντέρου αναπτύσσονται σε ένα περιβάλλον επαγόμενης φλεγμονής μετά από κυτταρική καταστροφή (Kohno et al., 2005; Maeda et al., 2005; Verna et al., 1996). Η απενεργοποίηση της Smyd3 δεν επηρέασε ούτε τον κυτταρικό θάνατο ούτε την στρατολόγηση ανοσοποιητικών κυττάρων της φλεγμονής σε κανένα από τα καρκινο-επαγόμενα μοντέλα, ωστόσο επηρέασε έντονα την ένταση



του αντισταθμιστικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενός σημαντικού γεγονότος της καρκινογένεσης. Η έλλειψη της Smyd3 επηρέασε την ενεργοποίηση της πλειονότητας των DEN-επαγόμενων γονιδίων (περίπου του 90%), 68% των οποίων προσδένονται από τη Smyd3. Ο υψηλός αριθμός των Smyd3-εξαρτώμενων καρκινο-επαγόμενων γονιδίων είναι σε συμφωνία με το φαινότυπο της απαίτησης της Smyd3 για τον σχηματισμό καρκίνου. Ο μηχανισμός της Smyd3 εξαρτώμενης καρκινικής επαγωγής περιλαμβάνει τόσο άμεσες όσο και έμμεσες επιδράσεις στον μεταγραφικό έλεγχο των γονιδίων που επάγουν καρκίνο. Ανάμεσα στους άμεσους στόχους είναι και πολλοί ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου, όπως γονίδια κυκλινών, PCNA, Plk1 και IGFBP1. Μία άλλη κατηγορία των Smyd3 στόχων περιλαμβάνει τα ογκογονίδια c-myc και β-catenin και συστατικά του IL6-Jak-Stat3 ογκογόνου μονοπατιού, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να ενεργοποιήσει κάτωθι το ίδιο ή διαφορετικό σετ ειδικών του πολλαπλασιασμού γονιδίων στόχων. Η Smyd3-εξαρτώμενη ενεργοποίηση ογκογόνων μεταγραφικών παραγόντων, όπως c-myc, β-catenin, Stat3 και η δυναμική συνέργεια με τη Smyd3 σε κοινούς κάτωθι στόχους θα έπρεπε να συμβάλει σε ενισχυμένα μεταγραφικά αποτελέσματα των τελευταίων. Αυτό το ρυθμιστικό δίκτυο, το οποίο σχηματικά παρουσιάζεται στην εικόνα 70, εμπλουτίζεται από τα ευρήματα τα οποία δείχνουν την αναγκαιότητα της Smyd3 για τη μεταγραφική ενεργοποίηση πολλών ρυθμιστών κλειδιών της EMT (Επιθηλιακής σε Μεσεγχυματική μετάβαση), μίας πολύπλοκης διεργασίας με την οποία οι κυτταρικές συνδέσεις χαλαρώνουν και τα καρκινικά κύτταρα αποκτούν αυξημένη κινητικότητα και ικανότητα εξάπλωσης (Jou and Diehl, 2010).

Προτείνουμε λοιπόν ότι η πυρηνική Smyd3 είναι ένας κεντρικός ρυθμιστής της έκφρασης του καρκινοειδικού γονιδιακού προγράμματος, δρώντας σε διαφορετικά επίπεδα της μεταγραφικής ιεραρχίας. Ρυθμίζει ένα ρυθμιστικό δίκτυο (Εικόνα 70) υπεύθυνο για τον μεταγραφικό έλεγχο ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων των οποίων η ενεργοποίηση εξειδικεύει πολλαπλά γνωρίσματα κλειδιά του καρκινικού φαινοτύπου.



*Εικόνα 70 : Σχηματική απεικόνιση των ρυθμιζόμενων από τη Smyd3 γονιδίων και μονοπατιών που προάγουν τον καρκίνο καθώς και του μηχανισμού εύρεσης των γονιδίων στόχων.*

Η σχετικότητα των ευρημάτων αυτών με το ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα αποδείχθηκε με την ανάλυση των TCGA δεδομένων. Διαπιστώθηκε μία σημαντική συσχέτιση μεταξύ της Smyd3 υπερέκφρασης και της υπερέκφρασης πολλών γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο. Περαιτέρω, Kaplan-Meier ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε ότι η έκφραση της Smyd3 συσχετίζεται με τη συνολική επιβίωση, την πιθανότητα μηδενικής εμφάνισης όγκου μετά τη χειρουργική αφαίρεση, τη νέα εμφάνιση καρκίνου και την κλίμακα καρκίνου (tumor grade). Περαιτέρω ανάλυση κατάταξης πληροφοριακού κέρδους (Information Gain Ranking), αναγνώρισε τη Smyd3 σαν ένα από τα πιο υψηλού σκορ ταξινόμησης γονίδια (69<sup>η</sup> θέση, με ευρύτητα από 6-641) ανάμεσα σε 18000 ανθρώπινα γονίδια των οποίων η έκφραση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό καρκινικών συκωτιών και φυσιολογικών. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκφραση της Smyd3 μπορεί να έχει τόσο διαγνωστική όσο και προγνωστική αξία στο ανθρώπινο ηπατοκαρκίνωμα.

### **Η Smyd3 δρα σαν ένας ενισχυτής της μεταγραφής των γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκινογένεσης.**

Αν και η απενεργοποίηση της Smyd3 είχε μία πολύ υψηλή προστατευτική επίδραση στην DEN-επαγόμενη καρκινογένεση, αντίστροφος φαινότυπος δεν παρατηρήθηκε στο ηπατοειδικό διαγονιδιακό (TgSmyd3) ποντίκι. Εκτοπική υπερέκφραση της Smyd3 στα ηπατοκύτταρα δεν οδήγησε στην έναρξη αυθόρμητης καρκινογένεσης, υποδηλώνοντας ότι η υπερέκφρασή της δεν είναι ικανή για την ενεργοποίηση των σχετιζόμενων με τον καρκίνο γονιδίων. Συνεπώς η Smyd3 δε μπορεί να θεωρηθεί ως ένα αυτόνομο δρων «πρωτοπόρο» ογκογονίδιο, αλλά ως ένα απαραίτητο συνεργαζόμενο συμπαραγοντα άλλων παραγόντων, οι οποίοι οδηγούν το καρκινο-ειδικό γονιδιακό πρόγραμμα.

Ανιχνεύσαμε μία υψηλή αλληλοεπικάλυψη μεταξύ της πρόσδεσης της Smyd3 και της RNA Pol-II στα DEN-επαγόμενα καρκινικά συκώτια και μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της πυκνότητας πρόσδεσης της Smyd3 και της RNA Pol-II πυκνότητας στις περιοχές υποκινητών με τα μεταγραφικά αποτελέσματα. Με άλλα λόγια, όσο πιο ενεργό ένα γονίδιο, τόσο πιο πολύ Smyd3 στρατολογείται στον υποκινητή, υποδηλώνοντας ότι η Smyd3 δρα σαν ένας ενισχυτής της μεταγραφικής ενεργότητας. Ένα παρόμοιο φαινόμενο το οποίο καλείται γενικός ενισχυτής της μεταγραφής, προτάθηκε πρόσφατα για το μηχανισμό δράσης του c-myc ογκογονιδίου (Lin et al., 2012) (Nie et al., 2012). Αν και η καθολική φύση της λειτουργίας του Myc σαν ένας μεταγραφικός ενισχυτής αμφισβητήθηκε αργότερα (Sabo et al., 2014) (Walz et al., 2014), αυτός ο τρόπος δράσης εξηγεί τις επιδράσεις της στρατολόγησης και ενεργοποίησης ενισχυτών (enhancers) συγκεκριμένων γκρουπ

γονιδίων στους καρκίνους όπου τα επίπεδα της *Myc* πρωτεΐνης υπερεκφράζονται. Τα αποτελέσματά μας σε σχέση με την γονιδιακή κατανομή της *Smyd3* αποκάλυψαν πολλά κοινά αλλά και σημαντικές διαφορές με τον μηχανισμό του *c-Myc*. Για παράδειγμα, η έκφραση της *Smyd3* ήταν έντονα αυξημένη στα DEN-επαγόμενα καρκινικά συκώτια όπου εισβάλλει κατά προτίμηση ανοιχτές H3K4me3-εμπλουτισμένες χρωματινικές περιοχές στους υποκινητές των ήδη ενεργών γονιδίων. Σε αναλογία με τη δράση του *c-Myc*, θα περίμενε κανείς μία περαιτέρω ενίσχυση των *Smyd3* επιπέδων να ευαισθητοποιούσε τα ηπατοκύτταρα στην DEN-επαγόμενη καρκινική ανάπτυξη μέσω αυξημένης έκφρασης των γονιδίων του πολλαπλασιασμού. Ένας τέτοιος όμως φαινότυπος ευαισθητοποίησης στα αρχικά στάδια καρκινογένεσης δεν παρατηρήθηκε στα *Smyd3-Tg* ποντίκια. Αναφέρουμε ωστόσο ότι στο διαγονιδιακό μας μοντέλο, τα επίπεδα *Smyd3* mRNA είναι αφύσικα υψηλά, φτάνοντας επίπεδα έκφρασης 13.5 φορές πάνω από τα ήδη αυξημένα επίπεδα που παρατηρούνται στα DEN-επαγόμενα καρκινικά συκώτια. Συνεπώς πιθανολογούμε ότι τα ήδη υψηλά αυξημένα επίπεδα της ενδογενούς *Smyd3* στα συκώτια των DEN-επαγόμενων ποντικών μπορεί να κορεννύουν τους στόχους και μία περαιτέρω αύξηση από την εκτοπική έκφραση της *Smyd3* να μην αναμένεται να παράγει σημαντικές μεταγραφικές αλλαγές.

Αν και η αναλογική αύξηση της πυκνότητας πρόσδεσης της *Smyd3* με την αυξημένη πυκνότητα της RNA Pol-II στα ενεργά γονίδια και η συσχέτιση με τα θετικά μεταγραφικά αποτελέσματα δηλώνει ισχυρά ότι η *Smyd3* δρα σαν ένας μεταγραφικός ενισχυτής, η λειτουργία αυτή δεν είναι καθολική όπως προτείνεται για το *Myc* (Lin et al., 2012) (Nie et al., 2012), αλλά περιορίζεται σε ένα μικρότερο και πιο ειδικό υποσύνολο των ενεργών γονιδίων. Αυτή η ιδέα εισήχθη αρχικά από το δικόρυφο πρότυπο εκτίμησης κατανομής πυκνότητας πιθανότητας με τη μέθοδο των Πυρήνων (Kernel Density estimation) της *Smyd3* πρόσδεσης, χαρακτηριστικό μεταγραφικών ρυθμιστών με περιοχές πρόσδεσης τόσο με υψηλή όσο και χαμηλή συγγένεια, σε αντίθεση με το μονοκόρυφο πρότυπο παραγόντων, όπως του *c-myc*, των οποίων η επιλογή στόχων ομοιάζει συνεχή ανάλογα πρότυπα (Nie et al., 2012). Η *Smyd3* εισβάλλει τους υποκινητές περίπου 10,300 γονιδίων στα DEN-επαγόμενα καρκινικά συκώτια, αλλά η έκφραση μόνο 590 από αυτά προκαλείται με έναν *Smyd3*-εξαρτώμενο τρόπο. Αυτό το τελευταίο εύρημα δείχνει ξεκάθαρα ότι η *Smyd3* δεν είναι ένας bona fide μεταγραφικός ενεργοποιητής ο οποίος από μόνος του είναι ικανός να υποκινήσει το σχηματισμό του συμπλόκου προ-έναρξης μεταγραφής (Preinitiation Complex, PIC) στους υποκινητές. Τα δεδομένα είναι πιο συμβατά με ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο η *Smyd3* δρα σαν ένας συνενεργοποιητής, ο οποίος εισβάλλει σε ρυθμιστικές περιοχές ήδη ενεργών γονιδίων και ενισχύει περαιτέρω τη μεταγραφή τους η οποία καθοδηγείται από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. Η λειτουργική εξειδίκευση μπορεί να έρχεται από την δυνατότητα της *Smyd3* να συνεργάζεται με άλλους παράγοντες οι οποίοι ρυθμίζουν τα DEN-επαγόμενα γονίδια και όχι από στοχευμένη στρατολόγηση (παρακάτω).

### Ο μηχανισμός εύρεσης των γονιδίων στόχων της Smyd3.

Η στοχευμένη στρατολόγηση στα ειδικά γονίδια στόχους ενός μεταγραφικού παράγοντα συνήθως πραγματοποιείται από την ικανότητά του τελευταίου για πρόσδεση σε ειδική-συγκεκριμένη αλληλουχίας DNA. Προηγούμενα πειράματα εύρεσης *in vitro* DNA πρόσδεσης είχαν ανακαλύψει την αλληλουχία 5'-CCCTCC-3' στο 34,8% των διπλής έλικας ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία συνδέονταν με ακινητοποιημένη GST-Smyd3 (Hamamoto et al., 2004). Αναζητήσαμε τις αλληλουχίες κάτω από τις περιοχές πρόσδεσης της Smyd3 και αναζητήσαμε επιπλέον στοχευμένα και την αλληλουχία αυτή και βρήκαμε ότι είναι παρούσα σε ποσοστά της τάξης του 85% (Εικόνα 69). Αν και η τιμή αυτή είναι στατιστικά σημαντική, αυτό το μοτίβο αλληλουχίας έχει επίσης υψηλή πιθανότητα σε τυχαίες background αλληλουχίες (52% του δείγματος), το οποίο υποδηλώνει ότι δεν μπορεί να προσδώσει την απαραίτητη εξειδίκευση στην πρόσδεση του Smyd3. Η δικιά μας *de novo* αναζήτηση δεν ανίχνευσε την CCCTCC αλληλουχία. Εντούτοις, νέα μοτίβα ανακαλύφθηκαν τα οποία είναι σε υψηλό ποσοστό παρόντα στις Smyd3-προσδεσμένες περιοχές, αλλά όχι σε τυχαίες αλληλουχίες. Πολλά από αυτά τα μοτίβα μοιάζουν τα μοτίβα πρόσδεσης γνωστών μεταγραφικών παραγόντων, όπως των Zfx, Stp1, Nrf1, Egr1 και GABPA, πρωτεΐνες οι οποίες πιθανόν και να διαμεσολαβούν την πρόσδεση του Smyd3 μέσω αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών.

Η προτίμηση για στρατολόγηση σε ενεργά ρυθμιστικές περιοχές μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αλληλεπίδρασης με στοιχεία την μεταγραφικής συσκευής ή με αλληλεπίδραση με τροποποιήσεις χρωματίνης οι οποίες «διακοσμούν» την μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη. Η Smyd3 αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα της RNA Pol-II ((Hamamoto et al., 2004) και παρούσα μελέτη), η οποία αλληλεπίδραση μπορεί εν μέρει να εξηγήσει την υψηλή αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των περιοχών πρόσδεσης της Smyd3 και της RNA Pol-II. Ωστόσο το προφίλ εκτίμησης κατανομής πυκνότητας πιθανότητας με τη μέθοδο των Πυρήνων των Smyd3 διαβασμάτων στους υποκινητές υποδηλώνει ότι ένας δεύτερος πληθυσμός Smyd3 μορίων με υψηλότερη συγγένεια μπορεί να υπάρχει επίσης (Εικόνα 57). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο πληθυσμός αυτός αντιστοιχεί σε Smyd3 μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με νουκλεοσώματα H3K4me3 τροποποίησης. Στους υποκινητές των ευκαρυωτικών γονιδίων, τα νουκλεοσώματα πλησίον του TSS των μεταγραφικά ενεργών γονιδίων είναι εμπλουτισμένα με την H3K4me3 τροποποίηση (Santos-Rosa et al., 2002) (Kouskouti and Talianidis, 2005) (Kouzarides, 2007), προσφέροντας μία επιφάνεια για αλληλεπίδραση με διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες μεταφράζουν την τροποποίηση αυτή για να σηματοδοτήσουν μεταγραφική ενεργοποίηση (Gardner et al., 2011) (Wozniak and Strahl, 2014). Γνωστές H3K4me3 αλληλεπιδρούσες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν τις κατέχουσες PHD finger πρωτεΐνες TAF3, BPTF, ING2, PHF8, JARID1, την chromodomain πρωτεΐνη CHD, την Tudor μοτίβου πρωτεΐνη Jmjd2a και άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν WD40 επαναλήψεις με μικρότερη εξειδίκευση (Vermeulen et al., 2007) (Bartke et al., 2010) (Wozniak and Strahl, 2014). Η πρόσδεση αυτών των παραγόντων σε υποκινητές με H3K4me3

νουκλεοσώματα μπορεί να προωθήσει τη συναρμολόγηση ενεργών συμπλεγμάτων προ-έναρξης της μεταγραφής (Preinitiation Complexes, PIC) στους υποκινητές ή να ρυθμίσει την μεταγραφική ενεργότητα των αντίστοιχων γονιδίων. Είναι σημαντικό ότι σε πολλές περιπτώσεις επαναλαμβανόμενες μεταλλαγές ή αλλοιωμένη έκφραση των πρωτεϊνών ανάγνωσης (readers) των τροποποιήσεων των ιστονών έχουν ενοχοποιηθεί στην παθογένεση διαφορετικών καρκίνων (Dawson et al., 2012). Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η Smyd3 άμεσα και εξειδικευμένα προσδένεται σε τριμεθυλιωμένες H3K4 ουρές ιστονών *in vitro* και δείχνει μία ισχυρή *in vivo* πρόσδεση για γενωμικές περιοχές που είναι εμπλουτισμένες με αυτή την τροποποίηση.

Τα προφίλ συν-πρόσδεσης των Smyd3, RNA Pol-II και H3K4me3-τροποποιημένων νουκλεοσωμάτων παρουσιάζουν πολύ μεγάλη αν και όχι πλήρη επικάλυψη (Εικόνα 67). Αυτό υποδηλώνει ότι η Smyd3 επιλέγει τους στόχους της μέσω πολλαπλών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της αλληλεπίδρασης με DNA αλληλουχίες ή αλληλουχιο-ειδικούς DNA προσδεδεμένους παράγοντες, αλληλεπίδραση με την RNA Pol-II μηχανή και άμεση αλληλεπίδραση με τα H3K4me3-τροποποιημένα νουκλεοσώματα στους υποκινητές (Εικόνα 70). Οι δύο τελευταίοι μηχανισμοί μπορούν να αποδώσουν το 83% των ευρεθέντων Smyd3 περιοχών πρόσδεσης, το οποίο είναι σε συμφωνία με το μοντέλο κατά το οποίο η Smyd3 κατά προτίμηση εισβάλλει σε ήδη ανοιχτές, μεταγραφικά ενεργές περιοχές.

### **Ο ρόλος της ενεργότητας μεθυλάσης ιστονών στον μηχανισμό μεταγραφικής ενεργότητας.**

Στα συκώτια των DEN-επαγόμενων Smyd3-KO ποντικών παρατηρήσαμε μειωμένη τριμεθυλιωμένη H3K4 στους υποκινητές των προσδεδεμένων Smyd3 περιοχών, το οποίο ταιριάζει με την αρχική πρόταση ότι η Smyd3 μπορεί να ενεργοποιεί τη μεταγραφή μέσω H3K4 μεθυλίωσης (Hamamoto et al., 2004). Ωστόσο, η μείωση της H3K4me3 μπορεί επίσης να είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης μεταγραφικής ενεργότητας. Το σενάριο αυτό ενισχύεται από τα πειράματα διαμόλυνσης DNA (transfection assays), τα οποία αποκαλύπτουν ότι η ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης της Smyd3 δεν είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Περαιτέρω, άλλες μελέτες έδειξαν ότι η ιστόνη 4 αλλά όχι η ιστόνη 3 είναι στόχος μεθυλίωσης από την Smyd3 και έθεσαν την λυσίνη 5 της ιστόνης 4 (H4K5) ως τον πρωταρχικό *in vitro* στόχο της Smyd3 (Van Aller et al., 2012). Βέβαια η πιθανότητα η Smyd3 να μεθυλιώνει H3K4 για ορισμένα συγκεκριμένα γονίδια κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησής τους δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Συγκεντρωτικά λοιπόν, η διαθέσιμη πληροφορία της εργασίας αυτής υποστηρίζει τον ρόλο της Smyd3 σαν ένα ενισχυτή της μεταγραφής ανεξαρτήτως της ενεργότητας μεθυλοτρανσφεράσης. Όπως περιγράφεται παραπάνω, η στρατολόγηση της Smyd3 είναι κυρίως εξαρτώμενη από την κατάσταση ανοιχτής χρωματίνης ή ενεργής κατάστασης, ενώ η διαμεσολαβούμενη από τη Smyd3 μεταγραφική

ενίσχυση είναι έντονα εξαρτώμενη από το περιεχόμενο του υποκινητή. Η λειτουργική εξειδίκευση της Smyd3 οδηγεί σε μία έντονα επιλεκτική ενεργοποίηση των γονιδίων του πολλαπλασιασμού και γονιδίων που προωθούν τον καρκίνο. Το γνώρισμα αυτό καθιστά την Smyd3 έναν ιδανικό στόχο για την ανάπτυξη δυνητικών αντικαρκινικών θεραπευτικών φαρμάκων. Η έλλειψη ανιχνεύσιμων φαινοτύπων στα φυσιολογικά Smyd3-ελλειμματικά ποντίκια αυξάνει την προσδοκία ότι οι αναστολείς της Smyd3 μπορεί να έχουν ελάχιστες παρενέργειες.





## Υλικά και Μέθοδοι

### Ποντίκια και αγωγές καρκινογένεσης.

Τα πρωτότυπα Smyd3-ελλειματικά (Smyd3-KO) ποντίκια δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας gene-trap κλώνους ES κυττάρων (AS0527 από International Gene Trap Consortium), στα οποία μία κασέτα επιλογής, η οποία περιέχει θέση αποδοχής ματίσματος (splice acceptor site) από το ποντικίσιο EN2 εξόνιο 2 ακολουθούμενη από ένα β-geo γονίδιο και την SV40 αλληλουχία πολυαδενυλίωσης, εισήχθη στο 5 εσόνιο του Smyd3 γονιδίου. Το ποντίκι που προέκυψε δεν εξέφραζε ώριμο Smyd3 mRNA και πρωτεΐνη σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του ήπατος και του παχέως εντέρου (Εικόνες 22, 28, 29, 30). Για τη δημιουργία του Smyd3-Tg ποντικού, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) του ποντικίσιου Smyd3, το οποίο περιείχε επίσης 3 Flag επιτόπους στο 3' άκρο και 3 HA επιτόπους στο 5' άκρο, εισήχθη στην StuI θέση περιορισμού του pTTR1-ExV3 πλασμιδίου (Yan et al., 1990). Το κομμάτι μετά από πέψη με HindIII, συνολικού μήκους 6,8kb το οποίο περιείχε τον ποντικίσιο υποκινητή/ενισχυτή του γονιδίου της transthyretin (TTR) enhancer/promoter μαζί με το εσόνιο 1, τρεις HA επιτόπους, το Smyd3 cDNA, τρεις Flag επιτόπους και την SV40 θέση πολυαδενυλίωσης, χρησιμοποιήθηκε για να μικροενεθεί σε C57Bl/6 γονιμοποιημένα ωάρια. Τα ζώα ιδρυτές (Founder) ταυτοποιήθηκαν με Southern blotting και διασταυρώθηκαν με F1 ποντίκια προκειμένου να δημιουργηθεί η σειρά σε ανάμικτο background. Η ειδική υπερέκφραση στο ήπαρ ελέγχθηκε με ανάλυση RT-PCR σε διαφορετικούς ιστούς.

Τα ποντίκια διατηρήθηκαν σε κλουβιά ανά γκρουπ ίσων ατόμων σε ελεγχόμενη θερμοκρασία, σε συνθήκες στερείς από παθογόνους μικροοργανισμούς, σε κύκλο 12 ωρών φωτός/12 ωρών νυκτός και τρέφονταν με πρότυπη ξηρά τροφή (Altromin 1324; 19% πρωτεΐνη, 5% λίπος) και νερό ad libitum.

Προκειμένου να προκληθεί ηπατοκαρκίνωμα έγινε μία μοναδική ενδοπεριτοναϊκή ένεση σε ποντίκια ηλικίας 14 ημερών με 25 mg/kg diethylnitrosamine (N0756 Sigma) τα οποία και θυσιάστηκαν σε ηλικία 8.5 μηνών. Για την αγωγή με τη σχετιζόμενη με την κολίτιδα επαγωγή καρκίνου του παχέως εντέρου, δύο μηνών ποντίκια υπέστησαν ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 30 mg/kg 1,2 dimethylhydrazine (DMH) και μετά από μία εβδομάδα τους δόθηκε 2% w/v Dextran Sulfate Salt (DSS) στο πόσιμο νερό τους για 6 μέρες ακολουθούμενο για 14 μέρες κενό-διάλειμμα με σκέτο νερό. Ο εξαήμερος DSS κύκλος επαναλήφθηκε 2 ακόμα φορές με 14 μέρες κενό με σκέτο νερό και μετά και από τον τελευταίο κύκλο τα ποντίκια θυσιάστηκαν για την μελέτη των καρκινωμάτων.

Η αγωγή με το TCPOBOP (1,4-Bis-[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene, 3,3',5,5'-Tetrachloro-1,4-bis(pyridyloxy)benzene) πραγματοποιήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση με 3 mg/kg TCPOBOP διαλυμένο σε καλαμποκέλαιο. Τα ποντίκια θυσιάστηκαν 7 μέρες μετά για ανάλυση. Ποντίκια μάρτυρες (Control) έγιναν αγωγή μόνο με τους διαλύτες των εκάστοτε χημικών-επαγωγέων.

Για τις ηπατεκτομές, 2 με 3 μηνών ποντίκια υποβλήθηκαν σε ηπατεκτομές των 2/3 των συκωτιών τους και θυσιάστηκαν 48 ώρες μετά για ανάλυση. Ποντίκια μάρτυρες υπέστησαν sham χειρουργική τομή. Όλα τα πειράματα έγιναν υπό την έγκριση της κτηνιατρικής υπηρεσίας της νομαρχίας Αττικής και βάση των κανόνων της εθνικής και Ευρωπαϊκής νομοθεσίας.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε τυχαία επιλεγμένα ίδιας ηλικίας, ανά γονότυπο, ανά πείραμα αρσενικά ποντίκια.

### **Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρά ποντικού.**

Σε νεαρά ποντίκια ηλικίας 10-15 ημερών αφαιρείται ένα μικρό κομμάτι από την ουρά και τοποθετείται σε 600 μl TNES buffer (50 mM Tris pH 8, 400 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0,5% SDS) και εν συνεχεία προστίθεται 10 μl Πρωτεϊνάση K (10 mg/ml). Ακολουθεί επώαση O/N (Over Night) στους 55°C για να δράσει το ένζυμο. Στη συνέχεια προστίθενται 167 μl 6M NaCl και το δείγμα ανακινείται για 15 sec. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στην μέγιστη ταχύτητα για 5 min και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Η κατακρήμνιση του DNA γίνεται με 95% αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και το ίζημα πλένεται με 70% αιθανόλη. Τέλος το DNA επαναδιαλύεται σε 100 μl ddH<sub>2</sub>O και για την PCR γονοτύπηση χρησιμοποιούνται 50-100 ng γενωμικού DNA (παρακάτω).

### **Απομόνωση ολικού RNA από ήπαρ.**

Το ολικό RNA από ήπαρ ποντικού απομονώθηκε σύμφωνα με τις τεχνικές οδηγίες της εταιρείας για το προϊόν (Trizol) TRI Reagent® Solution (ThermoFisher AM9738) με το οποίο γίνεται η απομόνωση και ο πρώτος καθαρισμός. Αφού απομονώσουμε το ήπαρ του ποντικού, ξεπλένουμε με 1x PBS και μέρος αυτού (συνήθως ένας ολόκληρος μεσαίος λοβός) τοποθετείται σε 4 mL TRI Reagent® Solution και ομογενοποιείται με χρήση ομογενοποιητή τύπου Polytron. Έπειτα προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία 200 μl ανά 1000 μl Trizol και το δείγμα ανακινείται χειροκίνητα και εν συνεχεία με vortex για 10 sec. Αφού το επώασουμε 3 λεπτά στον πάγκο, φυγοκεντρείται για 15 min στους 4°C στις 12.000 g και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο eppendorf όπου και κατακρημνίζεται με 100% αιθανόλη και 1/10 του όγκου 3 M CH<sub>3</sub>COONa pH 5.8. Έπειτα από χειροκίνητη ανακίνηση το δείγμα τοποθετείται τους -20°C τουλάχιστον O/N ή μεταφέρεται στους -80°C για μακροχρόνια αποθήκευση. Κατόπιν φυγοκεντρείται στους 4°C στις 14.000 rpm για 30 min, το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη. Η διαδικασία πλύσης επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά. Μετά την φυγοκέντρηση και την απομάκρυνση του υπερκείμενου το ίζημα στεγνώνει σε speedvac φυγόκεντρο από τα υπολείμματα της αλκοόλης

και επαναδιαλύεται σε 200-300  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O. Μετά την πλήρη επαναδιάλυσή του, το RNA ποσοτικοποιείται με φωτομέτρηση στα 260 nm και η ποιότητα του ελέγχεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

### **Καθαρισμός ολικού RNA με DNAάση και αντίστροφη μεταγραφή.**

40  $\mu\text{g}$  ολικού RNA επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά με 1  $\mu\text{L}$  (10 u/ $\mu\text{L}$ ) DNaseI RNase-free (Roche 04716728001) σε ρυθμιστικό διάλυμα που διατίθεται από την εταιρία μαζί με το ένζυμο. Παράλληλα ανά 50 $\mu\text{L}$  αντίδραση προστίθεται και 0,5  $\mu\text{L}$  RNaseOUT (inhibitor) (Invitrogen 10777-019). Μετά την επώαση προστίθεται όγκος ddH<sub>2</sub>O ώστε να χαθεί όσο λιγότερο δείγμα γίνεται και ακολουθεί ένας καθαρισμός με φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (σε αναλογία όγκων 25:24:1) και ένας δεύτερος με χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (24:1). Στο υπερκείμενο προστίθενται 2,5x όγκοι 100% αιθανόλης και 1/10 όγκου οξικό νάτριο (3 M CH<sub>3</sub>COONa pH 5.2) και αφήνεται στους -80°C για μια ώρα ή στους -20°C για O/N επώαση-κατακρήμνιση. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται στους 4°C για 30 min στις 14.000 rpm και το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε ddH<sub>2</sub>O (~ 50-100  $\mu\text{L}$ ).

Για την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιείται 1  $\mu\text{g}$  RNA, DNaseI επεξεργασμένο όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Προστίθενται 1,2  $\mu\text{L}$  τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές OligoDT (100 ng/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  10 mM dNTPs (μείγμα των τεσσάρων dNTPs από εταιρία Invitrogen 10297-018), 4  $\mu\text{L}$  5x ρυθμιστικό διάλυμα M-MLV και ο τελικός όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 19  $\mu\text{L}$  με ddH<sub>2</sub>O. Το μίγμα επωάζεται για 5 λεπτά στους 65°C και αμέσως μετά αφήνεται να κρυώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος προστίθεται 1  $\mu\text{L}$  (200 u/ $\mu\text{L}$ ) M-MLV Reverse Transcriptase (της Invitrogen 28025-013) και 0,1  $\mu\text{L}$  RNaseOUT και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια αποθηκεύεται στους -20°C.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μία τεχνολογία η οποία χρησιμοποιείται για να ενισχύσει πολλές φορές, ένα ή πολύ λίγα αντίγραφα ενός κομματιού DNA, δημιουργώντας χιλιάδες έως και εκατομμύρια αντίγραφα. Μία από τις λειτουργίες της η οποία και χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη είναι η ποσοτικοποίηση ή και ταυτοποίηση γονιδίων (γονοτύπηση, genotyping PCR) ή mRNA μορίων (RT-PCR, Reverse Transcriptase PCR). Μία δεύτερη είναι η απλή ενίσχυση επιθυμητών γονιδιωματικών τμημάτων ή και γονιδίων για την κλωνοποίησή τους.

Όσον αφορά τη γονοτύπηση, χρησιμοποιήθηκε συσκευή PCR της Biorad. Η αντίδραση περιλαμβάνει τα εξής: Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αποδιάταξη του DNA στους 95°C που χρησιμοποιείται ως μήτρα, στο δεύτερο στάδιο ακολουθεί υβριδοποίηση των εκκινητών πολυμερισμού στην κατάλληλη θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από το ζευγάρι των εκκινητών και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 54-60°C. Το τελικό στάδιο, είναι το στάδιο πολυμερισμού από την Taq πολυμεράση στους 72°C. Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για αρκετούς κύκλους, συνήθως 30-40. Οι αντιδράσεις γίνονται με μήτρα DNA 50-200 ng σε τελικό όγκο 50  $\mu\text{L}$  με την ακόλουθη σύσταση : 5  $\mu\text{L}$  10x ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης (100 mM Tris pH 8.5, 500 mM KCl, 1% Triton-X100, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 2  $\mu\text{L}$  5' εκκινητή 10  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{L}$  3' εκκινητή 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  dNTPs mix (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  (5 u/ $\mu\text{L}$ ) Taq DNA πολυμεράσης (Minotech 203-1, Recombinant E.coli), 3  $\mu\text{L}$  (25 mM)  $\text{MgCl}_2$ , 8  $\mu\text{L}$  Betaine (1 M), και συμπληρώνουμε μέχρι τα 50  $\mu\text{L}$  με ddH<sub>2</sub>O. Για όγκο 20  $\mu\text{L}$  χρησιμοποιούμε την ακόλουθη σύσταση: 2  $\mu\text{L}$  10x ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης (100 mM Tris pH 8.5, 500 mM KCl, 1% Triton-X100, 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  5' εκκινητή 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  3' εκκινητή 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  dNTPs mix (10 mM), 0,4  $\mu\text{L}$  (5 u/ $\mu\text{L}$ ) Taq DNA πολυμεράσης (Minotech 203-1, Recombinant E.coli), 2,8  $\mu\text{L}$  (25 mM)  $\text{MgCl}_2$ , 4  $\mu\text{L}$  Betaine (1 M), και συμπληρώνουμε μέχρι τα 20  $\mu\text{L}$  με ddH<sub>2</sub>O.

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR).**

Αποτελεί την ίδια διαδικασία με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως, με την διαφορά ότι δίνεται η δυνατότητα ποσοτικοποίησης του προϊόντος σε κάθε κύκλο σε πραγματικό χρόνο. Η σύσταση της αντίδρασης είναι διαφορετική και γίνεται σε τελικό όγκο 20  $\mu\text{L}$ . Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα StepOne™ Real-Time PCR System και το LightCycler® 96 Instrument. Η σύσταση της αντίδρασης είναι 2  $\mu\text{L}$  10x ρυθμιστικού διαλύματος πολυμεράσης (100 mM Tris pH 8,5, 500 mM KCl, 1% Triton X100), 0,3  $\mu\text{M}$  εκκινητή 5', 0,3  $\mu\text{M}$  εκκινητή 3', 100  $\mu\text{M}$  4 dNTPs, 1  $\mu\text{L}$  (5 u/ $\mu\text{L}$ ) Taq DNA πολυμεράσης (Minotech 203-1, Recombinant E.coli), 200 mM Betaine, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  νερό και cDNA 5 ng. Εναλλακτικά χρησιμοποιήθηκε το έτοιμο μίγμα της εταιρίας Roche (FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) 04913914001) στο οποίο προστίθενται μόνο εκκινητές και μήτρα cDNA για τελικός όγκο 20  $\mu\text{L}$ .

Για τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων σε διαφορετικές συνθήκες μεταξύ των WT και Smyd3-KO ποντικών, ακολουθήθηκε η παραγωγή cDNA από RNA συκωτιών ή εντέρων των αντίστοιχων ποντικών σύμφωνα με τα παραπάνω πρωτόκολλα και ακολουθήθηκε Q-PCR για Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).

Για κάθε αντίδραση τελικού όγκου 20 $\mu\text{L}$  χρησιμοποιήθηκαν 5ng cDNA, και για τα υπό μελέτη έκφρασης γονίδια οι εξής εκκινητές:

*Αλληλουχίες των RT-PCR εκκινητών στην παρούσα μελέτη*

SMYD3	NM_027188.3	5' TGCTGATGACCAGCGAGGAACG 3' 5' AACCTGCTCCCACCTCCAGTGC 3'
GAPDH	NM_008084	5' CCA ATG TGT CCG TCG TGG ATC T 3' 5' GTT GAA GTC GCA GGA GAC AAC C 3'
CyclinA2	NM_009828.2	5' CAGCCTGCAAACCTGTAAGGT 3' 5' CAATGACTCAGGCCAGCTCT 3'
CyclinD1	NM_007631.2	5' GCC GAG AAG TTG TGC ATC TAC 3' 5' GGA GAG GAA GTG TTC GAT GAA 3'
CyclinE1	NM_007633.2	5' GTTCCAAGCTCAAGCACTTCC 3' 5' CACTCGGAGGAGGAGAAATCC 3'
c-Myc	NM_001177352.1	5' CAGCGACTCTGAAGAAGAGCA 3' 5' GACCTCTTGGCAGGGGTTTG 3'
Ctnnb1	NM_007614	5' TCT TGG ACT GGA CAT TGG TGC 3' 5' GGC CAC CCA TCT CAT GCT C 3'
Il6	NM_031168.1	5' AAGCCAGAGTCCTTCAGAGAG 3' 5' GGTCCTTAGCCACTCCTTCT 3'
Jak1	NM_146145.2	5' TTTAGTCCCATGGCCTTGTTC 3' 5' CAGTTGGGTGGACATGGCAG 3'
Jak2	NM_001048177.2	5' GCAACGGAAGATTGCCAAGG 3' 5' CCGGATTTGATCCACCCGAA 3'
Snai1	NM_011427.2	5' CCACACTGGTGAGAAGCCATTC 3' 5' GACATGCGGGAGAAGGTTTCG 3'
Snai2	NM_011415.2	5' CAAGGCTTTCTCCAGACCCT 3' 5' GCCCTCAGGTTTGATCTGTCT 3'
Twist1	NM_011658.2	5' GCTACGCCTTCTCCGTCTG 3' 5' AATGACATCTAGGTCTCCGGC 3'
Zeb1	NM_011546.3	5' CGGATTCACAGTGGAGAGAAGC 3' 5' GCCATTCACAGGCATCAAGCTA 3'
Fn1	NM_001276408.1	5' ACAGACTACAGCACCTGACG 3' 5' ACCCTGTGATAGGTGCCTGG 3'
Vim	NM_011701.4	5' TCATGCGGCTGCGAGAGAAA 3' 5' AGGTCAAGACGTGCCAGAGAA 3'
Timp1	NM_001044384.1	5' TTTCTCATCACGGGCCGC 3' 5' GAGCAGGGCTCAGAGTACG 3'

Sox4	NM_009238.2	5' TTTCAGCTCCTCATCGGCG 3' 5' CCAGGTTAGAGATGCTGGACTC 3'
MMP2	NM_004530.5	5' AAGGACCGGTTTATTTGGCG 3' 5' GCGTCAATCTTTTCTGGGAGC 3'
MMP7	NM_010810.4	5' GTGAGGACGCAGGAGTGAA 3' 5' CCGGGAACAGAAGAGTGAC 3'
MMP9	NM_013599.3	5' GCAAGGGGCGTGTCTGGAGATTC 3' 5' AGGGCACTGCAGGAGGTCGT C 3'
MMP13	NM_008607.2	5' TTTAGAGGGAGAAAATTCTGGGC 3' 5' CAGTCTCTTCACCTCTTTTGGGA3'
MMP14	NM_008608.3	5' GCTCTCTTCTGGATGCCCAAT 3' 5' CACTGCCCATGAATGACCCC 3'
CD45 (Ptprc)	NM_001111316.2	5' CCAGCAGACAGGGTTGTTCT 3' 5' CGGGATAGATGCTGGCGATG 3'
F4/80 (Emr1)	NM_010130.4	5' CCATCCACTTCCAAGATGGGTTA 3' 5' TGCCATCAACTCATGATACCCT 3'

#### **Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων (WCE- Whole Cell Extract) από το ήπαρ.**

Το ήπαρ απομονώνεται και ξεπλένεται με 1x PBS και μέρος αυτού (συνήθως μισός λοβός από τον 2ο μεγαλύτερο) μεταφέρεται σε 15 ml σωλήνα falcon που περιέχει 1,5 ml παγωμένο διάλυμα RIPA (50 mM Tris pH 7.5, 1% NP40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 10% Glycerol, 1 mM PMSF, 2 μg/ml Aprotinin και ανά 10 mL παρασκευής διαλύματος προστέθηκε μία ταμπλέτα αναστολέων πρωτεασών (Complete mini EDTA-free, Roche 11836170001). Ακολουθεί ομογενοποίηση στο Polytron και συνεχή ανάδευση με περιστροφή για 20 λεπτά στους 4°C. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται 14.000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Τέλος το υπερκείμενο που περιέχει όλες τις διαλυτές πρωτεΐνες μεταφέρεται σε καθαρό eppendorf και αποθηκεύεται στους -80° C.

### **Παρασκευή ολικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα.**

Τα κύτταρα από πιάτο διαμέτρου 10 cm αφού ξεπλυθούν 3 φορές με 10 mL 1x PBS, μαζεύονται με ξύσιμο με όγκο 1 ml 1x PBS σε erppendorf και φυγοκεντρώνται στις 1.500 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Αφού πεταχτεί το υπερκείμενο, η πελέτα επαναδιαλύεται σε RIPA buffer διάλυμα (50 mM Tris pH 7.5, 1% NP40, 0.25% Na-Deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8, 10% Glycerol, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin και ανά 10 mL παρασκευής διαλύματος προστέθηκε μία ταμπλέτα complete mini EDTA Roche). Προαιρετικά ακολουθεί το σπάσιμο των κυττάρων με υπερήχους στον Bioruptor (3 κύκλοι των 30 sec έκαστος, και ενδιάμεσα διαλείμματα των 20 sec για να μην θερμανθεί το δείγμα) και τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 14.000 rpm, στους 4°C για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέγεται σε καθαρά erppendorf και φυλάσσεται στους -80°C.

### **Παρασκευή πυρηνικών πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από ήπαρ.**

Το ήπαρ του ποντικού ξεπλένεται με 1x PBS και οι δύο του μεγάλοι λοβοί τοποθετούνται σε 10 ml διάλυμα σουκρόζης A (0.32 M σουκρόζη, 15 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% BSA, 0.5 mM spermidine, 0.15 mM spermine, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM aprotinin) όπου και κόβεται σε μικρά κομμάτια και ομογενοποιείται σε Teflon ομογενοποιητή. Στη συνέχεια το δείγμα διέρχεται μέσα από πλαστικό πλέγμα ώστε να απομακρυνθούν συσσωματώματα και εξωκυττάρια ύλες και ακολουθεί δεύτερη ομογενοποίηση με γυάλινο ομογενοποιητή, από το οποίο λαμβάνονται οι πυρήνες. Χρησιμοποιείται 5 mL από αυτό το εκχύλισμα και μεταφέρεται σε 15 ml σωλήνα falcon που περιέχει ήδη 5 ml διάλυμα B (ίδιο με το διάλυμα A με τη διαφορά ότι δεν έχει BSA και περιέχει 30% σουκρόζη). Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3000 rpm, 4° C για 15 λεπτά για να πέσουν οι πυρήνες με τη μορφή πελέτας. Το υπερκείμενο απομακρύνεται με αργές κινήσεις (για να μην αναμιχτούν οι δύο φάσεις) και η πελέτα πλένεται με 1x PBS. Μετά την ακόλουθη φυγοκέντρηση το ίζημα που αποτελείται αποκλειστικά από πυρήνες επαναδιαλύεται σε 1 (ίσο) όγκο Buffer A διαλύματος (25 mM Hepes pH 7.9, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,1% NP40, ενώ πριν τη χρήση προσθέτουμε 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 10 µg/mL Aprotinin και μεταφέρεται σε νέο Erppendorf όπου και μεταφέρεται ίσος ολικός όγκος διαλύματος NLB800 (25 mM Hepes pH 7.9, 10% Glycerol, 0,8 M KCl, 0,1% NP40, 0,2 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 10 µg/mL Aprotinin). Το δείγμα επωάζεται με περιστροφή για 20 λεπτά στους 4°C και έπειτα φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο που περιέχει όλες τις πυρηνικές πρωτεΐνες μεταφέρεται σε καθαρό erppendorf και αποθηκεύεται στους -80° C.



### **Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών και Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot).**

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αρχικά ποσοτικοποιούνται με αντιδραστήριο Bradford (Biorad Protein assay, Biorad) και η επιθυμητή ποσότητα (συνήθως 40 ng πρωτεΐνης τρέχονται ανά σειρά για Western Blot) αναμειγνύεται με ίσο όγκο 2x SDS Loading Buffer (L.B: 100 mM Tris pH=7,5, 4% SDS, 20% Glycerol, 200 mM DTT, 0,2% bromophenol blue). Στη συνέχεια βράζεται για 5min στους 100°C για αποδιάταξη και αναδεύεται έντονα με vortex και φυγοκεντρώνται προκειμένου να μη χαθεί ποσότητα. Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται και ηλεκτροφορούνται για περίπου μιάμιση ώρα στα 120 Volt σε πήκτωμα SDS/ακρυλαμίδης. Εν συνεχεία, το πήκτωμα μαζί με μια μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τοποθετείται σε ειδική συσκευή μεταφοράς με την ηλεκτροφόρηση της οποίας επιτυγχάνεται η μεταφορά και η υβριδοποίηση των πρωτεϊνών στη μεμβράνη. Η μεμβράνη μετά την ηλεκτροφόρηση επωάζεται υπό ανάδευση σε διάλυμα TBS-T (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween) με 5% w/v BSA για να εμποδιστεί η μη ειδική πρόσδεση του αντισώματος. Ακολουθούν 3 πλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBS-T και εν συνεχεία είτε επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου είτε επώαση O/N στους 4°C (ανάλογα με το αντίσωμα) με το πρώτο αντίσωμα σε διάλυμα 1% BSA w/v διαλυμένο σε 1x TBS-T. Στη συνέχεια η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις με διάλυμα 1x TBS-T και επωάζεται για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι σημασμένο με HRP (horseradish - περοξειδάση) διαλυμένο σε 1% BSA w/v διαλυμένο σε 1x TBS-T. Στη συνέχεια η μεμβράνη υπόκειται σε 3 πλύσεις με διάλυμα 1x TBS-T και επωάζεται για 5 λεπτά με αντιδραστήριο ECL (υπόστρωμα luminol της περοξειδάσης) (Amersham) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για την ανίχνευση των πρωτεϊνών με χημειοφθορισμό. Τέλος η μεμβράνη εκτίθεται σε φιλμ και εμφανίζεται σε ειδικό εμφανιστικό μηχάνημα (KODAK X-OMAT 1000).

### **Τεχνικές ιστολογικής ανάλυσης.**

Για την ιστολογική ανάλυση των ιστών οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν με δύο τρόπους. Αφού κόπηκαν σε σχετικά μικρού μεγέθους κομμάτια, μονιμοποιήθηκαν είτε με εμβάπτισή τους σε OCT υλικό και πάγωμα σε υγρό άζωτο πριν την αποθήκευσή τους στους -80°C, είτε μέσω μονιμοποίησης σε 4% φορμαλδεΰδη / 1x PBS για 16 ώρες. Στην τελευταία περίπτωση μετά την επώαση ακολούθησαν 3 πλύσεις με 1x PBS και οι ιστοί αφυδατώθηκαν και παραφηνοποιήθηκαν με τη βοήθεια αυτοματοποιημένου μηχανήματος.

### **Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης.**

Αφού κόπηκαν τομές από τους παραφρηνοποιημένους ιστούς με πάχος από 5-10  $\mu\text{m}$ , αφήνονται να στεγνώσουν για 2 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  και έπειτα ακολουθεί η εξής διαδικασία εμβαπτίσεων των πλακιδίων με τις τομές ιστών στα εξής περιέχοντα δοχεία για τους αναγραφόμενους χρόνους : Ξυλένιο No1/2/3 διαδοχικά - 2,5 min έκαστο, 100% EtOH - 2 min, 96% EtOH - 2min, 96% EtOH - 2 min, 70% EtOH - 2 min, 50% EtOH - 2min, H<sub>2</sub>O No1/2 - 2 min, Αιματοξυλίνη - 2,5 min → Πλύσεις με H<sub>2</sub>O , Acid / 70 % EtOH – 1 sec → Πλύσεις με H<sub>2</sub>O, Scot's Salt – 3 min → Πλύσεις με H<sub>2</sub>O, 50% EtOH – 30 sec, 70% EtOH – 30 sec, Εωσίνη → 1,5 min Πλύσεις με H<sub>2</sub>O, 50% EtOH – 30 sec, 70% EtOH – 30 sec, 96% EtOH – 30 sec, 96% EtOH – 30 sec, Εμβάπτιση σε DPX medium, το οποίο στερεοποιείται και προστατεύει το δείγμα για παρατήρηση και φύλαξη.

### **Ανοσοϊστολογία φθορισμού.**

#### **Ανοσοϊστολογία φθορισμού σε τομές παραφίνης.**

Αφού κοπούν τομές από τους παραφρηνοποιημένους ιστούς με πάχος από 5  $\mu\text{m}$ , αφήνονται να στεγνώσουν για 2 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$  και επιπλέον για να φύγει η περίσσεια παραφίνης επωάζονται σε επωαστή θερμού αέρα στους  $65^\circ\text{C}$  για 30 min. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία εμβαπτίσεων των πλακιδίων με τις τομές ιστών στα εξής δοχεία που περιέχουν τα ανάλογα διαλύματα για τους αναγραφόμενους χρόνους, προκειμένου να αφαιρεθεί και η υπόλοιπη παραφίνη και να ενυδατωθούν οι ιστοί. Ξυλένιο No1 - 2,5 min, Ξυλένιο No2 - 2,5 min, Ξυλένιο No3 - 5 min, 100% EtOH - 2 min, 96% EtOH - 2 min, 96% EtOH - 2 min, 70% EtOH - 2 min, 50% EtOH - 2 min, H<sub>2</sub>O No1 - 2 min, H<sub>2</sub>O No2 - 2min

Στη συνέχεια οι ιστοί εμβαπτίζονται για 10 min σε 1x PBS σε θερμοκρασία δωματίου. Προκειμένου να μπλοκαριστεί η αυτοφθοριστική ιδιότητα ορισμένων ενδογενών περοξειδασών επωάζουμε τους ιστούς σε 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για 10 min στους  $37^\circ\text{C}$ , ξεπλένονται με 1x PBS όπου και επωάζονται για 5min. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία «φάνερωσης του επιτόπου» (antigen unmasking) κατά την οποία αποδιατάσσονται σε ένα βαθμό οι μονιμοποιημένες πρωτεΐνες προκειμένου το 1<sup>ο</sup> αντίσωμα να βρει ευκολότερα το στόχο του. Η διαδικασία αυτή γίνεται ως εξής :

Εμβαπτίζονται οι πλάκες σε 10 mM Citric Acid Monohydrate buffer pH 6.0 (διαλύοντας 1.88 g σε 900 ml H<sub>2</sub>O) και βράζονται σε φούρνο μικροκυμάτων για 15-20 λεπτά. Αφαιρούνται ώστε να επέλθει θερμοκρασία δωματίου σταδιακά και αργά. Ξεπλένονται με άπλετο νερό βρύσης και εν συνεχεία 2 φορές με 1x PBS. Ακολουθεί κοινή διαδικασία η οποία αφορά και τις κρυοτομές και περιγράφεται παρακάτω.

### **Ανοσοϊστολογία φθορισμού σε κρυο-τομές.**

Οι φυλασσόμενοι στους  $-80^{\circ}\text{C}$  με OCT ιστοί μεταφέρονται στον κρυοτόμο ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) και κόβονται τομές πάχους  $5\mu\text{m}$  οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικά πλακάκια με θετικά φορτισμένη επιφάνεια για καλύτερη προσκόλληση των ιστών.

Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min να εξατμιστεί η υγρασία και εν συνεχεία μονιμοποιούνται σε 4% φορμαλδεΐδη διαλυμένη σε 1x PBS για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 1x PBS και ακολουθεί διάτρηση των μεμβρανών (Permeabilization) με 0,1-0,2% v/v Triton X-100 διαλυμένο σε 1x PBS για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

(Τα περαιτέρω βήματα είναι κοινά και για τις δύο περιπτώσεις ανοσοϊστολογίας φθορισμού)

Ακολουθούν 3 πλύσεις με 1x PBS. Στη συνέχεια οι τομές επωάζονται σε Blocking Buffer (1% BSA / 0,1% Triton / 1x PBS) για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το πρώτο αντίσωμα διαλύεται σε Blocking Buffer σε αραιώση (1:100 με 1:800 ανάλογα με το αντίσωμα) και οι τομές επωάζονται O/N στους  $4^{\circ}\text{C}$  μέσα σε αυτοσχέδιο κουτί με υγρασία. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 1x PBS / 0,1% Triton και εν συνεχεία το 2<sup>ο</sup> αντίσωμα (σημασμένο με το φθορίζον μόριο 488nm ή 568nm) αραιωμένο 1:500 σε Blocking Buffer για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθούν 3 πλύσεις με 1x PBS / 0,1% Triton και εν συνεχεία πλύση με  $\text{dH}_2\text{O}$  και DAPI και κάλυψη με Mowiol mounting medium και καλυπτρίδα.

### **Ανοσοκατακρήμιση Χρωματίνης για Q-PCR και για sequencing (ChIP-QPCR , ChIP-seq).**

Η τεχνική αυτή συνδυάζει την ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης, δηλαδή την απομόνωση των περιοχών DNA που προσδένονται από έναν συγκεκριμένο παράγοντα-πρωτεΐνη και είτε τη μελέτη τους και ανίχνευση της υπό ερώτησης περιοχής μέσω ενίσχυσης με Q-PCR, είτε εναλλακτικά αλληλούχιση (sequencing) ολόκληρου του κατακρημινισμένου DNA και ως εκ τούτου τον χαρακτηρισμό και ανάλυση όλων των περιοχών πρόσδεσης της πρωτεΐνης επί του γονιδιώματος σε λογισμικό Genome Browser.

Η διαδικασία απομόνωσης της χρωματίνης παρουσιάζεται υπό τη μορφή πρωτοκόλλου.

1. Απομονώνεται το ήπαρ του ποντικού και ξεπλένεται με 1x PBS. Εν συνεχεία κόβεται σε μικρά κομμάτια τα οποία μαζί με το PBS μεταφέρονται σε ένα σωλήνα falcon ενώ συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 9mL (ιστός + 1x PBS) με 1x PBS. Προστίθεται 1 mL 10 % formaldehyde (ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1%) και επωάζεται αυστηρά 10 min. Με

το χρόνο να μετράει μεταφέρεται άμεσα σε έναν γυάλινο ομογενοποιητή και ομογενοποιείται. Περνώντας το εκχύλισμα από πλέγμα μεταφέρεται σε νέο σωλήνα falcon και συμπληρώνεται μέχρι τα 10 mL με 1% formaldehyde. Στα 10 min προστίθεται 1 ml 1.375 M γλυκίνη (τελική 0.125 M) και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 2000 rpm 5 min.

2. Αφαιρείται το υπερκείμενο και αναδιαλύεται η πελέτα σε κρύο 1x PBS / PMSF και ξανά-φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 5 min.
3. Επαναδιαλύεται η πελέτα σε B buffer (0.25% Triton-x100, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 20 mM HEPES, 10 µg/mL aprotinin, 0,5mM PMSF). Αναδεύεται για 10 min στους 4°C και ξανά-φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 5 min.
4. Επαναδιαλύεται η πελέτα σε C buffer (0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 20 mM HEPES, 10 µg/mL aprotinin, 0,5mM PMSF). Αναδεύεται για 10 min στους 4°C και ξανά-φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 5 min.
5. Επαναδιαλύεται η πελέτα (πυρήνες) προσθέτοντας 9 όγκους Sonication Buffer (50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Na-deoxycholate, 0.5% Sarkosyl, 0.5 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail (Roche))
6. Ακολουθεί σπάσιμο της χρωματίνης με υπέρηχους, 12 φορές για 30 seconds στην υψηλότερη ισχύ (Bioruptor) .
7. Προστίθεται 0,5 ml Dilution Buffer (50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.5 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail (Roche)) για κάθε 1 ml sonicated εκχυλίσματος. Αναμιγνύεται και μοιράζεται σε eppendorf και φυγοκεντρείται στις 14.000 rpm για 15 min. Το δείγμα ξαναμοιράζεται σε eppendorf και αποθηκεύεται αν χρειαστεί στους -80°C.
8. Υπολογίζεται η χρωματίνη που θα χρειαστεί (500-1000 µL ανά I.P) και φυλάσσεται το 1/10 του όγκου για input.

Σημείωση: 5-6 ώρες πριν το I.P, τα μαγνητικά σφαιρίδια πρέπει να «μπλοκαριστούν» και να κάνουν σύμπλοκο με το αντίσωμα. Για αυτό το λόγο προστίθενται 100 µl Dynabeads Protein G (Novex 100040) ανά I.P στο eppendorf το οποίο τοποθετείται στον μαγνήτη , αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται 1 ml 0.5% BSA σε 1x PBS, μαζεύονται με τον μαγνήτη τα σφαιρίδια και πλένονται 2 ακόμα φορές με 0.5% BSA/1x PBS και τέλος τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 250 µl 0.5% BSA / PBS και προστίθενται 2-15 µg αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση για τουλάχιστον 5 ώρες με ήπια περιστροφή στους 4°C.

9. Προστίθεται το εκχύλισμα στα σφαιρίδια με το αντίσωμα και επώάζεται O/N με περιστροφή στους 4°C.

10. Συλλέγονται τα σφαιρίδια με τον μαγνήτη σε ένα eppendorf και ακολουθούν πλύσεις των 10 min έκαστη στους 4°C , αρχικά 2 φορές με 1 ml Wash Buffer S (50 mM Hepes pH 7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin), στη συνέχεια 1 φορά με 1 ml Wash buffer A (50 mM Hepes pH 7.9, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin), στη συνέχεια με 1 ml Wash buffer B (20 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5 % NP-40, 0.5 % Na-deoxycholate, 0.5 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin) και τέλος 1 φορά με 1 ml TE buffer.
11. Προστίθενται 150 µl Elution buffer (50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 50 mM NaHCO<sub>3</sub>) στα σφαιρίδια και επωάζονται στους 65°C για 10 min. Ακολουθεί vortex και συλλογή των σφαιριδίων με τον μαγνήτη. Το υπερκείμενο (140 µl) μεταφέρεται σε ένα νέο eppendorf. Ξανα-προστίθενται στα σφαιρίδια 150 µl elution buffer. Ακολουθεί εκ νέου vortex και επώαση στους 65°C για 10 min. Τα 150 µl του υπερκείμενου προστίθενται στα πρώτα 140 µL (290 µl ολικός όγκος) και προστίθενται 110 µl H<sub>2</sub>O.
12. Προστίθενται 21 µl NaCl (από 4 M stock) και παράλληλα ξεπαγώνονται τα input samples (50 µL) στα οποία προστίθενται 240 µl elution buffer και 110 µl H<sub>2</sub>O. Προστίθενται 21 µl NaCl (από 4 M stock).
13. Ακολουθεί επώαση στους 65°C για περισσότερο από 5 ώρες, κατά προτίμηση O/N.
14. Προστίθενται 1 µl RNase A (από την 10 mg/ml, DNase-free stock) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 1 ώρα και εν συνεχεία προστίθενται 4 µl EDTA (0.5 M) και 2 µl Proteinase K (από 10 mg/ml stock). Ακολουθεί επώαση στους 42°C για 2 ώρες και προστίθενται 100 µl H<sub>2</sub>O.
15. Ακολουθεί καθαρισμός μία φορά με φαινόλη / χλωροφόρμιο / ισοαμλική, χρησιμοποιώντας Phase Lock Tubes και προστίθεται 1µl GlycoBlue (από 20 mg/ml stock), 40 µl Na-acetate (3M) και 1 ml 100% EtOH για κατακρήμνιση.
16. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm, 30 min και πλύση 1 φορά με 80% EtOH. Τέλος τα IP και Input δείγματα επαναδιαλύονται σε 50 µl 10 mM Tris (pH 7.5).

Στο σημείο αυτό το DNA χρησιμοποιείται είτε για Q-PCR είτε δίνεται για αλληλούχιση (sequencing).

Η ανάλυση των ChIP-seq πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την βέλτιστη ChIP-seq ροή εργασίας (Life Technologies) για το σύστημα Ion Proton χρησιμοποιώντας το Kit Agencourt AMPure XP για σύνδεση (ligation) των προσαρμογέων (adapter), επιλογή μεγέθους και ενίσχυση των ανοσοκακρημισμένων DNA κομματιών καθώς και τα kit Ion PI Sequencing 200 v3 και Ion PI

ChIPv2 για το sequencing. Όλα τα πειράματα ChIP-seq πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας 2 βιολογικά δείγματα.

Για την εν λόγω εργασία χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα Smyd3 antiserum το οποίο φτιάχτηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο (καθηγητής κ. Χαλεπάκης Γεώργιος, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης) σε θηλυκά κουνέλια New Zealand White, στα οποία έγινε ένεση με την full-length ανασυνδρασμένη Smyd3 πρωτεΐνη, και η οποία καθαρίστηκε σε native συνθήκες.

Για το Smyd3 ChIP-QPCR πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές.

#### **Αλληλουχίες των ChIP εκκινητών στην παρούσα μελέτη.**

CyclinE1	Gene ID: 12447	5' AATGTCAGCAGGGCAGATCG 3' 5' GACGGGTTCTTA ACTCCGGG 3'
CyclinD1	Gene ID: 12443	5' GTGGTCTCGGTTGGGCTC 3' 5' GCAGAGAGCTACAGACTCCG 3'
CyclinA2	Gene ID: 12428	5' ATAAACCAATGAGGGCGTCCG 3' 5' GCTCCCGCCCTGTAAGATT 3'
c-Myc	Gene ID: 17869	5' CTGGAGTGAGAGGGGCTTTG 3' 5' TGATGTTGGGTCAGTCGCAG 3'
Fn1	Gene ID: 14268	5' GGACCCCTGAGCATCTTGAG 3' 5' CCCACCTCAGGACTTTTCCC 3'
Sox4	Gene ID: 20677	5' CACCTCCGCCTTTTGC 3' 5' CATGCATTAACATCCTCTT 3'
Jak2	Gene ID: 16452	5' CAGGAAGGGGAAAGTCTCCG 3' 5' GACGGCTGGGAATGAGTCAG 3'
PCNA	Gene ID: 18538	5' CGAGGTCATGACGCCACAG 3' 5' CCTTGCTCAAACCACGGGTA 3'
Ctnnb1	Gene ID: 12387	5' GCCGCGCCGCTTATAAATC 3' 5' CTTACAGGACACGAGCTGA 3'
Igfbp1	Gene ID: 16006	5' GCTTCGTGCCCCGAGATTT 3' 5' CACCCATCGGCAAGGCA 3'
Control region 1 (upstream of Ctnnb1)		
chr9:120,841,051-120,841,130		5' GCGTCTGGCTAGAGGAATA 3' 5' CTCGTTAAGAAGCGCCTGC 3'

Control region 2 (upstream of ApoB)

chr12:7,979,249-7,979,376

5' TCCGTAGAAGGAGCTGGACA 3'

5' ATGTGCTGTGTACTCCAGGC 3'

Control region 3 (upstream of Alb)

chr5:90,888,318-90,888,467

5' AGAGTGCTAAAAGCCTGAGTT 3'

5' CCTGGTGTGGGTCTTGATAAAC 3'

### **In vitro pull down πειράματα.**

Συνθετικά βιοτινυλιωμένα πεπτίδια για ουρές ιστόνης H3, μήκους 1-20 αμινοξέων αγοράστηκαν από την εταιρία Millipore. Επιλέχθηκαν τα εξής: μη τροποποιημένα (unmodified #12-403), μονομεθυλιωμένα (H3K4me1 #12-563), διμεθυλιωμένα (H3K4me2 #12-460), τριμεθυλιωμένα για την λυσίνη 4 (H3K4me3 #12-564) και τριμεθυλιωμένα για την λυσίνη 9 (H3K9me3 #12-564).

5 μg πεπτιδίων επώασθηκαν για 1 ώρα στους 4°C υπό μετακίνηση με μαγνητικά σφαιρίδια στρεπταβιδίνης (Dynabeads MyOne Streptavidin T1-Life Technologies 65601) τα οποία πρώτα πλύθηκαν 3 φορές με 1x PBS. Το σχηματισμένο σύμπλοκο επώασθηκε στη συνέχεια με περίπου 1 mg από ολικά εκχυλίσματα από HEK293 κύτταρα τα οποία είχαν επιμολυνθεί είτε με pCMV-Flag (control) είτε με pCMV-Flag-Smyd3 πλασμίδιο έκφρασης. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε RIPA buffer, O/N στους 4°C υπό ανάδευση. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκαν 4 x 10 min πλύσεις στους 4°C σε διάλυμα 25 mM Hepes pH 7.9, 0.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5 mM PMSF, 2 μg/ml aprotinin, 1 mM DTT. Μετά τις πλύσεις τα σφαιρίδια με τα σύμπλοκα συλλέχθηκαν με το μαγνήτη και αναδιαλύθηκαν σε 30 μL 2x L.B (SDS, DTT), βράστηκαν και ανιχνεύτηκαν με Western Blot ανάλυση.

In vitro pull down πραγματοποιήθηκαν επίσης με βακτηριακά εκφρασμένες His6-tagged full-length Smyd3 πρωτεΐνη καθώς και με His6-tagged κατακερματισμένες περιοχές domains της Smyd3. Οι επώσεις αλληλεπίδρασης και οι πλύσεις έγιναν όπως περιγράφεται παραπάνω.



## **Κλωνοποίηση και βακτηριακή έκφραση και απομόνωση των ανασυνδυασμένων Smyd3 πρωτεϊνών.**

Για τη βακτηριακή έκφραση της ανθρώπινης (human, “h”) Smyd3, είχε κατασκευαστεί στο εργαστήριο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που έφερε το σύνολο της κωδικής αλληλουχίας της ανθρώπινης Smyd3. Για βακτηριακή έκφραση είθισται να χρησιμοποιούνται πλασμίδια pRSETA (Cat. no. V351-20, Invitrogen). Τα pRSET προέρχονται από pUC-πλασμίδια και είναι σχεδιασμένα για υψηλού επιπέδου (ποσοτικού) πρωτεϊνική έκφραση και καθαρισμό από κλωνοποιημένα γονίδια σε βακτηριακό στέλεχος της *E.coli*. Η υψηλή έκφραση επιτυγχάνεται με την παρουσία του T7 υποκινητή στο πλασμίδιο. Το μοτίβο πρόσδεσης μετάλλων των 6 επαναλαμβανόμενων επιτόπων HIS, το οποίο υπάρχει στις χμιαϊκές πρωτεΐνες που παράγονται, βοηθάει τόσο στην απομόνωση-καθαρισμό των πρωτεϊνών με τη χρήση μεταλλικών σφαιριδίων ρεσίνης (TALON® Metal Affinity Resin (Takara Clontech 635501)) όσο και στην αναγνώριση και ταυτοποίηση των χμιαϊκών πρωτεϊνών με anti-HIS αντίσωμα με Western Blot ανάλυση.

Το pRSETA-hSmyd3 πλασμίδιο προϋπήρχε. Σχεδιάστηκαν εκκινητές ώστε με μήτρα το πλασμίδιο αυτό να πολλαπλασιαστούν κομμάτια της Smyd3 τα οποία κωδικοποιούν για διαφορετικά πρωτεϊνικά μοτίβα της Smyd3. Στους εκκινητές προστέθηκαν τα 6 νουκλεοτίδια με τις περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών γονιδίων συν επί πλέον 2 νουκλεοτίδια προς το 5' άκρο ώστε να διευκολυνθεί το ένζυμο να δράσει. Συνεπώς οι primers είχαν την παρακάτω λογική, και παραθέτονται παρακάτω.

(NN RRR RRR ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ) όπου NN τα extra νουκλεοτίδια, RRR RRR η θέση αναγνώριση του περιοριστικού ενζύμου και ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ η συμπληρωματική αλληλουχία της Smyd3 κωδικής περιοχής.

Ακολούθησε PCR για περίπου 38 κύκλους με Expand High Fidelity Polymerase (Expand high fidelity PCR, Roche 11732641001), τα κομμάτια τρέχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με gel-extraction kit, κόπηκαν με το 1<sup>ο</sup> ένζυμο περιορισμού για 3 ώρες στους 37°C, ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη, χλωροφόρμιο, ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Στη συνέχεια έγινε πέψη και με το 2<sup>ο</sup> ένζυμο περιορισμού και τρέχθηκαν τα κομμάτια σε πήκτωμα αγαρόζης όπου ελέγχθηκαν για την ποσότητα, το μήκος (bp) και εν συνεχεία καθαρίστηκαν με εμπορικό αντιδραστήριο-πρωτόκολλο καθαρισμού του DNA από την αγαρόζη (gel-extraction kit της Macherey-Nagel 740609.50- Nucleospin Gel και PCR Clean-up). Παράλληλα με την ίδια στρατηγική κόπηκε και ο φορέας πλασμίδιο (vector) pRSETA. Ακολούθησε ligation αντίδραση με την T4 DNA ligase (New England BioLabs #M0202L) σε μοριακή αναλογία 4 μόρια insert : 1 μόριο vector (50 ng), και τα DNA επώασθηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και O/N στους 16°C στη συνέχεια, σε αντίδραση ολικού όγκου 20 μL που περιείχε 1 μL T4 DNA ligase.

**Αλληλουχίες Εκκινητών.**

RecSmyd3Forw1	CAGCTAGCGAGCCGCTGAAGGTGGAAAAG
RecSmyd3Rev1	CACTCGAGGCAGCTTTTAAGGCATTTGCA
RecSmyd3Forw2	CAGCT AGCAGTCGTGGCGTCGTCTGCGA
RecSmyd3Forw3	CAGCTAGCAAACCCAGATATCCTCCAGACTCC
RecSmyd3Rev2	CACTCGAGGTCCTGGGTTTGGCAACGGAAA
RecSmyd3Forw4	CAGCTAGCAAGGATGCTGATATGCTAACTGG
RecSmyd3Rev3	CACTCGAG TTAGGATGCTCTGATGTTGGC

Ακολούθησε μετασχηματισμός του μισού όγκου της αντίδρασης του Ligation (10  $\mu$ L από τα 20 $\mu$ L) σε DH5a competent κύτταρα. Ακολουθήθηκε το κλασικό πρωτόκολλο και η πρώτη επιλογή έγινε με επώαση σε θρεπτικό με αμπικιλίνη, καθώς το πλασμίδιο pRSETA φέρει γονίδιο για ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Ακολούθησαν mini preps και διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα και επιλέχθηκαν οι σωστοί κλώνοι. Στη συνέχεια για αναπαραγωγή των σωστών κλωνοποιημένων πλασμιδίων κλώνων με μεγαλύτερη απόδοση και καλύτερη καθαρότητα επιμολύνθηκαν μεγαλύτερου όγκου καλλιέργειες (200 mL) και πραγματοποιήθηκαν midi preps με εμπορικό αντιδραστήριο-πρωτόκολλο (NucleoBond Xtra Midi – Macherey-Nagel 740410-50).

Μαζί με το pRSETA-hSmyd3, φτιάχτηκαν επιπλέον τα εξής πλασμίδια, από την ονομασία των οποίων προκύπτει και το δομικό μοτίβο που κωδικοποιούν:

pRSETA-hSmyd3  
 pRSETA-Set1-Mynd(hSmyd3)  
 pRSETA-Mynd(hSmyd3)  
 pRSETA-Set2-Post(hSmyd3)  
 pRSETA-Cterm(hSmyd3)  
 pRSETA-Set1-Mynd-Set2-Post(hSmyd3)

**Έκφραση και απομόνωση.**

Στη συνέχεια αυτά τα πλασμίδια μετασχηματίστηκαν σε BL21\*plus βακτηριακά κύτταρα κατά το πρότυπο πρωτόκολλο και επώασθηκαν σε πιάτα με θρεπτικό και αμπικιλίνη. Την επόμενη μέρα, έγινε μόλυνση μίας μικρής καλλιέργειας 20 mL και επώασθηκε O/N στους 37°C. Ο λόγος της ενδιάμεσης καλλιέργειας είναι να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση (μέσω μέτρησης O.D) στην επόμενη. Την επόμενη λοιπόν μέρα μετρήθηκε η O.D στα 600 και επώασθηκε σε μία μεγάλη φλάσκα με 330 mL LB+amp, ποσότητα τόση (περίπου 4-6 mL) ώστε σύμφωνα με τον απλό νόμο της

αραίωσης η αρχική O.D στη μεγάλη καλλιέργεια να είναι O.D ~ 0,1. Ακολουθεί επώαση στους 25°C υπό ανάδευση και όταν η συγκέντρωση φτάσει O.D ~ 0,6-0,8 προσθέτουμε IPTG σε τελική συγκέντρωση (0.2 mM). Με το IPTG ξεκινά η έκφραση του πλασμιδίου από την T7 RNA πολυμεράσης μέσω της παρεμπόδισης του Lac repressor. Ακολουθεί 3 ώρες επώαση στους 25°C και τα κύτταρα εν συνεχεία συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4,000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C και αποθηκεύονται αν χρειαστεί στους -80°C.

Η πελέτα επαναδιαλύεται σε 40 mL Sonication buffer I (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5 mM Imidazole, 1 mM PMSF, 2 µg/mL Aprotinin). Ακολουθεί διάρρηξη των κυττάρων και σπάσιμο του DNA με υπέρηχους και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 30 min στους 4°C. Παράλληλα εξισορροπούμε τα σφαιρίδια, δηλαδή τα μεταλλικά σφαιρίδια ρεσίνης (TALON® Metal Affinity Resin (Takara Clontech 635501)) στα οποία μέσω των HIS επιτόπων θα προσδεθούν οι πρωτεΐνες μας προκειμένου να καθαριστούν. 300 µL καθαρού όγκου σφαιριδίων ξεπλένονται 3 φορές με Wash Buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.1% NP-40, 5 mM Imidazole, 1 mM PMSF ). Το υπερκείμενο αποτελεί το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που θεωρητικά περιέχει υπερεκφρασμένη την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, άρα και επιάζεται με τα πλυμένα σφαιρίδια για 1 ώρα στους 4°C υπό ανάδευση. Ακολουθεί απομόνωση της πρωτεΐνης με χρωματογραφία συγγένειας με τα μεταλλικά σφαιρίδια ρεσίνης. Το υλικό (υπερκείμενο και σφαιρίδια) φορτώνεται σε μία κολώνα πολυπροπυλενίου (Pierce #29924). Οι πρωτεΐνες που προσδένονται μη ειδικά στην κάθε κολώνα απομακρύνονται με 4 πλύσεις με τα παραπάνω διαλύματα Wash Buffer (10 φορές ο όγκος της κολώνας) για 10 min το καθένα, στους 4°C. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες εκλούνται από την κολώνα με προσθήκη 2,5 mL ολικού όγκου Elution Buffer (50 mM Tris pH8.0, 250 mM NaCl, 0.1% NP-40, 400 mM Imidazole pH 8.0, 10 mM mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinin). Η διαδικασία της έκλουσης είναι καλύτερο να επαναλαμβάνεται 5 φορές (2,5/5 mL) και τα προϊόντα να συλλέγονται σε ξεχωριστά eppendorf. Για έλεγχο της έκφραση 7 µL τρέχονται σε πήκτωμα ακρυλαμίδης το οποίο βάφεται με Coomassie προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση και η καθαρότητα.

### **Ζυμογραφία αποικοδόμησης υποστρώματος ζελατίνης.**

Η αρχή μεθόδου αφορά την ικανότητα των πρωτεϊνών-ενζύμων μεταλλοπρωτεϊνών (οι οποίες δεν αποδιατάσσονται πριν τρεχθούν με ηλεκτροφόρηση σε αυτή την περίπτωση) να αποικοδομούν τη ζελατίνη (gelatin) ως υπόστρωμα. Με μέτρηση του μεγέθους της αποικοδόμησης του πηκτώματος ζελατίνης υπολογίζουμε έμμεσα την ενεργότητα του ενζύμου.

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (20 µg) διαχωρίστηκαν σε 10% SDS-PAGE διαχωριστικά gel, τα οποία περιείχαν 0.1% w/v ζελατίνη. Στη συνέχεια τα πηκτώματα επώασθησαν με περίσσεια 2,5% Triton X-100 για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να επαναδιαταχτούν οι πρωτεΐνες και ακολούθησε επώαση σε buffer 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M NaCl και 10 mM CaCl<sub>2</sub> για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα αντικαταστάθηκε με νέο φρέσκο όμοιο και το πήκτωμα επώασθηκε 16 ώρες στους 37°C προκειμένου να δράσει το ένζυμο. Ακολούθησε η χρώση του πηκτώματος με Coomassie Blue R-250 (0.5% w/v) σε 5:1:4 v/v Μεθανόλη : Οξικό Οξύ : H<sub>2</sub>O. Η απόχρωση των πηκτωμάτων ώστε να φανούν καλύτερα οι αποχρωματισμένες περιοχές στις οποίες τα ένζυμα έχουν πέσει το υπόστρωμα, γίνεται με 5:1:4 v/v Μεθανόλη : Οξικό Οξύ : H<sub>2</sub>O. Βάση του μεγέθους που αναμένεται να βρίσκεται το υπό εξέταση ένζυμο (πχ η MMP9 στα 92kDa) ταυτοποιούμε τη μπάντα πέψης από το ένζυμο. Οι εικόνες αναλύθηκαν και οι μπάντες ποσοτικοποιήθηκαν με το λογισμικό Image J.

### **Πειράματα μέτρησης ενεργότητας μεταγραφικών παραγόντων με μέτρηση του γονιδίου αναφοράς Λουσιφεράσης (Luc-assays).**

HepG2 κύτταρα μεγάλωσαν και διατηρήθηκαν σε Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) ενισχυμένο με 10% ορό από heat-inactivated fetal calf. Τα κύτταρα αυτά διαμολύνθηκαν με το αντιδραστήριο P-PEI με ανασυνδυασμένα πλασμίδια τα οποία περιείχαν κλωνοποιημένες περιοχές υποκινητών γονιδίων από το γονιδίωμα του ποντικού καθώς και πλασμίδια μάρτυρες χωρίς αντίστοιχες περιοχές τα οποία κωδικοποιούσαν μετά την περιοχή κλωνοποίησης για την πρωτεΐνη της Λουσιφεράσης (Luciferase) (Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)). Επιπλέον ως μάρτυρας για την εξάλειψη του παράγοντα διαφορικής επιμόλυνσης μεταξύ των δειγμάτων όλα τα δείγματα επιμολύνονταν ταυτόχρονα και με το pRL-CMV πλασμίδιο το οποίο κωδικοποιεί για ένα δεύτερο φθορίζον μόριο, τη Renilla η οποία και μετρήθηκε κάθε φορά σαν παράγοντας κανονικοποίησης. Έκαστο γκρουπ για κάθε υποκινητή επιμολύνονταν ταυτόχρονα είτε με πλασμίδια pCMV-HA3 (μάρτυρας), είτε με pCMV-Smyd3 Full length WT, είτε με pCMV-Smyd3 Full length H206G μεταλλαγμένη, η οποία είναι καταλυτικά ανενεργή ως προς την ενεργότητα μεθυλοτρανσφεράσης.

Όσον αφορά τα πλασμίδια αναφοράς λουσιφεράσης, αυτά περιείχαν έκαστο τις εξής περιοχές :

- 832 nt to + 170 nt region of *IGFBP1* gene,
- the -864 to +139 bp region of *PCNA* gene,
- the -438 to +561 region of the *Sox4* gene,
- the -809 to +316 bp region of *Myc* gene,
- the -864 to -102 bp region of *Vnn1* gene,

the -855 to +8 bp region of *Fabp4* gene,  
 the -775 to +75 bp region of *Sparc* gene και  
 the -815 to +71 bp region of *Mpeg1* gene.

### **Κλωνοποίηση γονιδιωματικών περιοχών υποκινητών στο πλασμίδιο αναφοράς Luciferase, pGL4.10-Luc2.**

Η κλωνοποίησή των γονιδιωματικών περιοχών υποκινητών στο πλασμίδιο αναφοράς pGL4.10(Luc2) έγινε με τον ακόλουθο τρόπο. Σε πρώτη φάση επιλέχθηκαν από το Genome Browser οι περιοχές υποκινητών των γονιδίων που μας ενδιέφεραν, εκπληρώνοντας τις εξής προϋποθέσεις : α) να περιέχουν την περιοχή όπου βρίσκονται οι κορυφές (peak) της Smyd3 και κατά συνέπεια και της RNA Pol-II, β) να είναι αρκετά μεγάλες περιοχές, κοντά στα 1000bp να βρίσκονται οπωσδήποτε upstream του ATG ώστε να μην κλωνοποιηθεί περιοχή έναρξης κωδικής περιοχής.

Αφού επιλέχθηκαν, σχεδιάστηκαν εκκινητές με τη βοήθεια του PrimerBlast για το γένωμα του ποντικού και επαληθεύτηκαν και με in silico PCR στο Genome Browser. Στη συνέχεια και αφού επιλέχθηκαν κάποια περιοριστικά ένζυμα από το MCS (Multi Clonal Site) του πλασμιδίου-φορέα (vector) στον οποίο και κλωνοποιήθηκαν, ελέχθηκαν με το online πρόγραμμα NEBcutter ώστε οι υπό κλωνοποίηση περιοχές να μην κόβονται από τα περιοριστικά ένζυμα επιλογής. Στους εκκινητές των υπό επιλογή περιοχών προστέθηκαν τα 6 νουκλεοτίδια με τις περιοχές αναγνώρισης των περιοριστικών γονιδίων συν επί πλέον 2 νουκλεοτίδια προς το 5' άκρο ώστε να διευκολυνθεί το ένζυμο να δράσει. Συνεπώς οι primers είχαν την παρακάτω λογική, και παραθέτονται παρακάτω.

(NN RRR RRR ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ) όπου NN τα extra νουκλεοτίδια, RRR RRR η θέση αναγνώρισης περιοριστικού ενζύμου και ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ ZZZ η συμπληρωματική στο γένωμα του ποντικού αλληλουχία.

Ακολούθησε PCR για περίπου 38 κύκλους με Expand High Fidelity Polymerase (Expand high fidelity PCR, Roche 11732641001), τα κομμάτια τρέχθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν με gel-extraction kit, κόπηκαν με το 1<sup>ο</sup> ένζυμο περιορισμού για 3 ώρες στους 37°C, ακολούθησε καθαρισμός με φαινόλη, χλωροφόρμιο, ισοαμυλική αλκοόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη. Στη συνέχεια έγινε πέψη και με το 2<sup>ο</sup> ένζυμο περιορισμού και τρέχθηκαν τα κομμάτια σε πήκτωμα αγαρόζης όπου ελέχθηκαν για την ποσότητα, το μήκος (bp) και εν συνεχεία καθαρίστηκαν με εμπορικό αντιδραστήριο-πρωτόκολλο καθαρισμού του DNA από την αγαρόζη (gel-extraction kit της Macherey-Nagel 740609.50- Nucleospin Gel και PCR Clean-up). Παράλληλα με την ίδια στρατηγική κόπηκε και ο φορέας πλασμίδιο (vector) pGL4.10. Ακολούθησε ligation αντίδραση με την T4 DNA ligase (New England BioLabs #M0202L) σε μοριακή αναλογία 4 μόρια insert : 1 μόριο vector (50 ng), και τα DNA επώασθηκαν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και O/N στους 16°C στη συνέχεια, σε αντίδραση ολικού όγκου 20 μL που περιείχε 1 μL T4 DNA ligase.

Ακολούθησε μετασχηματισμός του μισού όγκου της αντίδρασης του Ligation (10μL από τα 20μL) σε DH5a competent κύτταρα. Ακολουθήθηκε το κλασσικό πρωτόκολλο και η πρώτη επιλογή έγινε με επώαση σε θρεπτικό με αμικιλίνη, καθώς το πλασμίδιο pGL4.10 φέρει γονίδιο για ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Ακολούθησαν mini preps και διαγνωστικές πέψεις με περιοριστικά ένζυμα και επιλέχθηκαν οι σωστοί κλώνοι. Στη συνέχεια για αναπαραγωγή των σωστών κλωνοποιημένων πλασμιδίων κλώνων με μεγαλύτερη απόδοση και καλύτερη καθαρότητα επιμολύνθηκαν μεγαλύτερου όγκου καλλιέργειες (200 mL) και πραγματοποιήθηκαν midi preps με εμπορικό αντιδραστήριο πρωτόκολλο (NucleoBond Xtra Midi – Macherey-Nagel 740410-50).

Κλωνοποιήθηκαν τα εξής πλασμίδια, από την ονομασία των οποίων προκύπτει και η περιοχή υποκινητή γονιδίου που έχει κλωνοποιηθεί:

pGL4.10-*IGFBP1.promoter*

pGL4.10-*PCNA.promoter*

pGL4.10-*Sox4.promoter*

pGL4.10-*Myc.promoter*

pGL4.10-*Vnn1.promoter*

pGL4.10-*Fabp4.promoter*

pGL4.10-*Sparc.promoter*

pGL4.10-*Mpeg1.promoter*

### **Αλληλουχίες Εκκινητών.**

Για την PCR αντίδραση και πολλαπλασιασμό των γενωμικών περιοχών προς κλωνοποίηση χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές:

Luc.Vnn1For	CACTCGAGGCTGTAAATGTCAGAAGGTGTGC
Luc.Vnn1Rev	CCAAGCTTACCGTATCTTCAGATTTTCAGTGT
Luc.Sparc1For	CAGCTAGCCCAAAGCTGTCTTTTCTTTCTCCC
Luc.Sparc1Rev	CCAAGCTTATGCAGCTTCATTGGTAGCAT
Luc.Fabp4For	CAGCTAGCGTGCTATGAGCCTCTGAAGTCC
Luc.Fabp4Rev	CCAAGCTTACATGGCTATTTACGAATGGGAA
Luc.MycFor	CAGCTAGCGACCTACAGGGGAAAGAGCCG
Luc.MycRev	CCCTCGAGCTCCAGAGCTGCCTTCTTAGGT
Mpeg1promF	CCCTCGAGTCAGCAGATAGACACAAAGGTATG
Mpeg1promR	CAAAGCTTCAACTGGTTCAGCAGGCTGTGGAT
PCNApromF	CCGCTAGCCGGAGTTGTGGCGACTAGATGAGA

PCNApromR	CCAAGCTTATATTTTACCTACCACCAAAACCAA
Sox4promF	CAGCTAGCAACCTAGAGTCCCCGAGGCCCTC
Sox4promR	CCAAGCTTTTAAGCAGAAAGCTTCCATTTACA
IGFBP1promF	CCCTCGAG TCAGCAGATAGACACAAAGGTATG
IGFBP1promR	CAAAGCTT CAACTGGTTCAGCAGGCTGTGGAT

### **Αντισώματα.**

Τα παρακάτω αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, στις τεχνικές ανοσοαποτύπωσης κατά Western, στις χρώσεις ανοσοϊστοχημείας φθορισμού, στις ανοσοκατακρημνίσεις χρωματίνης (ChIP), και στις ανοσοκατακρημνίσεις για *in vivo* και *in vitro* αλληλεπίδραση πρωτεϊνών και πεπτιδίων.

Santa Cruz Biotechnology, anti-TFIIB (C-18) (sc-225); anti- GAPDH (6C5) (sc-32233); anti- HA-probe (Y-11) (sc-805).

από Serotec, anti-His6 (MCA1396).

από Cell signaling Technology, anti-SAPK/JNK (56G8) (#9258); anti-p-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (81E11) (#4668); anti-MEK1/2 (#9122); anti-p-MEK1/2 (Ser217/221) (#9121); anti-Snail(C15D3) (#3879); anti-Stat3 (#9132); anti-pStat3 (#4113).

από Abcam, anti-Ki67 (ab15580); anti-Fibronectin (ab2413); anti-H3K4Me3 (ab8580).

από Sigma, anti-BrdU (BU-33) (B 8434).

από Biolegend, anti-CD45 (30-F11).

από Abdsertec, anti-F4/80 (CI:A3-1).

από Euromedex , anti-RNA Polymerase II(B) (IPB-7G5).

από BD Transduction Laboratories, anti-E-Cadherin (#610181).

Το Smyd3 antiserum φτιάχτηκε σε συνεργαζόμενο εργαστήριο (καθηγητής κ. Χαλεπάκης Γεώργιος, Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης) σε θηλυκά κουνέλια New Zealand White, στα οποία έγινε ένεση με την full-length ανασυνδυασμένη Smyd3 πρωτεΐνη, και η οποία καθαρίστηκε σε native συνθήκες.





## Βιβλιογραφία.

Ahnen, D.J. (2011). The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived? *Am J Gastroenterol* 106, 190-198.

Bartke, T., Vermeulen, M., Xhemalce, B., Robson, S.C., Mann, M., and Kouzarides, T. (2010). Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* 143, 470-484.

Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412.

Bhat, M., Sonenberg, N., and Gores, G.J. (2013). The mTOR pathway in hepatic malignancies. *Hepatology* 58, 810-818.

Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396-398.

Bourzac, K. (2014). Microbiome: the bacterial tightrope. *Nature* 516, S14-16.

Brown, M.A., Foreman, K., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Edwards, M., Shaaban, S., and Tucker, H. (2015). C-terminal domain of SMYD3 serves as a unique HSP90-regulated motif in oncogenesis. *Oncotarget* 6, 4005-4019.

Cairns, R.A., Harris, I.S., and Mak, T.W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11, 85-95.

Cock-Rada, A.M., Medjkane, S., Janski, N., Yousfi, N., Perichon, M., Chaussepied, M., Chluba, J., Langsley, G., and Weitzman, J.B. (2012). SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res* 72, 810-820.

Dawson, M.A., Kouzarides, T., and Huntly, B.J. (2012). Targeting epigenetic readers in cancer. *N Engl J Med* 367, 647-657.

Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell* *18*, 884-901.

Elinav, E., Nowarski, R., Thaiss, C.A., Hu, B., Jin, C., and Flavell, R.A. (2013). Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* *13*, 759-771.

Farazi, P.A., and DePinho, R.A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* *6*, 674-687.

Filippakopoulos, P., and Knapp, S. (2014). Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov* *13*, 337-356.

Foreman, K.W., Brown, M., Park, F., Emtage, S., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Crew, A., Arnold, L., Shaaban, S., *et al.* (2011). Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3. *PLoS One* *6*, e22290.

Gabay, M., Li, Y., and Felsher, D.W. (2014). MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med* *4*.

Gardner, K.E., Allis, C.D., and Strahl, B.D. (2011). Operating on chromatin, a colorful language where context matters. *J Mol Biol* *409*, 36-46.

Gilkes, D.M., Semenza, G.L., and Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* *14*, 430-439.

Greer, E.L., and Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* *13*, 343-357.

Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M., Iimura, Y., Silva, F.P., Li, M., Yagyu, R., and Nakamura, Y. (2004). SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* *6*, 731-740.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Humphries, C. (2014). Sex differences: Luck of the chromosomes. *Nature* 516, S10-11.

Jou, J., and Diehl, A.M. (2010). Epithelial-mesenchymal transitions and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 120, 1031-1034.

Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 141, 52-67.

Kim, H., Heo, K., Kim, J.H., Kim, K., Choi, J., and An, W. (2009). Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated transcription. *J Biol Chem* 284, 19867-19877.

Kim, J.M., Kim, K., Schmidt, T., Punj, V., Tucker, H., Rice, J.C., Ulmer, T.S., and An, W. (2015). Cooperation between SMYD3 and PC4 drives a distinct transcriptional program in cancer cells. *Nucleic Acids Res.*

Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S., and Tanaka, T. (2005). Beta-Catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 96, 69-76.

Kooistra, S.M., and Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 297-311.

Kouskouti, A., and Talianidis, I. (2005). Histone modifications defining active genes persist after transcriptional and mitotic inactivation. *EMBO J* 24, 347-357.

Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.

Kunizaki, M., Hamamoto, R., Silva, F.P., Yamaguchi, K., Nagayasu, T., Shibuya, M., Nakamura, Y., and Furukawa, Y. (2007). The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res* 67, 10759-10765.

Lao, V.V., and Grady, W.M. (2011). Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 686-700.

Laursen, L. (2014). A preventable cancer. *Nature* 516, S2-3.

Lin, C.Y., Loven, J., Rahl, P.B., Paranal, R.M., Burge, C.B., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2012). Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* *151*, 56-67.

Llovet, J.M., Villanueva, A., Lachenmayer, A., and Finn, R.S. (2015). Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era (vol 12, pg 408, 2015). *Nat Rev Clin Oncol* *12*.

Lodish, H.F. (2008). *Molecular cell biology*, 6th edn (New York, W.H. Freeman).

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J.L., Leffert, H., and Karin, M. (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* *121*, 977-990.

Margueron, R., and Reinberg, D. (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* *11*, 285-296.

Mazur, P.K., Reynold, N., Khatri, P., Jansen, P.W., Wilkinson, A.W., Liu, S., Barbash, O., Van Aller, G.S., Huddleston, M., Dhanak, D., *et al.* (2014). SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature* *510*, 283-287.

Morgan, B. (2014). Fatty liver disease: the liver labyrinth. *Nature* *516*, S8-9.

Nam, S.W., Park, J.Y., Ramasamy, A., Shevade, S., Islam, A., Long, P.M., Park, C.K., Park, S.E., Kim, S.Y., Lee, S.H., *et al.* (2005). Molecular changes from dysplastic nodule to hepatocellular carcinoma through gene expression profiling. *Hepatology* *42*, 809-818.

Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., *et al.* (2012). c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* *151*, 68-79.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell* *140*, 197-208.

Pinyol, R., Nault, J.C., Quetglas, I.M., Zucman-Rossi, J., and Llovet, J.M. (2014). Molecular profiling of liver tumors: classification and clinical translation for decision making. *Semin Liver Dis* 34, 363-375.

Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873-887.

Proserpio, V., Fittipaldi, R., Ryall, J.G., Sartorelli, V., and Caretti, G. (2013). The methyltransferase SMYD3 mediates the recruitment of transcriptional cofactors at the myostatin and c-Met genes and regulates skeletal muscle atrophy. *Genes Dev* 27, 1299-1312.

Qatanani, M., Zhang, J., and Moore, D.D. (2005). Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology* 146, 995-1002.

Sabo, A., Kress, T.R., Pelizzola, M., de Pretis, S., Gorski, M.M., Tesi, A., Morelli, M.J., Bora, P., Doni, M., Verrecchia, A., *et al.* (2014). Selective transcriptional regulation by Myc in cellular growth control and lymphomagenesis. *Nature* 511, 488-492.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C., Schreiber, S.L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.

Sarris, M., Nikolaou, K., and Talianidis, I. (2014). Context-specific regulation of cancer epigenomes by histone and transcription factor methylation. *Oncogene* 33, 1207-1217.

Sherr, C.J. (2004). Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235-246.

Sirica, A.E. (2012). The role of cancer-associated myofibroblasts in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 44-54.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., *et al.* (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016-1028.

Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., and Miyajima, A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem* 149, 231-239.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.

Toffanin, S., Friedman, S.L., and Llovet, J.M. (2010). Obesity, inflammatory signaling, and hepatocellular carcinoma-an enlarging link. *Cancer Cell* 17, 115-117.

Tsuge, M., Hamamoto, R., Silva, F.P., Ohnishi, Y., Chayama, K., Kamatani, N., Furukawa, Y., and Nakamura, Y. (2005). A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nat Genet* 37, 1104-1107.

Van Aller, G.S., Reynoird, N., Barbash, O., Huddleston, M., Liu, S., Zmoos, A.F., McDevitt, P., Sinnamon, R., Le, B., Mas, G., *et al.* (2012). Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation. *Epigenetics* 7, 340-343.

Vander, A.J., Sherman, J.H., and Luciano, D.S. (2001). *Human physiology : the mechanisms of body function*, 8th edn (Boston, McGraw-Hill).

Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W., van Schaik, F.M., Varier, R.A., Baltissen, M.P., Stunnenberg, H.G., Mann, M., and Timmers, H.T. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131, 58-69.

Verna, L., Whysner, J., and Williams, G.M. (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 71, 57-81.

Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K.E., von Eyss, B., Herold, S., Rycak, L., Dumay-Odelot, H., Karim, S., Bartkuhn, M., *et al.* (2014). Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature* 511, 483-487.

Wozniak, G.G., and Strahl, B.D. (2014). Hitting the 'mark': interpreting lysine methylation in the context of active transcription. *Biochim Biophys Acta* 1839, 1353-1361.

Yan, C., Costa, R.H., Darnell, J.E., Jr., Chen, J.D., and Van Dyke, T.A. (1990). Distinct positive and negative elements control the limited hepatocyte and choroid plexus expression of transthyretin in transgenic mice. *EMBO J* 9, 869-878.

Yoshimoto, S., Loo, T.M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., *et al.* (2013). Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* 499, 97-101.

Zheng, H., and Kang, Y. (2014). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* 33, 1755-1763.

## Δημοσίευση εργασίας στο περιοδικό **Cancer Cell**.

Η παρούσα εργασία έχει γίνει αποδεκτή από το περιοδικό **Cancer Cell**, και αναμένεται να δημοσιευτεί στο τεύχος Ιανουαρίου ή Φεβρουαρίου του 2016.

Επισυνάπτεται παρακάτω το εξώφυλλο του manuscript που κατατέθηκε μετά το γράμμα αποδοχής από τη συντάκτρια του περιοδικού.

### **Cancer Cell**

#### **Smyd3 is a transcriptional potentiator of multiple cancer-promoting genes and required for liver and colon cancer development**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	CANCER-CELL-D-15-00284R3
<b>Full Title:</b>	Smyd3 is a transcriptional potentiator of multiple cancer-promoting genes and required for liver and colon cancer development
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Keywords:</b>	Histone methylase; Smyd3; Hepatocellular carcinoma; colorectal carcinoma; histone code; transcription regulation
<b>Corresponding Author:</b>	Iannis Talianidis Biomedical Sciences Research Center Alexander Fleming Vari, Athens GREECE
<b>First Author:</b>	Michalis E Sarris
<b>Order of Authors:</b>	Michalis E Sarris Panagiotis Moulos Anna Haroniti Antonis Giakountis Iannis Talianidis
<b>Abstract:</b>	Smyd3 is a protein methyltransferase implicated in cancer development. Here we show that Smyd3 expression in mice is required for chemically-induced liver and colon cancer formation. In these organs Smyd3 functions in the nucleus stimulating the transcription of several key regulators involved in cell proliferation, epithelial-mesenchymal transition, the JAK/Stat3 oncogenic pathway, as well as of the c-myc and $\beta$ -catenin oncogenes. Smyd3 interacts with H3K4Me3-modified histone tails, which facilitates its recruitment to the core promoter regions of most active genes. Smyd3 binding density on target genes positively correlates with increased RNA Polymerase-II density and transcriptional outputs. Despite its widespread distribution, the transcription potentiating function of Smyd3 is restricted to a particular set of genes, whose expression is induced specifically during carcinogenesis.
<b>Suggested Reviewers:</b>	
<b>Opposed Reviewers:</b>	