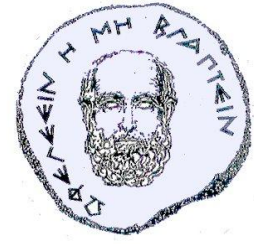
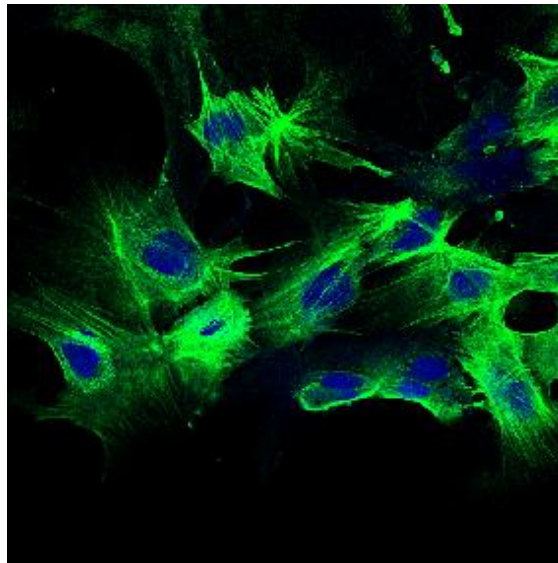




**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**Ο ρόλος του μεταγραφικού καταστολέα ERF  
κατά την ογκογένεση και την  
επιθηλιομεσενχυματική μετάβαση (EMT)**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**  
**ΑΝΔΡΕΑΣ ΖΑΡΑΓΚΟΥΛΙΑΣ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2017

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



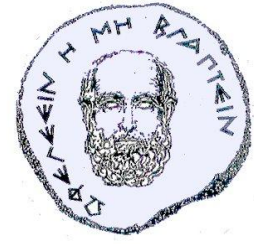
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

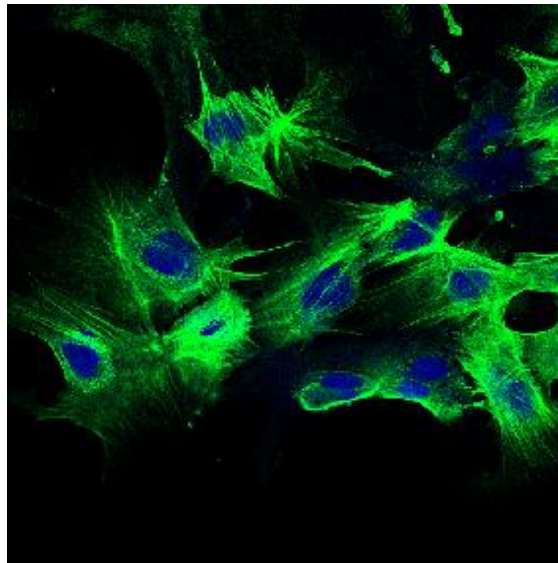




**UNIVERSITY OF CRETE  
MEDICAL SCHOOL**



**The role of ERF transcriptional repressor  
during oncogenesis and  
epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)**



**DOCTORAL THESIS  
ANDREAS ZARAGKOULIAS**

HERAKLION 2017

This work has been co-financed by the European Union (European Social Fund – ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) - Research Funding Program: Heracleitus II. Investing in knowledge society through the European Social Fund



**Thesis supervisor:**

**G. Mavrothalassitis**, Professor of Medical Chemistry, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**Members of advisory committee:**

**G. Mavrothalassitis**, Professor of Medical Chemistry, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**D. Kardassis**, Professor of Biochemistry, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**G. Garinis**, Professor of Genetics, University of Crete, Dept. of Biology – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**Members of examination committee:**

**G. Mavrothalassitis**, Professor of Medical Chemistry, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**D. Kardassis**, Professor of Biochemistry, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**G. Garinis**, Professor of Genetics, University of Crete, Dept. of Biology – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**G. Sourvinos**, Professor of Clinical Virology, University of Crete, Medical School

**C. Tsatsanis**, Professor of Clinical Biochemistry, University of Crete, Medical School

**A. G. Eliopoulos**, Professor of Molecular & Cellular Biology, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

**D. Karagozeos**, Professor of Molecular Biology/Developmental Neurobiology, University of Crete, Medical School – Researcher, Institute of Molecular Biology and Biotechnology-FORTH

## Personal Data



Full Name: **ZARAGKOULIAS Andreas**  
Born: April 3, 1984  
Nationality: Greek  
Phone: (0030) 6979226916  
E-mail: a.zaragkoulias@med.uoc.gr  
andreas3484@gmail.com

## Education

- 2017:** **PhD** in Molecular Biology and Gene Regulation in Development and Disease, Greece, **University of Crete, Medical School**. PhD thesis: “**The role of ERF transcriptional repressor during oncogenesis and epithelial-mesenchymal transition (EMT)**”.
- 2009:** Master’s Degree, Greece, University of Crete, Medical School, graduate program “**Molecular Basis of Human Disease**”. Graduate thesis: “The role of CD40 pathway at cancer cell death”.
- 2006:** Bachelor’s Degree, Greece, Democritus University of Thrace, Health Sciences-School, Department of **Molecular Biology & Genetics** (Grade 8,08/10).
- 2002:** Senior High School, Kavala, Greece (Grade 18<sup>6/10</sup> / 20).
- 1999:** High School, Kavala, Greece (Grade 19<sup>6/13</sup> / 20).

## Research Experience

**2017:** PhD thesis: “The role of ERF transcriptional repressor during oncogenesis and epithelial-mesenchymal transition (EMT)”, University of Crete, Medical School, Laboratory of Chemistry, supervisor: professor G. Mavrothalassitis.  
*Duration:* 11/2009 - 02/2017 (6 years in the lab, military service in 2015)

### Projects:

- a. Examination of the transcriptional repressor Ets2-repressor factor (ERF) ability to interfere with TGF- $\beta$ -induced **EMT** in mammary epithelial cells (EpH4) expressing oncogenic Ras (EpRas).
- b. Study of in vitro and in vivo **mammary development and oncogenesis** during tissue specific ERF deletion from mammary glands.
- c. Examination of ERF role in the differentiation of **trophoblast stem cells (TSCs)** that contribute to the placenta formation.

**2009:** Master thesis: “The role of CD40 pathway at cancer cell death”, University of Crete, Medical School, Laboratory of Molecular and Cellular Biology, supervisor: professor A. Eliopoulos.  
*Duration:* 09/2008 – 09/2009 (1 year)

- 2008:** 2 lab rotations (2 months each) at Biochemistry lab (supervisor: professor C. Stournaras) and Molecular and Cellular Biology lab (supervisor: professor A. Eliopoulos), University of Crete, Medical School.
- 2007:** Fieldwork at Chemistry lab of the University of Crete, Medical School, supervisor: professor G. Mavrothalassitis. *Duration:* 05-06/2007 (2 months)
- 2006:** Undergraduate thesis: “Study of regulatory factors of undifferentiated embryonic stem cells”, Institute of Molecular Biology and Biotechnology (IMBB) of the Foundation for Research and Technology of Heraklion Crete (FORTH), Laboratory of Mammalian Gene Expression, supervisor: professor J. Papamatheakis, co-supervisor: principal researcher A. Kretsovali.  
*Duration:* 03-07/2006 (5 months)

## Laboratory skills

Cell culture (2D, 3D), transfection, cloning, PCR, RT-PCR, qPCR, adenovirus propagation and titration, silencing techniques, immunocytochemistry, immunohistochemistry (cryosections, paraffin sections), microscopy (fluorescence, confocal), SDS-PAGE, western blots, chromatin immunoprecipitation (ChIP), flow cytometry, in vivo mouse model techniques (MEFs-Mouse Embryonic Fibroblasts isolation from mouse embryos dpc13.5, PMECs-Primary Mammary Epithelial Cells isolation from mouse mammary glands, BMDM-Bone Marrow Derived Monocytes isolation from murine limb long bone)

## Publications

1. Vorgia E\*, **Zaragkoulias A\***, Peraki I, Mavrothalassitis G. (2017) Suppression of Fgf2 by ETS2 repressor factor (ERF) is required for chorionic trophoblast differentiation. *Mol Reprod Dev.* 9999:1–10. doi: 10.1002/mrd.22780. **(IF 2.5 – sub printing)** (\*Equal contribution)
2. Twigg SR, Vorgia E, McGowan SJ, Peraki I, Fenwick AL, Sharma VP, Allegra M, **Zaragkoulias A**, Sadighi Akha E, Knight SJ, Lord H, Lester T, Izatt L, Lampe AK, Mohammed SN, Stewart FJ, Verloes A, Wilson LC, Healy C, Sharpe PT, Hammond P, Hughes J, Taylor S, Johnson D, Wall SA, Mavrothalassitis G, Wilkie AO (2013) Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nat Genet* 45(3): 308-13. doi: 10.1038/ng.2539. **(IF 35.5 – Google Scholar cites 57)**
3. Allegra M, **Zaragkoulias A**, Vorgia E, Ioannou M, Litos G, Beug H, Mavrothalassitis G. (2012) Semaphorin-7a reverses the ERF-induced inhibition of EMT in Ras-dependent mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 23:3873-81. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0276. **(IF 4.8 – Google Scholar cites 14)**

## **Grants / Awards**

- 2013-14:** “Maria Michail Manassaki” scholarship for excellence, Medical School, University of Crete.
- 2010-13:** "IRAKLITOS II - University of Crete" scholarship, co-funded by the European Union (European Social Fund) and National Resources.
- 2009-10:** Scholarship for oncogenesis research, Medical School, University of Crete.
- 2007-09:** “Bodossaki Foundation” scholarship for postgraduate studies.
- 2007:** “State Scholarships Foundation-IKY” scholarship after giving exams in 3 courses. (refused because of “Bodossaki” fellowship at the same time)
- 2003:** “State Scholarships Foundation-IKY” undergraduate scholarship for excellence for the academic year 2002-03 at Molecular Biology & Genetics Department, Democritus University of Thrace.

## **Conferences / Seminars**

1. Allegra M., **Zaragkoulias A.**, Vorgia E., Ioannou M., Litos G., Beug H. and Mavrothalassitis G. Semaphorin7a reverses the ERF-induced inhibition of EMT in Ras-dependent mouse mammary epithelial cells. 63<sup>rd</sup> Panhellenic Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology, FORTH, Heraklion, Crete, Greece 9-11/11/2012, poster.
2. 11-15/07/2011: The 2011 **Lectures in Biology: Basic And Applied Virology**, The Onassis Foundation Science Lecture Series 2011 in Biology, Heraklion, Greece

## **Teaching / Supervising**

I have trained both undergraduate and postgraduate students during their thesis in various molecular biology techniques.

## **Membership**

- Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB).

## **Languages**

1. **Greek:** native speaker
2. **English:** fluent (University of Cambridge, First Certificate in English, 1999)

## **Computer skills**

- Windows, Microsoft Office, Photoshop, Image J, GraphPad.



*Στους γονείς μου Γιώργο κ Ντίνα,  
στον αδερφό μου Κυριάκο,  
και στο Ευάκι μου . . .*

# Περίληψη

Ο ERF (Ets-2 Repressor Factor) είναι μεταγραφικός καταστολέας της οικογένειας των ETS γονιδίων, ο οποίος ρυθμίζεται από το μονοπάτι RTK/RAS/ERK. Τα μέλη της οικογένειας των ETS μεταγραφικών παραγόντων ελέγχουν σημαντικές βιολογικές διαδικασίες, όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την αιμοποίηση, την αγγειογένεση και την ογκογένεση. Αντίστοιχα λοιπόν και ο ERF θα μπορούσε να έχει ανάλογες ποικίλες δράσεις αφού το *Erf* γονίδιο εκφράζεται παντού στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και σε όλους τους ιστούς στο ενήλικο και τις κυτταρικές σειρές που έχουν εξεταστεί. Η ERK-διαμεσολαβούμενη φωσφορυλίωση του ERF έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του υποκυτταρικού εντοπισμού του. Έτσι, η φωσφορυλιωμένη μορφή του ERF (κάτω από μιτογόνες συνθήκες που η ERK είναι ενεργή) βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ενώ όταν το Ras/Erk μονοπάτι αναστέλλεται, τότε ο ERF συσσωρεύεται γρήγορα στον πυρήνα, αποφωσφορυλιώνεται και ασκεί τη δράση του ως μεταγραφικός παράγοντας, ρυθμίζοντας την έκφραση ποικίλων γονιδίων. Έχοντας ήδη πλέον ανακαλυφθεί η ρύθμιση του ERF αλλά και κάποιες βασικές του λειτουργίες, όπως η αναστολή του κυτταρικού κύκλου καταστέλλοντας το *c-Myc* με έναν Rb-εξαρτώμενο τρόπο, καθώς και η αναστολή του *ets* και *ras* επαγόμενου μετασχηματισμού και του σαρκώματος του Ewing's σε κυτταρικά συστήματα, με την παρούσα διδακτορική διατριβή προχωρήσαμε τη μελέτη του ERF ένα βήμα παραπέρα. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε ο ρόλος του ERF στην επιθηλιομεσεγγυματική μετάβαση (EMT) και την ογκογένεση στο μαστό, καθώς επίσης και στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων (TSCs), μία κρίσιμη διαδικασία κατά την πλακουντογένεση.

Η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT) είναι μία καθοριστική διαδικασία στην πρόοδο του καρκίνου και τη μετάσταση, απαιτώντας τη συνεργασία των EGF/Ras και TGFβ σηματοδοτικών μονοπατιών σε πολλαπλά επίπεδα. Παρόλα αυτά, οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η Ras σηματοδότηση συμβάλει στο EMT, παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Ως εκ τούτου, μελετήσαμε το κατά πόσον ο ERF είναι ικανός να παρεμβαίνει στο TGFβ-επαγόμενο EMT σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού (ErH4) που υπερεκφράζουν το ογκογόνο Ras (ErRas). Τα ErRas κύτταρα που υπερεκφράζουν τον ERF απέτυχαν να οδηγηθούν προς TGFβ-επαγόμενο EMT, σχημάτισαν τρισδιάστατες σωληνοειδής δομές μέσα σε γέλη κολλαγόνου, και διατήρησαν την έκφραση επιθηλιακών μαρτύρων. Ανάλυση του μεταγραφώματος έδειξε ότι η TGFβ σηματοδότηση μέσω Smads ήταν κυρίως ανεπηρέαστη και ότι ο ERF ανέστειλε το TGFβ-επαγόμενο EMT, μέσω καταστολής του *Semaphorin-7a*. Η αναστολή του *Semaphorin-7a* στα πατρικά ErRas κύτταρα ανέστειλε την ικανότητά τους να οδηγηθούν προς TGFβ-επαγόμενο EMT. Τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι το ογκογόνο Ras μπορεί να παίζει έναν επιπλέον ρόλο στο EMT μέσω του ERF, ρυθμίζοντας το *Semaphorin-7a* και παρέχοντας μία νέα διασύνδεση μεταξύ των Ras- και TGFβ- σηματοδοτικών μονοπατιών. Αφορμή από αυτά τα ευρήματα, ήταν να ξεκινήσει και η μελέτη απαλοιφής του *Erf* από το μαστό του ποντικού ή από τα ποντικίσια πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (PMECs), συσχετίζοντάς τον έτσι με την ογκογένεση του μαστού. Η μελέτη αυτή όμως είναι σε εξέλιξη, οπότε δεν υπάρχουν ακόμη κάποια ασφαλή συμπεράσματα.

Επιπλέον, ασχοληθήκαμε με το ρόλο του ERF στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων (TSCs), που συμβαίνει κατά την πλακουντογένεση, μία διαδικασία στην οποία παίζει αρκετά σημαντικό ρόλο το EMT φαινόμενο που μελετήθηκε αρχικά παραπάνω. Η ομόζυγη απαλοιφή του *Erf* στο ποντίκι έχει δείξει παλιότερα ότι παρεμποδίζει τη χοριακή τροφοβλαστική διαφοροποίηση, οδηγώντας σε αποτυχία χοριοαλλαντοειδικής σύντηξης και εμβρυϊκό θάνατο. Η FGF σηματοδότηση είναι σημαντική για την κατάλληλη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων (TSCs) και την ανάπτυξη του αιμοχοριακού πλακούντα. Η απουσία του *Fgf2* προάγει τη διαφοροποίηση των TSCs, ενώ ο FGF4 ή FGF2 απαιτούνται για τη διατήρηση των TSCs στα ποντίκια. Με μοριακές και κυτταρικές προσεγγίσεις δείξαμε εδώ

ότι χαμηλά επίπεδα *Fgf2* mRNA μπορούν να ανιχνευτούν *ex vivo* στα TSCs. Η έκφραση αυτή αναστέλλεται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης του ERF με την *Fgf2* μεταγραφική μονάδα, αυξάνεται απουσία ERF και μειώνεται παρουσία μεταλλαγμένου ERF που είναι ανθεκτικός στη φωσφορυλίωση από την ERK. Η αναστολή του *Fgf2* από τον ERF φαίνεται να είναι απαραίτητη για την κατάλληλη διαφοροποίηση των χοριακών τροφοβλαστικών κυττάρων (TSCs) και μπορεί να ευθύνεται για το φαινότυπο του *Erf* knock out. Τέλος, η διαφοροποίηση των TS κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν ERF προτείνουν ότι πέραν από τις *Fgf2* διαμεσολαβούσες επιρροές, το *Erf* μπορεί να έχει έναν επιπλέον ρόλο στη δέσμευση των χοριακών τροφοβλαστικών κυττάρων προς συγκυτιοτροφοβλάστες.

Τέλος, δείχθηκε ότι μειωμένες δόσεις του ERF προκαλούν σύνθετη κρανιοσυνοστέωση (πρόωρο κλείσιμο κρανιακών ραφών) στον άνθρωπο και το ποντίκι. Χαρακτηριστικά αυτής της νέας αναγνωρισμένης κλινικής διαταραχής περιλαμβάνουν τη συνοστέωση ποικίλων κρανιακών ραφών, τη δυσμορφία κρανίου και προσώπου, τη δυσμορφία Chiari και γλωσσική καθυστέρηση. Στα πλαίσια λοιπόν αυτής της ευρύτερης δουλειάς, εδώ έγιναν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε ποντικίστους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (MEFs) και μεγάλης κλίμακας αλληλούχιση (ChIP-seq) και βρήκαμε ότι ο ERF προσδένεται κατά προτίμηση σε γενωμικά στοιχεία μακριά από υποκινητές, που περιλαμβάνουν RUNX και AP1 μοτίβα πρόσδεσης στο DNA. Η δουλειά αυτή ταυτοποιεί τον ERF ως ένα νέο ρυθμιστή της οστεογένεσης που επάγεται από RAS-ERK σηματοδότηση, πιθανώς συναγωνιζόμενος τους ETS παράγοντες ενεργοποίησης στα πολυπαραγοντικά μεταγραφικά συμπλέγματα.

# Abstract

ERF (Ets-2 Repressor Factor) is a transcriptional repressor that belongs to ETS family and is regulated by RTK/RAS/ERK signalling pathway. ETS family members control important biological processes, including cell proliferation, differentiation, apoptosis, hematopoiesis, angiogenesis and oncogenesis. Respectively, ERF could have such a variety of actions, thinking that *Erf* gene is ubiquitously expressed in the developing mouse embryo and adult tissues as well as in all cell lines that have been examined. ERF's ERK-mediated phosphorylation determines its subcellular localization. After mitogenic stimulation ERF is phosphorylated by ERK and exported from the nucleus to the cytoplasm, while in the absence of mitogenic stimulation, ERF is accumulating in the nucleus in a non-phosphorylated state and thus can act as a transcriptional repressor, regulating the expression of a big diversity of genes. Although much is known about Erf regulation and some of its basic functions, such as cell cycle arrest by direct suppression of *c-Myc* with a Rb-dependent manner, as well as inhibition of *ets*- and *ras*- induced transformation and Ewing's sarcoma in cellular systems, with this work we advanced the ERF study a step further. Specifically, here we examined the ERF function to epithelial-mesenchymal transition (EMT) and mammary oncogenesis, as well as the differentiation of trophoblast stem cells (TSCs) that is a critical process in the formation of placenta.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) is a key process in cancer progression and metastasis, requiring cooperation of the epidermal growth factor/Ras with the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signaling pathway in a multistep process. The molecular mechanisms by which Ras signaling contributes to EMT, however, remain elusive to a large extent. We therefore examined the transcriptional repressor Ets2-repressor factor (ERF) for its

ability to interfere with TGF- $\beta$ -induced EMT in mammary epithelial cells (EpH4) expressing oncogenic Ras (EpRas). ERF-overexpressing EpRas cells failed to undergo TGF- $\beta$ -induced EMT, formed three-dimensional tubular structures in collagen gels, and retained expression of epithelial markers. Transcriptome analysis indicated that TGF- $\beta$  signaling through Smads was mostly unaffected, and ERF suppressed the TGF- $\beta$ -induced EMT via *Semaphorin-7a* repression. Inhibition of *Semaphorin-7a* in the parental EpRas cells inhibited their ability to undergo TGF- $\beta$ -induced EMT. Our data suggest that oncogenic Ras may play an additional role in EMT via the ERF, regulating *Semaphorin-7a* and providing a new interconnection between the Ras- and the TGF- $\beta$ -signaling pathways. The cause of these findings, it was to start the study of *Erf* deletion from the mouse mammary glands or the mouse primary mammary epithelial cells (PMECs), thus associating ERF with mammary oncogenesis. However, this study is in progress, so there are still no any safe conclusions.

Furthermore, we examined the ERF role in the differentiation of trophoblast stem cells (TSCs) that contribute to the placenta formation, a process in which EMT procedure that we studied initially is very important. Homozygous deletion of the *Erf* in mice has been shown to block chorionic trophoblast differentiation leading to the failure of chorioallantoic fusion and embryo death. Fibroblast growth factor (FGF) signaling is important for the proper trophoblast stem cell (TSC) differentiation and development of the hemochorial placenta. Lack of *Fgf2* promotes TSC differentiation while FGF4 or FGF2 is required for murine TSC maintenance. Employing molecular and cellular approaches we show here that low levels of *Fgf2* mRNA can be detected *ex vivo* in TSC. This expression is repressed via direct interaction of ERF with the *Fgf2* transcription unit, is increased in the absence of ERF and is decreased in the presence of an ERF mutation resistant to ERK phosphorylation. *Fgf2* inhibition by ERF appears to be necessary for the proper differentiation of the chorionic trophoblast stem cells and may account for the *Erf* knock out phenotype. Finally, differentiation of ERF overexpressing TSC lines suggests that in addition to *Fgf2* mediated effects *Erf* may have an additional role in the commitment of chorionic trophoblasts towards syncytiotrophoblast.

Finally, it was shown that reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis (premature fusion of the cranial sutures) in humans and mice. Features of this newly recognized clinical disorder include multiple-suture synostosis, craniofacial dysmorphism, Chiari malformation and language delay. So within this wider work, here using chromatin immunoprecipitation in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and high-throughput sequencing (ChIP-seq), we find that ERF binds preferentially to elements away from promoters that contain RUNX or AP-1 motifs. This work identifies ERF as a novel regulator of osteogenic stimulation by RAS-ERK signaling, potentially by competing with activating ETS factors in multifactor transcriptional complexes.

# Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	1
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ.....	2
Γενικά.....	2
Δομή των ETS πρωτεϊνών .....	3
Ρύθμιση της δράσης των ETS πρωτεϊνών .....	5
ETS knock-out και μεταλλαγμένα μοντέλα ποντικών .....	6
ETS μεταγραφικοί παράγοντες και καρκίνος.....	7
Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ERF (ETS-2 REPRESSOR FACTOR) .....	14
ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ RAS/ERK.....	20
TGFB-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΕΠΙΘΗΛΙΟΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT) ..	22
TGFB σηματοδότηση και βιολογία.....	22
Επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT).....	26
Ο ΜΑΣΤΙΚΟΣ ΑΔΕΝΑΣ .....	31
Ανάπτυξη και δομή του μαστού .....	31
Η σηματοδότηση στο μαστό .....	35
Καρκίνος του μαστού και επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT).....	36
Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ .....	38
Γενικά.....	38
Πλακουντογένεση.....	41
Αρχέγονα τροφοβλαστικά κύτταρα (TSCs): <i>in vivo</i> και <i>ex vivo</i> διατήρηση και διαφοροποίηση.....	44
2. Υλικά και Μέθοδοι .....	47
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	48
Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων .....	48
Ανασύσταση ( <i>passaging</i> ) κυττάρων .....	49
Πάγωμα κυττάρων .....	49
Απομόνωση εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs) .....	50
Απομόνωση πρωτογενών μαστικών επιθηλιακών κυττάρων ποντικού (PMECs).....	51
3D καλλιέργεια κυττάρων σε γέλη κολλαγόνου .....	52
Μόνιμη επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων .....	53
Παροδική επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων .....	53
Μεταγωγή ανασυνδισμένων αδενοϊών σε κύτταρα ( <i>virus transduction</i> )	54



ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΗΣ (WOUND HEALING ASSAY) .....	54
ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ .....	54
<i>Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης</i> .....	55
<i>Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης</i> .....	55
ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (MTT ASSAY) .....	55
ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS) .....	56
ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ .....	56
<i>Ανοσοφθορισμός σε κυτταρικές σειρές</i> .....	56
<i>Ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές</i> .....	57
<i>Ανοσοφθορισμός κυττάρων σε γέλη κολλαγόνου (3D)</i> .....	58
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DNA .....	58
<i>Απομόνωση γενωμικού DNA από κυτταρικές σειρές</i> .....	58
<i>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)</i> .....	59
<i>Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών</i> .....	60
<i>PCR για γονοτύπηση ποντικών</i> .....	60
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ .....	62
<i>Απομόνωση ολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος</i> .....	62
<i>Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Bradford)</i> .....	62
<i>Στύπωμα κατά Western</i> .....	63
ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA .....	64
<i>Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές σειρές</i> .....	64
<i>Αντίστροφη μεταγραφή RNA (Reverse Transcription)</i> .....	64
<i>Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR)</i> .....	65
ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (ChIP) ΚΑΙ QPCR .....	66
ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	68
<i>Μονιμοποίηση ιστών</i> .....	68
<i>Έγκλειση και πάγωμα ιστών για τομές σε κρυοτόμο</i> .....	69
<i>Έγκλειση ιστών σε παραφίνη</i> .....	69
<i>Τομές σε μικροτόμο ή κρυοτόμο</i> .....	69
<i>Ιστολογική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&amp;E) σε τομές παραφίνης</i> ..	70
<i>Ιστολογική χρώση με καρμίνη (Carminium-red) σε ολόκληρους ιστούς</i> .....	70
ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ .....	71
<i>Πολλαπλασιασμός ανασυνδυασμένων αδενοϊών</i> .....	71
<i>Καθαρισμός ανασυνδυασμένων αδενοϊών</i> .....	72

<i>Τιτλοποίηση ανασυνδυσασμένων αδenoϊών (FFU assay)</i> .....	72
<b>3. Αποτελέσματα</b> .....	<b>73</b>
Ο ERF ΚΑΤΑΣΤΕΛΕΙ ΤΗΝ ΤGFβ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT) ΜΕΣΩ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ Semaphorin-7a ΓΟΝΙΔΙΟΥ .....	74
<i>Ο ERF αναστέλλει το EMT</i> .....	74
<i>Η Semaphorin-7a είναι απαραίτητη για το EMT</i> .....	77
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗΣ ΑΠΑΛΟΙΦΗΣ ΤΟΥ ERF ΑΠΟ ΤΟ ΜΑΣΤΟΣΤΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΑΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	80
<i>Μελέτη της in vitro απαλοιφής του Erf από τα πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (PMECs)</i> .....	81
<i>Μελέτη της in vivo απαλοιφής του Erf ειδικά από το μαστό του ποντικού</i> .....	85
Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ Fgf2 ΑΠΟ ΤΟΝ ERF ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΧΟΡΙΑΚΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ .....	91
<i>Ο ERF προσδένεται στο Fgf2 γονίδιο και καταστέλλει τη μεταγραφή του</i> .....	91
<i>Ο ERF καταστέλλει την έκφραση του Fgf2 στα TSCs</i> .....	93
<i>Ακόμη και χαμηλά επίπεδα Fgf2 επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των TSCs</i> .....	94
ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ERF ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ .....	96
<b>4. Συζήτηση</b> .....	<b>99</b>
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT) .....	100
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ .....	103
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....	104
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ .....	107
<b>5. Βιβλιογραφία</b> .....	<b>109</b>

# 1. Εισαγωγή

## ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ETS ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

### Γενικά

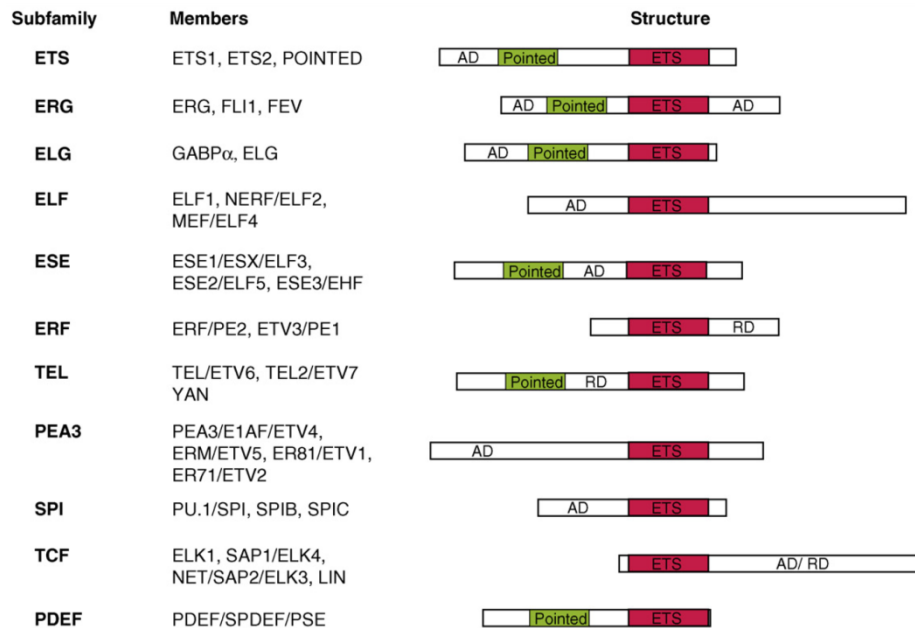
Το v-ets ογκογονίδιο ανακαλύφθηκε το 1983 ως μέρος μίας συντηγμένης ογκογόνου πρωτεΐνης (p135, gag-myb-ets) του ρετροϊού E26 στα κοτόπουλα. Τόσο το v-ets όσο και το v-myb συμμετέχουν στο μετασχηματισμό διαφόρων κυτταρικών γενεαλογιών και τύπων. Το όνομα ets προέρχεται από το “E26 transforming sequence” ή από το “E-twenty-six specific sequence”. Το v-ets ογκογονίδιο μετασχηματίζει ινοβλάστες, μυελοβλάστες, και ερυθροβλάστες *in vitro* και προκαλεί ποικιλία ερυθροειδών-μυελοειδών και λεμφοειδών λευχαιμιών *in vivo* (Blair and Athanasiou 2000).

Όλα τα μέλη της ETS οικογένειας χαρακτηρίζονται από μια συντηρημένη αλληλουχία που κωδικοποιεί την περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA και ονομάζεται “ETS DNA-binding domain” (EBD). Η ταυτοποίηση v-ets-σχετιζόμενων γονιδίων σε όλο το ζωικό βασίλειο έχει καθιερώσει την ETS ως μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, αποτελούμενη από 28 ETS γονίδια στον άνθρωπο, 27 στον ποντικό, 11 στον αχινό, 10 στο *C. elegans* και 9 στη *Drosophila*. Οι ανθρώπινοι ETS παράγοντες κατηγοριοποιούνται σε υποομάδες βασιζόμενοι στην ομολογία της ETS περιοχής (Εικ.1.1). Επιπλέον, ένα υποσύνολο τεσσάρων ETS γονιδίων (ELF3, ELF5, EHF, SPDEF) αποτελεί μια μοναδική υποομάδα, όπου η έκφρασή τους περιορίζεται σε ιστούς με υψηλή περιεκτικότητα επιθηλιακών κυττάρων (Findlay et al. 2013).

Μελέτες των mRNA επιπέδων των γονιδίων της ETS οικογένειας στον άνθρωπο σε διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές έδειξε ότι το πρότυπο έκφρασης των μελών δείχνει σημαντικό βαθμό αλληλοκάλυψής τους. Έτσι, περίπου τα μισά μέλη εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και τις κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν, ενώ άλλα εκφράζονται αποκλειστικά ιστοειδικά ή/και κυτταρο-ειδικά (Hollenhorst, Jones, and Graves 2004).

Τα περισσότερα από τα μέλη της ETS οικογένειας είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές, ωστόσο τέσσερα μέλη (YAN, ERF, NET, TEL) είναι μεταγραφικοί καταστολείς. Για τους NET και TEL η καταστολή έχει δειχθεί ότι μεσολαβεί από την στρατολόγηση ιστονικών απακετυλασών (HDACs).

Ωστόσο και οι τέσσερις καταστολείς ρυθμίζονται από το MAPK μονοπάτι, ενώ τα μέλη YAN και ERF μέσω της ERK (Mavrothalassitis and Ghysdael 2000).



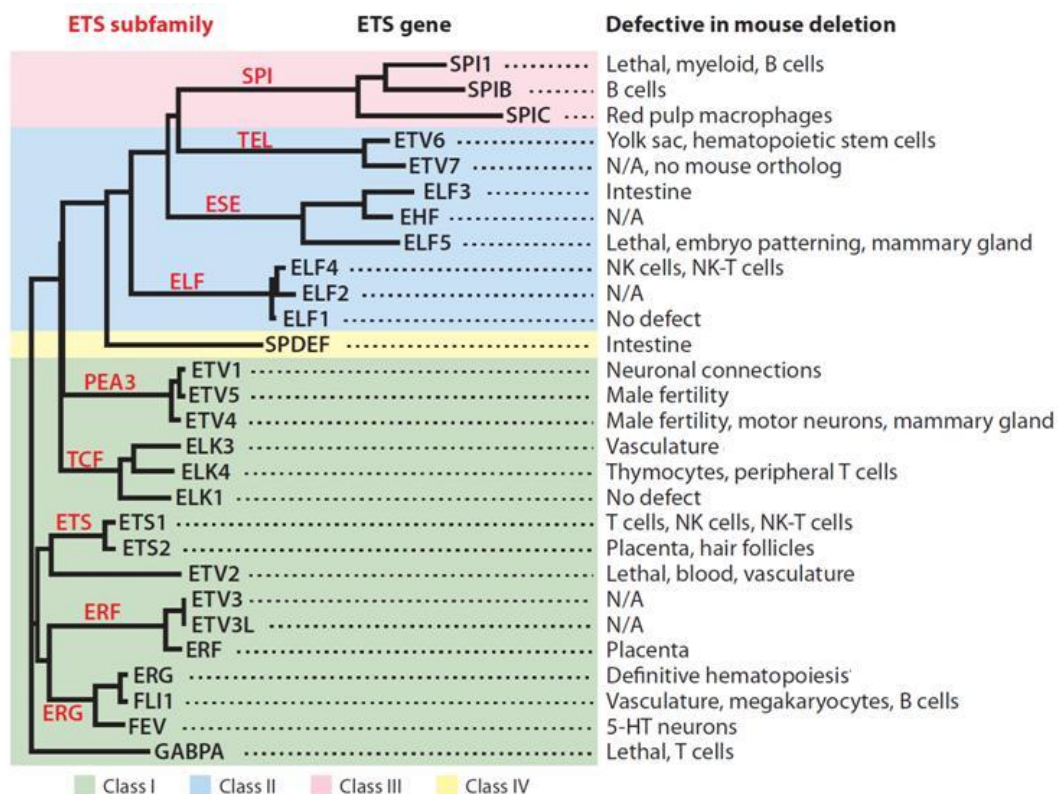
**Εικόνα 1.1: Η οικογένεια των ETS μεταγραφικών παραγόντων.** Απεικονίζονται οι κύριες χαρακτηριστικές λειτουργικές δομές κάθε υποομάδας. Περιοχές: AD, transcriptional activation domain; ETS, DNA binding domain; Pointed, basic helix–loop–helix pointed domain; RD, transcriptional repressor domain. Συντομογραφίες πρωτεϊνών: E1AF, E1A enhancer binding protein; EHF, ETS homologous factor; ELF, E74-like factor; ELG, ETS like gene; ER81, ETS related protein 81; ERF, ETS repressor factor; ERG, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene related; ERM, ETS related molecule; ESE, Epithelial specific ETS; ETS, v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog; ETV, ETS variant gene; FLI1, Friend leukemia virus integration 1; FEV, Fifth Ewing variant; GABP, GA repeat binding protein; LIN, abnormal cell lineage; MEF, myeloid ELF1-like factor; NERF, New ETS-related factor; PEA3, polyomavirus enhancer activator-3; PDEF, prostate derived ETS transcription factor; PSE, prostate epithelium-specific ETS; SAP, Serum response factor accessory protein; SPDEF, SAM pointed domain containing ETS transcription factor; SPI, spleen focus forming virus proviral integration oncogene; TEL, translocation, Ets, leukemia; TCF, Ternary complex factor. (Gutierrez-Hartmann, Duval, and Bradford 2007)

### Δομή των ETS πρωτεϊνών

Η ETS DNA-δεσμευόμενη περιοχή (EBD) καθώς και η λεγόμενη “pointed or helix-loop-helix” περιοχή (PNT-HLH) είναι οι δύο πιο συνηθισμένες περιοχές στις ETS πρωτεΐνες, όπου θα αναλυθούν περισσότερο παρακάτω, ενώ εντοπίζονται και αυτόνομες περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης ή καταστολής (AD/RD) (Εικ.1.1). Επίσης έχουν χαρακτηριστεί και άλλες περιοχές που βρίσκονται σε μικρότερα υποσύνολα των ETS πρωτεϊνών, όπως οι OST, GABPA και B-box (TCF υποομάδα: ELK1, ELK3, ELK4) περιοχές (Hollenhorst, McIntosh, and Graves 2011).

Η ETS DNA-δεσμευόμενη περιοχή (EBD) εντοπίζεται είτε στο άμινο-, είτε στο καρβόξυ-τελικό άκρο των πρωτεϊνών και αποτελείται από 85

αμινοξέα, που σχηματίζουν 3  $\alpha$ -έλικες και 4  $\beta$ -πτυχωτές επιφάνειες, σχηματίζοντας μία δομή έλικας-στροφής-έλικας (HTH) (Kodandapani et al. 1996). Μέσω της συγκεκριμένης δομής, οι πρωτεΐνες αυτές αναγνωρίζουν και αλληλεπιδρούν με τη συναινετική αλληλουχία GGA(A/T) (ETS binding site, EBS) στο γενωμικό υλικό, ενώ και πρόσθετα γειτονικά νουκλεοτίδια υποβοηθούν την πρόσδεση. Οι ETS πρωτεΐνες ομαδοποιούνται σε 4 κλάσεις με βάση την ειδικότητά τους στην πρόσδεση του DNA (Εικ.1.2) (Wei et al. 2010). Ο μηχανισμός για την αναγνώριση της DNA αλληλουχίας εξωτερικά του GGA(A/T) πυρήνα είναι λιγότερο ξεκάθαρος. Δεδομένης λοιπόν αυτής της επικάλυψης που υπάρχει στην ETS αναγνώριση των αλληλουχιών, περαιτέρω ειδικότητα επιτυγχάνεται μέσω συνδυαστικής και συνεργατικής πρόσδεσης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στη σειρά (πχ ETS1/RUNX) ή παλινδρομικά (ETS1) αντιστοίχως. Ακόμα, η πρόσδεση στο DNA μπορεί να ρυθμίζεται και από τις αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της ETS περιοχής (EBD) (Cooper, Newman, and Gileadi 2014).



**Εικόνα 1.2: Η ποικιλία λειτουργικότητας της ETS οικογένειας.** (αριστερά) Ένα δένδρογραμμα δείχνει το βαθμό συγγένειας των 28 ανθρώπινων ETS αλληλουχιών. Το μήκος κάθε οριζόντιας γραμμής δείχνει την εξελικτική απόσταση. Οι κλάσεις αντιπροσωπεύουν τη διαφορετική ειδικότητα πρόσδεσης στο DNA και απεικονίζονται με διαφορετικά χρώματα. (δεξιά) Μία λίστα επιλεγμένων ιστών που είναι ελαττωματικοί μετά από απαλοιφή του εκάστοτε γονιδίου στα ποντίκια σύμφωνα με το <http://www.knockoutmouse.org>. N/A αντιπροσωπεύει την απαλοιφή γονιδίου που δεν έχει αναφερθεί. (Hollenhorst, McIntosh, and Graves 2011)

Η δεύτερη συντηρημένη περιοχή που βρίσκεται σε ένα υποσύνολο των ETS γονιδίων είναι η “pointed or helix-loop-helix” περιοχή (PNT-HLH). Η περιοχή αυτή των 65-85 αμινοξέων βρίσκεται σε 11 από τα 28 ETS ανθρώπινα γονίδια και είναι υπεύθυνη για πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, και ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό. Ο ομοδιμερισμός επιτρέπει τη συνεργατική πρόσδεση σε επαναλαμβανόμενα στοιχεία DNA και ο ετεροδιμερισμός με μη-EYS πρωτεΐνες προσφέρει έναν συνδυαστικό έλεγχο στην πρόσδεση του DNA, που είναι σημαντικός στην ιστο-ειδική μεταγραφική ρύθμιση. Επιπλέον, οι PNT-HLH περιοχές αρκετών EYS παραγόντων παρέχουν επίσης μία θέση ρύθμισης από εξωκυτάρια σηματοδοτικά μονοπάτια (Cooper, Newman, and Gileadi 2014; Findlay et al. 2013).

### ***Ρύθμιση της δράσης των EYS πρωτεϊνών***

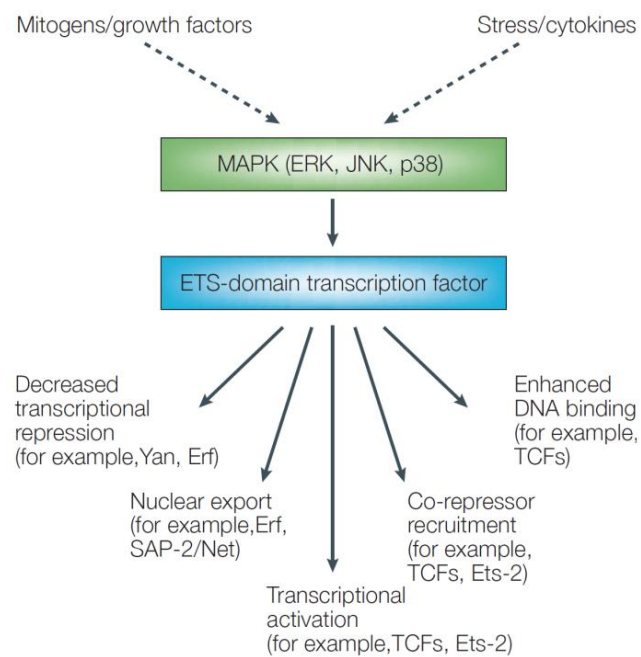
Η EYS λειτουργική ενεργότητα ρυθμίζεται σε πολλαπλά επίπεδα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι EYS παράγοντες εξαρτώνται από την αλληλεπίδρασή τους με άλλους παράγοντες για ακριβή μεταγραφική ρύθμιση. Επιπλέον, ειδικά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις επηρεάζουν άμεσα την ενεργότητα αρκετών EYS πρωτεϊνών ρυθμίζοντας την υποκυτταρική κατανομή τους, την πρόσδεσή τους στο DNA, την δυνατότητα ενεργοποίησης ή καταστολής ή/και τη σταθερότητά τους.

Ένα κοινό χαρακτηριστικό πολλών καρκινικών όγκων είναι η απορύθμιση σημάτων μεταγωγής μονοπατιών, οδηγώντας στη συνεχή και συχνά ανεξάρτητη από προσδέτη (ligand) ενεργοποίηση. Ως τελικοί τελεστές των μονοπατιών αυτών, η λειτουργικότητα των EYS παραγόντων αλλάζει σημαντικά στον καρκίνο. Επιπλέον, όντας καθοδικά από πολλούς RTK (*Receptor Tyrosine Kinase*) υποδοχείς, οι EYS παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση πολλών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των HER2/neu, M-CSF υποδοχέα, MET, c-kit και VEGF υποδοχέα (Sementchenko and Watson 2000).

Η λειτουργικότητα των EYS παραγόντων ρυθμίζεται μέσω φωφορυλίωσης, ακετυλίωσης, σουμouλίωσης, ουμπικουϊτινίωσης και γλυκοζυλίωσης. Μια από τις καλύτερα μελετημένες μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις είναι η φωσφορυλίωση (Εικ.1.3). Η φωσφορυλίωση των ETS πρωτεϊνών επιδρά στην πρόσδεση του DNA, τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, τη μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή και την υποκυτταρική κατανομή. Οι ERK, JNK και p38 MAPK κινάσες είναι τελικά συστατικά σηματοδοτικών καταρρακτών.

Οι ERKs ενεργοποιούνται από μιτογόνα σήματα, ενώ οι JNKs και p38/SAPKs αποκρίνονται σε στρεσογόνα ερεθίσματα (Charlot et al. 2010).



**Εικόνα 1.3:** Η ρύθμιση των ETS μεταγραφικών παραγόντων μέσω της φωσφορυλίωσης. TCFs, ternary complex factors. (Sharrocks 2001)

### ***ETS knockout και μεταλλαγμένα μοντέλα ποντικών***

Μέχρι σήμερα, 23 από τα 27 *Ets* γονίδια του ποντικού έχουν γενετικά τροποποιηθεί (knockouts or mutant). Το μεγάλο φαινοτυπικό εύρος που βρέθηκε σε αυτά τα μοντέλα υποστηρίζει την ποικιλία βιολογικών ρόλων των μελών της ETS οικογένειας (Εικ.1.2). Τα περισσότερα μέλη έχουν συγκεκριμένους φαινοτύπους, με εξαίρεση τα ELF1 (μικρές ανωμαλίες κατά τη νευρική γονιδιακή ενεργοποίηση) και ELK1 (μειωμένη ανάπτυξη και λειτουργία των NK-T κυττάρων), υποδεικνύοντας έτσι μη πλεονάζουσες λειτουργίες για την πλειονότητα των ETS παραγόντων. Σε 11 μέλη της οικογένειας παρατηρήθηκε πλήρης ή σημαντική εμβρυϊκή ή μεταγεννητική θνησιμότητα. Σύμφωνα με τα προφίλ της ιστο-ειδικής τους έκφρασης, η πλειονότητα εμφανίζει φαινοτύπους που υποδεικνύουν τη σημαντικότητά τους στην αιμοποίηση, είτε αποκλειστικά είτε σε συνδυασμό με ανωμαλίες άλλων κυτταρικών γενεαλογιών. Υπάρχει μία πληθώρα φαινοτύπων που εμφανίζονται ακόμη και μέσα στην ίδια υποοικογένεια. Για παράδειγμα, στη SPI1 υποομάδα, οι φαινότυποι ποικίλουν από τον SPI1, τον κύριο ρυθμιστή



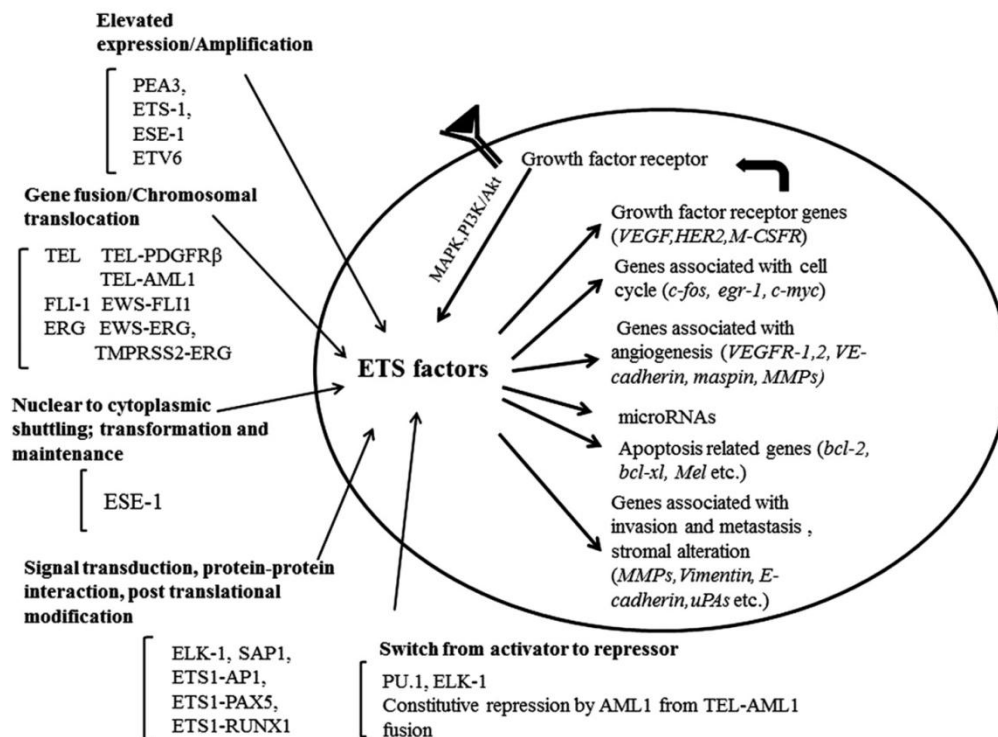
μυελικής λεμφοποίησης, τον SPIB, που ρυθμίζει την κατάλληλη λειτουργία των τελικών διαφοροποιημένων γενεαλογιών και τον SPIC που είναι χρήσιμος για τη λειτουργία ενός υποσυνόλου των μακροφάγων. Οι ETS1 και ELF4 είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης των T-κυττάρων (T, NK, NKT). Τα μέλη FLI1, ETV2 και ETV6 εμφανίζουν λειτουργίες στην αιμοποίηση και/ή την αγγειογένεση. Μη αιμοποιητικές ανωμαλίες παρατηρούνται για τον ETS2 που εμφανίζει φαινότυπους σχετικά με την εξω-εμβρυϊκή ανάπτυξη. Οι ETV1, ETV4 και FEV έχουν ο καθένας προβληματική νευρογένεση, ενώ οι ETV4 και ETV5 επηρεάζουν την ανδρική γονιμότητα. Σε συμφωνία με την περιορισμένη επιθηλιακή τους έκφραση, οι ESE και SPDEF υποοικογένειες (ELF3, EHF, SPDEF) δείχνουν ιστο-ειδικούς φαινοτύπους (πχ έντερο, μαστικός αδένας), αν και σε σημαντικά διαφορετική βαρύτητα (Findlay et al. 2013).

Αυτά τα σταθερά knockout μοντέλα αποκαλύπτουν μόνο τις πρώιμες/περισσότερο συγκεκριμένες λειτουργίες του κάθε μέλους της ETS οικογένειας. Μία καλύτερη κατανόηση των ρόλων και ιεραρχιών των μελών αυτών στην κυτταρική διαφοροποίηση και λειτουργία προσφέρει η δημιουργία απαλειμμένων αλληλίων σε παραπάνω μέλη της οικογένειας, διπλών knockouts, ES κυτταρικής διαφοροποίησης και χιμαιρικών πειραμάτων επιβίωσης, και ιστο-ειδικών επαγόμενων knockouts, για τα οποία δε θα μπορούμε σε λεπτομέρειες στην παρούσα φάση.

### ***ETS μεταγραφικοί παράγοντες και καρκίνος***

Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός καρκινικού κυττάρου είναι ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός, αδυναμία διαφοροποίησης, συνεχής κυτταρική διαίρεση, αυξημένη αγγειογένεση, αδυναμία απόπτωσης, και η ικανότητα μετανάστευσης και διείσδυσης σε άλλους ιστούς και όργανα. Όλες αυτές οι διαδικασίες καθοδηγούνται από παροδικές ή μόνιμες αλλαγές στα προφίλ γονιδιακής έκφρασης που προκαλούνται μέσω ενεργοποίησης ή καταστολής καρκινικά σχετιζόμενων γονιδίων. Είναι επομένως ξεκάθαρο ότι δε μπορεί να υποτιμηθεί ο ρόλος της μεταγραφικής γονιδιακής ρύθμισης στην εξέλιξη του καρκίνου και πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες περιλαμβανομένων και των μελών της ETS οικογένειας έχουν χαρακτηριστεί ως υποψήφια ογκογονίδια ή ογκοκαταστολείς. Η σημαντικότητα των ETS γονιδίων στην

ανθρώπινη καρκινογένεση φαίνεται από παρατηρήσεις ότι κατά την εξέλιξη του καρκίνου ETS γονίδια αποκτούν σημειακές μεταλλάξεις (SPI1, ETS1), γενωμικό πολλαπλασιασμό (ETS1, ETS2, ERG), αυξημένη (ETS1, ETS2, ERG) ή μειωμένη (SPDEF, EHF) έκφραση, ή αναδιατάξεις (ETV6, FLI1, ERG), οδηγώντας σε τροποποιημένη ETS γονιδιακή έκφραση η οποία διαταράσσει τον ρυθμιζόμενο έλεγχο πολλών σύνθετων βιολογικών διαδικασιών, που εξαρτώνται από τα αποκρινόμενα γονίδια στόχους (Εικ.1.4) (Seth and Watson 2005). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι τα ETS γονίδια ρυθμίζουν πάνω από 700 γονίδια στόχους, μεταξύ αυτών αρκετά με σημαντικό ρόλο σε κακοήθειες και μεταστατικές διαδικασίες, όπως γονίδια που λειτουργούν στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (πχ cyclins και cdk), κινητικότητας (hepatocyte growth factor, HGF), διεισδυτικότητας (uPA & uPAR, PAI, MMPs; TIMPs), πρόσθετης αγγείωσης (MMPs, Integrins), μικρομετάστασης (Osteopontin; BSP και Osteonectin), και δημιουργίας και διατήρησης μετάστασης και αγγειογένεσης σε απομακρυσμένα σημεία (Neovascularization and Neoangiogenesis (integrin  $\beta$ 3, VEGF, Flt-1/KDR, Tie2)) (Sementchenko and Watson 2000).



**Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των ETS πρωτεϊνών στη βιολογία του καρκίνου.** Η απορύθμιση των ETS μεταγραφικών παραγόντων, μέσω πολλαπλασιασμού/υπερέκφρασης, γονιδιακής σύντηξης, μεταγωγής σήματος και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, οδηγεί σε αλλαγές γονιδιακής έκφρασης των ETS στόχων. Αυτές οι αλλαγές προκαλούν διαδικασίες, που είναι χαρακτηριστικές του καρκίνου, όπως πολλαπλασιασμό, διείσδυση, μετάσταση και αγγειογένεση. (Kar and Gutierrez-Hartmann 2013)

Τροποποιημένα επίπεδα ETS γονιδιακής έκφρασης συσχετίζονται με τη δημιουργία όγκου σε ανθρώπινες νεοπλασίες, περιλαμβανομένων καρκινωμάτων θυροειδούς, παγκρέατος, συκωτιού, εντέρου, πνεύμονα και μαστού, καθώς και λευχαιμιών. Επιπλέον, στον καρκίνο του μαστού, η αύξηση των επιπέδων διαφόρων ETS παραγόντων, όπως του ETS1, ETS2, ETV4, ETV5, και ETV1, σχετίζεται με κακή πρόγνωση και με μετάσταση. Αντιθέτως, άλλοι ETS παράγοντες, όπως ο SPDEF, ELF5, και EHF είναι μειωμένοι κατά την πρόοδο του καρκίνου του μαστού. Επίσης, ο ETS1 ρυθμίζει μεταξύ άλλων και γονίδια που αποκρίνονται σε ανδρογόνα, συνεισφέροντας έτσι και στη δημιουργία του καρκίνου του προστάτη (Seth and Watson 2005; D. K. Watson et al. 2010).

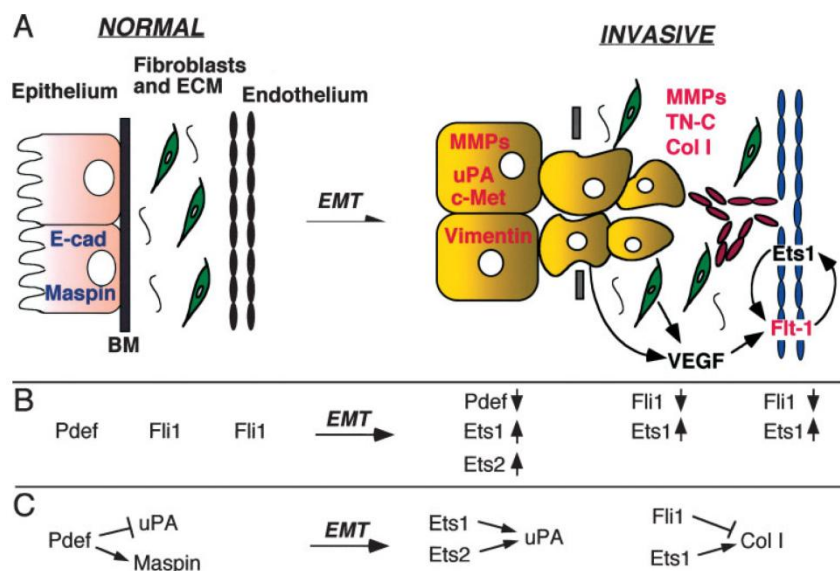
Ο καρκίνος περιλαμβάνει πολλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, με τις περισσότερο μελετημένες να είναι οι μη τυχαίες χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, που οδηγούν στη δημιουργία ανασυνδιασμένων χρωμοσωμάτων. Στο σάρκωμα Ewing παρατηρείται η σύντηξη της μονάδας ενεργοποίησης (AD) του γονιδίου EWS με την ETS DNA-δεσμευόμενη περιοχή (EBD) των FLI1, ETV1, ETV4, ERG ή FEV, ενεργοποιώντας έντονα τη μεταγραφή των ETS γονιδίων στόχων (Jankecht 2005). Πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου *ETV1* σχετίζονται με μελάνωμα ενώ είτε η PNT είτε η ETS περιοχή ή και οι δύο περιοχές μαζί του *ETV6* έχουν βρεθεί σε πάνω από 20 διαφορετικές μετατοπίσεις που παρατηρήθηκαν σε ανθρώπινες λευχαιμίες και σπανιότερα σε συμπαγείς όγκους (Mavrothalassitis and Ghysdael 2000). Ο ERG υπερεκφράζεται σε πάνω από το 60% των καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε σχέση με καλοήθεις ιστούς. Ο μοριακός μηχανισμός στον οποίο οφείλεται αυτή η υπερέκφραση του ERG είναι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις που οδηγούν στη σύντηξη του *ERG* με το ρυθμιζόμενο από ανδρογόνα, προστατο-ειδικό γονίδιο *TMPRSS2*. Η σύντηξη αυτή μεταξύ *TMPRSS2*-*ERG* συμβαίνει στο 40-80% των καρκίνων του προστάτη (Shah and Chinnaiyan 2009). Σε καρκίνους του προστάτη, αλλά σε μικρότερο βαθμό, έχουν βρεθεί επίσης και συντήξεις του *TMPRSS2* γονιδίου και με άλλους ETS μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο *ETV1*, *ETV4* ή *ETV5*.

Μελέτες λειτουργικότητας καταδεικνύουν τις επιπτώσεις της τροποποιημένης έκφρασης στη ρύθμιση γονιδίων που σχετίζονται με πολλαπλασιασμό, μετασχηματισμό, μετανάστευση, διείσδυση, αντι-

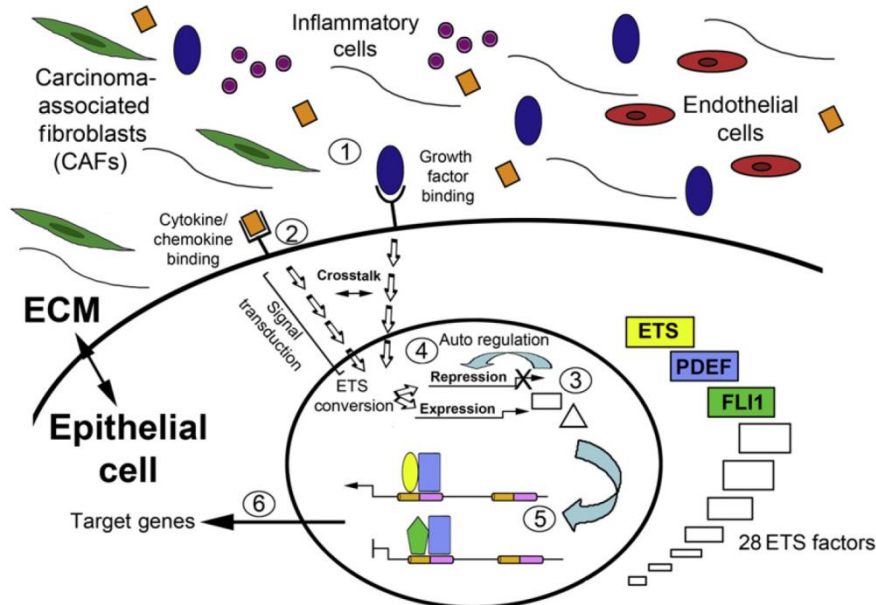
απόπτωση, και αγγειογένεση και περιλαμβάνουν, αλλά όχι αποκλειστικά, το Her2/neu, uPA, MMPs, TIMPs, MET, Bcl2, maspin, και VEGFR (Εικ.1.4) (Sementchenko and Watson 2000; Seth and Watson 2005). Οι μεταβολές στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου είναι ένα κρίσιμο βήμα στην καρκινογένεση. Έτσι, βρέθηκε ότι η ρύθμιση της έκφρασης του p21 από τον SPDEF σχετίζεται με αναστολή της ανάπτυξης *in vitro* και *in vivo*. Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η κινάση PAK1 (p21-activated kinase) ρυθμίζει την ενεργότητα του ELF3 μέσω φωσφορυλίωσης και αυξημένα επίπεδά της σχετίζονται με περισσότερο επιθετικό καρκίνο του μαστού (Salh et al. 2002). Η μετανάστευση και η διείσδυση, σημαντικά στάδια της μεταστατικής διαδικασίας, απαιτούν μεταβολές στην προσκόλληση τόσο μεταξύ κυττάρων όσο και μεταξύ κυττάρου και ECM (Extra-Cellular Matrix). Η μετανάστευση και η διείσδυση σχετίζονται συχνά με EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) και μειωμένα επίπεδα της E-cadherin. Η διείσδυση διαμεσολαβείται εν μέρει από πρωτεολυτική αποδόμηση του ECM από MMPs και uPA. Πράγματι, ενεργοποίηση του uPA συστήματος σχετίζεται με κακή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού. Γενικότερα, οι ETS παράγοντες είναι σημαντικοί ρυθμιστές του EMT, της έκφρασης πρωτεασών, και του ECM. Για παράδειγμα, μελέτες σε καρκινικά κύτταρα μαστού, προστάτη, εντέρου, ή ωοθηκών έδειξαν τις αντι-μεταναστευτικές και αντι-διεισδυτικές ιδιότητες του SPDEF, μέσω αρνητικής ρύθμισης του EMT ρυθμιστή SLUG και μεσεγχυματικών γονιδίων, πρωτεασών (uPA, MMPs).

Μέχρι σήμερα, η έρευνα για τους ETS παράγοντες εστίαζε κυρίως στους μοριακούς μηχανισμούς και λειτουργίες του κάθε παράγοντα ξεχωριστά τόσο στα κανονικά όσο και στα καρκινικά κύτταρα. Σε πολλά κύτταρα, διάφοροι ETS παράγοντες με παρόμοιες ή αντίθετες δράσεις συνυπάρχουν ταυτόχρονα και η κυτταρική μοίρα μπορεί να εξαρτάται τελικά από την ισορροπία μεταξύ των ενεργειών συγκεκριμένων ETS παραγόντων. Η απορρύθμιση ενός ETS παράγοντα διαταράσσει την κανονική κυτταρική ομοίωση, αυξάνοντας την καρκινική ανάπτυξη, διείσδυση, και μετανάστευση. Ενώ κάποιοι ETS παράγοντες εξαφανίζονται κατά την καρκινογένεση, άλλοι εμφανίζουν αυξημένη έκφραση (ογκοκατασταλτικοί και ογκογόνοι ETS παράγοντες). Υποθέτουμε ότι η ισορροπία μεταξύ ογκοκατασταλτικών και ογκογόνων ETS παραγόντων θα μπορούσε να είναι

ένας δείκτης για επιθετικό καρκίνο. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δείχνουν ότι διάφοροι ETS παράγοντες δρουν συντονισμένα ρυθμίζοντας θετικά ή αρνητικά τα μονοπάτια που ελέγχουν την πρόοδο του μεταστατικού καρκίνου. Αυτό υποδεικνύει έναν πιθανό μηχανισμό “ETS μεταστροφής” γονιδιακής ρύθμισης παρέχοντας στο κύτταρο έναν ενσωματωμένο μηχανισμό μέσω του οποίου αποκρίνεται αποτελεσματικά σε μία ποικιλία ενδο- και εξω-κυττάρων σημάτων (Hsu, Trojanowska, and Watson 2004; Turner et al. 2007). Διάφοροι ETS παράγοντες απορυθμίζονται κατά την ανάπτυξη καρκίνων του μαστού. Κατά την καρκινογένεση, η έκφραση κάποιων ETS παραγόντων (πχ ETS1, ETS2, ETV4, ETV5, ELF3) συχνά αυξάνεται, ενώ η έκφραση άλλων (SPDEF, EHF) μειώνεται ή εξαφανίζεται τελείως. Σύμφωνα με το μοντέλο της ETS μεταστροφής, για την καρκινική πρόοδο απαιτείται η αλλαγή στο πρότυπο έκφρασης από αυτό που παρατηρείται σε κανονικούς καλοήθεις ιστούς, σε αυτό που παρατηρείται στο διεισδυτικό καρκίνο. Ένα χαρακτηριστικό αντιπροσωπευτικό παράδειγμα μοντέλου “ETS μεταστροφής” είναι αυτό που συμβαίνει κατά την EMT επαγωγή και επακόλουθη διείσδυση και μετανάστευση και απεικονίζεται λεπτομερώς στην Εικόνα 1.5.



**Εικόνα 1.5: ETS μεταστροφή κατά το EMT.** Εδώ χρησιμοποιούνται ορισμένα παραδείγματα ETS παραγόντων και γονιδίων στόχων. **A:** Με μπλε σημειώνονται οι ETS στόχοι που εκφράζονται αρκετά στο κανονικό επιθήλιο, όπου καταστέλλονται στα διεισδυτικά καρκινικά κύτταρα. Με κόκκινο σημειώνονται οι ETS στόχοι που επάγονται κατά τη φάση διείσδυσης. Η VEGF σηματοδότηση, προερχόμενη από τα καρκινικά κύτταρα αλλά και από τους ινοβλάστες, παρέχεται σαν παράδειγμα αλληλεπίδρασης όγκου-στρώματος και βρόχου ρυθμιστικής ανάδρασης που διαμεσολαβείται από τους ETS. **B:** Παραδείγματα διαφόρων ETS παραγόντων που συμμετέχουν στην ETS μεταστροφή κατά το EMT και τον διεισδυτικό καρκίνο σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. **C:** Παραδείγματα ETS γονιδίων στόχων κατά την ETS μεταστροφή σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα. BM, basement membrane; Col I, collagen I; E-cad, E-cadherin; ECM, extracellular matrix; EMT, epithelial–mesenchymal transition; MMP, matrix metalloproteinase; TN-C, tenascin C; uPA, urokinase-like plasminogen activator. (Hsu, Trojanowska, and Watson 2004)



**Εικόνα 1.6:** Υποθετικό μοντέλο του ETS ρυθμιστικού δικτύου στον καρκίνο. Περισσότερες λεπτομέρειες στο κείμενο. (Findlay et al. 2013)

Στο σύνολό τους, αυτά τα στοιχεία δείχνουν σαφώς την ύπαρξη διακριτών ρυθμιστικών δικτύων ETS έκφρασης, τα οποία δρουν συντονισμένα ρυθμίζοντας θετικά ή αρνητικά γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο. Κάθε ETS δίκτυο θα μπορούσε να οδηγήσει σε διακριτά πρότυπα έκφρασης γονιδίων στόχων, η αποσαφήνιση των οποίων μπορεί να ταυτοποιήσει προ-μεταστατικές και αντι-μεταστατικές “υπογραφές” γονιδιακής ρύθμισης που μπορεί να προβλέψει την επιθετικότητα των καρκινικών κυττάρων. Το ETS ρυθμιστικό δίκτυο αποτελείται από τους ETS παράγοντες καθαυτούς, τους ανοδικούς ρυθμιστές, τις συνρρυθμιστικές πρωτεΐνες τους, και τα γονίδια στόχους τους (Εικ.1.6) (Findlay et al. 2013). Κύτταρα του ανοσοποιητικού στρατολογούνται από όγκους μέσω έκκρισης χημειοκινών, κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων (Εικ.1.6-1). Σε απόκριση, τα παρευρισκόμενα κύτταρα ανοσοποιητικού και άλλα κύτταρα του μικροπεριβάλλοντος (πχ ινοβλάστες) προωθούν τον καρκινικό πολλαπλασιασμό και πρόοδο μέσω επιπρόσθετης έκκρισης βιολογικά ενεργών μορίων. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω πρόσδεσης ενός “ligand” στην κυτταρική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Εικ.1.6-2). Τα ενεργοποιημένα σήματα-καταρράκτες οδηγούν άμεσα ή έμμεσα στην έκφραση και αναστολή ποικίλων συνδυασμών των 28 μελών της ETS οικογένειας (Εικ.1.6-3). Οι ETS παράγοντες μπορούν να ρυθμίσουν τη δική τους έκφραση αλλά και την έκφραση άλλων μελών της οικογένειας (Εικ.1.6-4).

Η σύσταση των ETS παραγόντων καθορίζει τη μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων στόχων τους, πολλά από τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην καρκινογένεση (Εικ.1.6-5). Η τροποποιημένη έκφραση αυτών των γονιδίων έχει προφανείς επιπτώσεις σε πολλά μονοπάτια που σχετίζονται με τον καρκίνο (Εικ.1.6-6).

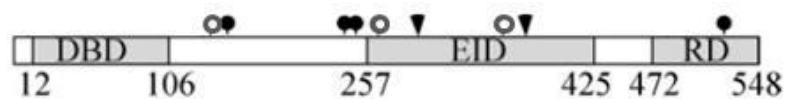
Οι μεταγραφικοί παράγοντες έχουν άμεσο ρόλο στο καρκινικό μετασχηματισμό και τη μετάσταση, και η τροποποίηση ή η αναστολή τους έχει γίνει εδώ και αρκετό καιρό πρωταρχικός στόχος της μεταφραστικής έρευνας του καρκίνου (Darnell 2002). Όπως περιγράφηκε παραπάνω, οι υπερεκφρασμένοι ETS παράγοντες είναι κυρίαρχοι παίκτες στην ανάπτυξη του καρκίνου και μπορούν να οδηγήσουν σε επιθετική ασθένεια. Έτσι, οι ETS παράγοντες έχουν ταυτοποιηθεί ως σημαντικοί στόχοι για την ανάπτυξη φαρμάκων και υπάρχουν διαθέσιμες διάφορες στρατηγικές για τη φαρμακευτική τους στόχευση, που αφορούν την άμεση αναστολή του υποκινητή των ογκογόνων ETS παραγόντων μέσω ανταγωνισμού πρόσδεσης σε αυτούς, την άμεση στόχευση του mRNA για την αναστολή έκφρασης, την άμεση στόχευση των ETS πρωτεϊνών για αναστολή λειτουργικότητας, ή την έμμεση αναστολή των υποκινητών που αποτελούν στόχους των ETS παραγόντων για παρεμπόδιση της ETS μεταγραφικής ρύθμισης (Εικ.1.7) (Yan and Higgins 2013).

Approach	Mode of action	Method	Molecular target
ETS promoter occupancy	Competition for binding to promoters	Decoy oligonucleotides Triplex-forming oligonucleotides	ETS1, ETS2
ETS mRNA	Prevention of expression	Antisense oligonucleotides, RNA interference	Multiple ETS factors, EWS-FLI1
ETS protein	Functional inhibition	Small-molecule inhibitor	ESE1-SER2, ETS fusions, ERG
ETS responsive promoters	Prevention of ETS transcriptional regulation	Triplex-forming oligonucleotides, dominant negative	TIE1, FGF2

**Εικόνα 1.7:** Προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται για τη διερεύνηση των πολύπλευρων πτυχών της βιολογίας των ETS παραγόντων, προκειμένου να αξιολογηθεί η δυνατότητα θεραπευτικής στόχευσης των πρωτεϊνών αυτών. (Findlay et al. 2013)

## Ο ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΑΣ ERF (ETS-2 REPRESSOR FACTOR)

Ο μεταγραφικός παράγοντας ERF αποτελεί μέλος της ETS οικογένειας με ισχυρή κατασταλτική δράση. Στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DBD), το κεντρικό τμήμα της είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδραση με την ERK κινάση (EID), ενώ στο καρβόξυ-τελικό άκρο βρίσκεται η περιοχή μεταγραφικής καταστολής (RD) (Εικ.1.8). Ο ERF δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με άλλες ETS πρωτεΐνες (πέρα από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA), εκτός από τον PE1/METS όπου μαζί συνιστούν την ERF υποοικογένεια (Εικ.1.1). Η περιοχή καταστολής του ERF δρα με αυτόνομο τρόπο, αφού έχει δειχθεί ότι μπορεί να μεταφέρει τη δράση της όταν συντηχθεί με περιοχές πρόσδεσης στο DNA γνωστών μεταγραφικών ενεργοποιητών, όπως ο ETS1, ο NFκB και ο GAL4. Επιπλέον, η μεταγραφική του δράση εξαρτάται από την πρόσδεση στο DNA, αφού κολοβές πρωτεΐνες στο αμινο-τελικό άκρο δεν μπορούν να καταστείλουν τη μεταγραφή, ενώ μεταλλαγμένες θέσεις πρόσδεσης στο DNA, επίσης καταργούν τη δράση του ERF (Sgouras et al. 1995).



**Εικόνα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση της πρωτεϊνικής δομής του ERF μεταγραφικού παράγοντα. Με κύκλο απεικονίζονται τα σημεία φωσφορυλίωσης και συγκεκριμένα με μαύρο τα *in vivo* σημεία και με μαύρο τρίγωνο τα δύο FxY μοτίβα με τα οποία αλληλεπιδρά με την ERK. Τα νούμερα αντιπροσωπεύουν τα κατάλοιπα εκείνα που βρίσκονται στα όρια των εκάστοτε περιοχών. DBD, ETS DNA-binding domain; EID, ERK interaction domain; RD, repression domain. (Polychronopoulos et al. 2006)

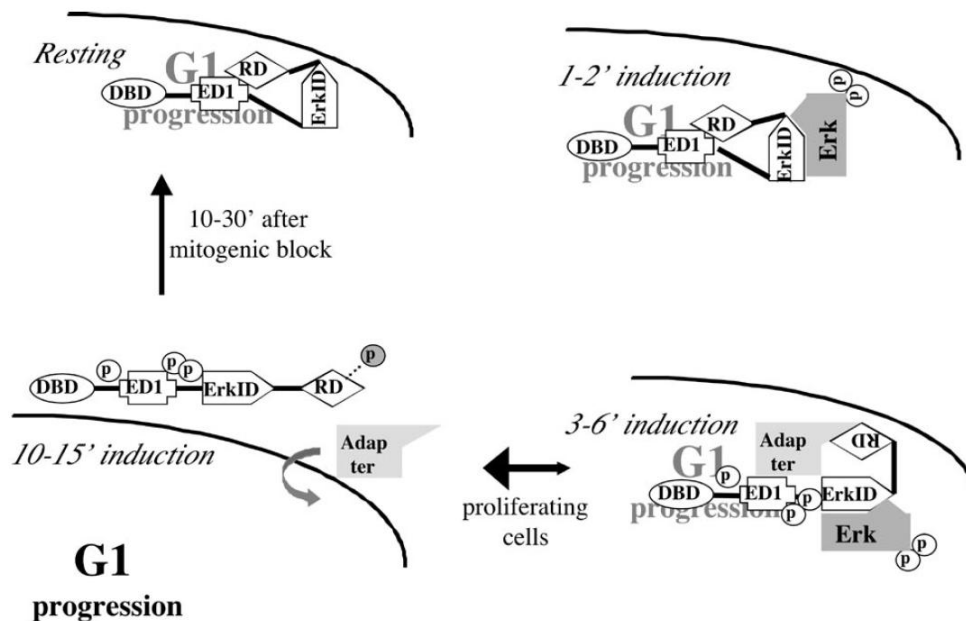
Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί το ανθρώπινο και το ποντικίσιο γονίδιο του ERF τα οποία παρουσιάζουν πολλή μεγάλη ομολογία τόσο στην κωδική τους αλληλουχία (90%), όσο και σε πρωτεϊνικό (98%) επίπεδο. Το ίδιο μεγάλη ομολογία (91%) παρουσιάζουν και οι υποκινητές των δύο γονιδίων, οι οποίοι περιέχουν δυνητικές θέσεις πρόσδεσης για διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ETS, SP1 και CREB/ATF. Το γονίδιο και στα δύο είδη οργανώνεται σε τέσσερα εξόνια και στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 19q13.1, ενώ στον ποντικό στη συνταϊνιακή θέση κοντά στο κεντρομερίδιο του χρωμοσώματος 7. Και τα δύο χρωμοσώματα συνδέονται με χρωμοσωμικές μετατοπίσεις και τρισωμίες που οδηγούν σε κακοήθειες του αιμοποιητικού ιστού καθώς και σε συμπαγείς όγκους όπως του μαστού και



των πνευμόνων, οπότε είναι πιθανόν και ο ERF να συνδέεται με αυτές τις κακοήθειες (D. Liu et al. 1997).

Το 2.8 kb mRNA του *Erf* κωδικοποιεί μία φωσφοπρωτεΐνη 80 kDa με χρόνο ημίσειας ζωής άνω των 24 ωρών, η οποία εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε ένα μεγάλο εύρος ιστών του ενήλικου ποντικού που έχουν εξεταστεί, όπως νεφρά, εγκέφαλος, καρδιά, πνεύμονες, λεμφαδένες, ωθήκη και όρχεις καθώς και σε διάφορες κυτταρικές σειρές (D. Liu et al. 1997). Ακόμη, κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, ο ERF εκφράζεται σε πρώιμα βλαστικά εξωεμβρυικά και εξωπλακουντικά κύτταρα, καθώς και σε τροφοβλαστικά αρχέγονα κύτταρα, και σε συνδυασμό με την απουσία του από τα διαφοροποιημένα κύτταρα (πχ συγκυτιοτροφοβλάστες) συνιστά ένα σημαντικό ρόλο στη ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων αυτών και τη δημιουργία ενός λειτουργικού πλακούντα (Paradaki et al. 2007).

Ο ERF εκφράζεται συνεχώς στα ίδια επίπεδα, σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η δράση του ρυθμίζεται από μιτογόνα ερεθίσματα και το στάδιο του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης του Ras/Erk μονοπατιού. Ενεργοποίηση του εν λόγω μονοπατιού από μιτογόνα, οδηγεί στη φωσφορυλίωση του ERF από την ERK κινάση (Sgouras et al. 1995). Έχει δειχθεί ότι ο ERF αλληλεπιδρά άμεσα με την ERK τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, ενώ δεν προσδένεται στις συγγενείς κινάσες JNK και p38. Η αλληλεπίδραση αυτή διαμεσολαβείται από μία μικρή περιοχή 22 αμινοξέων του ERF στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης, μέσω δύο μοτίβων FXF, χαρακτηριστικά των ERK υποστρωμάτων, στις θέσεις 303-305 και 375-377 (Εικ.1.8). Τα δύο αυτά μοτίβα δείχνουν διαφορετική προτίμηση για την πρόσδεση με την ενεργό ή την ανενεργό ERK κινάση. Συγκεκριμένα, η ενεργός ERK, αλληλεπιδρά με τον ERF περίπου 5 φορές ισχυρότερα σε σχέση με την ανενεργό μορφή της (Polychronopoulos et al. 2006). Επίσης, η παραπάνω αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση του ERF στον πυρήνα του κυττάρου και το συνεπακόλουθο εντοπισμό του στο κυτταρόπλασμα (Εικ.1.9). Εκεί βρίσκεται ανενεργός. Αντίθετα, κάτω από συνθήκες έλλειψης αυξητικών παραγόντων, ο ERF οδηγείται ταχύτατα στον πυρήνα και απόφωσφωρυλιώνεται. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση των γονιδίων-στόχων του, οπότε βρίσκεται στην ενεργοποιημένη του μορφή. Επιπλέον, το πρότυπο φωσφορυλίωσης του ERF



Εικόνα 1.9: Ένα μοντέλο ρύθμισης, λειτουργίας και υποκυτταρικού εντοπισμού του ERF κατά τη διάρκεια ενός ERK μιτογόνου ερεθίσματος. DBD, ets DNA binding domain; ED1, export domain 1; ErkID, Erk interaction domain; RD, repressor domain (also contains part of export domain 2). (Lionel Le Gallic et al. 2004)

διαφοροποιείται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση G<sub>0</sub>, ο ERF είναι αποφωσφορυλιωμένος, ενώ κατά την πρόοδο της G<sub>1</sub> φάσης και την μετάβαση στην S φάση, παρατηρείται έντονη φωσφορυλίωση, η οποία γίνεται εντονότερη κατά τη διάρκεια της G<sub>2</sub> φάσης πριν την είσοδο στη μίτωση. Έχει προταθεί ότι ο ERF περιέχει επτά δυνητικές θέσεις φωσφορυλίωσης από την ERK κινάση, από τις οποίες πέντε φωσφορυλιώνονται *in vivo* στις θέσεις S161, S246, S251, S284 και T526 (Εικ.1.8) (L Le Gallic et al. 1999; Sgouras et al. 1995). Μεταλλαγμένη μορφή του ERF (M1-7), στην οποία και οι επτά θέσεις φωσφορυλίωσης έχουν μεταλλαχθεί σε αλανίνη, καθιστά την πρωτεΐνη μονίμως πυρηνική. Ο ERF, όπως και τα υπόλοιπα μέλη της ETS οικογένειας, έχει πυρηνικό σήμα εντοπισμού (NLS) μέσα στο ETS domain, ενώ αντίθετα δεν έχει πυρηνικό σήμα εξόδου (NES) και η έξοδος του παρεμποδίζεται από τη Leptomycin B (LMB), προτείνοντας έτσι ένα CRM1-εξαρτώμενο μηχανισμό εξόδου από τον πυρήνα (Lionel Le Gallic et al. 2004).

Χρησιμοποιώντας το μονίμως πυρηνικό μετάλλαγμα του ERF (M1-7), κατέστη δυνατό να αντληθούν πληροφορίες για τη φυσιολογική λειτουργία του. Έτσι, έχει δειχθεί ότι η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης M1-7 σε ινοβλάστες προκαλεί την αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη φάση G<sub>1</sub>. Η

αναστολή αυτή εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb), αφού κύτταρα με έλλειψή της δεν επηρεάζονται από τον ERF. Στο ίδιο αποτέλεσμα οδηγεί και η υπερέκφραση των κυκλινών D1 και E, υποστηρίζοντας την εμπλοκή του ERF στην πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Επιπλέον δεδομένα υποδεικνύουν ένα ογκοκατασταλτικό ρόλο για τον ERF. Πρώτον, η ERF M1-7 πρωτεΐνη αναστρέφει το Ras-επαγώμενο μετασχηματισμό των ινοβλαστών ποντικού, ενώ η αγρίου τύπου πρωτεΐνη αναστρέφει τον gag-myb-ets μετασχηματισμό (L Le Gallic et al. 1999; Sgouras et al. 1995). Δεύτερον, σύντηξη της ρυθμιστικής και κατασταλτικής περιοχής του ERF στην DNA-δεσμευόμενη περιοχή του FLI1 προκαλεί αναστολή του σαρκώματος Ewing, που προκαλείται από τη σύντηξη του FLI1 με το EWS και επακόλουθη συνεχή έκφραση των γονιδίων-στόχων του FLI1 σε αθυμικά ποντίκια (M Athanasiou et al. 2000). Αναστολή του κυτταρικού κύκλου και αντιστροφή του Ras μετασχηματισμού προκαλείται επίσης και από την ελαττωματική, ως προς τη δέσμευση με την ERK, πρωτεΐνη του ERF, ενισχύοντας ακόμα περισσότερο την άποψη ότι ο ERF αποτελεί στόχο του Ras/Erk μονοπατιού (Polychronopoulos et al. 2006). Τέλος, βρέθηκε ακόμη ότι ο ERF, σε συνεργασία με τον EGR1 (early growth response-1) και μετά από ερέθισμα με EGF (epidermal growth factor), επηρεάζει την κυτταρική κινητικότητα και μετανάστευση σε ανθρώπινα κύτταρα μαστού, μια διαδικασία χαρακτηριστική της επιθηλιομεσεγγυματικής μετάβασης (EMT) και της μετάστασης κατά τον καρκίνο (Ben-Chetrit, Tarcic, and Yarden 2013; Tarcic et al. 2012).

Ο ERF φαίνεται να έχει ακόμα συμμετοχή στην κυτταρική διαφοροποίηση. Η *in vitro* διαφοροποίηση ερυθροκυττάρων ενισχύεται από την υπερέκφραση του αγρίου τύπου ERF και της ειδικής αναστολής της ERK, ή από την υπερέκφραση του μόνιμως πυρηνικού μεταλλάγματος M1-7 (Meropi Athanasiou, Blair, and Mavrothalassitis 2003). Επιπρόσθετα, στο βάτραχο βρέθηκε ότι ο ERF και ο ETV3L προάγουν την RA (Retinoic acid) -επαγόμενη νευρική διαφοροποίηση, αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των νευρικών προγονικών κυττάρων (Janesick et al. 2013). Περισσότερα στοιχεία για το βιολογικό ρόλο του ERF *in vivo* προκύπτουν από τη δημιουργία ποντικών με έλλειψη της πρωτεΐνης. Η διακοπή της λειτουργίας του ERF οδηγεί τα ποντίκια σε θάνατο κατά το στάδιο 10.5 dpc, εξαιτίας σοβαρών

προβλημάτων στην ανάπτυξη του πλακούντα, γεγονός που συμφωνεί με το πρότυπο έκφρασης της πρωτεΐνης, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Στους πλακούντες των *Erf*<sup>-/-</sup> εμβρύων παρατηρείται μία συμπαγής χοριακή στοιβάδα, αγενεσία του λαβυρίνθου λόγω αδυναμίας χοριο-αλλαντοειδικής σύντηξης, μία εκτεταμένη στοιβάδα γιγαντιαίων κυττάρων και μία μικρότερη σπογγώδης στοιβάδα. Επίσης, παρατηρείται απουσία των μεταμιτωτικών κυττάρων του χορίου και των συγκυτιοκυττάρων που αποτελούν τα τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα του λαβυρίνθου. Αντίθετα, υπάρχει αυξημένη έκφραση γονιδίων-δεικτών των αρχέγονων τροφοβλαστικών κυττάρων που παραμένουν αδιαφοροποίητα. Επομένως, ο ERF φαίνεται ότι συμμετέχει στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων και την ανάπτυξη συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων που οδηγούν στην πλακουντογένεση. Επιπρόσθετα, η έλλειψη του ERF προκαλεί ατελή αγγειογένεση στο λεκιθικό σάκο. Ωστόσο, δεν είναι ξεκάθαρο αν ο παραπάνω φαινότυπος προκύπτει δευτερογενώς, λόγω ελλιπούς ανταλλαγής τροφικών στοιχείων του εμβρύου με τη μητέρα, ή αποτελεί πρωτογενή δράση του ERF στην αγγειογένεση (Paradaki et al. 2007). Προκειμένου να γίνουν γνωστές περισσότερες παράμετροι σχετικά με τη λειτουργία του ERF κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, δημιουργήθηκαν ποντίκια με επαγόμενη, ιστο-ειδική έλλειψη της πρωτεΐνης και βρέθηκε ότι η μειωμένη έκφραση του ERF (~30% των κανονικών επιπέδων) προκαλεί μεταγεννητική σύνθετη κρανιοσυστοστέωση και ελαφρώς καθυστερημένη εμβρυϊκή κρανιακή ανάπτυξη (Twigg et al. 2013). Στη μελέτη αυτή δείχθηκε επίσης ότι η ίδια ασθένεια προκαλείται και στον άνθρωπο με προτεινόμενο μηχανισμό παθογένειας την ετερόζυγη απαλοιφή γονιδίου (απλοανεπάρκεια). Το σύνδρομο αυτό χαρακτηρίζεται από πρόωρη σύντηξη των κρανιακών ραφών με κύρια επακόλουθα χαρακτηριστικά δυσμορφία κρανίου και προσώπου, δυσπλασία Chiari και προβλήματα ομιλίας. Επιπλέον, μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) σε ποντικίσσιους πρωτογενείς εμβρυϊκούς ινοβλάστες (MEFs) και συνεπακόλουθη αλληλούχιση (ChIP-seq) βρέθηκε ότι ο ERF προσδένεται κατά προτίμηση σε στοιχεία του DNA μακριά από υποκινητές που περιέχουν RUNX ή AP-1 μοτίβα πρόσδεσης. Ακόμη, μετα-ανάλυση των ChIP-seq στόχων ταυτοποίησε την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT) ως τη διαδικασία με την υψηλότερη συσχέτιση. Η μελέτη αυτή καθιστά τον ERF ως

νέο ρυθμιστή της οστεογένεσης μέσω Ras/Erk σηματοδότησης, πιθανώς ανταγωνιζόμενος με άλλους ETS ενεργοποιητικούς παράγοντες σε σύνθετα μεταγραφικά σύμπλοκα.

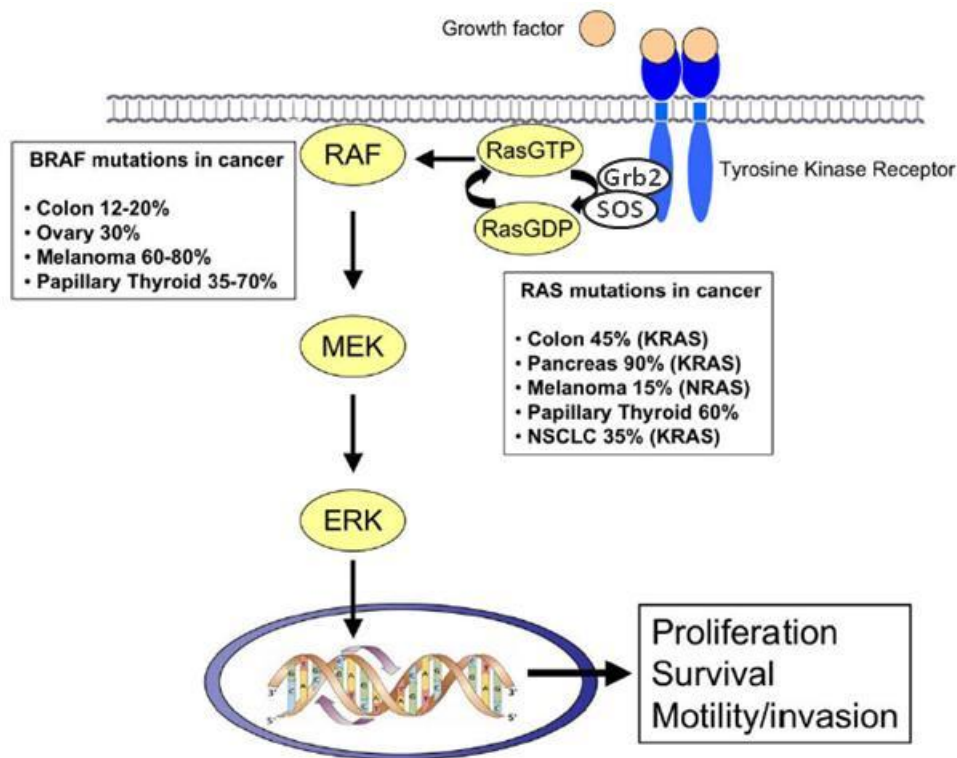
Ενώ η ρύθμιση και η φυσιολογική λειτουργία του ERF έχουν αρχίσει να διαλευκάνονται, ελλιπής είναι η γνώση σχετικά με τα γονίδια-στόχους του και το μοριακό μηχανισμό δράσης του. Έχει αναφερθεί ότι ο ERF καταστέλλει *in vitro* τον υποκινητή του γονιδίου της προλακτίνης σε απόκριση στην ντοπαμίνη, όταν και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων της υπόφυσης (Day et al. 1998; J. C. Liu et al. 2002). Στις παραπάνω μελέτες προτείνεται ότι ο ERF εμποδίζει την πρόσδεση του PIT-1 ενεργοποιητή στον υποκινητή της προλακτίνης, χωρίς να υπάρχουν ενδείξεις για ένα ενεργό μηχανισμό μεταγραφικής καταστολής. Έχει, επίσης, αναφερθεί ότι ο ERF καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου MIEP (Major immediate-early promoter) του κυτταρομεγαλοϊού σε κύτταρα που ο ιός βρίσκεται σε λανθάνουσα κατάσταση. Παρόλο που και σε αυτή την περίπτωση οι μελέτες στηρίζονται σε *in vitro* ευρήματα, προτείνεται ότι ο ενδογενής ERF αλληλεπιδρά με την απακετυλάση των ιστονών HDAC1 με αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου (Bain, Mendelson, and Sinclair 2003; Wright et al. 2005). Ωστόσο, και στις δύο περιπτώσεις δεν έχει δειχθεί φυσική αλληλεπίδραση του ενδογενούς ERF με τους υποκινητές των γονιδίων, αφήνοντας ακόμα ανοικτό το ερώτημα της ταυτοποίησης άμεσων στόχων του. Ο πρώτος άμεσος στόχος του ERF αποκαλύφθηκε το 2007 και ήταν το γονίδιο *c-Myc* (Verykokakis et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε ότι οι παραπάνω γνωστές λειτουργίες του ERF (αναστολή κυτταρικού κύκλου και Ras μετασχηματισμού) διαμεσολαβούνται μέσω της αναστολής του *c-Myc*. Η αναστολή αυτή είναι εξαρτώμενη από την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (EBD) και την περιοχή καταστολής (RD), καθώς απαιτούνται και οι δυο αυτές περιοχές προκειμένου να πραγματοποιηθεί. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) έδειξαν ότι ο ERF προσδένεται ειδικά στον υποκινητή του *c-Myc* με έναν E2F4/5- και Rb-εξαρτώμενο τρόπο. Η υπερέκφραση του πυρηνικού ERF σε μαστικά επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος (MCF7) έδειξε μειωμένη έκφραση του *c-Myc* mRNA και ογκογονικότητα, προτείνοντας έτσι το μηχανισμό του ήδη γνωστού ογκοκατασταλτικού ρόλου του ERF. Επιπλέον, στους πλακούντες των *Erf*<sup>-/-</sup> εμβρύων, που αναφέρθηκε παραπάνω, υπήρχε

αυξημένη έκφραση του *c-Myc* ενώ σε *Erf-/-* πρωτογενείς ινοβλάστες υπήρχε αποτυχία αναστολής του *c-Myc* σε συνθήκες έλλειψης αυξητικών παραγόντων, ενισχύοντας το ρόλο του ERF στην κυτταρική διαφοροποίηση. Έτσι, η μελέτη αυτή συνέδεσε άμεσα για πρώτη φορά το Ras/Erk σηματοδοτικό μονοπάτι με τη μεταγραφική ρύθμιση του *c-Myc*, προτείνοντας ότι η απόσβεση του Ras/Erk μονοπατιού μπορεί να ρυθμίζει ενεργά την κυτταρική μοίρα. Επίσης, μία ακόμη μελέτη το 2007 αποκάλυψε έναν επιπλέον άμεσο στόχο του ERF, εμπλέκοντάς τον στο μεταγραφικό ρυθμιστικό μηχανισμό των μυϊκών ινιδίων και συγκεκριμένα των νευρομυϊκών συνάψεων, καταστέλλοντας την έκφραση του *Utrophin*, ενός αναλόγου του *Dystrophin*, και προτείνοντάς τον ως πιθανό θεραπευτικό στόχο έναντι της μυϊκής δυστροφίας Duchenne (DMD) (Perkins et al. 2007).

## ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ RAS/ERK

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η επικοινωνία μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση και το συντονισμό των κυτταρικών διεργασιών, όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η διαφοροποίηση. Η πληθώρα των δικτύων μεταγωγής σήματος που διαμεσολαβούν αυτές τις βιολογικές διαδικασίες ρυθμίζεται εν μέρει από αυξητικούς παράγοντες που ενεργοποιούν υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωταρχικοί δέκτες των σημάτων είναι οι υποδοχείς κινάσης τυροσίνης (RTKs), μέσω των οποίων το σήμα μεταδίδεται καθοδικά και μετά από καταρράκτη αντιδράσεων τελικά φθάνει στους μεταγραφικούς παράγοντες.

Οι υποδοχείς RTK χαρακτηρίζονται από μία διαμεμβρανική περιοχή, μία εξωκυττάρια περιοχή που δεσμεύει τους συνδέτες και ένα ενδοκυττάριο τμήμα που έχει ενεργότητα κινάσης (Ullrich and Schlessinger 1990). Η σύνδεση των αυξητικών παραγόντων με τον υποδοχέα τυροσίνης επάγει το διμερισμό του στην κυτταρική μεμβράνη και αυξάνει την ενεργότητα κινάσης που οδηγεί στην αυτό-φωσφορυλίωση του υποδοχέα σε κατάλοιπα τυροσίνης (Εικ.1.10) (Greenfield et al. 1989; Heldin 1995; Ullrich and Schlessinger 1990). Έτσι, το σύμπλοκο προσαρμογής SHC-Grb2-SOS, που αλληλεπιδρά



**Εικόνα 1.10:** Απλή αναπαράσταση του RAS-RAF-MEK-ERK μονοπατιού. Μεταλλαγές στο RAS ή BRAF μπορούν να προκαλέσουν ανώμαλη ενεργοποίηση του μονοπατιού αυτού στον ανθρώπινο καρκίνο. (Montagut and Settleman 2009)

με φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης δεσμεύεται στον υποδοχέα και μεταδίδει το σήμα ενδοκυτταρικά. Το σύμπλοκο αυτό διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση της Ras πρωτεΐνης με τους RTK υποδοχείς και την επαγωγή του Ras/Erk μονοπατιού, που είναι πολύ σημαντικό για την προώθηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Dhanasekaran and Premkumar Reddy 1998). Μετά την πρόσδεση του συμπλόκου, η πρωτεΐνη-προσαρμογέας SOS μετατρέπει την ανενεργή Ras (Ras-GDP) στην ενεργή μορφή της (Ras-GTP). Η μετατροπή αυτή γίνεται μέσω της αποδέσμευσης από την Ras του GDP και αλληλεπίδρασης της πλέον με GTP. Η συνάφεια της ελεύθερης Ras όσον αφορά την πρόσδεση GTP έναντι GDP είναι 10 φορές μεγαλύτερη (Boguski and McCormick 1993; Donovan, Shannon, and Bollag 2002). Η ενεργή πλέον Ras-GTP φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Raf κινάση, η οποία με την σειρά της ενεργοποιεί την MEK κινάση και αυτή με την σειρά της την ERK κινάση (Kolch 2005). Η φωσφορυλιωμένη και ενεργή μορφή της ERK μεταναστεύει στον πυρήνα όπου και φωσφορυλιώνει μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για την ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης (Repasky, Chenette, and Der 2004; Yang et al. 2003).

Επιπλέον, η διάρκεια του σήματος και ο κυτταρικός τύπος παίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της ERK κινάσης και την επακόλουθη επιλογή της μοίρας του κυττάρου, όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό του ή τη διαφοροποίησή του. Επίσης, η ERK κινάση δε δρα μόνο ενεργοποιώντας γονίδια που υποβοηθούν τη μετάβαση στην S φάση, αλλά και καταστέλλοντας γονίδια με κυττοστατική δράση κατά τη διάρκεια της G1 φάσης (Yamamoto et al. 2006). Τέλος, είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση του RAS-RAF-MEK-ERK μονοπατιού έχει αρκετά ογκογόνες ιδιότητες, προκαλώντας πλήθος ανθρώπινων καρκίνων, και για το λόγο αυτό τα μέλη του μονοπατιού αυτού αποτελούν αρκετά καλούς αντικαρκινικούς φαρμακευτικούς στόχους (Εικ.1.10) (Nussinov, Tsai, and Mattos 2013; Samatar and Poulikakos 2014).

## **TGFβ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΕΠΙΘΗΛΙΟΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT)**

### ***TGFβ σηματοδότηση και βιολογία***

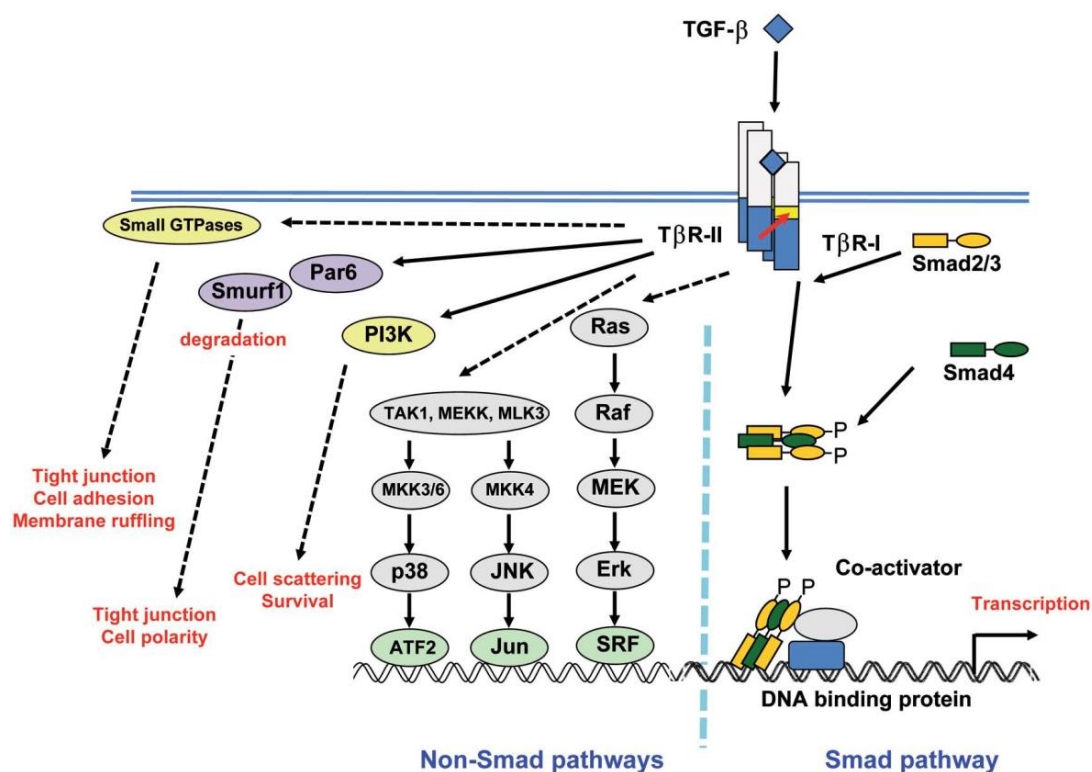
Ο TGFβ (Transforming Growth Factor-β) και άλλα μέλη της οικογένειάς του ρυθμίζουν πολλές θεμελιώδεις πτυχές της κυτταρικής συμπεριφοράς, μεταξύ των οποίων τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την προσκόλληση, την αγγειογένεση, την τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος και την επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGFβ παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όσο και κατά την ενήλικη ζωή, όπου ρυθμίζουν την ομοίωση των ιστών, ενώ η απορρύθμισή τους εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η ίνωση και ο καρκίνος (Bierie and Moses 2006; Piek, Heldin, and Ten Dijke 1999; Schmierer and Hill 2007; Siegel and Massagué 2003).

Η υπεροικογένεια των TGFβ κυτταροκινών κωδικοποιείται από τουλάχιστον 30 γονίδια, περιλαμβάνοντας ισομορφές του TGFβ, activins, την πρωτεΐνη Nodal, BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) και GDFs (Growth and Differentiation Factors) και διαχωρίζεται σε 2 υποοικογένειες, την TGFβ/Activin/Nodal και την BMP/GDF/MIS υποοικογένεια. Η ενεργός μορφή μίας κυτταροκίνης της TGFβ οικογένειας είναι ένα διμερές το οποίο



σταθεροποιείται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και περαιτέρω δισουλφιδικούς δεσμούς (Schmierer and Hill 2007; Shi and Massagué 2003).

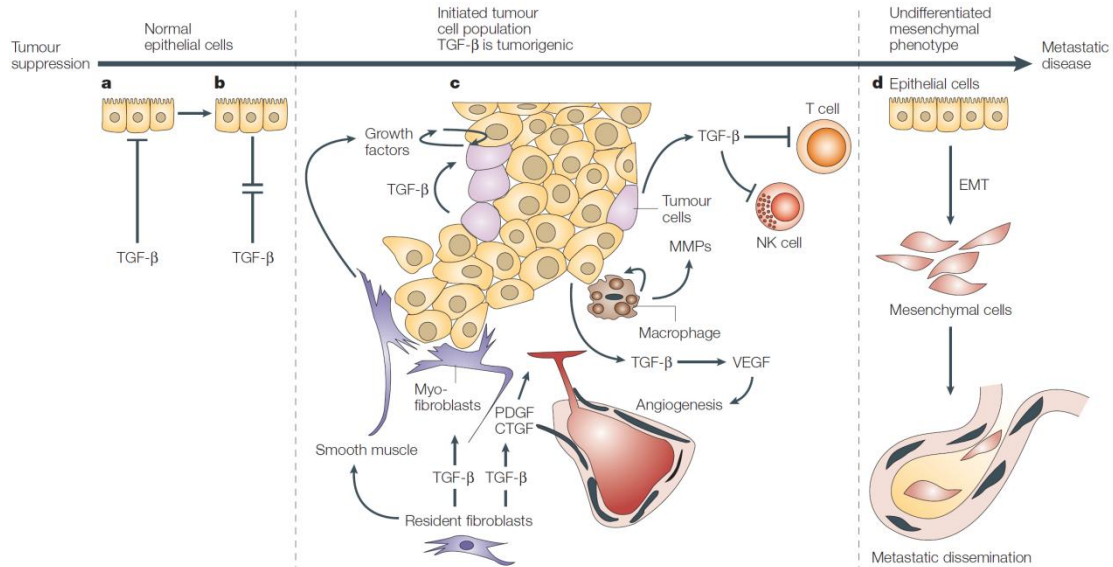
Η οικογένεια των υποδοχών κινάσης σερίνης/θρεονίνης αποτελείται από τύπου I (TβRI) και τύπου II (TβRII) υποδοχείς, όλοι αφιερωμένοι στο μονοπάτι του TGFβ. Και οι δύο τύποι υποδοχών κινάσης σερίνης/θρεονίνης διαθέτουν μία αρκετά συντηρημένη ενδοκυττάρια περιοχή, η οποία πρωτίστως αποτελείται από την κινάση σερίνης/θρεονίνης και δευτερευόντως από επιπρόσθετες αλληλουχίες οι οποίες εξυπηρετούν είτε ως θέσεις φωσφορυλίωσης είτε ως περιοχές αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες προσαρμογείς ή σηματοδοτικές πρωτεΐνες. Η πρόσδεση του συνδέτη γεφυρώνει τα προσχηματισμένα διμερή υποδοχών τύπου II με τα διμερή υποδοχών τύπου I και σχηματίζει ετεροτετραμερή σύμπλοκα ενεργών υποδοχών (Εικ.1.11). Η φωσφορυλίωση του TβRI υποδοχέα από τον TβRII προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωσή του και επακόλουθη απομάκρυνση αρνητικών ρυθμιστών, οδηγώντας στην καταλυτική του ενεργοποίηση και τη φωσφορυλίωση των σηματοδοτικών τελεστών της οικογένειας των SMAD πρωτεϊνών καθώς και σε άλλα σηματοδοτικά γεγονότα (Shi and Massagué 2003).



Εικόνα 1.11: TGFβ σηματοδότηση μέσω Smad και non-Smad σηματοδοτικών μονοπατιών. (Miyazono 2009)

Οι SMAD πρωτεΐνες διακρίνονται λειτουργικά σε 3 υποκατηγορίες, περιλαμβάνοντας α) τις “R-Smads” (Receptor-activated: SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5, SMAD8), οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους τύπου I υποδοχείς, β) τις “Co-Smads” (Common mediator: SMAD4), οι οποίες σχηματίζουν ολιγομερή με τις ενεργές R-Smads και γ) τις “I-Smads” (Inhibitory: SMAD6, SMAD7), οι οποίες δρουν ανασταλτικά μέσω ανταγωνισμού με τις R-Smads ως προς την αλληλεπίδραση με τον TβRI υποδοχέα και μέσω στόχευσης των υποδοχέων για αποικοδόμηση (Joan Massagué, Seoane, and Wotton 2005; A Moustakas, Souchelnytskyi, and Heldin 2001). Οι TβRI υποδοχείς της υποοικογένειας των TGFβ/Activin φωσφορυλιώνουν τις SMAD2 και SMAD3, ενώ της υποοικογένειας των BMPs τις SMAD1, SMAD5 και SMAD8. Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης των R-Smads είναι ο σχηματισμός συμπλόκων με την Co-Smad, SMAD4 και η είσοδός τους στον πυρήνα, όπου είτε προσδένοντας άμεσα σε υποκινητές είτε αλληλεπιδρώντας με άλλες πρωτεΐνες (μεταγραφικούς συν-ενεργοποιητές ή συν-καταστολείς) συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων στόχων (Εικ.1.11). Επίσης, οι R-Smads φωσφορυλιώνονται και από άλλες κινάσες, όπως η ERK (Kretzschmar et al. 1999), η CamKII (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase II) (Wicks et al. 2000), η PKC (Protein Kinase C) (Yakymovych et al. 2001) και οι CDKs (Cyclin Dependent Kinases) (F. Liu 2006) με αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησής τους. Πολλά μέλη από διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA – forkhead (πχ.Fast1), homeobox (πχ.Mixer), E-box, Jun/Fos, CREBP και E2F έχει δειχθεί ότι λειτουργούν ως συνεργάτες των SMADs (J Massagué and Wotton 2000).

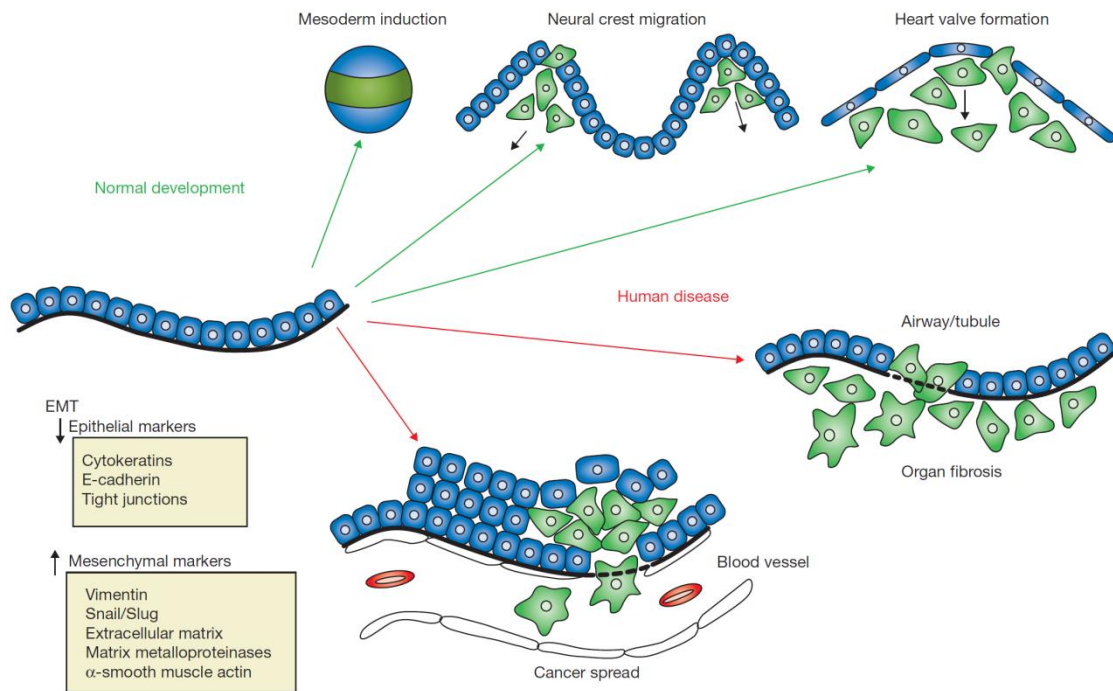
Είναι πλέον αποδεκτό, ότι ο TGFβ, εκτός από το καλά καθιερωμένο κεντρικό μονοπάτι των SMAD, ενεργοποιεί και ένα σύνολο εναλλακτικών μονοπατιών για να ρυθμίσει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών. Αυτά τα SMAD-ανεξάρτητα μονοπάτια περιλαμβάνουν αρκετά μονοπάτια των MAPK κινασών (ERK, p38, JNK), το μονοπάτι της PI3K/AKT, καθώς και των Rho-GTPασών (Ras, Rho, Cdc42) (Εικ.1.11) (Derynck, Muthusamy, and Saeteurn 2014; Aristidis Moustakas and Heldin 2005; Y. E. Zhang 2009). Γρήγορη ενεργοποίηση της ERK από τον TGFβ έχει παρατηρηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα μαστού και σε ινοβλάστες (Frey and Mulder



**Εικόνα 1.12: Η ογκοκατασταλτική και ογκογόνος δράση του TGFβ.** (Yingling, Blanchard, and Sawyer 2004)

1997; Hartsough and Mulder 1995; Mucsi, Skorecki, and Goldberg 1996). Επίσης, έχει βρεθεί ότι ο TGFβ ενεργοποιεί ταχύτατα τη JNK (Engel et al. 1999) και την p38 MAPK σε διάφορες κυτταρικές σειρές (Yu, Hébert, and Zhang 2002), καθώς και το μονοπάτι της PI3K, όπως υποδεικνύεται από την φωσφορυλίωση του καθοδικού τελεστή της AKT (Shin et al. 2001). Από την άλλη μεριά, ο TGFβ έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι PI3K/AKT μέσω επαγωγής της έκφρασης της φωσφατάσης SHIP με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τις SMADs (Valderrama-Carvajal et al. 2002). Αντιστρόφως το μονοπάτι PI3K/AKT ανταγωνίζεται το μονοπάτι των SMAD, προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση και την αναστολή της ανάπτυξης που επάγεται από τον TGFβ.

Ο βιολογικός ρόλος του TGFβ είναι ιδιαίτερα σύνθετος και περιλαμβάνει πτυχές ογκοκατασταλτικής αλλά και ογκογόνου συμπεριφοράς (Εικ.1.12) (Lebrun 2012). Ο TGFβ αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Ten Dijke et al. 2002) και επάγει απόπτωση (Pardali and Moustakas 2007; Siegel and Massagué 2003) σε διάφορους κυτταρικούς τύπους εκδηλώνοντας έτσι την ογκοκατασταλτική του δράση. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου και κατά τη δημιουργία μεταστάσεων, τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ανθεκτικά στην κυτταροστατική δράση του TGFβ, ενώ στην πλειονότητά τους υπερκεκφράζουν TGFβ, ο οποίος δρα προς όφελος της ανάπτυξης και εξέλιξης των όγκων μέσω αυτοκρινών και παρακρινών



**Εικόνα 1.13: Η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση στην ανάπτυξη και σε παθολογικές καταστάσεις.** Παρουσιάζονται παραδείγματα επιθηλιακών και μεσεγχυματικών μορίων που μειώνονται και αυξάνονται αντιστοίχως κατά το EMT. (Derynck and Akhurst 2007)

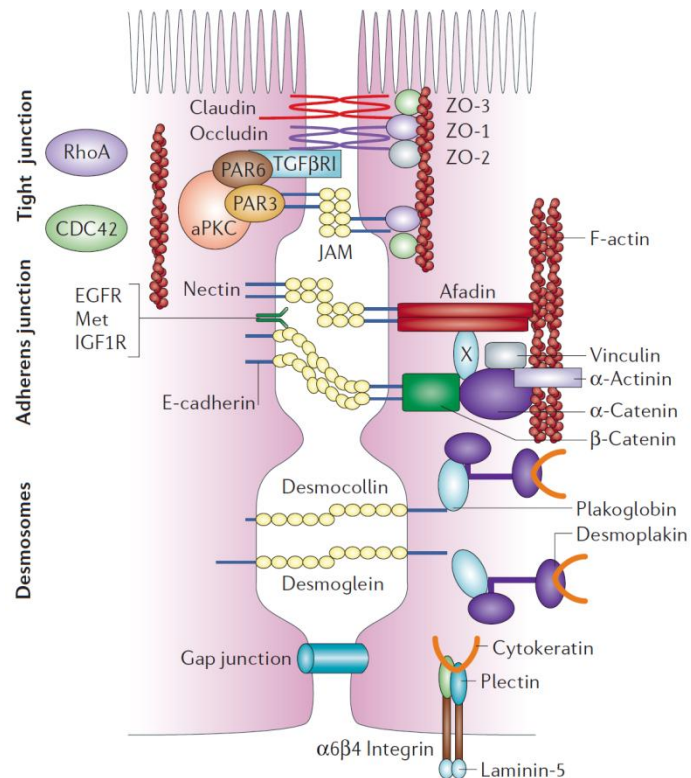
δράσεων, όπως είναι η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT), η προαγωγή της κινητικότητας και της διεισδυτικότητας, η ανοσοκαταστολή, η αγγειογένεση και η τροποποίηση της εξωκυττάριας ουσίας (Yingling, Blanchard, and Sawyer 2004).

### **Επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT)**

Η επιθηλιομεσεγχυματική μετάβαση (EMT, epithelial mesenchymal transition) είναι η διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μεσεγχυματικά. Ο όρος EMT περιγράφει μία σειρά γεγονότων κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν πολλά από τα χαρακτηριστικά τους και αποκτούν ιδιότητες που τυπικά αποδίδονται σε μεσεγχυματικά κύτταρα, ενώ απαιτούνται σύνθετες αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στη συμπεριφορά των κυττάρων. Η EMT είναι μία φυσιολογική διαδικασία απαραίτητη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την επούλωση των πληγών, η οποία όμως λαμβάνει χώρα και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο προχωρημένος καρκίνος και η ίνωση (Εικ.1.13).

Τα επιθηλιακά κύτταρα οργανώνονται σε στοιβάδες ή μονοστοιβάδες, οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω εξειδικευμένων

μεμβρανικών δομών, όπως οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions), οι συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions), τα δεσμοσώματα (desmosomes) και οι χάσμοσύνδεσμοι (gap junctions) (Εικ.1.14). Χαρακτηριστικό των επιθηλιακών κυττάρων είναι η κορυφαία-βασική (apical-basal) πολικότητα τους, η οποία εξασφαλίζεται από



**Εικόνα 1.14: Μοριακά χαρακτηριστικά των επιθηλιακών συνδέσεων.** Στενοσύνδεσμοι (tight junctions), συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions) και δεσμοσώματα, προσκόλληση στη λαμινίνη μέσω ιντεγκρινών. (Thiery and Sleeman 2006)

συγκεκριμένες ιντεγκρίνες, από την πολωμένη οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων και από την παρουσία μίας εξειδικευμένης δομής της εξωκυττάριας ουσίας, τη βασική λάμινα (basal lamina, basement membrane) κάτω από τη βασική τους επιφάνεια. Αντίθετα, τα μεσεγχυματικά κύτταρα δεν εμφανίζουν όλα τα παραπάνω επιθηλιακά χαρακτηριστικά, αλλά διαθέτουν μία ινοβλαστοειδή μορφολογία και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν (Thiery and Sleeman 2006).

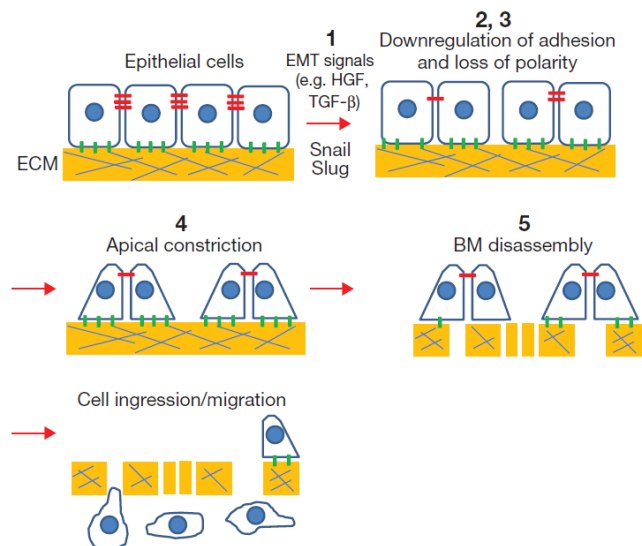
Προαπαιτούμενες κυτταρικές αλλαγές κατά την EMT είναι η καταστροφή των διακυτταρικών συνδέσεων, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η άρση της επιθηλιακής πολικότητας και η τροποποίηση της προσκόλλησης στην εξωκυττάρια ουσία (Εικ.1.15). Παράλληλα, τα μεταναστευτικά ινοβλαστοειδή κύτταρα ενεργοποιούν μοριακά προγράμματα τα οποία τους προσδίδουν την ικανότητα να αποικοδομούν αλλά και να συνθέτουν de novo συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (ECM, extracellular matrix), επιτρέποντάς τους να διαπερνούν τις βασικές μεμβράνες

και να εξέρχονται στην ECM συνεχίζοντας τη μετανάστευσή τους, μία διαδικασία η οποία καθορίζει κατά κανόνα την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων (tumor invasiveness). Τα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να αποκτήσουν επιπρόσθετες

ικανότητες ως μία προέκταση της κοινής EMT που τους επιτρέπουν να δημιουργούν

μεταστάσεις. Τέτοιες ικανότητες είναι η αντίσταση στην απόπτωση, η προσκόλληση σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η αυτόνομη ανάπτυξη και η έκκριση παραγόντων αγγειογένεσης (Zavadil and Böttinger 2005).

Ένα πολύ σημαντικό στάδιο κατά την EMT είναι η αποδόμηση των διακυτταρικών συνδέσεων (tight junctions, adherens junctions, desmosomes). Οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions) μεσολαβούνται από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες claudin και occludin και από πρωτεΐνες ικριώματος, όπως η ZO-1, η οποία συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Κατά την EMT οι στενοσύνδεσμοι αποδιατάσσονται και τα βασικά πρωτεϊνικά συστατικά τους ρυθμίζονται αρνητικά. Ο μηχανισμός αποδόμησης των στενοσυνδέσμων που έχει προταθεί είναι ότι η διέγερση με TGFβ προκαλεί την συμπικουτινίωση της RhoA και την αποικοδόμησή της από το πρωτεάσωμα (Wang et al. 2003), οδηγώντας έτσι στην έλλειψη της κορυφαίας-βασικής πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων και στην αποσταθεροποίηση των συνδέσεων (Perez-Moreno, Jamora, and Fuchs 2003). Οι συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions) μεσολαβούνται από ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις των εξωκυττάρων περιοχών της E-cadherin, όπου το ενδοκυττάριο τμήμα της αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των α- και β-catenins. Η αποδόμηση των συνδέσεων προσκόλλησης γίνεται κυρίως μέσω της μείωσης των



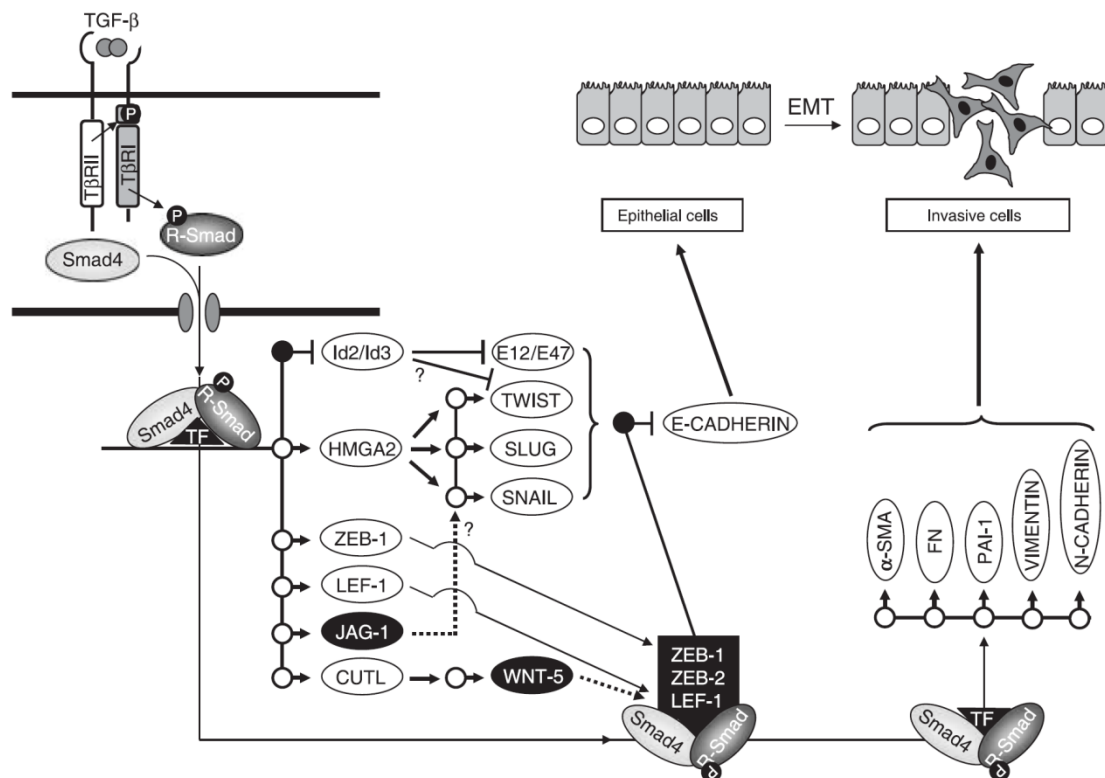
**Εικόνα 1.15: Τα βασικά βήματα κατά το EMT.** Οι κόκκινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις συνδέσεις προσκόλλησης και οι πράσινες τις ιντεγκρίνες και τα σημεία προσκόλλησης στην εξωκυττάρια ουσία. (Levy and Lécuit 2008)

επιπέδων της E-cadherin λόγω ενδοκυττάρωσης ή/και μεταγραφικής καταστολής της έκφρασής της.

Καθώς καταστρέφονται οι διακυτταρικές συνδέσεις, οι καλά οργανωμένες επιθηλιακές στοιβάδες απελευθερώνουν μοναδιαία ινοβλαστοειδή κύτταρα με εξαφανιζόμενη πολωμένη οργάνωση. Έτσι, ο επιθηλιακός δείκτης E-cadherin μειώνεται και αντικαθίσταται από τη μεσεγχυματική N-Cadherin (Maeda, Johnson, and Wheelock 2005), ενώ ο επιθηλιακός δείκτης πολικότητας, η κορυφαία διαμεμβρανική πρωτεΐνη mucin-1 (MUC1) είτε επαναδιανέμεται είτε μειώνονται τα επίπεδά της (Guaita et al. 2002). Επίσης η βασική ιντεγκρίνη α6β4 που μεσολαβεί την αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων με τη βασική λάμινα αντικαθίσταται από τη μεσεγχυματική ιντεγκρίνη α5β1 (Maschler et al. 2005).

Για να αποδευμευτούν τα κύτταρα που υφίστανται EMT από την επιθηλιακή στοιβάδα και να μεταναστεύσουν μέσω της ECM πρέπει να διαλύσουν τις επαφές με την βασική λάμινα που μεσολαβούνται από συγκεκριμένες ιντεγκρίνες και επιπλέον να την αποικοδομήσουν. Η βασική λάμινα είναι μία εξειδικευμένη δομή εξωκυττάριας ουσίας η οποία αποτελείται από κολλαγόνο τύπου IV, λαμινίνη και νιδογόνο. Ο TGFβ επάγει την έκφραση και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεασών MMP2 και MMP9 επιτρέποντας την αποικοδόμηση του κολλαγόνου τύπου IV και τη μετανάστευση των κυττάρων διαμέσου της βασικής λάμινα (Zavadil and Böttinger 2005).

Κατά την EMT που μεσολαβείται από τον TGFβ, οι SMADs καταστέλλουν μεταγραφικά την έκφραση των *Id* (Inhibitor of differentiation) γονιδίων *Id2* και *Id3*, ένα γεγονός το οποίο είναι απαραίτητο για την αρνητική ρύθμιση των E-cadherin και ZO-1 και την τελική καθιέρωση της EMT (Εικ.1.16) (Kowanetz et al. 2004). Επιπλέον, οι μεταγραφικοί καταστολείς του γονιδίου *E-cadherin*, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, E12/E47, Twist και LEF-1 εμπλέκονται στην EMT που επάγεται από τον TGFβ (Derynck, Muthusamy, and Saeteurn 2014; Héctor Peinado, Portillo, and Cano 2004). Οι καταστολείς αυτοί αναγνωρίζουν E-box DNA αλληλουχίες κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής στον υποκινητή του γονιδίου της *E-cadherin* στρατολογώντας μεταγραφικούς συν-καταστολείς και απακετυλάσες των ιστονών (HDACs). Ο TGFβ επάγει την αλληλεπίδραση των SMADs με τις ZEB1 ή ZEB2,



**Εικόνα 1.16:** Το μεταγραφικό πρόγραμμα που ενεργοποιείται από τον TGFβ κατά το EMT. Οι λευκοί κύκλοι υποδηλώνουν ενεργοποίηση ενώ οι μαύροι καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. (Aristidis Moustakas and Heldin 2007)

οδηγώντας στη δημιουργία συμπλόκων καταστολής στην E-box περιοχή του γονιδίου της *E-cadherin* καθώς και σε άλλα γονίδια στόχους (Εικ.1.16) (Comijn et al. 2001; Vandewalle et al. 2005). Επιπλέον, ο TGFβ επάγει την έκφραση της *Slug* και της *Snail* μέσω της SMAD3 ή των μονοπατιών των ERK και PI3K, καθώς και του LEF-1 μέσω των SMAD, σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα (Hector Peinado, Quintanilla, and Cano 2003; Romano and Runyan 2000). Το ερώτημα εάν όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί καταστολής του γονιδίου *E-cadherin* δρουν σε συνεργασία ή αντανακλούν ιστοειδικές αποκρίσεις κατά την TGFβ-επαγόμενη EMT παραμένει ανοιχτό. Πρόσφατα βρέθηκε ένας νέος ρυθμιστής κλειδί στη σηματοδότηση του TGFβ κατά την EMT, ο πυρηνικός παράγοντας HMGA2, ο οποίος επάγεται από τον TGFβ και ακολούθως επάγει την έκφραση των *Snail*, *Slug* και *Twist* (Eικ.1.16) (Thuault et al. 2006).

Παρά την κατανόηση του πως ρυθμίζεται η καταστολή του γονιδίου *E-cadherin* από τον TGFβ, πολύ λίγα είναι γνωστά για τη μεταγραφική ρύθμιση άλλων γονιδίων τα οποία είναι απαραίτητα για την καθιέρωση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου. Ο TGFβ μέσω του SMAD μονοπατιού επάγει



την έκφραση του συνδέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, Jagged1, εκκινώντας έτσι το μονοπάτι Notch σε συνεργασία με το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του μεταγραφικού καταστολέα Hey1, ο οποίος μεσολαβεί πολλές δράσεις του Notch μονοπατιού σχετικές με την EMT (Zavadil et al. 2004). Παρομοίως, ο TGFβ επάγει την έκφραση των συνδετών και των υποδοχέων του PDGF, ενεργοποιώντας έτσι το PDGF μονοπάτι, το οποίο έχειδειχθεί ότι δρα αυτοκρινώς προάγοντας την EMT, την in vivo μετάσταση και την in vivo ανάπτυξη των όγκων (Gotzmann et al. 2006; Jechlinger et al. 2006). Επίσης ο TGFβ πέρα από την επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2 και MMP9, όπως προαναφέρθηκε, επάγει την έκφραση ενζύμων που ρυθμίζουν την ECM, όπως η PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), καθώς και συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η fibronectin (FN) (Εικ.1.16). Το μονοπάτι των SMAD ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της PAI-1 σε συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο SP1 και ο TFE3, ενώ σήματα από την ERK και τη Rac1 επίσης χρειάζονται (Dennler et al. 1998; Hua et al. 1998; Kutz et al. 2001). Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της fibronectin δείχθηκε αρχικά ότι εξαρτάται από το μονοπάτι της JNK MAPK με ένα SMAD-ανεξάρτητο μηχανισμό, στη συνέχεια όμως αποδείχθηκε ότι το μονοπάτι των SMAD επίσης χρειάζεται (Hoccevar, Brown, and Howe 1999; Itoh et al. 2003; Aristidis Moustakas and Heldin 2005).

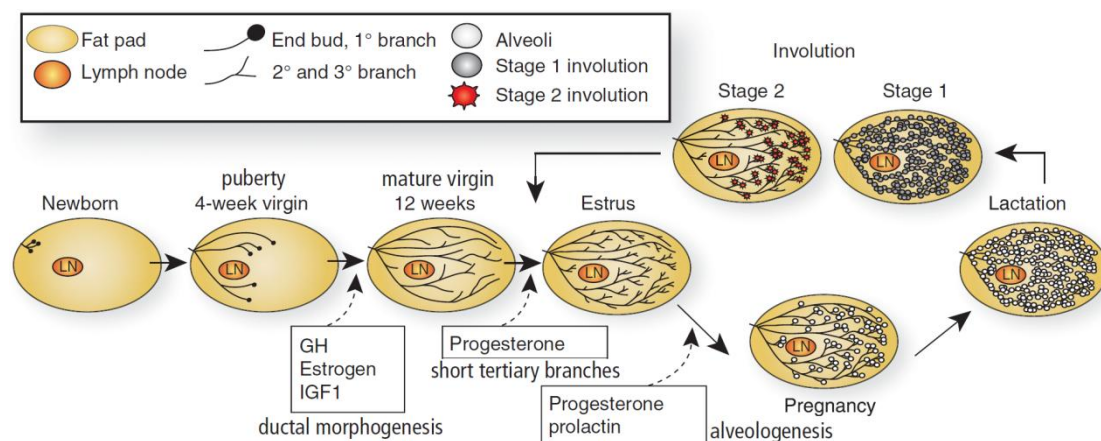
## **Ο ΜΑΣΤΙΚΟΣ ΑΔΕΝΑΣ**

### ***Ανάπτυξη και δομή του μαστού***

Η βασική λειτουργία του μαστού είναι να παράγει και να μεταφέρει γάλα από τη μητέρα στο νεογνό. Ο μαστός είναι το μόνο όργανο από το οποίο ονομάστηκε μία ολόκληρη κλάση ζώων, καθώς στο μαστικό αδένα αποδίδεται η εξελικτική επιτυχία των θηλαστικών, κυρίως λόγω της θρεπτικής και αντιμικροβιακής ικανότητας του γάλακτος. Η γαλουχία, δηλαδή η σύνθεση και έκκριση του γάλακτος, είναι δυνατή χάρη στην αρχιτεκτονική του μαστού. Η δομική λειτουργική μονάδα του μαστού ονομάζεται “acinus”, και είναι ένας σωλήνας που αποτελείται από μία διπλή στοιβάδα δύο επιθηλιακών κυτταρικών τύπων, που περιβάλλουν έναν κοίλο αυλό όπου εκκρίνεται γάλα

με κατεύθυνση προς τη θηλή, μέσω ενός συστήματος διακλαδισμένων αυλών. Επιθηλιακά κύτταρα αυλού περιβάλλονται από συσπώμενα μύοεπιθηλιακά κύτταρα, και οι δύο αυτές κυτταρικές στοιβάδες εγκολπώνονται από μία βασική μεμβράνη (BM) και περιβάλλονται από το στρώμα περιλαμβάνοντας και τα ανοσοκύτταρα. Παρά τις διαφορές μεταξύ ποντικίσσιου και ανθρώπινου μαστού, η κύρια δομική λειτουργική μονάδα είναι σε μεγάλο βαθμό παρόμοια στα δύο είδη. Οι παρατηρήσεις που προκύπτουν από το μαστό του ποντικού, μπορεί να μεταφερθούν στον ανθρώπινο μαστό, και αυτή η ανταλλαγή της πληροφορίας υπήρξε ανεκτίμητη για τη σταδιακή βελτίωση των μαστικών συστημάτων καλλιέργειας από μονοτυπικές 3D καλλιέργειες, σε πολυκυτταρικές συγκαλλιέργειες και *in vivo* μοντέλα ξενομοσχεύματος (Mroue and Bissell 2013).

Στο ποντίκι, υπάρχουν πέντε ζεύγη μαστικών αδένων, τοποθετημένα σε τμήματα λίπους (fat pads), αμέσως κάτω από το δέρμα. Τα ζεύγη αυτά εκκίνονται από τη θωρακική (3 ζεύγη) μέχρι τη βουβωνική (2 ζεύγη) χώρα του ζώου. Κάθε “fat pad” έχει μία εξωτερική θηλή συνδεδεμένη με τον κυρίως επιθηλιακό αυλό, στον οποίο απελευθερώνεται το γάλα μετά την άντλησή του μέσω των μύοεπιθηλιακών κυττάρων (Richert et al. 2000). Η ανάπτυξη του μαστικού αδένα πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: ανάπτυξη και επιμήκυνση αυλών και πρώιμη ανάπτυξη λοβών κατά τη διάρκεια της εφηβείας (Εικ.1.22). Επιπλέον, η ανάπτυξη, επέκταση και διαφοροποίηση των λοβών συμβαίνει σε κάθε εγκυμοσύνη και γαλουχία, ακολουθούμενη από μία περίοδο επιθηλιακής αναδιαμόρφωσης κατά την συρρίκνωση (Εικ.1.22). Πριν από τη γέννηση, εκτείνεται στο “fat pad” μία στοιχειώδης δομή αυλών που προέρχεται από το



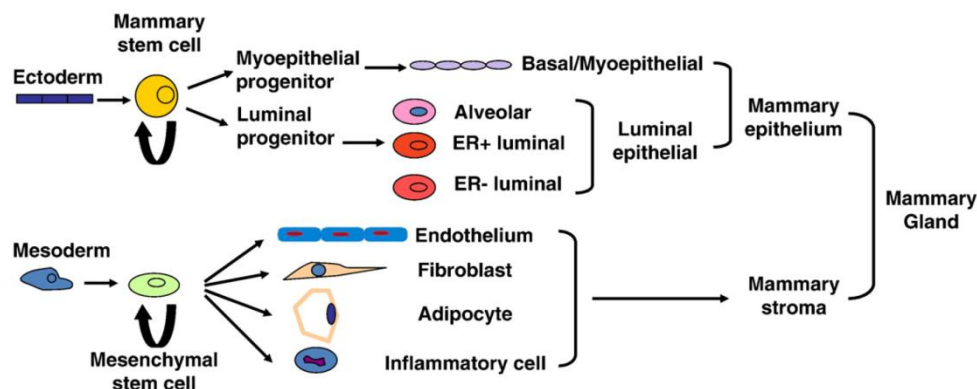
Εικόνα 1.22: Στάδια ανάπτυξης του μαστικού αδένα μετά τη γέννηση. (Macias and Hinck 2012)

παρέγχυμα (Richert et al. 2000). Αυτή η επιθηλιακή δομή παραμένει σε αδράνεια μέχρι περίπου την τρίτη εβδομάδα ηλικιακά, όταν πλέον και επάγεται από ορμόνες των ωοθηκών (Fendrick, Raafat, and Haslam 1998). Σε αυτή τη στιγμή, μια συστάδα επιθηλιακών κυττάρων, που καθορίζουν τα τελικά τυφλά άκρα (terminal end buds, TEBs), εμφανίζονται στο τέλος των μαστικών αυλών και ξεκινά η διαδικασία επιμήκυνσης των αυλών, και συνεχίζει μέχρι την 10<sup>η</sup>-12<sup>η</sup> εβδομάδα ηλικιακά, όπου τα TEBs φτάνουν στα όρια του “fat pad” (Silberstein 2001). Με την έναρξη του οίστρου κατά την εφηβεία, ο αδένας αρχίζει να διακλαδίζεται και να σχηματίζονται λοβοειδή άκρα. Κατά την εγκυμοσύνη, οι ορμονικές και τοπολογικές αλλαγές επιτρέπουν την εξέλιξη της ανάπτυξης των λοβών και την εγκαθίδρυση ενός αδένου που είναι γεμάτος από συμπυκνωμένα κυψελιδικά σωματίδια (alveolar bodies). Ταυτόχρονα, μαστικά επιθηλιακά κύτταρα μέσα στον αδένου αρχίζουν να αποκτούν τη διαφορική τους ικανότητα να συνθέτουν συγκεκριμένα συστατικά γάλακτος, έτσι ώστε να πραγματοποιείται λειτουργική γαλακτογένεση μετά τον τοκετό. Μετά τη γέννα οι κυψελίδες εκκρίνουν άφθονο γάλα για περίπου τρεις εβδομάδες (Barcellos-Hoff et al. 1989; Ramanathan et al. 2007; Rosen, Wyszomierski, and Hadsell 1999).

Κατά τον απογαλακτισμό, ο μαστός ξεκινάει μία διαδικασία αναδιαμόρφωσης (συρρίκνωση), η οποία εμπεριέχει οργανωμένη απόπτωση των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων, επιστρέφοντας έτσι σε μία κατάσταση αρκετά παρόμοια, αλλά όχι ταυτόσημη, με την προ εγκυμοσύνης αρχιτεκτονική του μαστού (Furth, Bar-Peled, and Li 1997; Li et al. 1997). Η διαδικασία αυτή της συρρίκνωσης/αναδιαμόρφωσης διαρκεί στα τρωκτικά περίπου δύο εβδομάδες, μετά την οποία ο αδένου είναι έτοιμος να ξανά αρχίσει έναν νέο κύκλο εγκυμοσύνης, γαλουχίας και συρρίκνωσης.

Το επιθήλιο του μαστού (luminal, myoepithelial) είναι ενσωματωμένο μέσα σε μία σύνθετη ουσία στρώματος (γνωστό και ως μαστικό “fat pad”) αποτελούμενο κυρίως από ινοβλάστες, λιποκύτταρα και ανοσοκύτταρα (Εικ.1.23). Η δομική λειτουργική μονάδα του μαστού “acinus” υπάρχει στο πλαίσιο ενός πλούσιου στρώματος και εξωκυττάριας ουσίας (ECM), ενός περιβάλλοντος που αλλάζει συνεχώς και υπόκειται σε κύματα σηματοδότησης από ποικιλία ορμονών και αυξητικών παραγόντων, από όπου προκύπτει και η περιπλοκότητα του μαστικού αδένου. Είναι γνωστό εδώ και δεκαετίες ότι ενώ

τα κύτταρα σε μονοκαλλιέργειες χάνουν τη λειτουργικότητά τους ως προς διαφοροποίηση, ακόμη και παρουσία λακτογόνων ορμονών, τα ίδια κύτταρα σχηματίζουν σωληνοειδής δομές και αποκρίνονται στα σωστά ορμονικά σήματα μετά από μεταμόσχευσή τους σε ελεύθερο από αδένια (gland-free) “fat pad” ποντικού (Daniel et al. 1971; Daniel and Deome 1965). Είναι φανερό ότι είτε το κυτταρικό μικροπεριβάλλον που περικλείει τα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα ασκεί ουσιώδη ρόλο οδηγώντας στη διαφοροποίησή τους, είτε οι συστημικοί παράγοντες που απουσιάζουν από την καλλιέργεια είναι λειτουργικοί *in vivo*. Το δομικό ικρίωμα που περιβάλλει τα κύτταρα στο φυσικό τους 3D περιβάλλον είναι η βασική μεμβράνη (BM), μία ειδική και ετερογενής οντότητα μέσα στο ECM (Kalluri 2003). Το ECM δεν είναι μία στατική αυτόνομη οντότητα, αλλά η σύστασή του είναι κάτω από τον έλεγχο φυσιολογικών τελεστών όπως αυξητικών παραγόντων, κυτοκινών και ορμονών και επομένως συνεχώς αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, γήρανσης, επιδιόρθωση ιστών, καθώς επίσης και κατά την πρόοδο του καρκίνου (Guo and Giancotti 2004). Με τη σειρά του το ECM και τα συστατικά του ρυθμίζουν την ανάπτυξη, διαφοροποίηση και επιβίωση των κυττάρων μέσα στους ιστούς. Για παράδειγμα, στο μαστικό αδένια, η ειδική βασική μεμβράνη που περιέχει collagen-IV και laminin-I αποφέρει καλύτερη έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες γάλακτος (Medina et al. 1987; Streuli et al. 1995), αλλά το πλούσιο σε collagen-I ECM ευνοεί την ανάπτυξη των αυλών κάτω από κατάλληλο ορμονικό ερέθισμα (Daniel et al. 1984). Τα σήματα από το ECM μεταφέρονται στα κύτταρα μέσω επιφανειακών υποδοχέων που μετατρέπουν το βιοχημικό και μηχανικό ερέθισμα σε κυτταρική και πυρηνική απόκριση (Streuli, Bailey, and Bissell 1991). Τέλος, επιπλέον από το ECM και την ορμονική σηματοδότηση, σημαντικός για τη

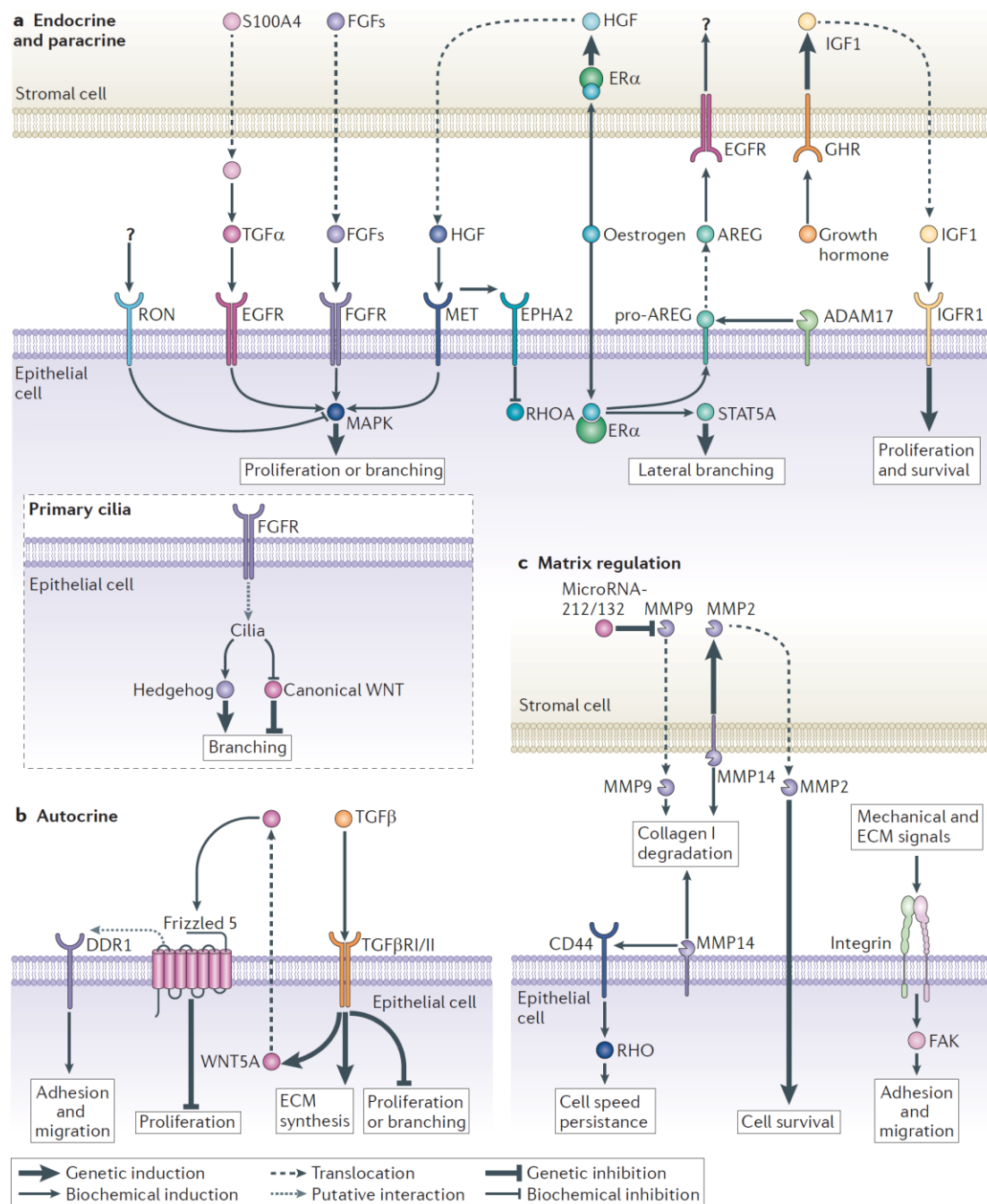


Εικόνα 1.23: Η προέλευση και η γενεαλογία των κυτταρικών τύπων του μαστού. (Su et al. 2011)

λειτουργική διαφοροποίηση είναι και ο ρόλος των γειτονικών κυττάρων και οι διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις μέσα στον ιστό (Nguyen and Neville 1998).

### Η σηματοδότηση στο μαστό

Ποικίλα σηματοδοτικά δίκτυα ρυθμίζουν την μορφογένεση του μαστού κατά τη διάρκεια της εφηβείας (Εικ.1.24). Καθολικά ενδοκρινή σήματα από τις ωθήκες και την υπόφυση ενεργοποιούν μία πληθώρα παρακρινών

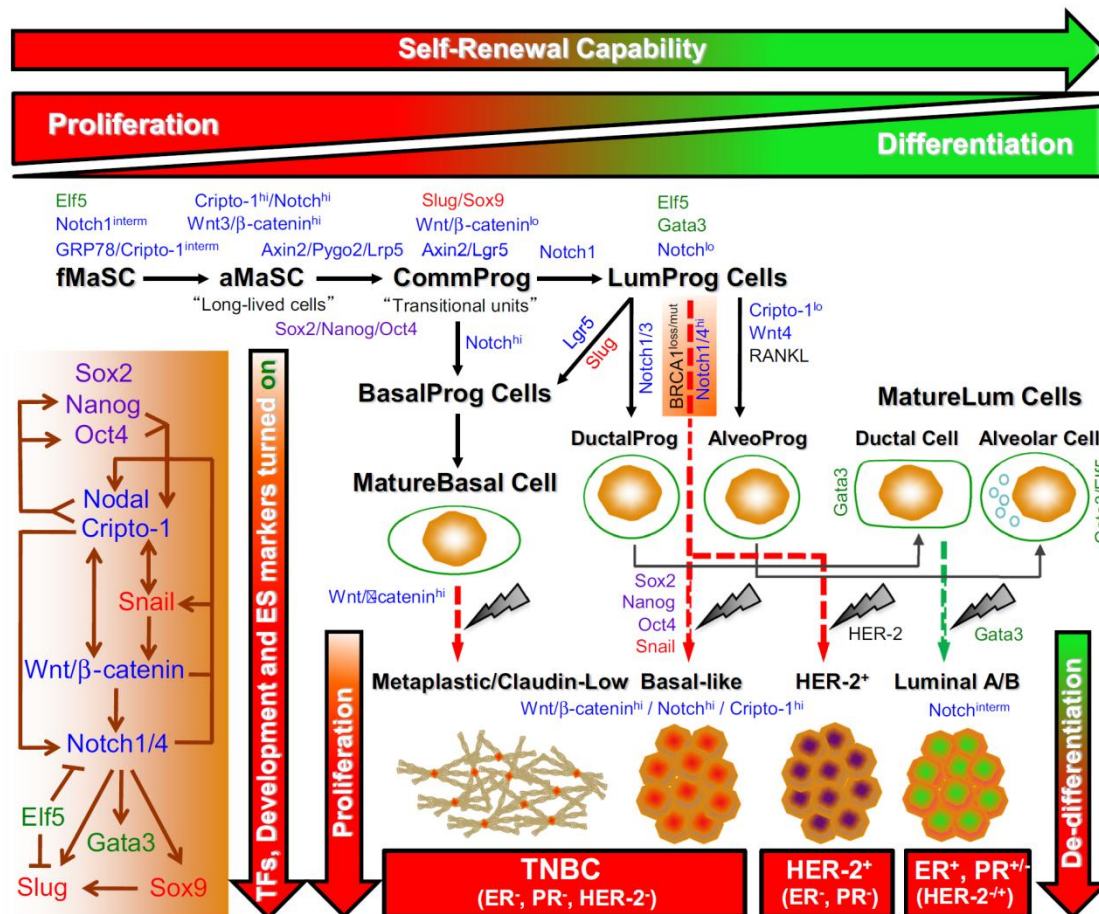


Εικόνα 1.24: Πολλαπλά ολοκληρωμένα δίκτυα σηματοδότησης ρυθμίζουν τη μορφογένεση του μαστού κατά την εφηβεία. (Gjorevski and Nelson 2011)

σηματοδοτικών μονοπατιών για να αρχίσει η μαστική μορφογένεση (Gjorevski and Nelson 2011). Η κυτταρική επικοινωνία μεταξύ επιθηλίου και στρώματος διαμεσολαβείται από αυξητικούς παράγοντες περιλαμβανομένων των IGF1 (insulin-like growth factor 1), HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor) και FGF (fibroblast growth factor), οι οποίοι προσδένονται στους συγγενείς υποδοχείς τους για να επάγουν κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επιβίωση και διακλάδωση (Kleinberg, Feldman, and Ruan 2000; Lu et al. 2008; Wiesen et al. 1999; H.-Z. Zhang et al. 2002). Κλασικά μονοπάτια όπως τα WNT και Hedgehog, που ενεργοποιούνται από σήματα μέσω πρωτογενών βλεφαρίδων, παρουσιάζονται επίσης ως απαραίτητοι ρυθμιστές της διαδικασίας (McDermott et al. 2010). Επιπλέον, αυτοκρινή σήματα, όπως ο TGFβ, χρησιμεύουν ως αρνητικοί ρυθμιστές της μορφογένεσης του μαστού άμεσα, επάγοντας τη σύνθεση του ECM ή τη non-canonical WNT σηματοδότηση, ώστε να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό και πιθανώς να ελέγξουν την κυτταρική προσκόλληση και μετανάστευση (Daniel, Robinson, and Silberstein 1996; Roarty and Serra 2007). Τέλος, η μορφογένεση του μαστικού αδένος καθοδηγείται και κατά ένα μέρος από MMPs (matrix metalloproteinases), όπου εμφανίζουν συγκεκριμένη τοπολογική έκφραση και ενεργότητα κατά τη διάρκεια της εφηβείας, και χρησιμεύουν τόσο στον έλεγχο της κυτταρικής μετανάστευσης και επιβίωσης, όσο και στην αποδόμηση του ECM (Sternlicht and Werb 2001). Η integrin-εξαρτώμενη ECM σηματοδότηση και τα μηχανικά σήματα παρουσιάζονται σαν επιπλέον ρυθμιστές της μαστικής μορφογένεσης (Gjorevski and Nelson 2010; Nagy et al. 2007).

### ***Καρκίνος του μαστού και επιθηλιομεσεγχευματική μετάβαση (EMT)***

Ο καρκίνος του μαστού είναι ο συχνότερος καρκίνος στις γυναίκες και ο δεύτερος πιο θανατηφόρος καρκίνος σε αυτές, με κύριο λόγο τη δημιουργία μετάστασης. Είναι γνωστό ότι ο καρκίνος του μαστού είναι μία ετερογενής ασθένεια που διαχωρίζεται, με βάση τη μικροσκοπική απεικόνιση και το μοριακό προφίλ, σε Luminal A, Luminal B, HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)-εμπλουτισμένο και “basal-like” υποτύπους, καθένας από τους οποίους έχει διαφορετική πρόγνωση και απόκριση στη θεραπεία (Εικ.1.25) (Sørlie et al. 2001; Sotiriou et al. 2003). Οι Luminal A, Luminal B και



Εικόνα 1.25: Υποθετική ιεραρχική οργάνωση των κανονικών μαστικών επιθηλιακών κυττάρων και της πιθανής τους σχέσης με τους καθορισμένους ανθρώπινους μαστικούς καρκινικούς μοριακούς υποτύπους. Μωβ, ES markers; Πράσινο-Κόκκινο, ορισμένοι TFs; Μπλε, σημαντικά αναπτυξιακά σηματοδοτικά μονοπάτια. (Rangel et al. 2016)

HER2-εμπλουτισμένοι όγκοι διατηρούν περισσότερο επιθηλιακά χαρακτηριστικά, ενώ οι “basal-like” όγκοι εκδηλώνουν τόσο “basal”, όσο και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά (Sethi et al. 2011). Τα “basal-like” μαστικά καρκινικά κύτταρα είναι σταθερά πιο διεισδυτικά. Επιπλέον, οι HER2-εμπλουτισμένοι όγκοι είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν μετάσταση. Η συστηματική θεραπεία του καρκίνου του μαστού, που περιλαμβάνει τη συμβατική κυτταροτοξική θεραπεία (fluorouracil, cis-platinum), την ενδοκρινή θεραπεία (tamoxifen) και στοχευόμενους παράγοντες όπως trastuzumab, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μείωση της θνησιμότητας και στην επιμήκυνση του χρόνου ζωής των ασθενών (Hernandez-Aya and Gonzalez-Angulo 2013). Ωστόσο, η αντοχή στους θεραπευτικούς παράγοντες παραμένει σταθερό εμπόδιο στην επιτυχία της θεραπείας (Coley 2008).

Μέχρι σήμερα, το EMT φαινόμενο έχει γίνει η συχνότερη εξήγηση των μακρινών μεταστάσεων στους επιθηλιακούς καρκίνους, περιλαμβανομένου

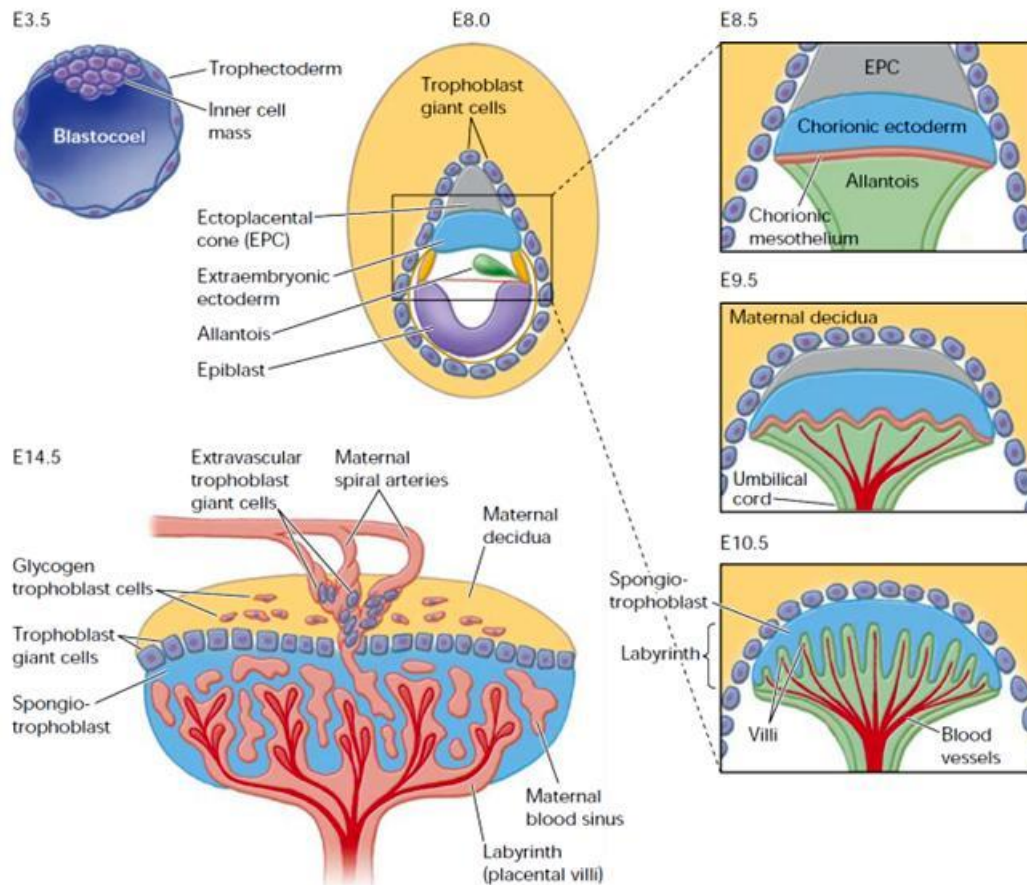
και του καρκίνου του μαστού (Wu, Sarkissyan, and Vadgama 2016). Το EMT και τα βασικά γενικά χαρακτηριστικά του αναλύθηκαν εκτενώς σε παραπάνω ενότητα. Ο καρκίνος του μαστού προέρχεται από τον επιθηλιακό ιστό. Η έκφραση μερικών EMT βιοδεικτών έχει ανιχνευτεί σε μία ποικιλία κλινικών ανθρώπινων καρκινικών ιστών, περιλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Αρκετές μελέτες εξέτασαν με ανοσοϊστοχημεία (IHC) την έκφραση EMT δεικτών όπως Vimentin, N-cadherin, Snail, Slug, Twist και κυτταροκερατινών, σε διάφορους υποτύπους μαστικών καρκινικών ιστών, και παρατήρησαν ότι οι δείκτες αυτοί ήταν πιθανότερο να εκφραστούν στον “basal-like” υπότυπο καρκίνου του μαστού και ότι σχετίζονται με την επιθετικότητα των όγκων (Choi et al. 2013; T. Liu et al. 2013). Έτσι, η έκφραση των EMT δεικτών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των EMT αλλαγών στους μαστικούς καρκινικούς ιστούς. Η cadherin εναλλαγή (E-cadherin<sup>-</sup> / N-cadherin<sup>+</sup> φαινότυπος) βρέθηκε να είναι συχνότερη στον HER2+ υπότυπο καρκίνου του μαστού (Aleskandarany et al. 2014). Συνοψίζοντας, είναι δυνατόν να προσδιοριστούν μερικοί EMT δείκτες για την ταυτοποίηση ενός σαφούς “basal-like” φαινοτύπου μέσα σε έναν υψηλά ετερογενή πληθυσμό καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ωστόσο, μένει να καθοριστεί εάν το EMT είναι μία υποχρεωτική διεργασία για τη δημιουργία της μετάστασης.

## **Ο ΠΛΑΚΟΥΝΤΑΣ**

### ***Γενικά***

Ο πλακούντας είναι ένα εφήμερο αλλά ζωτικό χιμαιρικό όργανο, καθοριστικό για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και επιβίωση, το οποίο εξασφαλίζει την επικοινωνία μητέρας και εμβρύου μέσω του αγγειακού τους δικτύου, συνεισφέροντας στην ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών και αερίων και στην αποβολή μεταβολικών αποβλήτων. Εκτός από το ρόλο του στην ανταλλαγή θρεπτικών και αερίων από τη μητέρα στο έμβρυο, επιπλέον ο πλακούντας έχει ενδοκρινική δράση, εμπλέκεται στην τοπική καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος εμποδίζοντας την απόρριψη του εμβρύου από τη

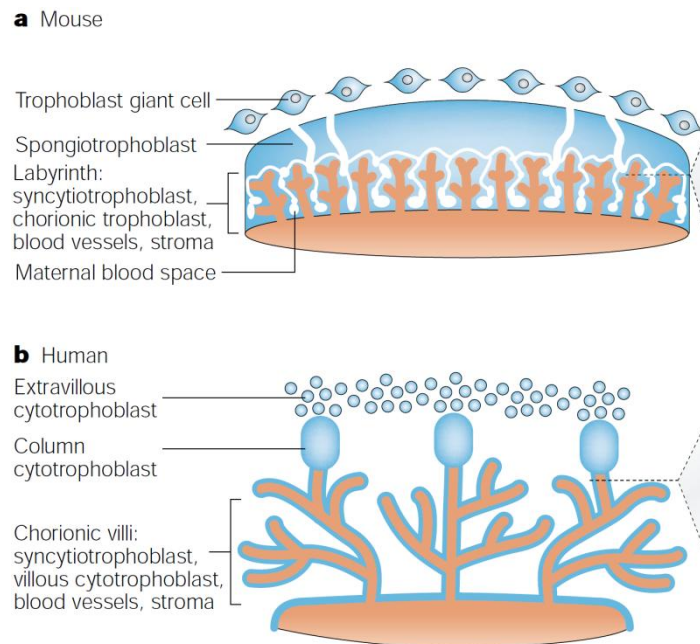




Εικόνα 1.17: Η ανάπτυξη του πλακούντα στο ποντίκι. (E. D. Watson and Cross 2005)

μήτρα και επάγει τη συνεχή παραγωγή προγεστερόνης από το ωχρό σωματίο καθώς και την ανάπτυξη του μαστικού αδένα.

Ο πλακούντας είναι το πρώτο όργανο που σχηματίζεται κατά την ανάπτυξη των θηλαστικών και αποτελείται από τρία μέρη, α) το “τροφοβλαστικό” το οποίο προέρχεται από την τροφοβλαστική γενεαλογία της βλαστοκύστης και αποτελεί το δομικό σκελετό του πλακούντα, β) το “εμβρυϊκό αγγειακό” μέρος το οποίο προέρχεται από το “αλλαντοϊδικό μεσόδερμα” του εμβρύου και γ) το “μητρικό” μέρος το οποίο αποτελείται από τα κύτταρα του “φθαρού” και τα “αγγεία της μητέρας” (Εικ.1.17). Κάθε γενετική αλλαγή ή περιβαλλοντικό ερέθισμα, που επηρεάζουν την ανάπτυξη κάθε ενός από τα τρία αυτά μέρη του πλακούντα καθώς και τη λειτουργία τους, προκαλούν καθυστέρηση στην ανάπτυξη του εμβρύου και πρώιμο εμβρυϊκό θάνατο τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο (Cross 2000; Georgiades, Ferguson-Smith, and Burton 2002; Hemberger and Cross 2001; Rossant and Cross 2001).



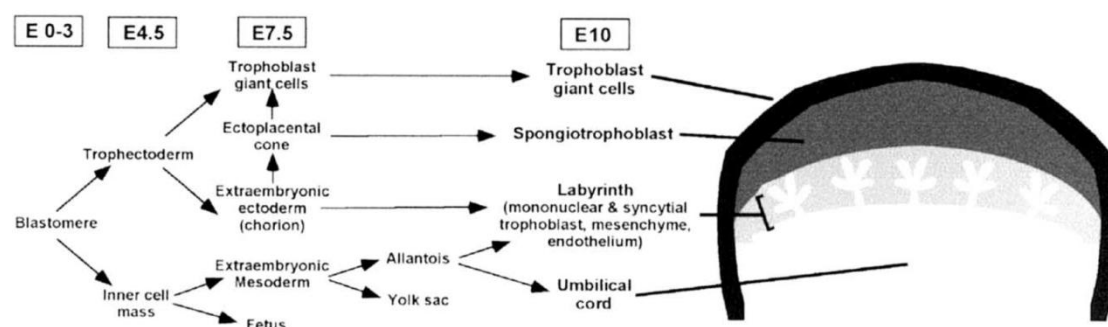
**Εικόνα 1.18:** Σύγκριση της ανατομίας του ποντικίσιου και του ανθρώπινου πλακούντα. (Rossant and Cross 2001)

Παρά τις ανατομικές και ενδοκρινικές διαφορές, οι πλακούντες των ανθρώπων και των τρωκτικών έχουν λειτουργικά ομόλογους κυτταρικούς τύπους και η ανάπτυξή τους ρυθμίζεται από αρκετά παρόμοιους μηχανισμούς (Εικ.1.18) (Cross 2005; Douglas et al. 2009; Malassiné, Frenco, and Evain-Brion 2003). Έτσι, δεδομένων των ηθικών και πρακτικών περιορισμών, ο ποντικίσιος πλακούντας αποτελεί ένα πολύ καλό εναλλακτικό πειραματικό σύστημα, για να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση της ανάπτυξης και ανωμαλιών του ανθρώπινου πλακούντα (Soncin, Natale, and Parast 2015). Οι πιο συχνές διαταραχές που εμφανίζονται στον ανθρώπινο πλακούντα είναι οι αυτόματες αποβολές, η προ-εκλαμψία (διαταραχή κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η οποία χαρακτηρίζεται από υπέρταση, πρωτεϊνουρία και βλάβη στα νεφρά) και ο περιορισμός στην ενδομήτριο ανάπτυξη (IUGR, intrauterine growth restriction). Αν και οι λόγοι που προκαλούν τις διαταραχές αυτές, κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης στον άνθρωπο, είναι άγνωστοι, υπάρχουν ενδείξεις ότι οφείλονται σε διακριτές παθολογίες που επηρεάζουν διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του πλακούντα. Για παράδειγμα η προ-εκλαμψία έχει συνδεθεί με ελαττωματική διαφοροποίηση και διείσδυση των extravillous cytotrophoblasts (ανάλογα των ποντικίσιων “γίγαντιαίων κυττάρων”), ενώ οι αυτόματες αποβολές και η IUGR έχουν συνδεθεί με

περιορισμένη διακλάδωση των χοριακών λάχνων και των αγγείων (Cross 2003).

### Πλακουντογένεση

Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης που λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυογένεση των θηλαστικών είναι ο σχηματισμός του τροφοεκτοδέρματος (TE) και της εσωτερικής μάζας κυττάρων (ICM, inner cell mass) (Εικ.1.19). Το τροφοεκτόδερμα (TE) αποτελεί την πηγή της τροφοβλαστικής γενεαλογίας, όπου στο ποντίκι εμφανίζεται στο στάδιο της βλαστοκύστης (3.5dpc) ως μία επιθηλιακή στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλει την εσωτερική μάζα κυττάρων (ICM) και το βλαστόκοιλο (Εικ.1.17). Μετά την εμφύτευση (4.5dpc) η ICM προορίζεται στο να σχηματίσει όλες τις κυτταρικές γενεαλογίες του εμβρύου, καθώς και μερικές εξωεμβρυϊκές δομές, ενώ το TE προορίζεται στο να σχηματίσει αποκλειστικά το τροφοβλαστικό κυτταρικό μέρος του πλακούντα (Εικ.1.19) (Rossant and Cross 2001). Σε αυτήν την τελευταία διαδικασία, τα κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος διατηρούνται και πολλαπλασιάζονται μέσω ισχυρής FGF σηματοδότησης από την ICM, και έτσι επάγεται ο σχηματισμός διαφορετικών τροφοβλαστικών κυτταρικών τύπων. Οι κύριοι τελεστές αυτής της διαδικασίας έχει δειχθεί ότι είναι το *Fgf4* και ο υποδοχέας του *Fgfr2*. Έτσι τα κύτταρα του TE τα οποία βρίσκονται σε άμεση επαφή με την ICM και αποτελούν το πολικό τροφοεκτόδερμα (polar TE) διατηρούν την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους και σχηματίζουν το εξωεμβρυϊκό εκτόδερμα (EXE, extraembryonic ectoderm) και τον εξωπλακουντικό κώνο (EPC, ectoplacental cone) (Εικ.1.17). Τα υπόλοιπα κύτταρα του TE τα οποία βρίσκονται μακριά από την ICM και αποτελούν το τοιχωματικό τροφοεκτόδερμα (mular TE)



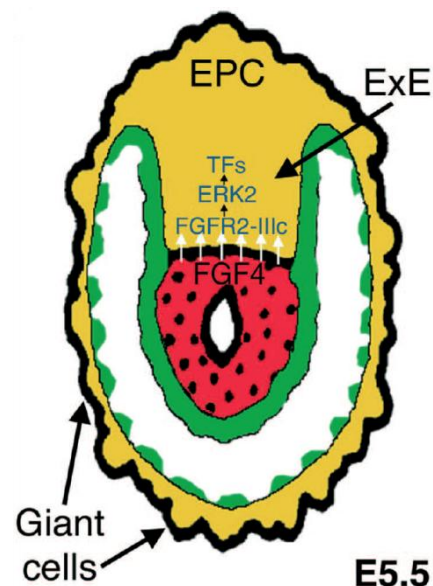
Εικόνα 1.19: Προέλευση όλων των κυτταρικών γενεαλογιών κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης στο ποντίκι και η ανατομική τους θέση στον πλακούντα. (Cross et al. 2002)

σταματούν να πολλαπλασιάζονται και μπαίνουν σε διαδικασία ενδοδιπλασιασμού του DNA τους και παράλληλη αύξηση του μεγέθους του πυρήνα τους, σχηματίζοντας τα πρωτογενή τροφοβλαστικά γιγαντιαία κύτταρα (primary TGCs, trophoblast giant cells). Περισσότερα TGCs σχηματίζονται από τις εξωτερικές περιοχές του EPC τα οποία αποτελούν τα δευτερογενή γιγαντιαία κύτταρα (secondary TGCs) και τελικά μαζί με τα πρωτογενή περιβάλλουν όλο το κύημα, προάγοντας τοπικά και συστηματικά προσαρμογές από τη μητέρα που είναι απαραίτητες για την εμβρυϊκή επιβίωση και ανάπτυξη (Rossant and Cross 2001).

Καθώς προχωρεί η ανάπτυξη (στάδιο 7.5dpc), από το εξωεμβρυϊκό εκτόδερμα (EXE) σχηματίζεται το χοριακό εκτόδερμα (Εικ.1.17). Στο στάδιο αυτό ανάμεσα στο χοριακό εκτόδερμα και τον EPC υπάρχει η ονομαζόμενη κοιλότητα του εξωπλακουντικού κώνου (EPC cav, ectoplacental cone cavity). Το χοριακό εκτόδερμα πολλαπλασιάζεται με πολύ γρήγορους ρυθμούς και αυτό οδηγεί στην επέκταση και την αναδίπλωσή του κεντρικού χοριακού εκτοδέρματος, δίνοντάς του μια θολωτή εμφάνιση. Η αναδίπλωση αυτή οδηγεί τελικά στην ένωση του χοριακού εκτοδέρματος με τον EPC με τελικό αποτέλεσμα την εξαφάνιση της κοιλότητας του εξωπλακουντικού κώνου κατά το στάδιο 7.5-8.0dpc (Downs 2002). Η τελική μορφογένεση του πλακούντα προκύπτει από την σύντηξη των δύο γενεαλογιών του, της τροφοβλαστικής και του αλλαντοϊδικού μεσοδέρματος, διαδικασία που ονομάζεται χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη και πραγματοποιείται στο στάδιο 8.5dpc (Εικ.1.17) (Downs and Gardner 1995). Η αλλαντοΐδα προέρχεται από το εγγύς εκτόδερμα (πρωτογενές εκτόδερμα) που είναι ο ίδιος ιστός που θα δώσει τα “blood islands” του λεκιθικού σάκου, το χοριακό μεσόδερμα και το άμνιον (Downs 1998). Ο σχηματισμός του αγγειακού δικτύου της αλλαντοΐδας ξεκινάει στο στάδιο 7.5dpc. Η αγγείωση επεκτείνεται πρόσθια τελικά φτάνοντας τη βάση της αλλαντοΐδας όπου ενώνεται με το αγγειακό δίκτυο του λεκιθικού σάκου. Τα αιμοφόρα αγγεία της αλλαντοΐδας σχηματίζονται με αγγειοποίηση, δηλαδή με διαφοροποίηση του μεσοδέρματος σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Risau 1997). Καθώς η αλλαντοΐδα μεγαλώνει και επεκτείνεται μέσα στην εξωκοιλωματική κοιλότητα φτάνει τελικά το χόριο με το οποίο συντήκεται περίπου στο στάδιο 8.5dpc, οδηγώντας στην προαναφερθέντα χοριοαλλαντοϊδική σύντηξη (Εικ.1.17) (Downs 2002).

Κατά το στάδιο 8.5-9.0dpc, το αρχικά επίπεδο χοριακό εκτόδερμα αρχίζει να αναδιπλώνεται στις περιοχές όπου το μεσόδερμα της αλλαντοΐδας και τα υποκείμενα σε αυτή εμβρυϊκά αιμοφόρα αγγεία διεισδύουν σε αυτό για να σχηματιστούν απλές λάχνες. Μέσα σε λίγες ώρες οι λάχνες αυτές αρχίζουν να επεκτείνονται και να σχηματίζουν διακλαδώσεις ώστε τελικά να δημιουργηθεί μια πυκνά πακεταρισμένη δομή από τροφοβλαστικά κύτταρα και αγγεία, ο λαβύρινθος (Εικ.1.17). Με την έναρξη της μορφογενετικής διακλάδωσης των αγγείων σχηματίζονται τα συγκυτιοκύτταρα, κύτταρα με πολλαπλούς πυρήνες που προέρχονται από τη σύντηξη μετα-μιτωτικών κυττάρων του χορίου (Rossant and Cross 2001). Ο λαβύρινθος συνεχίζει να αναπτύσσεται μέχρι και λίγες μέρες πριν το τέλος της κύησης (στάδιο, περίπου 17.5dpc). Καθώς ο λαβύρινθος αναπτύσσεται, υποστηρίζεται δομικά από τη σπογγώδη στοιβάδα η οποία αποτελείται από τροφοβλαστικά κύτταρα που προέρχονται από τα κύτταρα του EPC και βρίσκεται ανάμεσα στο λαβύρινθο και τη στοιβάδα των TGCs (Εικ.1.17) (Rossant and Cross 2001).

Γύρω από τη θέση εμφύτευσης της βλαστοκύστης πραγματοποιείται αγγειογένεση καθώς προστίθενται καινούργια μητρικά αγγεία, καθώς και αγγειοδιαστολή που οδηγεί σε αύξηση της αιματικής ροής από τη μητέρα. Η κεντρική αρτηρία της μήτρας διακλαδίζεται σε πολλές μικρότερες αρτηρίες σε κάθε θέση εμφύτευσης οι οποίες διαπερνούν το φθαρτό. Καθώς διαπερνούν τη στοιβάδα των TGCs, τα μητρικά αγγεία συγκλίνουν μεταξύ τους σε λίγα και μεγάλα κανάλια τα οποία δεν περιβάλλονται από ενδοθηλιακά κύτταρα και τα οποία διαπερνούν τη σπογγώδη στοιβάδα για να καταλήξουν στο λαβύρινθο (Cross et al. 2002). Στο λαβύρινθο, τα μητρικά κανάλια



διαχωρίζονται από τα εμβρυϊκά αιμοφόρα αγγεία από τις δύο στοιβάδες των συγκυτιοκυττάρων μέσω των οποίων γίνεται η μεταφορά των θρεπτικών ουσιών και των αερίων ανάμεσα στα μητρικά κανάλια και τα

**Εικόνα 1.20: Μοντέλο διατήρησης πολυδυναμικότητας των TSCs.** E5.5: νωρίς μετά την εμφύτευση του εμβρύου, κόκκινο: επιβλάστη, κίτρινο: extraembryonic ectoderm (ExE), πράσινο: extraembryonic endoderm, TFs: Cdx2, Sox2, Eomes, Esrrb, EPC: ectoplacental cone. (Kunath, Strumpf, and Rossant 2004)

εμβρυϊκά αιμοφόρα αγγεία. Η κυκλοφορία ανάμεσα στα δύο συστήματα καθιερώνεται την ημέρα 10.5dpc με τη δημιουργία από την αλλαντοΐδα της ομφάλιας φλέβας και της ομφάλιας αρτηρίας (Rossant and Cross 2001).

### **Αρχέγονα τροφοβλαστικά κύτταρα (TSCs): *in vivo* και *ex vivo* διατήρηση και διαφοροποίηση**

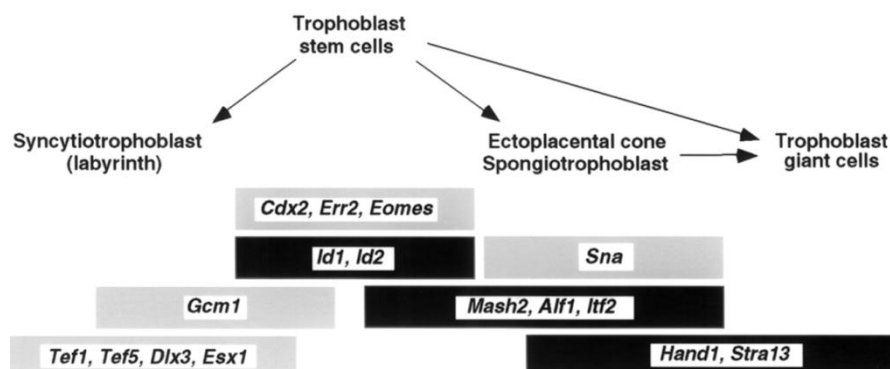
Τα αρχέγονα τροφοβλαστικά κύτταρα (TSCs) βρίσκονται στις περιοχές εκείνες του πλακούντα που αντιστοιχούν στο πολικό τροφεκτόδερμα (3.5dpc), το EXE (6.5dpc) και το χοριακό εκτόδερμα (7.5-8.5dpc) όσο αυτό δεν έχει ακόμη συντηχθεί με τη βάση του EPC, και όχι στην επιβλάστη ή τον EPC (Uy, Downs, and Gardner 2002). Τα κύτταρα αυτά είτε παραμένουν αδιαφοροποίητα σε μία πολυδύναμη κατάσταση, είτε διαφοροποιούνται δίνοντας όλους τους υποκυτταρικούς τύπους της τροφοβλαστικής γενεαλογίας όπως τροφοβλαστικά γιγαντιαία κύτταρα (TGCs), σπογγιο-τροφοβλαστικά κύτταρα (SpT cells), συγκυτιο-τροφοβλαστικά κύτταρα (SynT cells) του λαβυρίνθου και τροφοβλαστικά κύτταρα γλυκογόνου (GlyT cells) (Εικ.1.19). Τα SpT κύτταρα μπορεί να είναι πρόδρομοι των GlyT και TG κυττάρων.

Αξιοσημείωτα, οι *in vitro* μηχανισμοί διαφοροποίησης των TSCs μιμούνται τους *in vivo* μηχανισμούς, καθιστώντας τα TSCs ως ένα πολύ καλό μοντέλο *in vitro* μελέτης των παραγόντων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίησή της τροφοβλαστικής γενεαλογίας. Για τον σκοπό αυτό, τα TSCs απομονώνονται από τις περιοχές που βρίσκονται και αναφέρθηκαν παραπάνω και καλλιεργούνται *in vitro*. Η *ex vivo* διατήρηση του χαρακτήρα των ποντικίστων TSCs εξαρτάται από τη διέγερση με FGF4 (Erlebacher, Price, and Glimcher 2004; Kubaczka et al. 2014; Tanaka et al. 1998). Το FGF/MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι είναι αδιαμφισβήτητα κρίσιμο για τον πρώιμο τροφοβλαστικό πολλαπλασιασμό, αφού η ενεργοποίησή του προκαλεί την αύξηση των TSCs δεικτών, προάγοντας την τροφοβλαστική μοίρα. Ο FGF4 αυξητικός παράγοντας δρα προσδένοντας τον υποδοχέα FGFR2, ενεργοποιώντας το RAS/MAPK1 (ERK2) μονοπάτι (Εικ.1.20) (Kunath et al. 2004). Τα *Fgf4* *-/-* (Feldman et al. 1995) και *Fgfr2* *-/-* (Arman et al. 1998) έμβρυα σταματούν την ανάπτυξή τους στο στάδιο της βλαστοκύστης, αφού πεθαίνουν αμέσως μετά την εμφύτευση, και

παρουσιάζουν πρόβλημα στην ανάπτυξη της τροφοβλαστικής γενεαλογίας. Απουσία του FGF4, τα TSCs σταματούν να πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται κυρίως σε TGCs και πολύ λιγότερο σε SpT και SynT κύτταρα (Tanaka et al. 1998). Η έκφραση του *Fgfr2* στα TSCs καταστέλεται καθώς αυτά διαφοροποιούνται (Rossant and Cross 2001). Επιπρόσθετα, η αναστολή της MAPK σηματοδότησης μπλοκάρει την αυτό-ανανέωση, προάγοντας τη διαφοροποίηση και εμποδίζει την εμφάνιση των TSCs στη βλαστοκύστη του ποντικού (Corson et al. 2003; Daoud et al. 2005). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι επιπλέον ο FGF2 μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του πλακούντα και να υποστηρίζει τον TS χαρακτήρα πιο αποτελεσματικά από τον FGF4 (Ohinata and Tsukiyama 2014). Περιέργως, παρά τον κυρίαρχο ρόλο των FGFs στην ανάπτυξη του πλακούντα, πολύ λίγα είναι γνωστά μέχρι τώρα σχετικά με τη ρύθμισή τους στη διαδικασία αυτή.

Αξιοσημείωτα, διάφορα μέλη της TGFβ υπερ-οικογένειας, όπως TGFβ, NODAL ή ACTIVIN, μπορούν να μιμηθούν τη δράση του προερχόμενου από MEFs θρεπτικού μέσου, και να διατηρήσουν την TS πολυδυναμικότητα παρουσία FGF4. Το NODAL θεωρείται ότι μπορεί να διατηρήσει τον EXE χαρακτήρα παρουσία FGF4 (Guzman-Ayala et al. 2004). Τα ACTIVIN και TGFβ διατηρούν και τα δύο τα TSCs, ενώ απουσία FGF4 έχουν διαφορετικές δράσεις στα TSCs. Πιο συγκεκριμένα, η ACTIVIN προάγει τη διαφοροποίηση προς τα τροφοβλαστικά κύτταρα του λαβυρίνθου (SynT cells), ενώ ο TGFβ προάγει τη διαφοροποίηση προς τα TGCs (Erlebacher, Price, and Glimcher 2004; Natale et al. 2009).

Η διατήρηση ή διαφοροποίηση των TSC απομονωμένων κυτταρικών τύπων ρυθμίζεται από χαρακτηριστικούς μεταγραφικούς παράγοντες, που λειτουργούν και σαν δείκτες των κυτταρικών αυτών τύπων (Εικ.1.21). Το



Εικόνα 1.21: Πρότυπο έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων των τροφοβλαστικών κυτταρικών τύπων. Σε μαύρο κουτί απεικονίζονται bHLH TFs. (Cross 2000)

πρότυπο γονιδιακής έκφρασης των TSCs *in vitro* είναι αντιπροσωπευτικό με αυτό του EXE της τροφοβλάστης *in vivo*. Έτσι, όταν τα TSCs διατηρούνται σε συνθήκες πολυδυναμικότητας εκφράζουν τους EXE-ειδικούς γονιδιακούς δείκτες, όπως *Cdx2* (Caudal type homeobox 2), *Eomes* (Eomesodermin) και *Esrrβ* (Estrogen receptor-related receptor β). Στη συνέχεια, κατά τη διαφοροποίησή τους τα TSCs καταστέλλουν την έκφραση των παραπάνω EXE γονιδιακών δεικτών και επάγουν την έκφραση των EPC/σπογγιο-τροφοβλαστικών δεικτών *Mash2* (Mammalian achaete-scute homologous protein-2) και *4311/Trbpa* (Trophoblast-specific protein alpha), καθώς και των TGCs δεικτών *Hand1* (Heart and neural crest derivatives expressed transcript 1) και *Pl1* (Placental lactogen-1). Τέλος, κατά τη διάρκεια επίσης της διαφοροποίησης επάγεται και η έκφραση των συγκυτιο-τροφοβλαστικών δεικτών του λαβυρίνθου, όπως *Gcm1* (Glial cells missing-1), *Tfeb* (Transcription factor EB), *Cx26* (gap junction protein, beta 2), *Dlx3* (Distal-less homeobox 3), *Esx1* (Extraembryonic, spermatogenesis, homeobox 1), *Syn-a/b* (Syncytin-a/b) (Hughes et al. 2004; Rossant and Cross 2001; Tanaka et al. 1998).



## 2. Υλικά και Μέθοδοι

## ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### **Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων**

Η κυτταρική σειρά EpRas και όλα τα παράγωγά της αναπτύχθηκαν σε “DMEM, high glucose (4.5mg/L), GlutaMAX™, pyruvate” (Gibco), επιπλέον με 4% εμβρυϊκό ορό βοδιού (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT) και 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.

Τα πρωτεύοντα εμβρυϊκά ινοβλαστικά κύτταρα του ποντικού (primary MEFs) αναπτύχθηκαν σε “DMEM, high glucose (4.5mg/L), GlutaMAX™, pyruvate” (Gibco), επιπλέον με 10% εμβρυϊκό ορό βοδιού (FBS; Hyclone Laboratories, Logan, UT) και 100μM β-μερκαπτοαιθανόλης.

Οι τροφοβλαστικές κυτταρικές σειρές (TSCs) διατηρούνταν σε αδιαφοροποίητη κατάσταση σε 70% EMFI-CM (mouse embryonic fibroblast conditioned medium), 30% TS medium (RPMI, 20%FBS, 100μM β-μερκαπτοαιθανόλης, 1mM sodium pyruvate), 25ng/ml FGF4 και 1μg/ml heparin. Για τη διαφοροποίηση των TSCs, στρώνονταν  $2 \times 10^5$  κύτταρα σε 60mm τρυβλίο και το παραπάνω θρεπτικό μέσο αλλάζονταν 24 ώρες μετά (day 0) με 80%RPMI, 20%FBS.

Η κυτταρική σειρά HeLa αναπτύχθηκε σε DMEM χαμηλής συγκέντρωσης γλυκόζης (1 mg/L) παρουσία 10% ορού βοδιού.

Τα πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (PMECs) αναπτύχθηκαν σε DMEM-F12 GlutaMAX™ (Gibco), με επιπλέον 5%FBS, 10ng/ml EGF, 10μg/ml insulin, 1μg/ml hydrocortisone και 50 μg/ml gentamycin. Η καλλιέργειά τους έγινε σε πιάτα επικαλυμμένα με κολλαγόνο.

Σε όλα τα παραπάνω θρεπτικά υλικά προστέθηκε μίγμα αντιβιοτικών πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Gibco) σε συγκέντρωση 50μg/ml. Στα πειράματα στέρησης ορού (για την πυρηνική μετατόπιση του ERF), το πλήρες θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και, αφού πραγματοποιήθηκαν 2 πλυσίματα με PBS, αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό, και παρουσία 10mM HEPES. Βέβαια, για τα EpRas κύτταρα που έχουν μονίμως ενεργό το Ras σηματοδοτικό μονοπάτι, αντί για στέρηση ορού χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της Mek1/2 UO126 (Cell Signalling #9903) σε τελική συγκέντρωση 10μM. Η καλλιέργεια όλων των κυτταρικών σειρών

πραγματοποιήθηκε σε ειδικό επωαστήρα με συνθήκες 37°C, 5%CO<sub>2</sub> και υγρή ατμόσφαιρα. Όλοι οι χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε ειδικό απαγωγό κυτταροκαλλιιεργειών.

### **Ανασύσταση (passaging) κυττάρων**

Ανασύσταση (passaging) των κυτταρικών σειρών γινόταν όταν ο βαθμός συρροής στο πιάτο (confluency) έφτανε το 90%. Τα κύτταρα αφού ξεπλένονταν με διάλυμα PBS, επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 37°C παρουσία 25μl/cm<sup>2</sup> διαλύματος τρυψίνης (0,25% Trypsin/1mM EDTA, Gibco) μέχρι να αποκολληθούν. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνταν (1200rpm/3min/θερμοκρασία δωματίου) και η πελέτα (κυτταρικό ίζημα) επαναδιαλύονταν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Από το κυτταρικό εναιώρημα μεταφερόταν τμήμα (1:4-1:8 αραίωση) σε καινούργιο πιάτο με φρέσκο θρεπτικό μέσο τελικού όγκου 250μl/ cm<sup>2</sup> και τα κύτταρα τοποθετούνταν στον επωαστήρα για να προσκολληθούν στο πιάτο και να αρχίζουν να αναπτύσσονται.

### **Πάγωμα κυττάρων**

Απόθεμα κυτταρικών σειρών διατηρούνταν σε κατάλληλο μέσο στους -80°C. Συγκεκριμένα, μετά την τρυψινοποίηση, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στις 1200 rpm. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε φρέσκο. Κατόπιν, προστέθηκε στάγδην ίσος όγκος 2X θρεπτικού υλικού παγώματος. Τα κύτταρα μοιράστηκαν σε ειδικά σωληνάρια σε ποσότητες του 1ml και τοποθετήθηκαν σε ειδικά δοχεία στους -80°C, προκειμένου να παγώσουν σταδιακά (-1°C/min). Το ξεπάγωμα των κυττάρων γινόταν με επώαση τους για 1min σε υδατόλουτρο 37°C και τοποθέτησή τους σε πιάτο με φρέσκο θρεπτικό μέσο, το οποίο ανανεωνόταν κάθε 48-72 ώρες.

#### 2X Θρεπτικό υλικό παγώματος

EpRas, MEFs, HeLa	TSCs
60% πλήρες θρεπτικό υλικό	30% TS θρεπτικό υλικό
20% DMSO (προστίθεται στάγδην)	20% DMSO (προστίθεται στάγδην)
20% εμβρυϊκός ορός βοδιού (FBS)	50% εμβρυϊκός ορός βοδιού (FBS)

**Απομόνωση εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικού (MEFs)**

Θηλυκά ποντίκια, που βρίσκονταν στη μέρα 13.5dpc της εγκυμοσύνης, θυσιάστηκαν ακαριαία με αποκόλληση του νωτιαίου μυελού και στη συνέχεια τα έμβρυα χωρίστηκαν από τον πλακούντα. Αφαιρέθηκαν το κεφάλι και το συκώτι που περιέχουν πολλά ανεπιθύμητα νευρικά και αιμοποιητικά κύτταρα αντίστοιχα και το υπόλοιπο έμβρυο τοποθετήθηκε σε πλήρες θρεπτικό υλικό σε ένα τρυβλίο. Στη συνέχεια, το εναπομείναν έμβρυο τεμαχίστηκε σε μικρά κομματάκια με τη βοήθεια ξυραφιού-λεπίδας, αποδιοργανώθηκε με συνεχές πιπετάρισμα και τα κυτταρικά οργανίδια αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε κανονικές συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας, ώστε να προκύψουν πλέον τα μονά επιθυμητά κύτταρα MEFs.

Πιο λεπτομερώς, μετά τον τεμαχισμό και αποδιοργάνωση 8-10 εμβρύων που προέρχονται από μία έγκυο ποντίκινα, συλλέγουμε το εναιώρημα των κυττάρων σε 50ml σωλήνα και αφήνουμε σε ηρεμία για 2 λεπτά ώστε τα μεγάλα κομμάτια των ιστών να κατακαθίσουν. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε καθαρό σωλήνα και φυγοκεντρούμε (1000rpm, 7min). Επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε 20ml θρεπτικό και καλλιεργούμε σε φλάσκα T75, στους 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Χρειάζεται 2-3 ημέρες για να καλύψουν το 100% της επιφάνειας της φλάσκας και τότε ακολουθεί πέρασμα των κυττάρων 1:4. Όταν τα κύτταρα καλύψουν το 100% της επιφάνειας κάθε φλάσκας ξεπλένουμε 2 φορές με PBS και στη συνέχεια προσθέτουμε τρυψίνη στην οποία επωάζουμε τα κύτταρα για 2-3 λεπτά. Αδρανοποιούμε την τρυψίνη με θρεπτικό και με διαδοχικά πιπεταρίσματα διαχωρίζουμε τα κύτταρα. Φυγοκεντρούμε (1000rpm, 5min) και επαναδιαλύουμε το ίζημα των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό. Παγώνουμε τα 3/4 των κυττάρων (1 φλάσκα/vial) αναμιγνύοντας 1 όγκο κυττάρων με 1 όγκο 2x freezing υλικό. Κρατάμε την άλλη φλάσκα για να επεκτείνουμε τον αριθμό των MEFs με σταδιακά περάσματα 1:4 κάθε φορά. Τα MEFs είναι κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μέχρι 5-6 περάσματα αφού έκτοτε χάνουν το δυναμικό του πολλαπλασιασμού και μπαίνουν στο στάδιο της ηρεμίας (senescence).

**Απομόνωση πρωτογενών μαστικών επιθηλιακών κυττάρων ποντικού (PMECs)**

Θηλυκά παρθένα ποντίκια, ηλικίας 10-12 εβδομάδων, θυσιάστηκαν ακαριαία με αποκόλληση του νωτιαίου μυελού και τοποθετήθηκαν κάπου σταθερά με την κοιλιακή πλευρά προς τα επάνω, ώστε να ακολουθήσει η απομόνωση του μαστού. Κάθε φορά απομονωνόταν το 4<sup>ο</sup> ζεύγος μαστών (inguinal) από 5 περίπου ποντίκια, οπότε αφού πλένονταν με 70% αιθανόλη η κοιλιακή χώρα, γινόταν προσεκτικά επιφανειακή τομή, χωρίς εισχώρηση στο περιτόναιο, κατά μήκος της κοιλιάς από το στέρνο μέχρι κάτω στα πόδια. Με τη βοήθεια λαβίδων “ξεφλουδιζόταν” το δέρμα και άνοιγε σαν πουκάμισο ώστε να αποκαλυφθεί ο 4<sup>ος</sup> μαστός που βρισκόταν προσκολλημένος στην εσωτερική πλευρά του δέρματος. Στη συνέχεια, μετά από αφαίρεση του λεμφαδένα, απομονωνόταν προσεκτικά ο μαστός αποφεύγοντας την πρόκληση αιμορραγίας, ζυγίζονταν (περίπου 0.2gr το ζεύγος μαστών ανά ποντίκι) και τοποθετούνταν σε θρεπτικό DMEM-F12 GlutaMAX (Gibco).

Κατόπιν, σε στείρες πλέον συνθήκες στον απαγωγό κυτταροκαλλιιεργειών, ο κάθε μαστός εμβαπτιζόταν σε 70% αιθανόλη για περαιτέρω αποστείρωση και μετά τοποθετούνταν σε φρέσκο θρεπτικό DMEM-F12, όπου σε στείρο τρυβλίο petri τεμαχίζονταν με τη βοήθεια λεπίδας-ξυραφιού σε όσο το δυνατόν μικρότερα κομμάτια (μεγέθους 1mm) και τα κομμάτια αυτά συλλέγονταν σε 50ml falcon με 15ml ανά gr ιστού διαλύματος διάσπασης-λύσης (0.2% Collagenase, 5% FCS, 5μg/ml Gentamycin διαλυμένα σε DMEM-F12). Μετά το πέρας του τεμαχισμού όλων των μαστών, ακολουθούσε επώαση του 50ml falcon στους 37<sup>o</sup>C για 4hrs υπό ανακίνηση σε shaker (100rpm) και τοποθετημένο υπό γωνία για καλύτερη ανάδευση και επιπλέον ενδιάμεσες αναδεύσεις στο vortex κάθε ώρα.

Μετά την διάσπαση-λύση των κομματιών του μαστού με την κολλαγενάση και τη δημιουργία ενός κυτταρικού εναιωρήματος, συμπληρώνονταν τα 15ml του falcon με ακόμα 15ml DMEM-F12 και φυγοκεντρούνταν (400g, 10min). Μετά τη φυγοκέντρηση, το πάνω μέρος του διαλύματος αποτελούσε τη λιπαρή στοιβάδα, η οποία όμως περιείχε και κάποια κυτταρικά επιθηλιακά οργανίδια. Οπότε μεταφέρονταν 10ml από το πάνω μέρος σε ένα καθαρό 15ml falcon και το κυτταρικό ίζημα

επαναδιαλύονταν σε άλλα 10ml DMEM-F12 σε ένα 2<sup>ο</sup> 15ml falcon. Τα δύο 15ml falcons φυγοκεντρούνταν (400g, 10min) και τα δύο ιζήματα με τα κυτταρικά οργανίδια επαναδιαλύονταν διαδοχικά συνολικά σε 4ml DMEM-F12 και ενώνονταν σε καθαρό 15ml falcon. Προστίθονταν 40μl DNase-I (2U/ml) και ανακινούνταν για 2-5min σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, προστίθονταν 6ml DMEM-F12 και φυγοκεντρούνταν (400g, 10min). Στη συνέχεια, προκειμένου να διαχωριστούν τα επιθηλιακά κύτταρα από τους ινοβλάστες, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύονταν σε 8ml PBS/5%FCS και πραγματοποιούνταν 7-8 κύκλοι σύντομων φυγοκεντρίσεων (400g, 20sec), καταλήγοντας σε έναν πληθυσμό επιθηλιακών κυτταρικών οργανιδίων.

Θέλοντας συνήθως όμως, να καταλήξουμε σε έναν πληθυσμό μονών επιθηλιακών κυττάρων (single cells), την τελευταία φορά το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύονταν σε 10ml Joklik's medium (Ca-free) και επωάζονταν για 15min στους 37<sup>o</sup>C. Μετά από φυγοκέντρηση (400g, 10min), τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε 2ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) με 0.05% trypsin και επωάζονταν για 5min στους 37<sup>o</sup>C. Κατόπιν, μετά από έντονο πιπετάρισμα προστίθονταν 5ml DMEM-F12 με 50μl DNase-I (2U/ml) και επωάζονταν για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Για να σταματήσει η αντίδραση της DNase, προστίθονταν 7ml DMEM-F12/10%FCS και ακολουθούσε φυγοκέντρηση (400g, 10min). Τέλος, τα επιθηλιακά κύτταρα επαναδιαλύονταν σε DMEM-F12/10%FCS στον πάγο, περνούσαν από 70μm cell strainer-φίλτρο (BD) και μετριόντουσαν, όντας πλέον έτοιμα για καλλιέργεια ως single cells σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

### **3D καλλιέργεια κυττάρων σε γέλη κολλαγόνου**

Για την καλλιέργεια κυττάρων μέσα σε γέλη κολλαγόνου, κύτταρα και "rat tail collagen I" (BD Biosciences) αναμίχτηκαν σε πάγο και 100μl σταγόνες που περιείχαν 1500 κύτταρα και τελική συγκέντρωση κολλαγόνου 1.5 mg/ml απλώθηκαν σε 17-mm "24-well plate". Μετά την πήξη της γέλης σε θερμοκρασία δωματίου για 30min σε επίπεδη επιφάνεια, τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα (37<sup>o</sup>C, CO<sub>2</sub>) για 2h, και μετά συμπληρώθηκαν με 500μl θρεπτικού υλικού απουσία ορού και καλλιεργήθηκαν για κάποιες ημέρες.

**Μόνιμη επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων**

ErRas κύτταρα επιμολύνθηκαν μόνιμα με pLKO.1-Semaphorin-7a-siRNA πλασμιδιακό φορέα (Thermo Scientific, Waltham, MA, Cat.No.RMM4534), χρησιμοποιώντας ως μέσο Lipofectamine 2000™ (Invitrogen) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι κλώνοι επιλέχθηκαν για 7-10 ημέρες με βάση την ανθεκτικότητά τους σε αντιβιοτικό 4 mg/ml puromycin. Οι επιζήσαντες κλώνοι μαζεύτηκαν και αναπτύχθηκαν παρουσία του αντιβιοτικού και ελέγχθηκαν για την έκφραση του διαγονιδίου και των *Sema7a* mRNA επιπέδων.

**Παροδική επιμόλυνση ευκαρυωτικών κυττάρων**

Η παροδική διαμόλυνση των HeLa κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου.  $10^5$  κύτταρα ανά τρυβλίο 35mm (well) μεγάλωσαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό, ολονύκτια. Την επόμενη μέρα αλλάχθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού εμπλουτισμένου με 10mM HEPES pH 7, 1-4 ώρες πριν τη διαμόλυνση. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν ως εξής: 3μg συνολικού πλασμιδιακού DNA αναμίχθηκαν με νερό ώστε ο τελικός όγκος να είναι 75μl. Προστέθηκαν άλλα 75μl 0.5M προσφάτως παρασκευασμένου χλωριούχου ασβεστίου ( $\text{CaCl}_2$ ) και το μείγμα προστέθηκε στάγδην από ψηλά σε 150μl παγωμένου διαλύματος H που βρίσκονται σε ένα τρυβλίο ενός 24-well πιάτου. Το ίζημα αφέθηκε να σχηματιστεί για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε στάγδην από ψηλά στα κύτταρα. Ύστερα από ολονύκτια επώαση του ιζήματος με τα κύτταρα, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με PBS. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 3 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα αφέθηκαν να μεγαλώσουν για 24-30 ώρες.

Διάλυμα 10X HBSS

1.37M NaCl

0.05M KCl

0.007M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 

0.06M Δεξτρόζη

Διάλυμα H38 ml  $\text{H}_2\text{O}$ 

10 ml 10X HBSS

2 ml 1M HEPES pH 7

το pH ρυθμίζεται στο 7-7.1 με HCl

(όλα τα διαλύματα είναι φιλτραρισμένα σε 0.22μm φίλτρα)

## **Μεταγωγή ανασυνδιασμένων αδενοϊών σε κύτταρα (*virus transduction*)**

Αμέσως μετά την απομόνωσή τους από το μαστό του ποντικού, τα PMECs κύτταρα, πριν ακόμη στρωθούν και προσκολληθούν στα πιάτα καλλιέργειας, μολύνονταν σε εναιώρημα με τον εκάστοτε ανασυνδιασμένο αδενοϊό. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί αδενοϊοί, ένας που εξέφραζε GFP και Cre recombinase (Ad-Cre-GFP, Vector Biolabs, Cat.No.1700) και ένας που εξέφραζε μόνο GFP σαν δείγμα “control” (Ad-GFP, από εργαστήριο κ. Καρδάση, Ιατρικής Κρήτης). Στη συνέχεια, μετά την απομόνωσή τους (ως single cells), τα κύτταρα μετριόντουσαν και μολύνονταν σε 1.5ml μικροσωληνάριο erpendorf με κατάλληλη συγκέντρωση αδενοϊού (από MOI-10 έως MOI-100) και σε κατάλληλο όγκο θρεπτικού απουσία ορού (0.5-1 ml ανά 200.000 κύτταρα). Τα κύτταρα επωάζονταν στους 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub> παρουσία του ιού για 1.5hrs με παράλληλη ανακίνηση κάθε 10-15min. Κατόπιν ο ιός αφαιρούνταν, προστίθονταν πλήρες θρεπτικό μέσο με 5% ορό και τα κύτταρα στρώνονταν σε κατάλληλα τρυβλία καλλιέργειας και συνέχιζαν να επωάζονται στους 37<sup>0</sup>C, 5%CO<sub>2</sub>, μέχρι το τέλος του πειράματος.

## **ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΠΟΥΛΩΣΗΣ ΠΛΗΓΗΣ (WOUND HEALING ASSAY)**

10<sup>5</sup> ErRas κύτταρα στρώθηκαν σε 35mm πιάτα και αναπτύχθηκαν για 3 ημέρες παρουσία ή απουσία 5 ng/ml TGF-β1 (Preprotech). Οι γεμάτες πλέον καλλιέργειες χαραχτηκαν με ένα 1000μl-ripper-tip και το κλείσιμο του κενού από τα μεταναστεύοντα κύτταρα παρακολουθήθηκε κάτω από ανάστροφο μικροσκόπιο φάσης-αντίθεσης και κατόπιν φωτογραφήθηκε και μετρήθηκε στις 0, 6 και 16h μετά τη χάραξη.

## **ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ**

10<sup>5</sup> κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν όπως περιγράφηκε παραπάνω σε πιάτο 6 θέσεων. Μετά το τέλος της διαδικασίας, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με 2 ml διαλύματος PBS και εν συνεχεία επωάστηκαν σε 1 ml



διαλύματος PBS-0.5mM EDTA για 1 περίπου λεπτό. Αναμίχθηκαν με πιπέτα και μεταφέρθηκαν σε 1.5ml μικροσωληνάρια errendorf. Φυγοκεντρήθηκαν για μισό λεπτό στις 13000 rpm και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε σε 100μl διαλύματος λύσης RLB (Promega). Το διάλυμα επωάστηκε στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για 10-20 λεπτά (σε αυτό το σημείο, το δείγμα μπορεί να κρατηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα) και μεταφέρθηκε κατευθείαν στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 1-2 λεπτά, μέχρι να ξεπαγώσει. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό, στις 13000rpm και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο μικροσωληνάριο.

### **Μέτρηση ενεργότητας λουσιφεράσης**

Σε 20 μl του παραπάνω εκχυλίσματος κυττάρων προστέθηκαν 20 μl αντιδραστήριου λουσιφεράσης (Promega) και το δείγμα μετρήθηκε αμέσως σε ειδικό όργανο (illuminometer).

### **Μέτρηση ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης**

Σε 80 μl από το κυτταρικό εκχύλισμα προστέθηκαν 550 μl διαλύματος αντίδρασης/reaction buffer (60mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10mM KCl, 1mM  $\text{MgSO}_4$ ), 100 μl διαλύματος ONPG (ο-νιτρο-φαινυλο-β-D-γαλακτο-πυρανοσίδιο, stock 4mg/ml) και 1.25 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (stock 14.3M). Το διάλυμα επωάστηκε στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι να κιτρινίσει και η αντίδραση τερματίστηκε με 200 μl διαλύματος 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Τέλος, μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 410 nm (0.1-1).

## **ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ-ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ (MTT ASSAY)**

Η MTT ανάλυση είναι στην πραγματικότητα μία μέτρηση της μεταβολικής ενεργότητας των κυττάρων και συγκεκριμένα των μιτοχονδρίων που μεταβολίζουν την ουσία, άρα και κατ' επέκταση μία μέτρηση κυτταρικής επιβίωσης-πολλαπλασιασμού.

Τα κύτταρα (πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα, PMECs) ήταν σε 96-well πιάτο και σε κατάλληλους χρόνους αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο και προστέθηκε 100μl/well φρέσκου θρεπτικού μαζί με MTT διάλυμα (3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide), συγκέντρωσης 100µg/ml. Τα κύτταρα συνέχισαν να επωάζονται στους 37<sup>0</sup>C για 2-4hrs μέχρι να παρατηρηθούν μωβ ιζήματα (formazan). Στη συνέχεια αφαιρέθηκε προσεκτικά με σύριγγα το υπερκείμενο, προστέθηκε 200µl DMSO και αναδεύτηκε μέχρι να γίνει ομοιογενές. Τέλος, ακολούθησε μέτρηση σε φωτόμετρο ELISA στα 570nm.

## **ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ (FACS)**

Τα κύτταρα (πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα, PMECs) αφού ξεπλένονταν με διάλυμα PBS, επωάζονταν στους 37<sup>0</sup>C παρουσία 25µl/cm<sup>2</sup> διαλύματος τρυψίνης (0,25% Trypsin/1mM EDTA, Gibco) μέχρι να αποκολληθούν. Από τη στιγμή που τα κύτταρα είχαν ήδη μολυνθεί με αδενοϊό που εξέφραζε τη φθορίζουσα χρωστική GFP, δεν υπήρχε λόγος χρήσης κάποιου αντισώματος για κάποια περαιτέρω χρώση και ήταν έτοιμα για μέτρηση. Έτσι, κατόπιν διάλυσης των κυττάρων σε διάλυμα PBS με 2%PFA, καταμετρήθηκε η φθορίζουσα ουσία GFP, σε μηχανήμα FACSCalibur (BD).

## **ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ**

### ***Ανοσοφθορισμός σε κυτταρικές σειρές***

Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS για 5 λεπτά και μονιμοποιούνται σε μεθανόλη/ακετόνη (1:1) για 10 λεπτά στους -20<sup>0</sup>C. Στη συνέχεια ξεπλένονται 1 φορά με PBS και 2 φορές με TBST (50mM Tris-HCl pH 8.0, 138mM NaCl, 27mM KCl, 0.05% Tween-20) (5 λεπτά ανά πλύση). Ακολουθεί blocking σε TBST/normal goat serum 10%, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση. Μετά από 2-3 πλύσεις 5 λεπτών με TBST, τα κύτταρα επωάζονται με το πρωτεύον αντίσωμα (διαλυμένο σε TBST/normal goat serum 1%), για 30 λεπτά στους 37<sup>0</sup>C ή όλη τη νύχτα, στους 4<sup>0</sup>C. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με TBST και επώαση με το δευτερεύον αντίσωμα (διαλυμένο σε TBST) για 1.5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από 3 πλύσεις 5 λεπτών με TBST και μία γρήγορη με PBS, ακολουθεί σήμανση των πυρήνων με TO-PRO-3 (1:1000 σε PBS) για 5 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου. Τέλος, τα κύτταρα επικαλύπτονται (mounting) με το διάλυμα Mowiol και στεγνώνουν για 15-20 λεπτά στους 37<sup>0</sup>C και είναι έτοιμα για παρατήρηση και φωτογράφιση σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser, Leica TCS SP2 (confocal microscopy).

Πρωτεύοντα αντισώματα

- Mouse monoclonal anti-E-Cadherin, 1:1000 (BD Transduction Laboratories)
- Rabbit polyclonal anti-Fibronectin, 1:500 (Santa Cruz Biotechnology)
- Mouse monoclonal anti-Cytokeratin 8,18,19, 1:400 (abcam)
- Mouse monoclonal anti-SMA (Smooth Muscle Actin), 1:400 (Sigma)

Δευτερεύοντα αντισώματα

- anti-mouse Alexa 555, 1:500 (Molecular Probes)
- anti-rabbit Alexa 555, 1:500 (Molecular Probes)
- anti-mouse Alexa 488, 1:500 (Molecular Probes)

**Ανοσοφθορισμός σε κρυοτομές**

Από τους -80<sup>0</sup>C, οι τομές (από μαστό «YFP-Rosa26;MMTV-Cre» ποντικού) αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30min για να ζεσταθούν και να στεγνώσουν. Οι τομές περικλείονται με DAKO PEN (υδρόφοβο διάλυμα). Αρχικά οι τομές ξεπλένονται για 5min σε PBS και στη συνέχεια μονιμοποιούνται σε 4% PFA, για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι τομές ξεπλένονται 2 φορές με PBST (PBS/0.1% Triton X-100), για 5min. Ακολουθεί επώαση των τομών στο διάλυμα blocking (5% FCS σε PBST), για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ήπια ανάδευση. Επώαση με το πρωτεύον αντίσωμα έναντι του YFP (rabbit polyclonal anti-GFP, Minotech, 1:1000 σε PBST/1%BSA) όλη τη νύχτα, στους 4<sup>0</sup>C. Ξέπλυμα των τομών σε PBST, 3 φορές, για 10min κάθε φορά. Επώαση των τομών με το δευτερεύον αντίσωμα (anti-rabbit Alexa 555, Molecular Probes, 1:500 σε PBST), για 1.5hrs σε θερμοκρασία δωματίου. Ξέπλυμα των τομών 3 φορές σε PBST και 1 φορά σε PBS, για 10min κάθε φορά. Σήμανση πυρήνων με TO-PRO-3 (1:1000 σε PBS) για 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Επικάλυψη των τομών με το διάλυμα Mowiol για mounting και επακόλουθη παρατήρηση στο μικροσκόπιο όπως και παραπάνω.

### **Ανοσοφθορισμός κυττάρων σε γέλη κολλαγόνου (3D)**

Τα κύτταρα (ErRas ή PMECs) στο εσωτερικό γέλης κολλαγόνου (από 3D καλλιέργεια) ξεπλένονται με κρύο PBS για 5-10 λεπτά στους 4<sup>0</sup>C και μονιμοποιούνται σε μεθανόλη/ακετόνη (1:1) για 10 λεπτά στους -20<sup>0</sup>C (μαζί με το gel, αντιμετωπίζεται σαν ιστός). Στη συνέχεια, ακολουθεί σταδιακή ενυδάτωση σε 100%, 75%, 50% και 25% αιθανόλη σε PBS, πλύση με PBS και blocking για 1 ώρα σε 0.2% gelatin, 0.1% Tween και 20μg/ml non immune bovine IgGs (Sigma) σε PBS στους 4<sup>0</sup>C. Τα δείγματα επωάζονται με το πρωτεΐον αντίσωμα ολονυκτίως στους 4<sup>0</sup>C και ξεπλένονται 3 φορές σε PBST (0.1% Tween σε PBS). Για τη χρώση της E-Cadherin, τα δείγματα πλένονται με 4%PFA σε 250mM HEPES, 3 φορές με 10mM TBST και 2 φορές με PBST και ξανά μπλοκάρονται για 15min. Τέλος, όλα τα δείγματα επωάζονται με το δευτερεύον αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, πλένονται 3 φορές με PBST και επικαλύπτονται με Mowiol για περαιτέρω ανάλυση σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal).

#### Πρωτεύοντα αντισώματα

- Mouse monoclonal anti-E-Cadherin, 1:1000 (BD Transduction Laboratories)
- Rabbit polyclonal S17S anti-ERF 1:100

#### Δευτερεύοντα αντισώματα

- anti-mouse Alexa 555, 1:500 (Molecular Probes)
- anti-rabbit Alexa 488, 1:500 (Molecular Probes)

## **ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ DNA**

### **Απομόνωση γενωμικού DNA από κυτταρικές σειρές**

Στην περίπτωση των κυττάρων αφαιρείται το θρεπτικό υλικό, και ξεπλένονται 2 φορές με 1xPBS και στη συνέχεια προστίθενται 500μl από το διάλυμα λύσης (50mM Tris- HCl pH 8.0, 100mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl, 1% SDS) το οποίο περιέχει 0.1mg/ml πρωτεΐνάση K. Το μείγμα μεταφέρεται σε σωλήνα erpendorf και ακολουθεί επώαση στους 55<sup>0</sup>C, όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα προστίθενται 500μl φαινόλης και το δείγμα φυγοκεντρείται (13000rpm, 10min, θερμοκρασία δωματίου). Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε

άλλο μικροσωληνάριο και προστίθενται 500μl φαινόλης/χλωροφορμίου. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (13000rpm, 10min, θερμοκρασία δωματίου) και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο μικροσωληνάριο. Το DNA κατακρημνίζεται προσθέτοντας 1/10 όγκους οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) 3M και 2.5 όγκους 100% αιθανόλης και το ίζημα πλένεται με 70% αιθανόλη. Τέλος, το DNA επαναδιαλύεται σε 20-50μl TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA).

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Για την ταυτοποίηση της απαλοιφής (deletion) του *Erf*<sup>LoxP</sup> από την Cre-recombinase σε επίπεδο γενωμικού DNA, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές, όπου έδιναν ένα προϊόν 260bp μόνο σε περίπτωση απαλοιφής.

*Erf*:           **4021F**: 5'- GCACTGCTAGCTCTGAATGG -3'  
                   **6659R**: 5'- AGGAGGCAGGGAAGAGACTA -3'

#### Διάλυμα αντίδρασης

50-200ng γενωμικού DNA  
 1x buffer B (Invitrogen)  
 1.5mM MgCl<sub>2</sub>  
 0.2mM από κάθε dNTP  
 1μM από κάθε εκκινητή  
 2.5 units Taq πολυμεράση (Minotech)  
 τελικός όγκος αντίδρασης 25μl

#### Συνθήκες αντίδρασης

1. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 3min
2. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 30sec
3. Υβριδοποίηση, 58<sup>0</sup>C, 30sec
4. Επέκταση, 72<sup>0</sup>C, 30sec
5. Go to step 2, 34 cycles
6. Διόρθωση, 72<sup>0</sup>C, 7min
7. Συντήρηση, 10<sup>0</sup>C, for ever

Για την ταυτοποίηση της αποτελεσματικής μόνιμης επιμόλυνσης των ErRas κυττάρων με τον pLKO.1-Semaphorin-7a-siRNA πλασμιδιακό φορέα (Thermo Scientific, Waltham, MA, Cat.No.RMM4534), χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές, όπου έδιναν ένα προϊόν 436bp.

pLKO.1:       **pLKO.1-F**: 5'-TGCCTTGGGAATGCTAGTTGG-3'  
                   **pLKO.1-R**: 5'-CGAGATCCGTTCACTAATCG-3'

#### Διάλυμα αντίδρασης

10-200ng γενωμικού DNA  
 1x ρυθμιστικό διάλυμα (Minotech)

#### Συνθήκες αντίδρασης

1. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 3min
2. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 30sec

1.5mM MgCl <sub>2</sub>	3. Υβριδοποίηση, 56 <sup>0</sup> C, 30sec
0.2mM από κάθε dNTP	4. Επέκταση, 72 <sup>0</sup> C, 30sec
1μM από κάθε εκκινητή	5. Go to step 2, 34 cycles
2.5 units Taq πολυμεράση (Minotech)	6. Διόρθωση, 72 <sup>0</sup> C, 7min
τελικός όγκος αντίδρασης 25μl	7. Συντήρηση, 10 <sup>0</sup> C, for ever

### **Απομόνωση γενωμικού DNA από ουρές ποντικών**

Όταν τα νεογέννητα ποντίκια γίνουν 10 ημερών μαρκάρονται και από το κάθε ένα κόβουμε περίπου 3-5mm της ουράς του. Οι ουρές επωάζονται σε 500μl διάλυμα λύσης (50mM Tris- HCl pH 8.0, 100mM EDTA pH 8.0, 100mM NaCl, 1% SDS) στο οποίο προστίθεται κάθε φορά φρέσκια 0.3mg/ml πρωτεϊνάση K, στους 55<sup>0</sup>C, όλη τη νύχτα. Την επόμενη μέρα προσθέτουμε 20μg/ml RNase και επωάζουμε για 15 λεπτά, στους 37<sup>0</sup>C. Στη συνέχεια για να κατακρημνιστεί το SDS προσθέτουμε 250μl από το κορεσμένο διάλυμα NaCl (6M) και επωάζουμε στον πάγο για 5 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται (13000rpm, 10min, 4<sup>0</sup>C) και στο υπερκείμενο προστίθενται 0.6 όγκοι ισοπροπανόλη για την κατακρήμνιση του γενωμικού DNA. Μετά από φυγοκέντρηση (13000rpm, 10min, 4<sup>0</sup>C), το ίζημα του DNA πλένεται με 70% αιθανόλη και επαναδιαλύεται περίπου σε 100μl TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA), ώστε η τελική συγκέντρωση DNA να είναι περίπου 100-200ng/μl. Για καλύτερη επαναδιάλυση του DNA μπορούμε να επωάσουμε το δείγμα στους 65<sup>0</sup>C για 10min.

### **PCR για γονοτύπηση ποντικών**

Για την ταυτοποίηση των *Erf*<sup>LoxP/WT</sup> ποντικών γινόταν η παρακάτω PCR με το παρακάτω ζεύγος εκκινητών, όπου προκύπτει ένα προϊόν 151bp για το "WT" και ένα προϊόν ~200bp για το "LoxP".

*Erf*: **StopF2**: 5'- ACCGAGATTCCTGAGAGCTAT -3'

**5578R**: 5'- AGAGACTAAAGAGAGCTGTCC -3'

#### Διάλυμα αντίδρασης \*

25-50ng γενωμικού DNA

1x buffer E (Invitrogen)

#### Συνθήκες αντίδρασης

1. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 3min

2. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 30sec

1.5mM MgCl <sub>2</sub>	3. Υβριδοποίηση, 56 <sup>0</sup> C, 20sec
0.2mM από κάθε dNTP	4. Επέκταση, 72 <sup>0</sup> C, 30sec
1μM από κάθε εκκινητή	5. Go to step 2, 34 cycles
2% DMSO	6. Διόρθωση, 72 <sup>0</sup> C, 7min
2.5 units Taq πολυμεράση (Minotech)	7. Συντήρηση, 10 <sup>0</sup> C, for ever

Για την ταυτοποίηση των MMTV-Cre ποντικών γινόταν η παρακάτω PCR με τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών, όπου προκύπτει ένα προϊόν 265bp για την “Cre-recombinase” και ένα προϊόν 206bp για το “positive control”.

Cre: **GenCreF2**: 5'- AAAATTTGCCTGCATTACCG -3'

**GenCreR2**: 5'- ATGTTTAGCTGGCCCAAATG -3'

Internal Pos. Control: **mmtv-pos.c.\_F**: 5'- CAAATGTTGCTTGTCTGGTG -3'

**mmtv-pos.c.\_R**: 5'- GTCAGTCGAGTGCACAGTTT -3'

Διάλυμα αντίδρασης \*

50-100ng γενωμικού DNA  
1x ρυθμιστικό διάλυμα (Minotech)  
1.5mM MgCl<sub>2</sub>  
0.2mM από κάθε dNTP  
1μM από κάθε εκκινητή  
2.5 units Taq πολυμεράση (Minotech)

Συνθήκες αντίδρασης

1. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 3min  
2. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 30sec  
3. Υβριδοποίηση, 60<sup>0</sup>C, 30sec  
4. Επέκταση, 72<sup>0</sup>C, 30sec  
5. Go to step 2, 34 cycles  
6. Διόρθωση, 72<sup>0</sup>C, 7min  
7. Συντήρηση, 10<sup>0</sup>C, for ever

Για την ταυτοποίηση των YFP-ROSA26 ποντικών γινόταν η παρακάτω PCR με τα παρακάτω ζεύγη εκκινητών, όπου προκύπτει ένα προϊόν 597bp για την “WT” και ένα προϊόν ~320bp για το “YFP”.

ROSA26: **YFP LC**: 5'- GCTCTGAGTTGTTATCAGTAAGG -3'

**YFPR2**: 5'- GCGAAGAGTTTGTCTCAACC -3'

**YFPR3**: 5'- GGAGCGGGAGAAATGGATATG -3'

Διάλυμα αντίδρασης \*

100ng γενωμικού DNA  
1x ρυθμ.διάλ. pH8.8 ή 9.2 (Minotech)  
1.5mM MgCl<sub>2</sub>

Συνθήκες αντίδρασης

1. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 3min  
2. Αποδιάταξη, 94<sup>0</sup>C, 30sec  
3. Υβριδοποίηση, 55<sup>0</sup>C, 30sec

0.2mM από κάθε dNTP	4. Επέκταση, 72 <sup>0</sup> C, 45sec
1μM από YFP-LC εκκινητή	5. Go to step 2, 34 cycles
0.5μM από YFP-R2 εκκινητή	6. Διόρθωση, 72 <sup>0</sup> C, 10min
2μM από YFP-R3 εκκινητή	7. Συντήρηση, 10 <sup>0</sup> C, for ever
2.5 units Taq πολυμεράση (Minotech)	

\* όλες οι PCR γινόταν σε τελικό όγκο αντίδρασης 25μl

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

### **Απομόνωση ολικού κυτταρικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος**

Τα πιάτα με τα κύτταρα απομακρύνονταν από τον επωαστήρα και αμέσως μεταφέρονταν σε πάγο. Τα κύτταρα ξεπλένονταν δύο φορές με κρύο διάλυμα PBS και στη συνέχεια προστίθενται στο πιάτο κατάλληλη ποσότητα (1ml/10<sup>7</sup> κύτταρα) διαλύματος RIPA (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% DOC, 0.5% SDS) μαζί με αναστολείς πρωτεασών (1μg/ml Aprotinin, 1μg/ml Leupeptin, 1mM PMSF) και φωσφατασών (1mM orthovanadate-Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM β-glycerophosphate). Τα κύτταρα αποκολλιόνταν με τη βοήθεια ξύστρου και το μίγμα “διάλυμα λύσης-κύτταρα” μεταφερόταν σε 1.5ml μικροσωληνάρια erpendorf. Ακολουθούσε επώαση στον πάγο για 10 λεπτά με ενδιάμεσες ανακινήσεις/vortex και στη συνέχεια φυγοκέντρηση (12000g/10min/4<sup>0</sup>C). Το υπερκείμενο συλλεγόταν και ακολουθούσε υπολογισμός της συνολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης και χρήση του σε περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες όπως αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Τα δείγματα φυλάγονταν στους -20<sup>0</sup>C ή στους -80<sup>0</sup>C για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

### **Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης (Bradford)**

Η ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης γινόταν με τη μέθοδο Bradford και υπολογιζόταν με τη βοήθεια σπεκτροφωτόμετρου (Jenway). Αρχικά κατασκευαζόταν μια πρότυπη καμπύλη με βάση γνωστές συγκεντρώσεις μιας πρωτεΐνης όπως η αλβουμίνη (BSA). Σε νερό στήλης διαλυόταν (1:5 v/v) αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad) και σε 1ml από το διαλυμένο αντιδραστήριο



προστίθενται 20μl από το κάθε standard. Υπολογιζόταν η οπτική πυκνότητα (OD) στα 595nm με τη χρήση πλαστικών κυβετών (Plastibrand) και φτιαχνόταν μια πρότυπη καμπύλη με τη βοήθεια της οποίας υπολογιζόταν μια εξίσωση (π.χ.  $y=0,0627x-0,0786$  με  $R^2=0,98$ ). Στη συνέχεια προστίθενται 5μl από κάθε πρωτεϊνικό δείγμα σε 1ml διαλυμένου αντιδραστηρίου και μετρίοταν η OD που αντικαθιστούσε την τιμή  $y$  στην εξίσωση. Η τιμή  $x$  δίνει την ποσότητα της πρωτεΐνης σε  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ .

### **Στύπωμα κατά Western**

Τα δείγματα αναλύονταν με SDS-PAGE αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 10% πολυακρυλαμίδης-SDS. Χρησιμοποιήθηκαν 5-15μg από ολικό κυτταρικό εκχύλισμα και η ηλεκτροφόρηση γινόταν στα 120-150V για 90min. Ακολουθούσε η μεταφορά των πρωτεϊνών (semi dry transfer) σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης 0.45μm (PROTRAN). Η μεταφορά έγινε σε συσκευή της εταιρείας Hoefffer Scientific και διαρκούσε 90-120min σε ένταση ρεύματος  $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$  της μεμβράνης. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωαζόταν (blocking) για 30min σε θερμοκρασία δωματίου σε 5% άπαχο γάλα (Regilait) διαλυμένο σε TBST (50mM Tris-HCl pH 8.0, 138mM NaCl, 27mM KCl, 0.05% Tween-20), ξεπλενόταν μια φορά σε TBST για 5min και επωαζόταν με πρωτεΐον αντίσωμα στους  $4^{\circ}\text{C}$  για όλο το βράδυ. Έπειτα ξεπλενόταν 4 φορές για 10min με TBST και επωαζόταν για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου με δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο σε HRP (horseradish peroxidase). Μετά από 4 πλύσεις των 10min με TBST, η εμφάνιση του στυπώματος γινόταν με τη χρήση αντιδραστηρίων χημειοφωτάυγειας ECL (Amersham) και φιλμ αυτοραδιογραφίας (Fujifilm) σε συσκευή εμφάνισης φιλμ Kodak X-OMAT 1000 (Kodak), και τέλος σκανάρωνταν και ποσοτικοποιούνταν με το πρόγραμμα ανάλυσης ImageJ.

#### Πρωτεύοντα αντισώματα

- Rabbit polyclonal S17S anti-ERF 1:1000 σε TBST/5% γάλα
- Rabbit polyclonal anti-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Cell Signaling #9102) 1:3000 σε TBST

#### Δευτερεύοντα αντισώματα

- anti-rabbit-HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 1:5000

## ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ RNA

### **Απομόνωση ολικού RNA από κυτταρικές σειρές**

Η απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Trizol (Invitrogen), το οποίο περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη διατηρώντας την ακεραιότητα του RNA ενώ από την άλλη λύνει τα κύτταρα και διαλύει τα κυτταρικά συστατικά.

Τα κύτταρα ξεπλένονται με PBS και λύνονται προσθέτοντας απευθείας σε αυτά 1ml Trizol ανά 10 cm<sup>2</sup> επιφάνειας τρυβλίου. Τα λυμένα κύτταρα ομογενοποιούνται με πιπετάρισμα, μεταφέρονται σε 1.5ml μικροσωληνάριο erpendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο ανά 1ml Trizol, αναμιγνύουμε και το ομογενοποίημα των κυττάρων επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαχωρισμός της υδατικής φάσης που περιέχει το RNA από την οργανική φάση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση (13000rpm, 15min, 4°C). Κρατάμε την υπερκείμενη υδατική φάση και το RNA κατακρημνίζεται με 0.5ml ισοπροπανόλη ανά 1ml Trizol με φυγοκέντρηση (13000rpm, 15min, 4°C). Μετά από πλύσιμο με 70% αιθανόλη και φυγοκέντρηση (13000rpm, 5min, 4°C), το RNA επαναδιαλύεται σε 10-20μl καθαρό από RNase νερό. Για τον προσδιορισμό της ποσότητάς του, 1μl από το δείγμα φωτομετρείται στα 260nm σε φασματοφωτόμετρο NanoDrop 2000. Τα RNA δείγματα φυλάσσονταν στους -80°C.

### **Αντίστροφη μεταγραφή RNA (Reverse Transcription)**

Η παραγωγή cDNA από ολικό RNA απομονωμένου από κυτταρικές σειρές έγινε χρησιμοποιώντας το AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis Kit (Stratagene) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 5μg από το ολικό RNA σε συνολικό τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Μέσα στην αντίδραση περιέχονταν το ειδικό μείγμα που περιείχε την αντίστροφη μεταγραφάση και τα νουκλεοτίδια, 1μl DTT (stock 100mM) και 3μl από όλιγο(dT) εκκινητές (stock 100ng/μl). Τέλος, τα δείγματα επωάστηκαν σε κατάλληλες θερμοκρασίες για τη σύνθεση της

πρώτης αλυσίδας cDNA και μετά φυλάχθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

### **Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time qPCR)**

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, χρησιμοποιήθηκε το 2X μίγμα Brilliant III Ultra-Fast SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix (Stratagene, Cat No: 600882) στο μηχάνημα Stratagene MxPro3005 με το αντίστοιχο λειτουργικό πρόγραμμα για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων. Η τελική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Microsoft Office Excel.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20μl, η οποία αναλυτικά περιέχει 10μl 2X SYBR Green Kit, 0.25μM από τον κάθε εκκινητή και 50ng cDNA. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 40 κύκλους σε δύο βήματα: 1) θερμοκρασία αποδιάταξης  $95^{\circ}\text{C}$  για 10sec και 2) υβριδοποίηση των εκκινητών και επέκταση/σύνθεση σε θερμοκρασία  $56^{\circ}\text{C}$  για 20sec (στους  $58^{\circ}\text{C}$  για το *Ifrd1* και το *Erf* 4021F/bGH-pA). Στο τέλος της αντίδρασης σχηματίστηκε η καμπύλη αποδιάταξης των προϊόντων σε σχέση με τη θερμοκρασία, προκειμένου να φανεί η ύπαρξη παραπροϊόντων.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών (5'→3') που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

*Sema7a*:     **Sema7a-F**: TGCAGTCCATTAATCCAGCG  
                   **Sema7a-R**: TGGCGCCATAAGTAAGTGGC

*Snai1*:       **F**: ATGCACATCCGAAGCCACAC  
                   **R**: ACTCTTGCTGCTTGTGGAGCA

*Fgf2*:         **Fgf2-F**: TTCTTCCTGCGCATCCATCC  
                   **Fgf2-R1**: CTGGAGTATTTCCGTGACCG

*Cdx2*:         **F**: TCTCCGAGAGGCAGGTAAA  
                   **R**: GCAAGGAGGTCACAGGACTC

*Eomes*:       **Eomes 3utrF**: AAAGGTCGTTCAAGGTGCTG  
                   **Eomes 3utrR**: GTTAACTCAAGGTCCAACCC

*Ifrd1*:         **Ifrd1-F1**: GCCAAAGTGGACAAGAGAAAG  
                   **Ifrd1-R1**: GCGCTCAGGACCAAATTTAAC

*Erf*: **9701F**: TGTGGCACTTTATCCTGGAG  
**m10268R**: CTTGTAGGTGAACCGTTTCC  
*Cph*: **CPH-5'**: AGACCAGCAAGAAGATCACC  
**CPH-3'**: GGAAAATATGGAACCCAAAG  
*Gapdh*: **GAPDHfor**: CCAGTATGACTCCACTCAGG  
**GAPDHrev**: GACTCCACGACATACTCAGC

Για την έμμεση ταυτοποίηση του ποσοστού απαλοιφής (deletion) του *Erf*<sup>LoxP</sup> από την Cre-recombinase σε επίπεδο γενωμικού DNA πλέον (και όχι cDNA όπως παραπάνω), χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εκκινητές, όπου συγκεκριμένα δεν έδιναν προϊόν σε περίπτωση απαλοιφής και ανίχνευαν το εναπομείναν *Erf*<sup>LoxP</sup>.

*Erf*: **4021F**: 5'- GCACTGCTAGCTCTGAATGG -3'  
**bGH-pA**: 5'- TCGAGATCCACTAGTTCTAGC -3'

## ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ (ChIP) ΚΑΙ QPCR

25X10<sup>6</sup> κύτταρα (3x150mm πιάτα με TSCs ή MEFs) μονιμοποιήθηκαν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου (RT) με 1% φορμαλδεΰδη σε PBS. Η φορμαλδεΰδη εξουδετερώθηκε με 0.125M διαλύματος γλυκίνης (5min, RT). Τα πιάτα τοποθετήθηκαν στον πάγο και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 2 φορές με παγωμένο PBS, 0.5mM PMSF. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το πιάτο με ειδικό scraper σε PBS, 0.5% NP-40, 0.5mM PMSF και μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο όγκου 15ml. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (2500rpm, 4<sup>o</sup>C, 5min) και τα κύτταρα επαναδιαλύθηκαν σε 4ml υπότονο swelling buffer (25 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5% Nonidet P-40, 1mM dithiothreitol, αναστολείς πρωτεασών). Πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων στον πάγο για 10min και ομογενοποίησή τους σε γυάλινο ομογενοποιητή (Dounce, pestle B) με 20 “κτυπήματα” στον πάγο. Με τη διαδικασία αυτή απομονώθηκαν ακέραιοι πυρήνες. Οι πυρήνες μεταφέρθηκαν σε 1.5ml μικροσωληνάρια erpendorf και φυγοκεντρήθηκαν ήπια (5000rpm, 5min, 4<sup>o</sup>C). Το ίζημα των πυρήνων επαναδιαλύθηκε σε 2ml sonication buffer (50mM HEPES, pH 7.9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1%

deoxycholate, 1% SDS, αναστολείς πρωτεασών). Ο ηχοβολισμός πραγματοποιήθηκε σε 18 κύκλους των 20sec (6min) με ενδιάμεσες παύσεις των 2min με ένταση 50% (στα 12.5 Watt). Όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13000rpm, 15min, 4°C), το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επανα-φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Ακολούθησε διαπίδυση (dialysis, 2x1hr, 4°C) του εκχυλίσματος σε sonication buffer με 0.1% SDS (200ml για κάθε 2ml πυρηνικού εκχυλίσματος). Κατόπιν, στο παραπάνω πυρηνικό εκχύλισμα προστέθηκε 1mg/ml BSA και επωάστηκε με 30 μl εξισορροπημένων σφαιριδίων αгарόζης protein G για 2h, στους 4°C, υπό ανακίνηση. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν (2000rpm, 1min, 4°C) και το υπερκείμενο επωάστηκε ολονύκτια με το αντίσωμα S17S rabbit polyclonal anti-ERF, στους 4°C, υπό ανακίνηση. Πριν την προσθήκη του αντισώματος φυλάχθηκαν 50μl από το δείγμα στους -20°C (input). Την επόμενη μέρα προστέθηκαν 40μl εξισορροπημένων σφαιριδίων protein G, και επωάστηκαν για 2h, στους 4°C υπό ανακίνηση. Τα δείγματα ξεπλύθηκαν από δύο φορές κατά σειρά με 1ml sonication buffer με 0.1% SDS, διαλύματος ξεπλύματος A (sonication buffer with 0.1% SDS and 500 mM NaCl), διαλύματος ξεπλύματος B (20mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA, 250mM LiCl, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate), και TE (10 mM Tris, 1mM EDTA pH 7.5). Το κάθε ξέπλυμα πραγματοποιήθηκε για 5min, 4°C, υπό ανακίνηση και τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν για 1min, στους 4°C με 2000rpm. Τέλος, το σύμπλεγμα αντισώματος-πρωτεϊνών-DNA εκλούστηκε-αποσυζεύχτηκε από τα σφαιρίδια με επώαση με 400μl διαλύματος έκλουσης-αποσύζευξης (20mM Tris pH 8.0, 2mM EDTA, 0.5% SDS, 125 μg/ml proteinase K) για 3hrs στους 55°C και μετά στους 65°C, για όλο το βράδυ. Παράλληλα στο input προστέθηκαν 350μl διαλύματος έκλουσης. Την επόμενη μέρα πραγματοποιήθηκε κατεργασία των δειγμάτων με 10μg RNAase A, στους 37°C, για 1h. Η επίδραση της RNAασης εξουδετερώθηκε με την προσθήκη 5mM EDTA. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός του DNA με εκχύλιση μια φορά με φαινόλη/χλωροφόρμιο και μία φορά με χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με 100% αιθανόλη και προσθήκη 1/10 του όγκου οξικού νατρίου (CH<sub>3</sub>COONa) και 5μg γλυκογόνου και πλύσιμο με 70% αιθανόλη. Τα ανοσοκατακρημνισμένα δείγματα επαναδιαλύθηκαν σε 25μl TE και τα input σε 50μl.

- Σημείωση: Τα σφαιρίδια της protein G εξισορροπήθηκαν πριν τη χρήση τους με ξέπλυμα τρεις φορές με sonication buffer με 0.1% SDS και εν συνεχεία επώασή τους με αυτό το διάλυμα για 3-4hrs, 4°C υπό ανακίνηση παρουσία 3μg/ml ηχοβολισμένου λ φάγου DNA και 1mg/ml BSA.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε qPCR όπως περιγράφηκε παραπάνω, χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα ζεύγη εκκινητών (5'→3'), με θερμοκρασία επαναδιάταξης (annealing) τους 58°C (για το *lfrd1*-exon1 στους 60°C):

<i>Fgf2</i> -promoter:	<b>Fgf2-prom-F:</b> GGTGCAGACAATCTATTGGG <b>Fgf2-prom-R:</b> AGCGTGGGAAGATGAAAACC
<i>Fgf2</i> -intron1:	<b>Fgf2-int1-F:</b> CAGGCTGGATAACTTTGGAG <b>Fgf2-int1-R:</b> ACTGCCCAGTATTCCAGAGC
<i>Fgf2</i> -intron2:	<b>Fgf2-int2-F:</b> TCCTGGTGTATCCATTGGC <b>Fgf2-R1:</b> CTGGAGTATTTCCGTGACCG
<i>Cph:</i>	<b>CPH-5':</b> AGACCAGCAAGAAGATCACC <b>CPH-3':</b> GGAAAATATGGAACCCAAAG
<i>lfrd1</i> -exon1:	<b>lfrd1-exon1-F:</b> AGCGTTCGCTTCTTGTTCC <b>lfrd1-exon1-R:</b> ATCCTCGCTGAGCTCCAAG
<i>lfrd1</i> -intron1:	<b>lfrd1-intron1-F :</b> GGCTGGCCTTAAATTCACTG <b>lfrd1-intron1-R:</b> GTGATTGTTGCCCATCCTG
<i>Prlr</i> -promoter:	<b>Prlr-prom-F:</b> AACTGTGGGGTGAGGTCTTG <b>Prlr-prom-R:</b> TTCCTCGTGTTCTCCGTTTG
<i>Prlr</i> -distal:	<b>Prlr-exon6-F:</b> GGTTGCCACCTACCATAACTG <b>Prlr-intron6-R:</b> CTTGCCAAAGGACAGGATTC

## ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

### *Μονιμοποίηση ιστών*

Οι ιστοί και στη συγκεκριμένη περίπτωση, ο μαστικός αδένας ποντικού (4<sup>th</sup> inguinal) μονιμοποιούνται σε 4% PFA στους 4°C όλη τη νύχτα, υπό ήπια ανακίνηση. Την επόμενη μέρα και πριν από οποιαδήποτε άλλη διαδικασία οι ιστοί ξεπλένονται αρκετές φορές με ιστοτονικό διάλυμα 1x PBS.

### **Έγκλειση και πάγωμα ιστών για τομές σε κρυοτόμο**

Μετά τη μονιμοποίηση οι ιστοί ξεπλένονται σε 1xPBS αρκετές φορές και τοποθετούνται σε 30% w/v σουκρόζη στους 4<sup>0</sup>C όλη τη νύχτα. Η αντικατάσταση των υγρών του ιστού με σουκρόζη κρίνεται από το αν έχει κατακαθίσει ο ιστός την επόμενη μέρα. Ο ιστός τοποθετείται σε ένα τρυβλίο και με συγκεκριμένη κατεύθυνση καλύπτεται με 7.5% w/v ζελατίνη, 1.5% w/v σουκρόζη. Στη συνέχεια, κόβεται ο ιστός από τη ζελατίνη (στα όρια του) και καλύπτεται με υγρό κρυοπροστασίας OCT. Τέλος, παγώνουμε μέσα στο ισοπεντάνιο το οποίο έχει θερμοκρασία -35<sup>0</sup>C με τη βοήθεια ξηρού πάγου. Παγωμένοι οι ιστοί διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80<sup>0</sup>C.

### **Έγκλειση ιστών σε παραφίνη**

Μετά την μονιμοποίησή τους, οι ιστοί πλένονται υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με 1xPBS με ενδιάμεση αλλαγή στο μισάωρο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σταδιακή αφυδάτωση των ιστών σε αιθανόλη (κατά σειρά: 30%, 50%, 70%, 95%, 100%) υπό ανακίνηση για 2-3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και με ενδιάμεσες αλλαγές στη 1 ώρα. Ακολουθεί εμποτισμός των ιστών σε ξυλένιο περίπου για 1 ώρα και έως ότου αυτοί γίνουν διαυγείς. Έπειτα ακολουθεί η παραφίνωση των ιστών με 2 διαδοχικές αλλαγές σε παραφίνη για 1 ώρα η καθεμία, στους 60<sup>0</sup>C. Τέλος ακολουθεί η σκλήνωση κατά την οποία οι ιστοί τοποθετούνται με συγκεκριμένη κατεύθυνση σε ειδικά καλούπια (Base Molds, Tissue-Tek) όπου και περιλούνται με λειωμένη παραφίνη. Οι ιστοί παγιδευμένοι μέσα στην παραφίνη διατηρούνται στους 4<sup>0</sup>C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### **Τομές σε μικροτόμο ή κρυοτόμο**

Οι ιστοί που έχουν εγκλειστεί σε παραφίνη κόβονται σε μικροτόμο (Leica RM 2135) με πάχος τομών τα 7μm. Οι τομές απλώνονται σε υδατόλουτρο στους 37<sup>0</sup>C και στη συνέχεια συλλέγονται σε ειδικές (superfrost) αντικειμενοφόρους πλάκες. Πριν από οποιαδήποτε χρήση τους, οι τομές πρέπει να στεγνώσουν στους 37<sup>0</sup>C όλη τη νύχτα ή σε υψηλότερη θερμοκρασία για λίγες ώρες. Διατηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4<sup>0</sup>C.

Οι ιστοί που έχουν παγώσει κόβονται σε κρουτόμο-κρουστάτη (Leica) με πάχος τομών τα 7μm. Οι τομές συλλέγονται σε superfrost αντικειμενοφόρους πλάκες και αφού στεγνώσουν για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου φυλάσσονται στους -80°C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

### **Ιστολογική χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη (H&E) σε τομές παραφίνης**

Με την αιματοξυλίνη ο πυρήνας βάφεται με μπλε χρώμα ενώ η ηωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα και τα οργάνδια που περιέχονται σε αυτό με διαφορετικούς τόνους κόκκινου και ροζ.

Της χρώσης προηγείται η αποπαραφίνωση των τομών με ξυλένιο (5 λεπτά, 2 φορές) και στη συνέχεια η απομάκρυνση του ξυλενίου με 100% αιθανόλη (5 λεπτά, 2 φορές). Ακολουθεί σταδιακή ενυδάτωση των τομών με σειρά διαλυμάτων που χαρακτηρίζονται από την σταδιακή μείωση της συγκέντρωσης σε αιθανόλη (κατά σειρά: 95%, 70%, 50%, dH<sub>2</sub>O, 2 λεπτά το καθένα). Στη συνέχεια ακολουθεί χρώση με αιματοξυλίνη (Harris, Sigma) για 2 λεπτά, ξέπλυμα με νερό της βρύσης για 2 λεπτά (2 φορές), εμβάπτισμα στο διάλυμα του υδροχλωρικού (0.38% HCl σε 100ml 70% αιθανόλη) για 10 δευτερόλεπτα, ξέπλυμα σε νερό της βρύσης, 2 λεπτά, χρώση με ηωσίνη (Eosin Y, Sigma) (0.25% w/v ηωσίνη σε 80% αιθανόλη) για 40-60 δευτερόλεπτα. Μετά τη διαδικασία της χρώσης ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση των τομών με σειρά διαλυμάτων που χαρακτηρίζονται από σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης σε αιθανόλη (95% αιθανόλη για 3 λεπτά, 100% αιθανόλη για 3 λεπτά επί 2 φορές, ξυλένιο για 5 λεπτά επί 2 φορές) και τέλος κάλυψή τους με την συνθετική ακρυλ-ακρυλική ρητίνη (Entellan, Merck) και τοποθέτηση καλυπτρίδας.

### **Ιστολογική χρώση με καρμίνη (Carmine-red) σε ολόκληρους ιστούς**

Μετά την μονιμοποίησή τους όπως αναφέρθηκε παραπάνω (σε 4% PFA στους 4°C όλη τη νύχτα), οι ιστοί και συγκεκριμένα ο μαστικός αδένας ποντικού (4<sup>th</sup> inguinal) πλένονται υπό ανακίνηση σε θερμοκρασία δωματίου με 1xPBS 3 φορές από μισή ώρα. Κατόπιν ο μαστός τοποθετείται ολόκληρος σε



αντικειμενοφόρο πλάκα όσο γίνεται πιο απλωμένος (τραβηγμένος από τα άκρα) και πιο λεπτός. Ακολουθεί ολονύκτια χρώση με καρμίνη (carmine aluminum) σε θερμοκρασία δωματίου, όπου βάφεται κόκκινος ο βλεννογόνος και άρα το δίκτυο αυλών του μαστού. Στη συνέχεια μετά από πλύση με νερό ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση με αιθανόλη (κατά σειρά: 70%, 90% για 4 ώρες κάθε φορά, 100% ολονυκτίως). Τέλος, ολοκληρώνουμε με πλύση σε ξυλένιο ολονυκτίως ή και παραπάνω, μέχρι να γίνει ο ιστός όσο το δυνατόν πιο διαυγής ώστε να μπορεί να γίνει η φωτογράφιση κάτω από στερεοσκόπιο και να παρατηρηθεί η ανάπτυξη του δικτύου των αυλών στο μαστό καθώς και ο βαθμός διακλάδωσής τους.

Προετοιμασία διαλύματος χρώσης Carmine: 0.2% w/v carmine red (Sigma) και 0.5% w/v θειϊκό κάλιο αλουμινίου  $KAl(SO_4)_2$ , διαλυμένα σε νερό. Βράζουμε για 20 λεπτά 500ml διαλύματος και φιλτράρουμε σε 3M διηθητικό χαρτί. Προσθέτουμε 100mg thymol (Sigma) σαν συντηρητικό και αποθηκεύουμε στους 4°C.

## **ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ**

### ***Πολλαπλασιασμός ανασυνδυσασμένων αδενοϊών***

Η διαδικασία του πολλαπλασιασμού των αδενοϊών σε μεγάλη κλίμακα πραγματοποιείται συνήθως σε 3 διαδοχικά στάδια, στα οποία αυξάνονται σταδιακά το μέγεθος της κυτταρικής καλλιέργειας και ο τίτλος του ιού που θα παραχθεί στο τέλος. Βέβαια επειδή εμείς χρειαστήκαμε τον ιό σε μικρή κλίμακα, πραγματοποιήθηκε 1 μόνο στάδιο παραγωγής της τάξης των τριών 100mm τρυβλίων. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα 293T, τα οποία προέρχονται από τα HEK293, όντας ικανά για την παραγωγή μεγαλύτερου τίτλου ιού. Τα κύτταρα αυτά γενικώς διατηρούνταν σε θρεπτικό DMEM παρουσία 10% ορού. Στη συνέχεια όταν τα κύτταρα ήταν έτοιμα (~75-85% confluent) μολύνονταν με τον ανασυνδυσασμένο αδενοϊό με 5-10 FFU (Fluorescence Forming Unit) ανά κύτταρο, σε πολύ λίγο (ώστε να καλύπτονται οριακά τα κύτταρα) θρεπτικό DMEM παρουσία 2% ορού για 2hrs. Μετά τις 2hrs συμπληρώνονταν θρεπτικό μέσο και μετά από 3-4 μέρες

όταν παρουσιαζόταν ικανοποιητικό CPE (cytopathic effect), όπου δηλαδή πάνω από 50% των κυττάρων ήταν στρογγυλεμένα και ξεκολλημένα, αυτά συλλέγονταν με ξύστρο (scraping), είτε απλά με ελαφρύ χτύπημα της φλάσκας για να ακολουθήσει ο καθαρισμός και η τιτλοποίηση του ιού.

### ***Καθαρισμός ανασυνδυσασμένων αδενοϊών***

Αμέσως μετά τη συλλογή των μολυσμένων κυττάρων που έφεραν τον ιό στο εσωτερικό τους, αυτά επαναδιαλύονταν σε μικρότερο όγκο (0.5-1 ml) και λύνονταν με τη διαδικασία παγώματος-ξεπαγώματος, με τη βοήθεια ενός “ethanol bath” με ξηρό πάγο και ενός υδατόλουτρου στους 37<sup>0</sup>C, σε 3-4 κυκλικές επαναλήψεις ώστε σπάσουν τα κύτταρα και να απελευθερωθεί ο ιός. Κατόπιν μετά από φυγοκέντρηση (10min, 8000rpm, 4<sup>0</sup>C), κρατούσαμε το υπερκείμενο που περιείχε τον ιό. Ο ιός διατηρούταν στους -80<sup>0</sup>C σε διάλυμα 100mM Tris-HCl pH 8.0, παρουσία 4% σουκρόζης.

### ***Τιτλοποίηση ανασυνδυσασμένων αδενοϊών (FFU assay)***

Για την τιτλοποίηση των ιών χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα “911” και πιάτα διαμέτρου 35mm (με grids) τα οποία ήταν επικαλυμμένα με κολλαγόνο. Όταν τα κύτταρα ήταν έτοιμα (~90-95% confluent) μολύνονταν με διαδοχικές αραιώσεις (από 10<sup>4</sup> έως 10<sup>7</sup>) του ιού σε 1ml θρεπτικό DMEM παρουσία 10% ορού για 2hrs και στη συνέχεια αφαιρούταν το θρεπτικό που περιείχε τον ιό και τοποθετούνταν 2ml φρέσκου πλήρους θρεπτικού. Μετά από 2 μέρες καλλιέργειας στους 37<sup>0</sup>C, τα κύτταρα δε χρειαζόταν περαιτέρω επεξεργασία και χρώση με αντίσωμα που αναγνώριζε κάποια ιϊκή πρωτεΐνη, καθώς οι συγκεκριμένοι ιοί παράγαν οι ίδιοι τη φθορίζουσα ουσία GFP. Οπότε, μετά από μονιμοποίηση των κυττάρων με 4%PFA, μετρούνταν σε μικροσκόπιο φθορισμού τα κύτταρα που φθόριζαν πράσινο (GFP) και υπολογίζονταν ο τίτλος του ιού ως εξής: “Y (number of green cells, average of 20 squares) x 200 (squares per dish) x 10<sup>5</sup> (virus dilution example) = titer (ffu/ml)”.

# 3. Αποτελέσματα

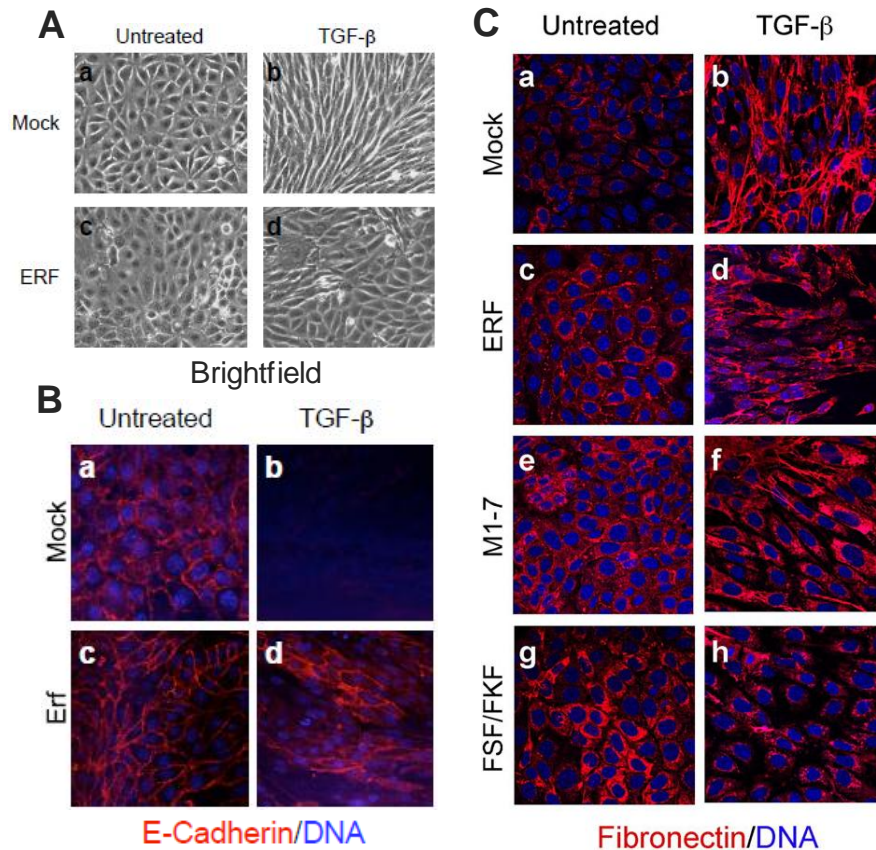
## **Ο ERF ΚΑΤΑΣΤΕΛΕΙ ΤΗΝ TGFβ-ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT) ΜΕΣΩ ΚΑΤΑΣΤΟΛΗΣ ΤΟΥ *Semaphorin-7a* ΓΟΝΙΔΙΟΥ**

### ***Ο ERF αναστέλλει το EMT***

Δεδομένου του ρόλου του ERF στην επαγωγή της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων και την απενεργοποίησή του από την Ras οδό, υποθέσαμε ότι η «αποδιαφοροποίηση» των επιθηλιακών κυττάρων κατά το EMT φαινόμενο, είναι δυνατόν να ενέχει την ρύθμιση του ERF. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα των ErRas επιθηλιακών κυττάρων του μαστού, που προχωρούν σε EMT μετά από έκθεση σε TGFβ, εφόσον έχει προηγηθεί η ενεργοποίηση της Ras οδού. Επίσης, είχαν ήδη δημιουργηθεί στο εργαστήριο και χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές των ErRas κυττάρων που υπερεκφράζουν, 5-10 φορές πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα, είτε την αγρίου τύπου είτε μεταλλαγμένες μορφές που δεν ανταποκρίνονται μερικά ή ολικά στην ρύθμιση από την Ras/Erk οδό, του γονιδίου ERF. Τα κύτταρα αυτά εξετάστηκαν ως προς την ικανότητά τους να μεταβαίνουν σε μεσεγχυματικά μετά από έκθεση σε TGFβ (Εικ.3.1). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.1(A, B), τα κύτταρα που υπερεκφράζουν ERF σε αντίθεση με τα πατρικά κύτταρα, διατηρούν τόσο την επιθηλιακή πλακοειδή μορφολογία τους, όσο και την έκφραση στην μεμβράνη τους επιθηλιακών μαρτύρων όπως η E-Cadherin μετά από παρατεταμένη έκθεση σε TGFβ.

Ανάλογα αποτελέσματα διαπιστώθηκαν και με την έκφραση του μεσεγχυματικού μάρτυρα της φιμπρονεκτίνης, μέσω ανοσοφθορισμού και συνεστιακής μικροσκοπίας (Εικ.3.1C). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν και οι τέσσερις μόνιμες κυτταρικές σειρές (ErRas, ErRasERF, ErRasM1-7, ErRasFSF.FKF) και καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία TGF-β, για την επαγωγή ή όχι αντίστοιχα του φαινομένου EMT. Το αποτέλεσμα, σύμφωνα με τα παραπάνω, ήταν το αναμενόμενο, δηλαδή τα πατρικά κύτταρα (ErRas), απουσία TGFβ, όντας επιθηλιακά, είχαν κυτταροπλασματική fibronectin, ενώ παρουσία TGFβ κατά το EMT, αποκτώντας πλέον μεσεγχυματικό χαρακτήρα, εναπόθεταν την fibronectin εξωκυττάρια. Αντιθέτως, οι υπόλοιπες τρεις κυτταρικές σειρές με αυξημένη έκφραση του ERF (ErRasERF) ή αυξημένο

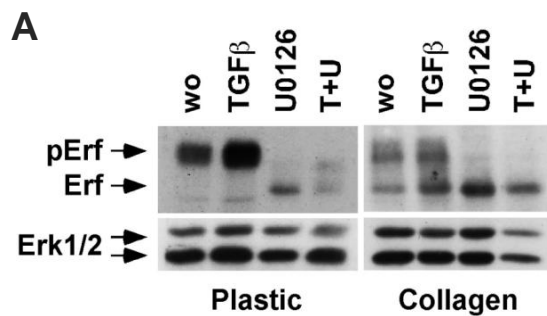
πυρηνικό ERF (ErRasM1-7, ErRasFSF.FKF), παρουσίασαν αντίσταση στο EMT παρουσία TGFβ, παραμένοντας επιθηλιακά και διατηρώντας κυτταροπλασματική την fibronectin.



**Εικόνα 3.1:** Τα ErRas κύτταρα που υπερεκφράζουν ERF, αντιστέκονται στην TGFβ-επαγόμενη EMT. Επιλεγμένοι κλώνοι ErRas κυττάρων, μόνιμα επιμολυσμένοι με άδειο φορέα (mock), wt ERF, M1-7 ERF μεταλλαγή, ή FSF/FKF ERF μεταλλαγή, καλλιεργήθηκαν απουσία (a, c, e, g) ή παρουσία (b, d, f, h) 5ng/ml TGFβ για 5 ημέρες. **(A)** Εικόνες φάσης-αντίθεσης, όπου τα πατρικά ErRas κύτταρα αποκτούν μία ατρακτοειδή μεσεγχυματική μορφολογία, μετά από έκθεση σε TGFβ (b), ενώ τα ErRas που υπερεκφράζουν ERF διατηρούν σε μεγάλο βαθμό την επιθηλιακή τους μορφολογία (d). **(B, C)** Εικόνες συνεστιακής μικροσκοπίας. Στα κύτταρα έγινε ανοσοφθορισμός με χρώση για E-cadherin (B) ή Fibronectin (C), με το αντίστοιχο αντίσωμα (κόκκινο), και με TOPRO-3 για το DNA (μπλε). Στα πατρικά ErRas κύτταρα, χάθηκε η έκφραση E-cadherin (B, b) και εκκρίθηκε Fibronectin (C, b), σαν αποτέλεσμα της TGFβ επώασης. Αντίθετα, τα wt ERF- (d), ERFm1-7- (f) και ERF-FSF-FKF- (h) εκφραζόμενα κύτταρα, διατήρησαν την βασεοπλευρική τους E-cadherin (B, d) και την κυρίως κυτταροπλασματική τους Fibronectin (C, d,f,h).

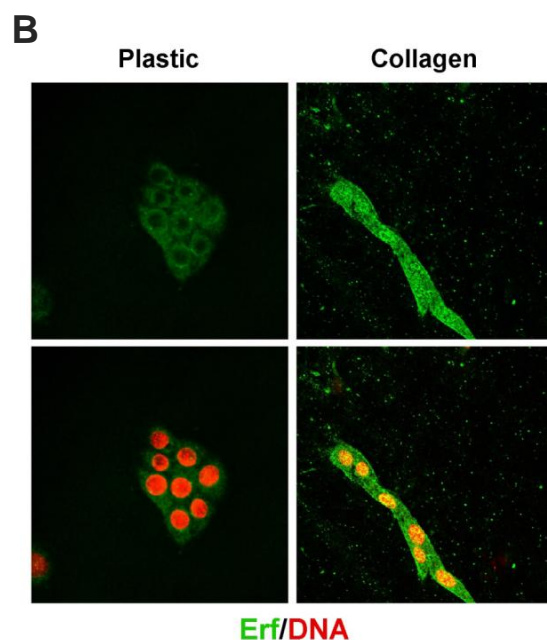
Ένα σημαντικό σημείο στην μελέτη του EMT είναι τα υποστρώματα ανάπτυξης των κυττάρων που πρέπει κατά το δυνατόν να προσομοιάζουν τις φυσιολογικές συνθήκες του οργανισμού. Ωστόσο, επιθηλιακά κύτταρα όπως τα ErH4/ErRas, αδυνατούν να επιτύχουν πλήρη πολικότητα σε πλαστικές επιφάνειες καλλιέργειας (Grunert et al. 2003). Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια κυττάρων και πηκτές κολλαγόνου, που είναι κατάλληλες για την επίτευξη πλήρους επιθηλιακής πολικότητας (Montesano et al. 1998), και στις συνθήκες αυτές αναλύθηκε η μορφολογία

των κυττάρων αλλά και η έκφραση και υποκυτταρική κατανομή του ενδογενούς ERF (Εικ.3.2). Έτσι, ανάλογα με τον τύπο της κυτταρικής καλλιέργειας (πλαστική επιφάνεια, 3D καλλιέργεια σε κολλαγόνο), μελετήθηκαν με ανοσοαποτύπωση και συνεστιακή μικροσκοπία τα επίπεδα του ενδογενούς ERF και κατά πόσο αυτά διαφέρουν στους διαφορετικούς τύπους καλλιέργειας. Όντως, τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορά στη φωσφορυλίωση και επομένως και κυτταρική κατανομή του ενδογενούς ERF, ανάλογα με τον τύπο καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, στη 3D καλλιέργεια κολλαγόνου βρέθηκε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα αποφωσφορυλιωμένου ERF, σχετικά με την καλλιέργεια σε πλαστικό, και άρα μεγαλύτερος πυρηνικός εντοπισμός της πρωτεΐνης, πράγμα που εξηγεί γιατί στη 3D καλλιέργεια παρατηρείται μεγαλύτερη αντίσταση στην EMT. Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι η ρύθμιση του ERF σε ένα σύστημα που απαιτεί την ενεργοποίηση της Ras/Erk οδού για την επαγωγή της EMT από τον TGFβ, είναι καθοριστική.



**Εικόνα 3.2: Αυξημένος πυρηνικός ERF σε κύτταρα που μεγαλώνουν σε πηκτή κολλαγόνου.**

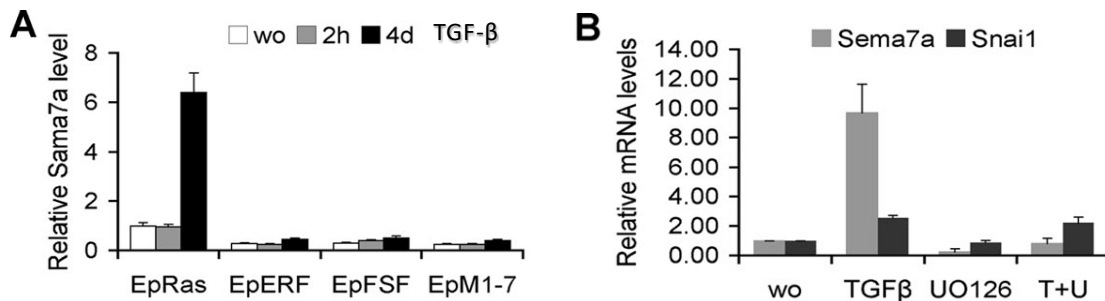
(A) ErRas κύτταρα καλλιεργήθηκαν είτε σε κατάλληλα πλαστικά τρυβλία, είτε σε πηκτή κολλαγόνου, παρουσία (TGFβ) ή απουσία (wo) του TGFβ για 4 ημέρες. Ο αναστολέας της Mek1/2 U0126 προστέθηκε 16 και 2h πριν από τη συλλογή των κυττάρων, παρουσία (T-U) ή απουσία (U0126) του TGFβ. Η ERF πρωτεΐνη ανιχνεύτηκε στα κυτταρικά εκχυλίσματα με στύπωμα κατά Western, με το S17S anti-ERF αντίσωμα. Τα επίπεδα της Erk1/2 ανιχνεύτηκαν επίσης, εξυπηρετώντας ως δείγμα φορτώματος. Τα κύτταρα που μεγάλωσαν σε κολλαγόνο εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα μη φωσφορυλιωμένης πυρηνικής ERF πρωτεΐνης.



(B) Ο υποκυτταρικός εντοπισμός του ERF στα ErRas κύτταρα που μεγάλωσαν είτε σε πλαστικό, είτε σε κολλαγόνο, έγινε με ανοσοφθορισμό με το S17S anti-ERF αντίσωμα (πράσινο) και με συνεστιακή μικροσκοπία (confocal). Το DNA σημάνθηκε με TOPRO-3 χρωστική (κόκκινο). Ο ERF μόνος του (πάνω εικόνες) και η μίξη ERF/DNA δείχνουν αυξημένο πυρηνικό εντοπισμό στα κύτταρα που μεγαλώνουν σε πηκτή κολλαγόνου.

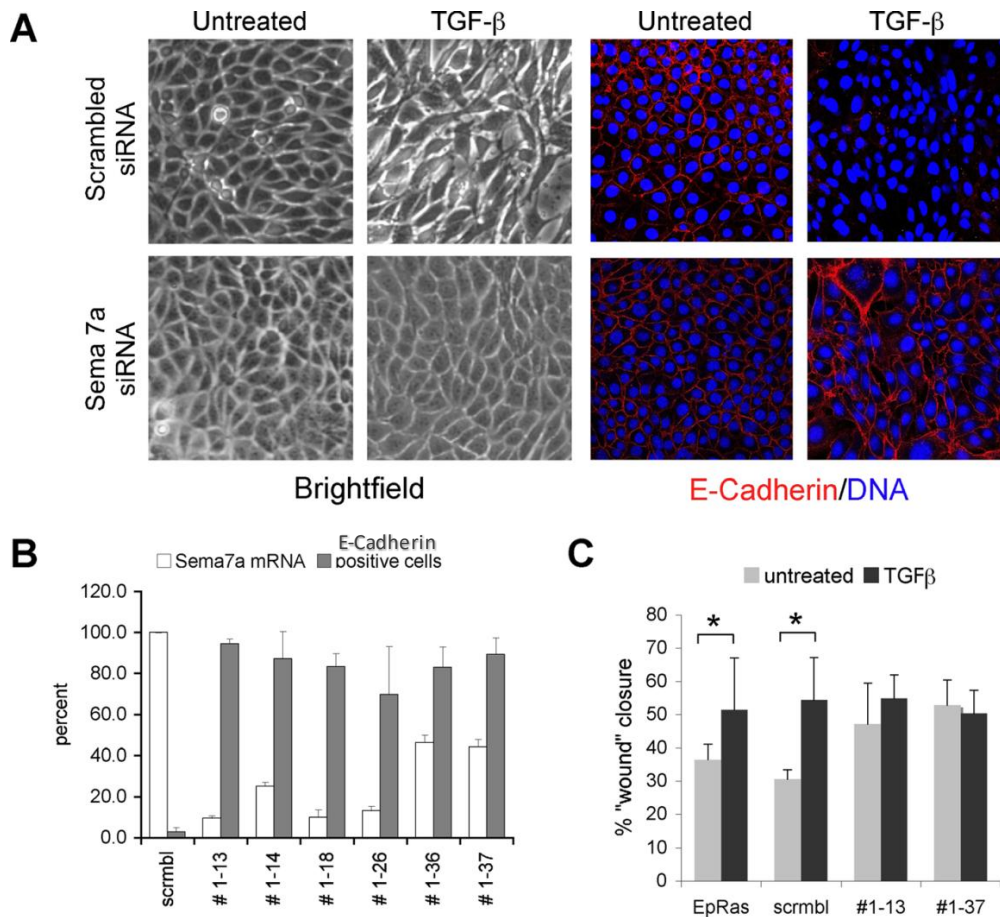
### Η *Semaphorin-7a* είναι απαραίτητη για το EMT

Στη συνέχεια, το επόμενο βήμα ήταν η ταυτοποίηση και αξιολόγηση των στόχων του ERF που ενέχονται στην EMT. Έτσι, μέσω ανάλυσης του μεταγραφικού προτύπου των κυττάρων με μικροσυστοιχίες DNA, είχε βρεθεί το γονίδιο *Sema7a* ως πιθανός στόχος του ERF, που πληρούσε όλα τα απαραίτητα κριτήρια. Ο καθορισμός του ρόλου του *Sema7a* στην αναστολή του EMT από τον ERF επιβεβαιώθηκε με ποσοτική PCR σε όλους τους EpRas κλώνους ύστερα από επώαση με TGFβ (Εικ.3.3A). Πράγματι, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών DNA, τα επίπεδα έκφρασης του *Sema7a* αυξάνονταν στα πατρικά κύτταρα, ενώ στους ERF-εκφραζόμενους κλώνους παρέμεναν σημαντικά χαμηλά, δείχνοντας ανθεκτικότητα στο EMT. Επιπλέον, η επώαση των πατρικών κυττάρων με τον αναστολέα των MEK1/2 κινασών (UO126) προκάλεσε δραματική μείωση των *Sema7a* mRNA επιπέδων αλλά όχι των άλλων TGFβ-επαγόμενων γονιδίων (*Snail1*), ενισχύοντας την υπόθεση ότι ο ERF μπορεί να επηρεάζει το EMT ρυθμίζοντας την έκφραση του *Sema7a* (Εικ.3.3B), ανεξάρτητα της TGFβ-Smad οδού.



**Εικόνα 3.3: Η αναστολή της *Semaphorin-7a* συνεισφέρει στον Erf EMT φαινότυπο. (A)** Ανάλυση με semi-quantitative PCR των *Sema7a* mRNA επιπέδων, μεταξύ των διαφορετικών EpRas κυτταρικών σειρών, απουσία ή παρουσία 5ng/ml TGFβ για 2h ή 4d. Τα *Sema7a* επίπεδα για κάθε δείγμα κανονικοποιήθηκαν με το *CPH* και συγκρίθηκαν με το RNA των πατρικών EpRas κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε κανονικό θρεπτικό μέσο. Τα *Sema7a* mRNA επίπεδα είναι χαμηλότερα σε όλους τους ERF κλώνους και αποτυγχάνουν να αυξηθούν μετά από 4d επώαση με TGFβ. **(B)** Ανάλυση με semi-quantitative PCR των *Sema7a* και *Snail1* mRNA επιπέδων, στα πατρικά EpRas κύτταρα, απουσία ή παρουσία TGFβ και του αναστολέα των Mek1/2 UO126. Τα κύτταρα επώαστηκαν με TGFβ για 5d και με UO126 δίπλα 16h και 2h πριν τη συλλογή των κυττάρων. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν με τις τιμές των πατρικών κυττάρων που δεν επώαστηκαν με τίποτα (wo).

Στα πλαίσια της αξιολόγησης αυτού του γονιδίου-στόχου του ERF, προσπαθήσαμε να αξιολογήσουμε την αυτόνομη αναγκαιότητα του *Sema7a* στο EMT, μέσω πειραμάτων απαλοιφής (shRNA). Έτσι, κατασκευάστηκαν κάποιοι επιπλέον κλώνοι σίγησης του *Sema7a* στα πατρικά κύτταρα (EpRas), στους οποίους ταυτοποιήθηκε με ποσοτική PCR η πτώση των επιπέδων του



**Εικόνα 3.4: Η Semaphorin-7a είναι απαραίτητη για το EMT. (A)** Εικόνες φάσης-αντίθεσης (αριστερά) και συνεστιακής μικροσκοπίας (δεξιά) των EpRas κυττάρων, που εκφράζουν είτε scrambled siRNA, είτε Semaphorin-7a-ειδικό siRNA, καλλιεργημένα σε μη επικαλυμμένες γυάλινες καλυπτρίδες. Τα κύτταρα επώαστηκαν με 5ng/ml TGFβ για 5d, μονιμοποιήθηκαν και βάφτηκαν με anti-E-cadherin αντίσωμα (πράσινο) και TOPRO-3, μία DNA-παρεμβαλλόμενη χρωστική (μπλε). Η απαλοιφή της Semaphorin-7a (κάτω) αναστέλλει το EMT, όπως φαίνεται από την παρουσία της E-cadherin. **(B)** Γραφική αναπαράσταση των *Sema7a* mRNA επιπέδων, ποσοτικοποιημένων με real-time qPCR (άσπρες μπάρες) και το κλάσμα των θετικών για E-cadherin κυττάρων (γκρι μπάρες), μετά από 5d επώαση με TGFβ. Τα θετικά για E-cadherin κύτταρα, υπολογίστηκαν βρίσκοντας το μέσο όρο από ανεξάρτητα πεδία εστίασης, για κάθε κυτταρική σειρά, που βάφτηκε όπως στο A. **(C)** Πείραμα “επούλωσης-πληγής” (wound healing) των πατρικών κυττάρων και των κλώνων που εκφράζουν είτε το scramble, είτε το *Sema7a* siRNA, παρουσία ή απουσία TGFβ. Οι “πληγές” φωτογραφήθηκαν στις 0, 6, και 16h, και μετρήθηκε το κλείσιμο στους αντίστοιχους χρόνους. Εδώ απεικονίζεται η χρονική στιγμή των 16h. Στατιστικά σημαντικές διαφορές (t-test,  $p < 0,05$ ) απεικονίζονται με έναν αστερίσκο.

mRNA από 2 μέχρι 10 φορές (Εικ.3.4B). Οι κλώνοι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν σε μια ποικιλία πειραμάτων, τα αποτελέσματα των οποίων πιστοποίησαν ότι το γονίδιο *Sema7a* είναι τόσο επαρκές, όσο και αναγκαίο για το EMT. Τα πειράματα τα οποία πραγματοποιήθηκαν ήταν η μελέτη της μορφολογίας των παραπάνω κλώνων καθώς και της έκφρασης και υποκυτταρικής κατανομής του επιθηλιακού μάρτυρα E-Cadherin ύστερα από επώαση με TGFβ, στα οποία φάνηκε ότι διατηρούσαν την επιθηλιακή μορφολογία τους και την έκφραση της E-Cadherin, αναπαριστώντας το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης του ERF (Εικ.3.4A,B). Επιπλέον, με πείραμα επούλωσης πληγής (wound



healing assay) φάνηκε ότι οι κλώνοι με μειωμένα επίπεδα *Sema7a* mRNA δεν εμφανίζουν αυξημένη κινητικότητα παρουσία TGFβ, που είναι ένα από τα χαρακτηριστικά του EMT (Moustakas and Heldin 2007) (Εικ.3.4C).

Επιπλέον, για να ισχυροποιήσουμε τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, προσπαθήσαμε να προσδιορίσουμε τα πρωτεϊνικά επίπεδα της επιφανειακής *Sema7a* παρουσία και απουσία TGFβ, καθώς και να διερευνήσουμε εάν τα επίπεδα της *Sema7a* επηρεάζονται μετά από φαρμακολογική αναστολή της ERK1/2. Για τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης, κυτταρομετρίας ροής και συνεστιακής μικροσκοπίας, αλλά δυστυχώς λόγω κακής ειδικότητας του αντισώματος (anti-*Sema7a*) δεν βγήκαν κάποια συμπεράσματα.

Τέλος, έχοντας αρκετά αποτελέσματα που ενισχύουν την άμεση ρύθμιση της μεμβρανικής πρωτεΐνης Semaphorin-7a από τον μεταγραφικό καταστολέα ERF, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP) στα ErRasERF κύτταρα, με αντίσωμα έναντι του ERF και ελέγχθηκαν με ποσοτική PCR τα επίπεδα έκφρασης της γενωμικής περιοχής της *Sema7a*. Τελικά δεν μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά της πρόσδεσης του ERF στην γενωμική περιοχή της *Sema7a*, κάτι το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι η ρύθμιση είναι έμμεση ή ότι η ειδικότητα-ποιότητα του αντισώματος δεν ήταν καλή.

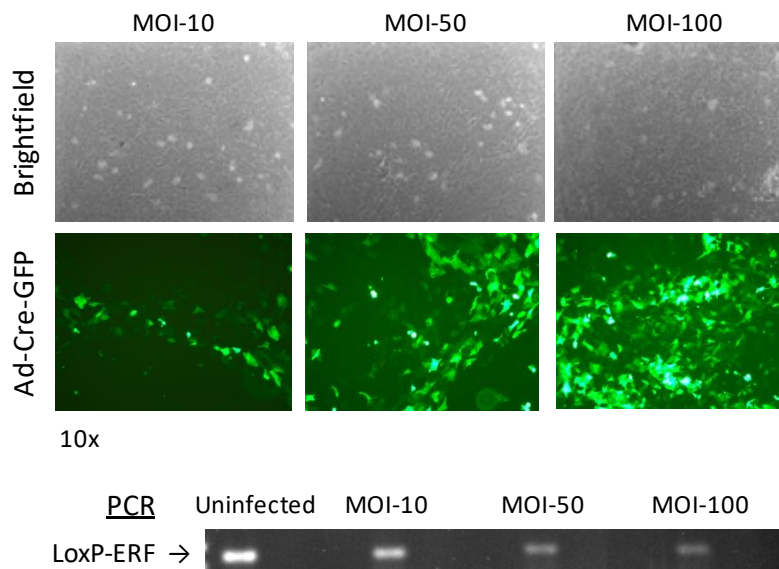
Απο όλα τα παραπάνω, τα μέχρι τώρα δεδομένα μας υποστηρίζουν ότι ο ERF επηρεάζει το EMT και πιθανώς την ογκογένεση, αλλά με μηχανισμούς ανεξάρτητους της TGFβ-Smad οδού. Η λεπτομερής διερεύνηση των μηχανισμών αυτών θα διευκρινίσει τον ρόλο του ERF και είναι πιθανόν να αποκαλύψει, αν όχι νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, τουλάχιστον μάρτυρες χαρακτηρισμού και πρόγνωσης.

## Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗΣ ΑΠΑΛΟΙΦΗΣ ΤΟΥ ERF ΑΠΟ ΤΟ ΜΑΣΤΟ ΣΤΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΑΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά την ολοκλήρωση των παραπάνω μελετών, προχωρήσαμε στην έναρξη μίας επιπλέον μελέτης, η οποία θα προσπαθήσει να διευρύνει τη γνώση μας σχετικά με το ρόλο του ERF στην ογκογένεση, και η οποία όμως βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη και χρήζει επιπλέον διερεύνησης. Προχωρήσαμε έτσι στη μελέτη της απουσίας του ERF από το μαστό του ποντικού, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*. Για το λόγο αυτό, προμηθευτήκαμε γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που εκφράζουν το ένζυμο ανασυνδιασμού Cre-recombinase ιστοειδικά, και συγκεκριμένα μόνο στο μαστό (MMTV-Cre) και τα διασταυρώσαμε μεταξύ τους προκειμένου να αναπαράγουμε τη γενετική αυτή σειρά. Επιπλέον, έχοντας ήδη στο εργαστήριο μία άλλη γενετική σειρά ποντικών, στα οποία έχει τοποθετηθεί μια LoxP κασέτα μέσα στο γονίδιο του ERF, ξεκινήσαμε διαδοχικές διασταυρώσεις των δύο παραπάνω διαφορετικών σειρών, προκειμένου να δημιουργηθεί μία νέα σειρά, η οποία εκφράζοντας την Cre-recombinase μόνο στο μαστό, θα οδηγήσει σε απενεργοποίηση του ERF γονιδίου μόνο στο μαστό (MMTV-Cre ; ERF<sup>LoxP/LoxP</sup>), δίνοντας έτσι τη δυνατότητα και *in vivo* μελέτης. Καθώς η διαδικασία των παραπάνω διαδοχικών διασταυρώσεων βρισκόταν στην πορεία, ξεκινήσαμε με τα *in vitro* πειράματα, που περιλαμβάνουν την απομόνωση Πρωτογενών Μαστικών Επιθηλιακών Κυττάρων (PMECs, Primary Mammary Epithelial Cells) από ERF<sup>LoxP/LoxP</sup> ποντικό, την καλλιέργειά τους σε 2D και 3D σε κολλαγόνο, και την επίδραση σε αυτά της απαλοιφής του γονιδίου *Erf* (υπο loxP sites) μετά από μόλυνση τους με αδενοϊό που εκφράζει την Cre-recombinase (καθώς και GFP), αφού έχει προηγηθεί η παραλαβή του αδενοϊού, ο πολλαπλασιασμός, ο καθαρισμός και η τιτλοποίησή του με χρήση κατάλληλης κυτταρικής σειράς (U293A).

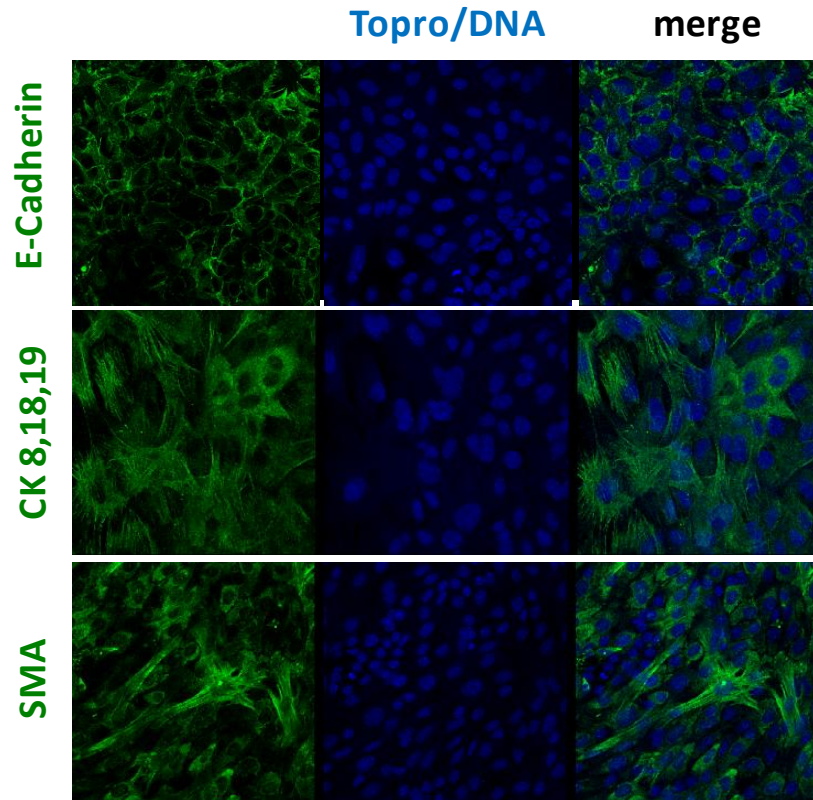
### Μελέτη της *in vitro* απαλοιφής του *Erf* από τα πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (PMECs)

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά δοκιμάσαμε διαφορετικές συγκεντρώσεις (MOI-10, MOI-50, MOI-100) του αδενοϊού (AdCre-GFP) ως προς την ικανότητα μόλυνσης αυτών των κυττάρων (PMECs) και μετά από φθορισμό μέσω του GFP, όσο και με PCR, φάνηκε ότι μολύνονται σε αρκετά ικανοποιητικό βαθμό της τάξεως του 90-95% με το MOI-50 (Εικ.3.10). Στη συνέχεια, έγινε χαρακτηρισμός των μαστικών επιθηλιακών κυττάρων που απομονώθηκαν και προσδιορισμός της καθαρότητας τους ως προς τον επιθηλιακό τους χαρακτήρα, μετά από ανοσοφθορισμό με τη χρήση ειδικών μαρτύρων όπως του επιθηλιακού δείκτη διακυτταρικών συνδέσεων E-Cadherin, του μάρτυρα των μυοεπιθηλιακών κυττάρων (myoepithelial cells), του ενός από τους δύο επιθηλιακούς πληθυσμούς του μαστού, SMA (Smooth Muscle Actin) και του μάρτυρα των επιθηλιακών κυττάρων του αυλού (luminal epithelial cells), του κυρίως επιθηλιακού πληθυσμού του μαστού Cytokeratin 8,18,19. Από τον παραπάνω χαρακτηρισμό και με τη βοήθεια συνεστιακής



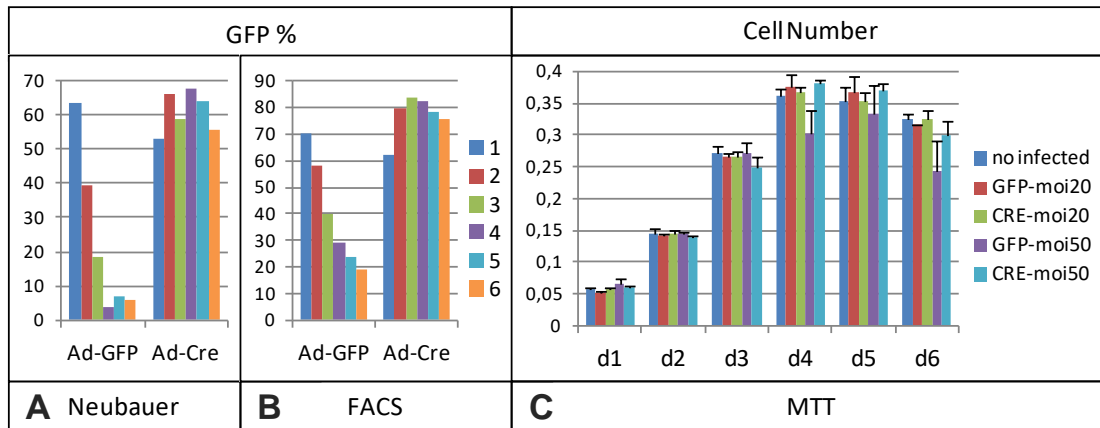
**Εικόνα 3.10: Διαβάθμιση μόλυνσης των PMECs με Ad-Cre-GFP και επακόλουθης απαλοιφής του *Erf*.** Πρωτογενή μαστικά επιθηλιακά κύτταρα (PMECs), απομονωμένα από τον 4<sup>ο</sup> βουβωνικό μαστό έφηβου ποντικού ηλικίας 12 εβδομάδων, μολύνθηκαν σε εναιώρημα για 2h με τον αδενοϊό AdCre-GFP σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (MOI: 10/50/100) και καλλιιεργήθηκαν για 5 ημέρες σε πλαστικό με επίστρωση κολλαγόνου. **(Πάνω)** Απλή απεικόνισή τους στο μικροσκόπιο (φακός 20x), είτε στο ορατό, είτε σε φθορισμό του GFP που προέρχεται από τον ιό. **(Κάτω)** DNA PCR για την εξέταση απαλοιφής του *Erf*, μέσω κοπής των LoxP περιοχών από την Cre-recombinase. Συγκεκριμένα ο ένας εκ των δύο εκκινητών της PCR προσδένεται μέσα στην αλληλουχία της LoxP κασέτας, οπότε όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ιού και ο επακόλουθος LoxP ανασυνδιασμός, τόσο λιγότερο προϊόν της PCR προκύπτει. Συνολικά από το GFP φθορισμό και την PCR, παρατηρείται μία ικανοποιητική απαλοιφή του *Erf* της τάξεως του 90-95%, μετά από μόλυνση με AdCre-GFP σε συγκέντρωση MOI-50.

μικροσκοπίας (confocal), φάνηκε ότι μετά την απομόνωση των PMECs έχω έναν καθαρό επιθηλιακό πληθυσμό (~98%) που αποτελείται κατά 90-95% από luminal epithelial cells και 5-10% από myoepithelial cells (Εικ.3.11).



**Εικόνα 3.11: Χαρακτηρισμός των PMECs μετά την απομόνωση και καλλιέργειά τους.** Όπως και στην προηγούμενη εικόνα, PMECs απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν για 4 ημέρες σε πλαστικό με επίστρωση κολλαγόνου. Στη συνέχεια τα κύτταρα χαρακτηρίστηκαν μετά από ανοσοφθορισμό με ειδικούς μοριακούς μάρτυρες και χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal). Οι μάρτυρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν α) E-Cadherin (epithelial cell junction marker), β) CK 8,18,19 (Luminal epithelial cell marker) και γ) SMA (Myoepithelial cell marker). Συνολικά, φάνηκε ότι μετά την απομόνωση και καλλιέργεια των PMECs έχω έναν καθαρό επιθηλιακό πληθυσμό (~98%) που αποτελείται κατά 90-95% από luminal epithelial cells και 5-10% από myoepithelial cells.

Έπειτα, ελέγχθηκε εάν η απουσία του ERF στα κύτταρα αυτά επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους. Για το σκοπό αυτό έγινε μόλυνση των κυττάρων με τον αδενοϊό (AdCre-GFP) σε χαμηλό MOI-20, έτσι ώστε να προκύψει ένας μεικτός πληθυσμός, αποτελούμενος τόσο από μολυσμένα φθορίζοντα κύτταρα στα οποία απουσιάζει ο ERF, όσο και από μη μολυσμένα κύτταρα που δε φθορίζουν και εκφράζουν κανονικά τον ERF. Οι παραπάνω δύο πληθυσμοί μετρήθηκαν, σε επόμενες μέρες καλλιέργειάς τους σε πλαστικό με επίστρωση κολλαγόνου, με τη χρήση πλάκας Neubauer και μικροσκοπίου φθορισμού (Εικ.3.12A), και ακόμη έγινε χρήση ενός επιπλέον αδενοϊού σαν κατάλληλο control δείγματος, του Ad-GFP, ο οποίος απλά εκφράζει GFP χωρίς να έχει κάποια ειδική επίδραση στα κύτταρα παρά μόνο

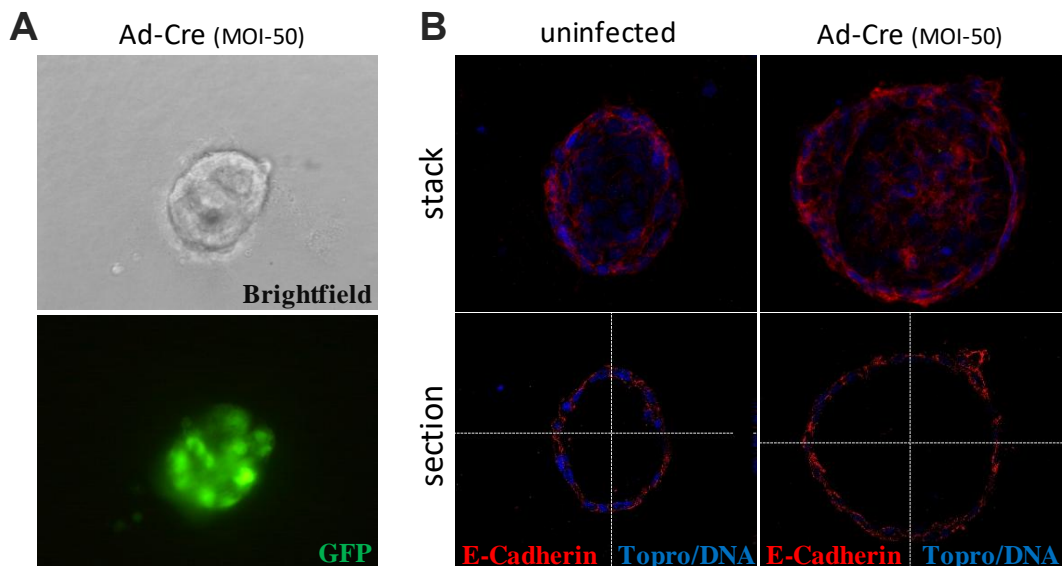


**Εικόνα 3.12: Η επίδραση της έλλειψης του *Erf* στον πολλαπλασιασμό και επιβίωση των PMECs.** Όπως και στις δύο προηγούμενες εικόνες, PMECs απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν για 6 ημέρες σε πλαστικό με επίστρωση κολλαγόνου. Στη συνέχεια, μετρήθηκε το ποσοστό των κυττάρων που φθορίζαν GFP, είτε με μικροσκοπικό φθορισμού και χρήση πλάκας Neubauer (A), είτε με FACS (B), μετά από μόλυνσή τους με δύο αδενοϊούς (control ή Cre) σε MOI-20. Επιπλέον, μελετήθηκε με MTT assay η συνολική κυτταρική επιβίωση, μετά από μόλυνση με δύο αδενοϊούς (control ή Cre) σε MOI-20 ή MOI-50 (C). Το MTT assay έδειξε ότι δεν επηρεάζεται η συνολική κυτταρική επιβίωση, αφού σε όλες τις συνθήκες ο πληθυσμός των κυττάρων παρέμεινε ίδιος. Τα αποτελέσματα όμως από Neubauer και FACS ήταν αρκετά πιο περίπλοκα και αμφιλεγόμενα και εξηγούνται λεπτομερώς στο κείμενο.

την οποιαδήποτε τοξικότητα σαν αδενοϊός. Τα αποτελέσματα όμως που προέκυψαν έχρηζαν περαιτέρω επιβεβαίωσης, επειδή η μέθοδος αυτή δεν είχε πολύ μεγάλη δυνατότητα ακρίβειας. Έτσι, ακολούθησαν κάποιες μετρήσεις με κυτταρομετρία ροής (FACS), ανιχνεύοντας το φθορίζον GFP με μεγαλύτερη πλέον ακρίβεια (Εικ.3.12B), παίρνοντας παρεμφερή με πριν αποτελέσματα. Από τα αποτελέσματα του μεικτού κυτταρικού πληθυσμού, παρουσία και απουσία ERF, και με το σκεπτικό ότι ο αδενοϊός παραμένει στο κύτταρο σαν επίσωμα χωρίς να ενσωματώνεται στο DNA και άρα χωρίς να μεταβιβάζεται στις επόμενες γενιές εξολοκλήρου, θα μπορούσαμε να πούμε ότι παρουσία κανονικά του ERF (συνθήκη με Ad-GFP), παρατηρούμε μία λογική πτώση των φθορίζοντων κυττάρων, όσο περνάν οι μέρες και αυξάνονται οι γενιές, και ότι απουσία του ERF (συνθήκη με AdCre-GFP), δεν παρατηρείται αυτή η πτώση, αλλά παραμένουν σταθερά σαν ποσοστό τα φθορίζοντα κύτταρα που δεν εκφράζουν ERF, με πολύ πιθανή και λογική εξήγηση τον αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων από τα οποία απουσιάζει ο ογκοκατασταλτικός ERF. Παράλληλα όμως με το FACS και τη μέτρηση του ποσοστού του κυτταρικού πληθυσμού που φθορίζει, έγινε και MTT assay μετρώντας τη βιωσιμότητα των κυττάρων, ώστε να ληφθεί υπόψη και η πορεία του συνολικού κυτταρικού πληθυσμού. Το αποτέλεσμα από το MTT δεν έδειξε κάποια διαφορά στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων είτε σε χαμηλό, είτε σε υψηλό MOI του Ad-GFP ή AdCre-GFP (Εικ.3.12C),

ακυρώνοντας στην ουσία το προηγούμενο αποτέλεσμα του FACS. Βέβαια, ίσως τελικά η χρήση του AdGFP control αδενοϊού δεν ήταν η καταλληλότερη, καθώς δεν κατασκευάστηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως ο AdCre-GFP αδενοϊός και έτσι η έκφραση του πλασμιδιακού GFP και η ένταση ή η διάρκεια φθορισμού των κυττάρων μπορεί να μην ήταν πανομοιότυπα.

Επιπρόσθετα, έγινε καλλιέργεια των κυττάρων (PMECs) σε πηκτή κολλαγόνου (3D) παρουσία του αυξητικού παράγοντα bFGF (Basic fibroblast growth factor), γνωστού και ως FGF2. Έτσι, δημιουργήθηκαν ειδικές τρισδιάστατες δομές που προσομοιάζουν, αρκετά περισσότερο από τις επίπεδες καλλιέργειες, τον φυσιολογικό μαστό και έγινε μελέτη της ανάπτυξης των δομών αυτών μετά από μόλυνση των κυττάρων με τον αδενοϊό (AdCre-GFP) σε MOI-50 και απουσία του ERF (Εικ.3.13A). Στις δομές αυτές που σχηματίστηκαν έγινε ανοσοφθορισμός με τη χρήση του επιθηλιακού δείκτη διακυτταρικών συνδέσεων E-Cadherin (Εικ.3.13B). Το αποτέλεσμα έδειξε ότι τόσο τα κανονικά πρωτογενή επιθηλιακά μαστικά κύτταρα (PMECs) (Εικ.3.13B αριστερά), όσο και αυτά στα οποία απουσίαζε ο ERF (Εικ.3.13B δεξιά), σχημάτιζαν απλές σφαιρικές τρισδιάστατες δομές με την ύπαρξη ενός κενού αυλού στο εσωτερικό της σφαίρας (Εικ.3.13B κάτω), με ελάχιστες

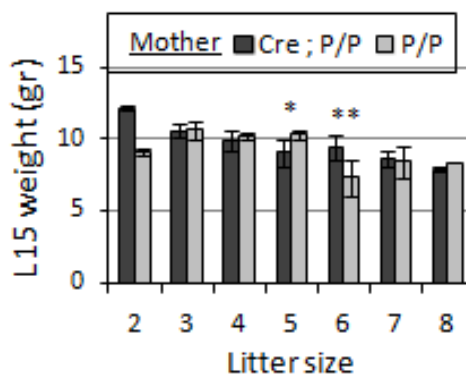


**Εικόνα 3.13: Η τρισδιάστατη δομή και μορφολογία των PMECs με παράλληλη προσθήκη FGF2.** PMECs κύτταρα απομονώθηκαν όπως προηγουμένως και καλλιεργήθηκαν τρισδιάστατα μέσα σε πηκτή κολλαγόνου για 6 ημέρες, παρουσία του *Erf* (uninfected) ή απουσία του (AdCre-GFP, MOI-50), με παράλληλη προσθήκη 50ng/ml του αυξητικού παράγοντα FGF2 (bFGF). **(A)** Απλή απεικόνισή τους μέσα στην πηκτή κολλαγόνου, με μικροσκόπιο φθορισμού (φακός 40x), είτε στο ορατό (πάνω), είτε σε φθορισμό του GFP (κάτω). **(B)** Συνεστιακή μικροσκοπία (confocal, φακός 60x) των 3D δομών, μετά από ανοσοφθορισμό με E-Cadherin (epithelial cell junction marker, κόκκινο) και TOPRO (DNA marker, μπλε), είτε συνολικά και επιφανειακά σαν z-stack, είτε εσωτερικά της δομής σε ένα συγκεκριμένο σημείο-ύψος σαν τομή (section). Από τα παραπάνω, δε φαίνεται καμία μορφολογική ή αναπτυξιακή διαφορά, παρουσία ή απουσία του *Erf*.

σποραδικές περιπτώσεις σχηματισμού περαιτέρω και πιο σύνθετων δομών που αναπαριστούν το μαστό σε κατάσταση εγκυμοσύνης, όπως διακλαδώσεων (branching) ή πολλών πυκνών σφαιρικών δομών (alveolar).

### Μελέτη της *in vivo* απαλοιφής του *Erf* ειδικά από το μαστό του ποντικού

Με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιώντας τα παραπάνω *in vitro* πειράματα, δημιουργήθηκε η κατάλληλη γενετική σειρά ποντικών «MMTV-Cre ; ERF<sup>LoxP/LoxP</sup>» και έγινε μέτρηση του βάρους των μωρών που θηλάζαν από την εκάστοτε γονιδιακά μητέρα (είτε ERF<sup>LoxP/LoxP</sup>, είτε MMTV-Cre ; ERF<sup>LoxP/LoxP</sup>) τις μέρες 5, 10, 15, 20 της ζωής τους, ώστε να εξεταστεί πιθανή ανωμαλία θρέψης τους, προερχόμενη από ελαττωματικό μαστό ως προς την παραγωγή ή έκκριση γάλακτος. Από τις συγκρίσεις του βάρους των ίδιων σε αριθμό μωρών γεννών (litter size), δεν βρέθηκε κάποια διαφορά στο βάρος τους που μπορεί να προέκυπτε λόγω του θηλασμού και την έλλειψη του *Erf* (Εικ.3.14).



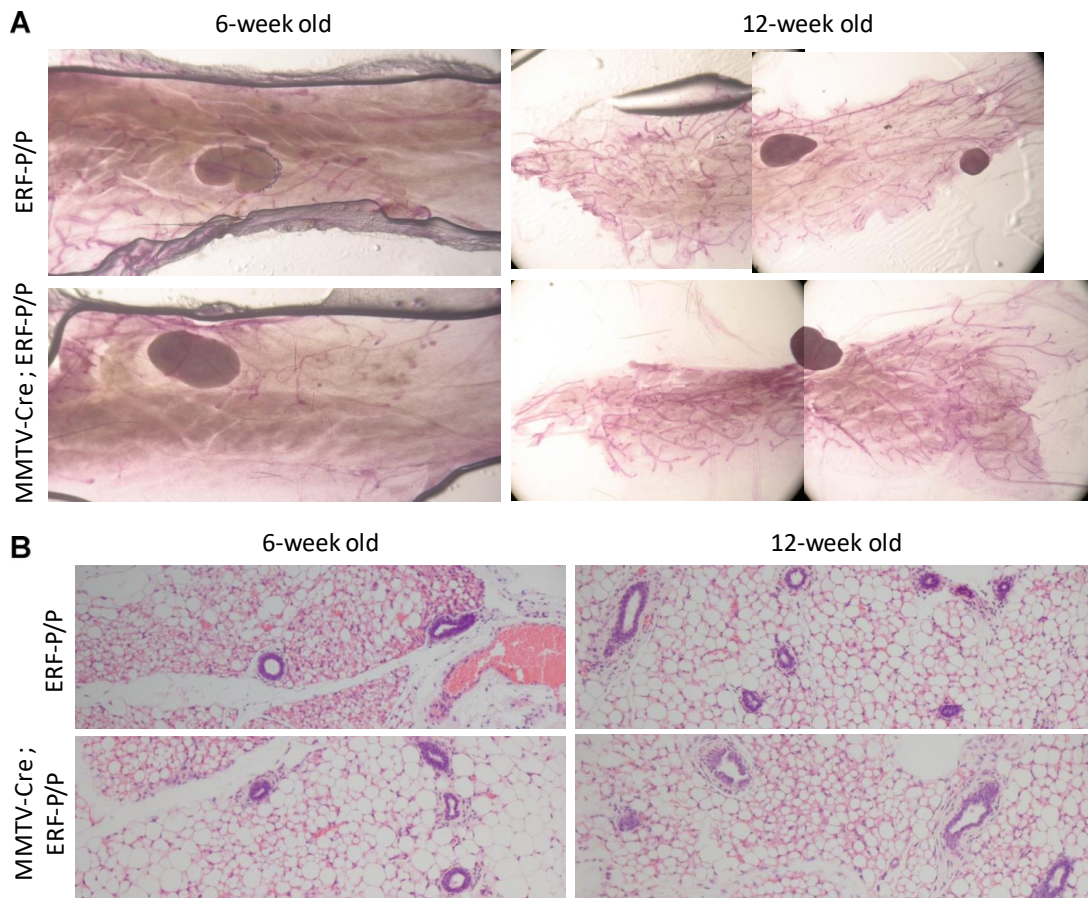
**Εικόνα 3.14:** Η απουσία του *Erf* από το μαστό της μητέρας δεν επηρεάζει το βάρος των νεογνών που θηλάζουν από αυτήν. Εδώ απεικονίζεται το βάρος των νεογνών τη 15<sup>η</sup> μέρα θηλασμού τους από μητέρα MMTV-Cre;ERF<sup>LoxP/LoxP</sup> (σκούρο γκρι) ή ERF<sup>LoxP/LoxP</sup> (ανοιχτό γκρι) και γίνεται σύγκριση μεταξύ των ίδιων, σε αριθμό νεογνών, γεννών, ώστε να είναι αντικειμενική.

Συνεχίζοντας τη μελέτη σχετικά με το ρόλο του *Erf* στην ογκογένεση, και πιο συγκεκριμένα, τις συνέπειες της απαλοιφής του ειδικά από το μαστό του ποντικού, αφού δημιουργήθηκε πλέον η κατάλληλη γενετική σειρά ποντικών «MMTV-Cre ; ERF<sup>fl/fl</sup>», στην οποία

απαλείφεται ιστοειδικά από το μαστό το γονίδιο του *Erf*, πραγματοποιήθηκαν κάποιες ιστολογικές αναλύσεις. Αρχικά, μετά από χρώση με Carmine-red ολόκληρου του μαστού, οπου βάφεται

κόκκινος ο βλεννογόνο, δηλαδή το δίκτυο των αυλών που υπάρχουν μέσα στο μαστό, μελετήθηκε σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (ενδιάμεσο στάδιο ηλικίας 6 εβδομάδων και τελικό στάδιο ανάπτυξης 12 εβδομάδων) το μήκος ανάπτυξης των αυλών καθώς και ο βαθμός διακλάδωσης τους (Εικ.3.15A). Επίσης, έγιναν και τομές παραφίνης και χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης (H&E)

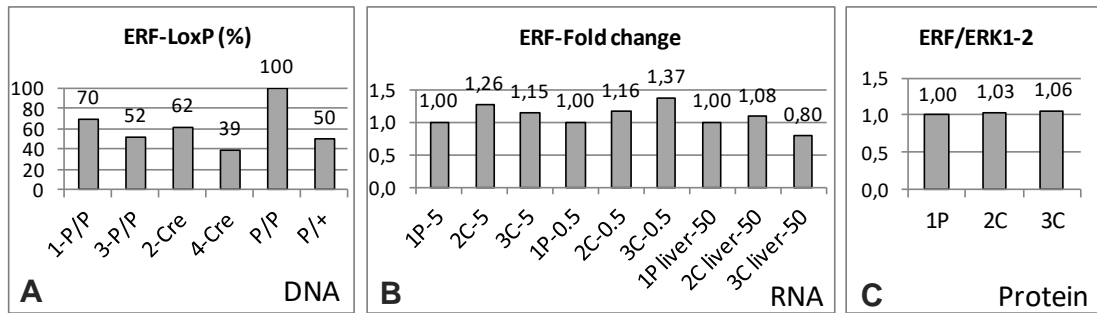
για περεταίρω μορφολογική ανάλυση (Εικ.3.15B). Και στις δύο παραπάνω περιπτώσεις ιστολογικών αναλύσεων δεν ανιχνεύτηκε καμία εμφανής διαφορά είτε παρουσία είτε απουσία του ERF από το μαστό.



**Εικόνα 3.15: Ιστολογική ανάλυση μαστού μετά από απαλοιφή του *Erf*.** (A) Χρώση με Carmine-red ολόκληρου του μαστού (κόκκινο δίκτυο αυλών) και απεικόνιση του μήκους ανάπτυξης των αυλών και του βαθμού διακλάδωσής τους με χρήση στερεοσκοπίου. (B) Τομές παραφίνης και χρώση αιματοξιλίνης-ηωσίνης (H&E) για περεταίρω μορφολογική ανάλυση (άσπρα: λιποκύτταρα, μωβ: επιθηλιακά κύτταρα) με χρήση ανάστροφου μικροσκοπίου (φακός 10x). Τα παραπάνω έγιναν στα αναπτυξιακά στάδια της προ-εφηβείας (αριστερά) και μετά την ολοκλήρωση εφηβείας (δεξιά) παρθένου ποντικού. (LN, Lymph Node).

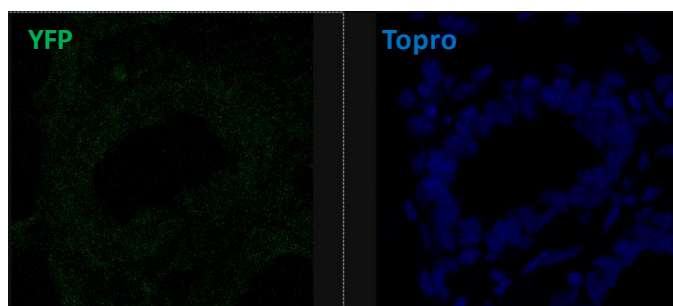
Βέβαια, παρόλο που δημιουργήθηκε γονοτυπικά σωστά η σειρά ποντικών «MMTV-Cre ; ERF<sup>fl/fl</sup>», ελέγχοντας από το DNA της ουράς το γονίδιο της Cre, έπρεπε να εξεταστεί και ειδικά, κατά πόσον όντως απαλείφεται ιστοειδικά από το μαστό το γονίδιο του *Erf*. Αρχικά εξετάστηκε με τη μέθοδο της ποσοτικής PCR η απαλοιφή του *Erf* σε επίπεδο DNA μετά από ανασυνδιασμό των LoxP σημείων από τη Cre-recombinase (Εικ.3.16A). Καθώς όμως η εξέταση αυτή δεν έδειξε να απαλείφεται το γονίδιο του *Erf* μετά από τη δράση της Cre, εξετάστηκαν επιπλέον τα επίπεδα του *Erf* τόσο σε επίπεδο mRNA (Εικ.3.16B) όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης (Εικ.3.16C), όπου πάλι δεν ανιχνεύτηκε η επιθυμητή μείωση του *Erf*, στα δείγματα που





**Εικόνα 3.16: Έλεγχος απαλοιφής του *Erf* σε επίπεδο DNA, RNA και πρωτεΐνης από PMECs μετά από καλλιέργειά τους.** PMECs κύτταρα απομονώθηκαν από το μαστό όπως προηγουμένως και μετά από καλλιέργειά τους για 5 ημέρες σε πλαστικό με επίστρωση κολλαγόνου, απομονώθηκε από αυτά DNA ή RNA ή πρωτεΐνη. **(Α)** Ποσοτική PCR με DNA και μέτρηση των εναπομεινάντων επιπέδων ERF-LoxP DNA με κατάλληλη χρήση εκκινήτων όπως και στην εικόνα 3.10. Οι δύο τελευταίες μπάρες είναι control δείγματα DNA από ουρά, για επιβεβαίωση της τεχνικής ως προς την ικανότητα ανίχνευσης διαφοράς σε επίπεδο αλληλίου (P/P και P/+). **(Β)** Ποσοτική PCR για μέτρηση των *Erf* mRNA επιπέδων με χρήση 50 ή 5 ή 0.5ng cDNA. **(C)** Western blot για την ανίχνευση των πρωτεϊνών ERF και ERK1/2 με κατάλληλα αντισώματα και απεικόνιση του λόγου ERF/ERK για κανονικοποίηση φορτώματος ανά δείγμα. (P/P ή P: ERF<sup>LoxP/LoxP</sup>, Cre ή C: MMTV-Cre;ERF<sup>LoxP/LoxP</sup>).

εξέφραζαν Cre-recombinase. Ακόμη, εξετάστηκαν και τα επίπεδα της Cre σε επίπεδο mRNA, όπου ήταν οριακά ανιχνεύσιμα, πράγμα στο οποίο μπορεί να οφείλεται και η απουσία απαλοιφής του *Erf*. Όλα τα παραπάνω εξετάστηκαν τόσο σε επίπεδο μαστικού ιστού, όσο και σε επίπεδο πρωτογενών μαστικών επιθηλιακών κυττάρων (PMECs) μετά από καλλιέργειά τους, καθώς και σε πρώιμες γενιές της συγκεκριμένης γενετικής σειράς ποντικών, έτσι ώστε να αποκλειστούν όλα τα ενδεχόμενα. Τέλος, προκειμένου να είναι ακόμη πιο ασφαλές το συμπέρασμα της μη απαλοιφής του *Erf* που προέκυψε από τα παραπάνω, πραγματοποιήθηκε μία επιπλέον διασταύρωση της σειράς ποντικών «MMTV-Cre ; ERF<sup>fl/fl</sup>» με «YFP-Rosa26» ποντίκι για τη δημιουργία «YFP-Rosa26 ; MMTV-Cre ; ERF<sup>fl/fl</sup>» ποντικού, ώστε να υπάρχει πλέον ένας φθορίζον μάρτυρας YFP μετά από σωστή και αποτελεσματική δράση της Cre-recombinase. Και σε αυτή την περίπτωση όμως δεν παρατηρήθηκε κανένας



**Εικόνα 3.17: Κρυστομή από μαστό «YFP-Rosa26;MMTV-Cre» ποντικού.** Φθορισμός με χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal, φακός 60x), μετά από ανοσοφθορισμό κρυστομής με κατάλληλο αντίσωμα έναντι του YFP (anti-GFP) και χρώση του DNA με TOPRO, για επιβεβαίωση σωστής λειτουργίας της Cre-recombinase στο μαστό και κατά συνέπεια YFP φθορισμού, μετά από ενζυμική κοπή των LoxP περιοχών. Το ελάχιστο πράσινο σήμα που παρατηρείται εδώ (αριστερά) είναι απλά “background” και όχι αληθές.

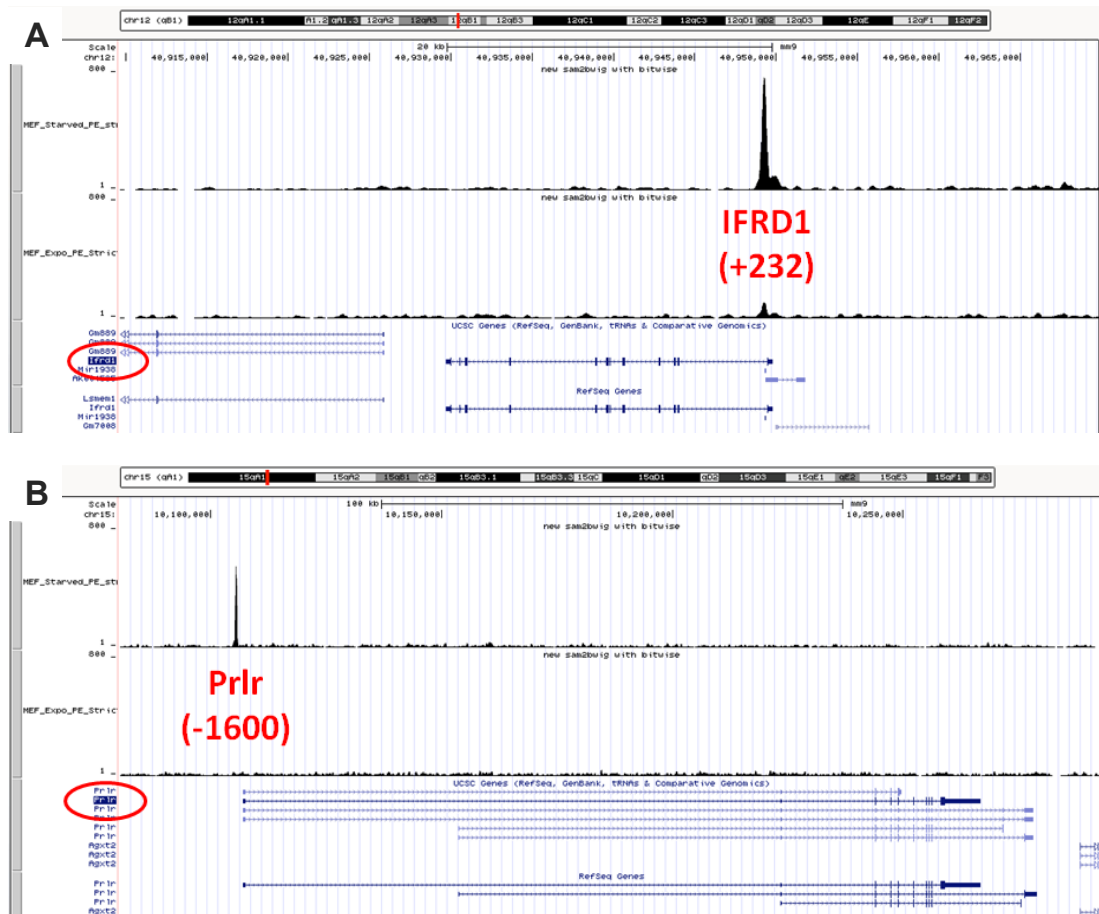
YFP φθορισμός είτε του μαστικού ιστού, είτε των κρυστομών από το μαστό (Εικ.3.17). Αποτέλεσμα όλων των παραπάνω ήταν τελικά να μην μπορούν να

γίνουν *in vivo* μελέτες της ιστοειδικής απαλοιφής του *Erf* γονιδίου από το μαστό κατόπιν κατάλληλων διασταυρώσεων, καθώς για κάποιο λόγο δεν επιτυγχάνεται αποτελεσματικά η απαλοιφή αυτή.

Οπότε, μετά από την παραπάνω αρνητική διαπίστωση, οι μόνοι τρόποι *in vivo* μελέτης της απαλοιφής του *Erf* γονιδίου από το μαστό είναι είτε με μεταμόσχευση πρωτογενών μαστικών επιθηλιακών κυττάρων (PMECs) από «ERF<sup>fl/fl</sup>» ποντίκι στα οποία έχει γίνει *ex vivo* απαλοιφή του *Erf* με τη χρήση του αδενοϊού AdCre-GFP σε MOI-50, στο μαστό ενός ανοσοκατεσταλμένου Rag1<sup>-/-</sup> ποντικού μετά από εκτομή του ενδογενούς δικτύου όντας άνηβο στην ηλικία των τριών εβδομάδων, είτε με μία λιγότερο επεμβατική μέθοδο όπως κατευθείαν ένεση του αδενοϊού AdCre-GFP διάμεσο της θηλής του «ERF<sup>fl/fl</sup>» ποντικού. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις δεν έχουν γίνει ακόμη κάποιες ακριβείς πειραματικές μελέτες, αλλά μόνο κάποια δοκιμή των τεχνικών αυτών προκειμένου να διαπιστωθεί κατά πόσο είναι πραγματοποιήσιμες λόγω ιδιαίτερης έλλειψης τεχνο-γνωσίας που υπάρχει από την πλευρά μας.

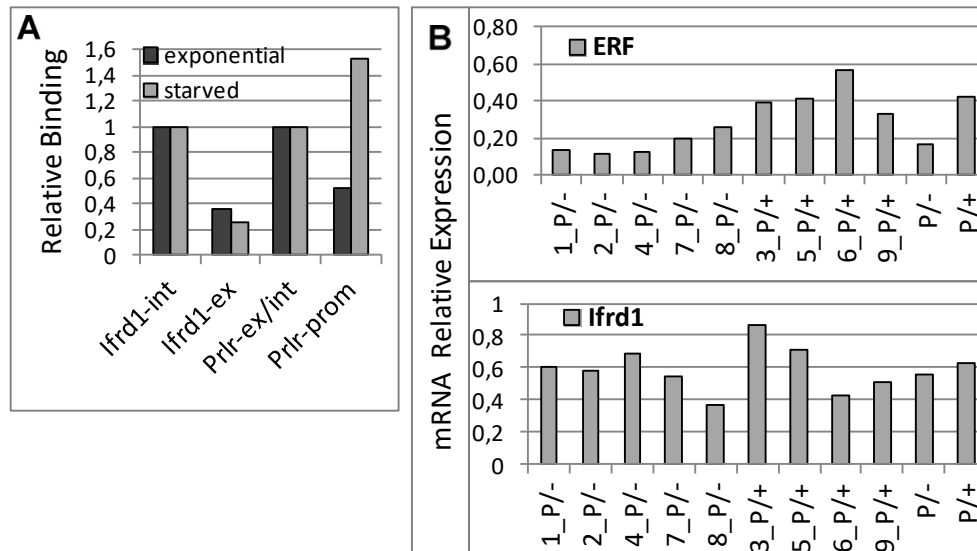
Επιπρόσθετα από την απαλοιφή του *Erf* γονιδίου που επιθυμούμε από το μαστό του ποντικού μέσω του συστήματος “Cre-LoxP”, αποκτήθηκε και μία ακόμη γενετική σειρά ποντικών «p53<sup>fl/fl</sup>», όπου μετά από κατάλληλες διαδοχικές διασταυρώσεις δημιουργήθηκε μια επιπλέον γενετική σειρά «p53<sup>fl/fl</sup>; ERF<sup>fl/fl</sup>» που είναι διπλά μεταλλαγμένη, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα μελέτης της ογκογένεσης στο μέλλον σε μικρότερο χρόνο.

Τέλος, παράλληλα με τα παραπάνω και με αφορμή κάποια υπάρχοντα δεδομένα από ChIP-seq που έγινε σε MEFs κύτταρα και είχαν δείξει ισχυρή άμεση πρόσδεση του ERF μεταγραφικού παράγοντα στα γονίδια *Ifrd1* (interferon-related developmental regulator 1) και *Prlr* (prolactin receptor) (Εικ.3.18) έγιναν τα ακόλουθα. Όσον αφορά το *Ifrd1* γονίδιο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αυτό εμπλέκεται μεταξύ άλλων και στη διαδικασία της οστεογένεσης (Vietor 2005) αλλά και της νευρικής διαφοροποίησης (Dieplinger 2007), όπως και ο ERF παράγοντας, και όσον αφορά το *Prlr* γονίδιο, αυτό έχει εξέχον ρόλο στη διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης του μαστού του ποντικού (Briskin et al. 1999; Shemanko 2008). Στις περιπτώσεις και των δύο γονιδίων *Ifrd1* και *Prlr* έγινε προσπάθεια επαλήθευσης του ChIP-seq αποτελέσματος με ChIP σε MEFs κύτταρα, όπου στην περίπτωση του *Ifrd1* δεν ανιχνεύτηκε κάποια πρόσδεση του ERF, αλλά



**Εικόνα 3.18:** Ο ERF προσδέεται σε περιοχές των γονιδίων *lfrd1* και *Prlr*. Δεδομένα από ChIP-seq ανάλυση της πρόσδεσης του ERF στα γονίδια *lfrd1* (A) και *Prlr* (B) σε MEFs κύτταρα. Το πάνω μέρος της εικόνας δείχνει καταγραφές όταν ο ERF είναι πυρηνικός και το κάτω μέρος δείχνει καταγραφές όταν ο ERF είναι κυτταροπλασματικός. Οι κορυφές που φαίνονται είναι ειδικές για τον ERF και αναλύθηκαν επιπλέον με ChIP και qPCR στα MEFs, όπως φαίνεται στην επόμενη εικόνα.

στην περίπτωση του *Prlr* ανιχνεύτηκε τρεις φορές μεγαλύτερη πρόσδεση του ERF, όταν αυτός είναι μέσα στον πυρήνα και ρυθμίζει τη μεταγραφή (Εικ.3.19A), υποδηλώνοντας ότι υπάρχει πιθανότητα εμπλοκής του ERF στη μορφογένεση του μαστού, μέσω άμεσης πρόσδεσής του και ρύθμισης του *Prlr* γονιδίου. Επιπλέον, στην περίπτωση του *lfrd1* γονιδίου, εξετάστηκαν τα επίπεδα mRNA του από κρανιακές ραφές εμβρύων ημέρας 16.5 (E16.5) που εξέφραζαν ελαττωμένο *Erf*, έχοντας ήδη δείξει στο παρελθόν ότι ο ελαττωμένος *Erf* προκαλεί κρανιοσυνοστέωση, επηρεάζοντας το κλείσιμο των κρανιακών ραφών (Twigg et al. 2013). Παρόλα αυτά, δεν ανιχνεύτηκε κάποια διαφορά στα *lfrd1* mRNA επίπεδα (Εικ.3.19B), μη επιβεβαιώνοντας έτσι, μαζί με το ChIP παραπάνω, τα πρωταρχικά αποτελέσματα από το ChIP-seq στα MEFs.

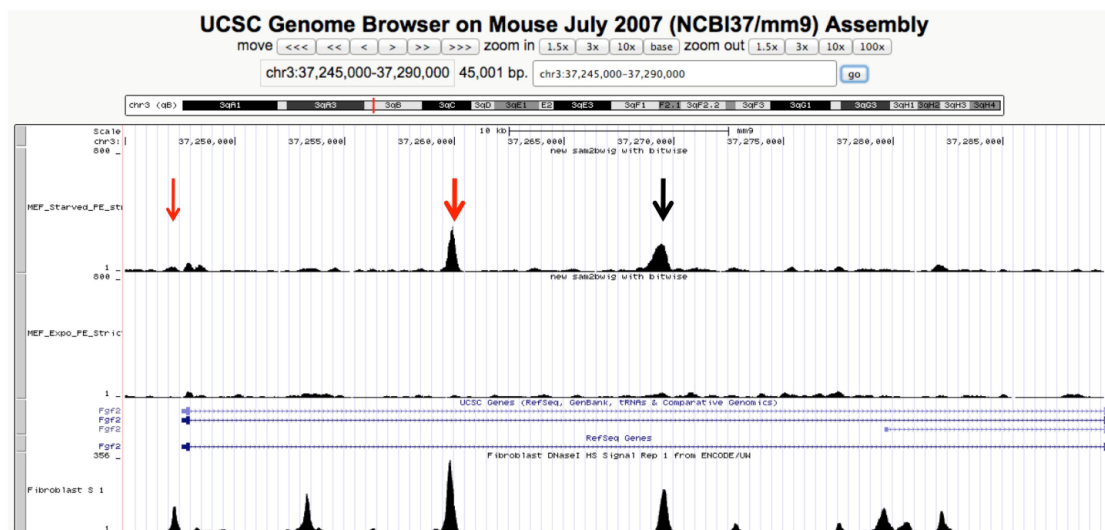


**Εικόνα 3.19: Έλεγχος άμεσης πρόσδεσης του ERF σε περιοχές των γονιδίων *lfrd1* και *Prlr* και επιπλέον έλεγχος επίδρασης του *Erf* στα επίπεδα του *lfrd1* mRNA. (A) Ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης (ChIP) σε MEFs κύτταρα, με ειδικό για τον ERF αντίσωμα (S17S α-ERF), για ειδικές (*lfrd1*-ex, *Prlr*-prom) και μη ειδικές (*lfrd1*-int, *Prlr*-ex/int) γενομικές περιοχές των *lfrd1* και *Prlr*, όταν ο ERF είναι κυτταροπλασματικός (σκούρο γκρι) ή πυρηνικός (ανοιχτό γκρι). Εδώ φαίνεται ότι ο ERF προσδένεται στον υποκινητή του *Prlr* τρεις φορές εντονότερα όταν είναι πυρηνικός. (B) Ποσοτική PCR και μέτρηση των mRNA επιπέδων των *Erf* (πάνω) και *lfrd1* (κάτω), σε κρανιακές ραφές εμβρύων 16.5 ημερών (E16.5). Οι δύο τελευταίες μπάρες απεικονίζουν το μέσο όρο ανά γονότυπο (P<sub>-</sub> και P<sub>+</sub>). Εδώ φαίνεται ότι ο *Erf*, δεν επηρεάζει τα mRNA επίπεδα του *lfrd1*, όταν βρίσκεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα (P<sub>-</sub>), στις κρανιακές ραφές νεογνών. (P<sub>-</sub>: ERF<sup>LoxP<sub>-</sub></sup>, P<sub>+</sub>: ERF<sup>LoxP<sub>+</sub></sup>).**

## Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ *Fgf2* ΑΠΟ ΤΟΝ ERF ΑΠΑΙΤΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗ ΧΟΡΙΑΚΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ

### Ο ERF προσδένεται στο *Fgf2* γονίδιο και καταστέλλει τη μεταγραφή του

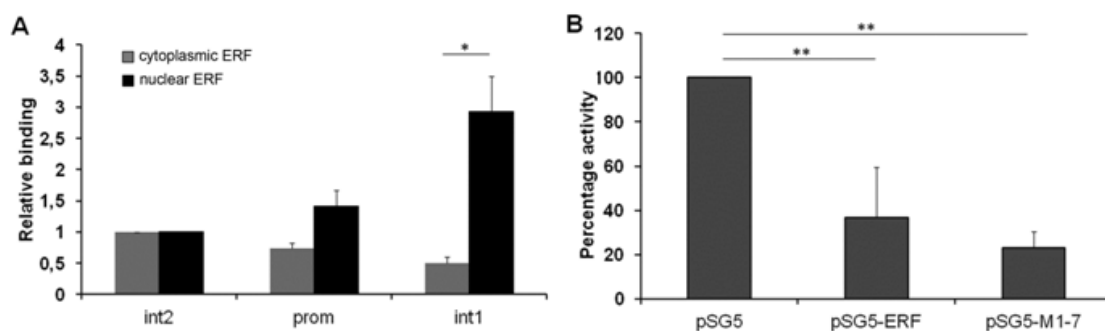
Σημαντική ποσότητα δουλειάς έχει αποκαλύψει πλήθος γονιδίων, που συμμετέχουν στην εξειδίκευση της κυτταρικής γενεαλογίας των τροφοβλαστικών κυττάρων (TSCs), κατά το σχηματισμό του πλακούντα. Έχουμε δείξει παλιότερα ότι το *Erf* είναι απαραίτητο για τον κατάλληλο σχηματισμό του λαβυρίνθου, καθώς επίσης και για την *ex vivo* διαφοροποίηση των TSCs (Paradaki et al. 2007). Ωστόσο, ο πιθανός μηχανισμός δράσης του στην διαφοροποίηση των TSCs ήταν άγνωστος. Η ανάλυση των DNA γενομικών περιοχών πρόσδεσης του ERF, με ανοσοκατακρήμιση χρωματίνης και μετέπειτα αλληλούχιση (ChIP-seq) (Twigg et al. 2013), αποκάλυψε πιθανή πρόσδεση του ERF σε περιοχές του υποκινητή και του ιντρονίου-1 του *Fgf2* γονιδίου (Εικ.3.5). Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε εάν πράγματι ο ERF προσδένεται στο *Fgf2*, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμισης χρωματίνης (ChIP) σε πρωτογενή TSCs, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες είτε πολλαπλασιασμού, είτε διαφοροποίησης.



**Εικόνα 3.5:** Ο ERF προσδένεται σε ποικίλες θέσεις μέσα στη γενομική περιοχή του *Fgf2*. Δεδομένα από ChIP-seq ανάλυση της πρόσδεσης του ERF στο *Fgf2* σε MEFs. Το πάνω μέρος της εικόνας δείχνει καταγραφές όταν ο ERF είναι πυρηνικός, το μεσαίο μέρος δείχνει καταγραφές όταν ο ERF είναι κυτταροπλασματικός και το κάτω μέρος της εικόνας δείχνει δεδομένα υπερεισθησίας της DNase στον UCSC περιηγητή γονιδιώματος. Τα κάθετα βέλη δείχνουν κορυφές ειδικές για τον ERF. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις κορυφές οι οποίες αναλύθηκαν επιπλέον με ChIP και qPCR στα TSCs.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6A, κάτω από συνθήκες διαφοροποίησης, παρατηρούμε αυξημένη πρόσδεση του ERF στον υποκινητή και ιντρόνιο-1 του *Fgf2* αλλά όχι στο απομακρυσμένο ιντρόνιο-2. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του ChIP-seq που αποκτήθηκαν από ποντικίσκιους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (MEFs), επιβεβαιώνοντας ότι ο ERF μπορεί να είναι ένας ρυθμιστής της μεταγραφής του *Fgf2*.

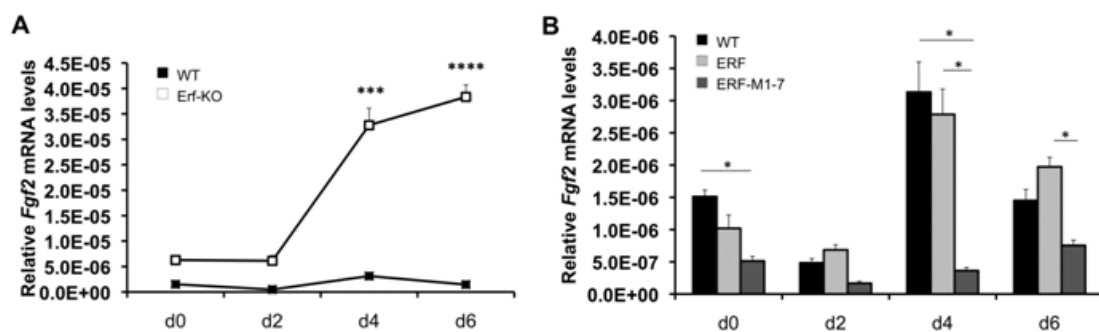
Για να διαπιστώσουμε εάν ο ERF μπορεί να καταστείλει την καθοδηγούμενη από τον υποκινητή του *Fgf2* μεταγραφή, σε ένα κυτταρικό σύστημα, πραγματοποιήσαμε πειράματα μεταγραφής και ενεργότητας λουσιφεράσης, χρησιμοποιώντας ένα πλασμίδιο αναφοράς που φέρει το υβρίδιο “*Fgf2* promoter-luciferase” και πλασμίδια που εκφράζουν ERF. Χρησιμοποιήσαμε τόσο wild type *Erf*, όσο και μεταλλαγμένο *Erf* (M1-7), που έχει 7 πιθανές θέσεις σερίνης/θρεονίνης MAPK φωσφορυλίωσης μεταλλαγμένες σε αλανίνη και βρίσκεται αποκλειστικά στον πυρήνα (Le Gallic et al. 1999), προσομοιάζοντας τις συνθήκες απουσίας αυξητικών παραγόντων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6B, παρατηρείται περισσότερη από 60% καταστολή με το wild type *Erf* πλασμίδιο, φτάνοντας στο 80% με το πυρηνικό μεταλλαγμένο *Erf*. Τα δεδομένα λοιπόν από το ChIP και τα πειράματα μεταγραφής και ενεργότητας λουσιφεράσης, δείχνουν ότι ο ERF μπορεί άμεσα να προσδένεται στο *Fgf2* γονίδιο και να καταστέλλει τη μεταγραφή του.



**Εικόνα 3.6: Ο ERF προσδένεται στο *Fgf2* και καταστέλλει την ενεργότητα του υποκινητή του. (A)** Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης πραγματοποιήθηκαν σε TSCs που μεγάλωναν εκθετικά (γκρι μπάρες) ή σε TSCs με έλλειψη ορού για 4 ώρες (μαύρες μπάρες). Η πρόσδεση που απεικονίζεται, είναι σχετική με τη μακρινή περιοχή του ιντρονίου-2. prom: FGF2-promoter primer set; int1: FGF2-intron 1 primer set; int2: FGF2-intron 2 primer set (βλέπε Υλικά και Μεθόδους). Οι τιμές εδώ είναι ο μέσος όρος από τρία ανεξάρτητα πειράματα. **(B)** Κύτταρα HeLa επιμολύνθηκαν με 0.2 μg από την -1078/-168 pGL3-basic-Luc *Fgf2* promoter πλασμιδιακή κατασκευή, μαζί με 1.7 μg από τον άδειο φορέα (pSG5), ή τον wild type *Erf* (pSG5-ERF), ή το πυρηνικό *Erf* μετάλλαγμα (pSG5-M1-7) όπως απεικονίζεται, και 1 μg από το RSV-LacZ σαν δείγμα ελέγχου αποτελεσματικότητας της επιμόλυνσης. Σε κάθε πείραμα, η ενεργότητα των δειγμάτων που επιμολύνθηκαν με τον άδειο φορέα pSG5 θεωρούταν 100%. Οι τιμές που απεικονίζονται εδώ, αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Επίσης, απεικονίζονται οι τυπικές αποκλίσεις και η στατιστική σημαντικότητα ( $p < 0.01$ ).

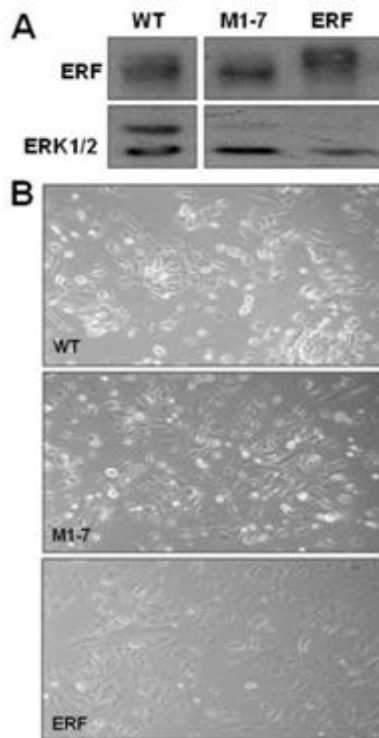
### Ο ERF καταστέλλει την έκφραση του *Fgf2* στα TSCs

Προκειμένου να εκτιμήσουμε την οποιαδήποτε βιολογική σημασία της παραπάνω μεταγραφικής καταστολής του *Fgf2* από τον ERF, εξετάσαμε περαιτέρω την έκφραση του *Fgf2* κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης είτε wild type, είτε Erf-KO TSCs. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν στο καθιερωμένο πρωτόκολλο *ex vivo* διαφοροποίησης, μετά την αφαίρεση των EMFI-CM, FGF4 και Heparin, και μετρήθηκαν τα επίπεδα της έκφρασης του *Fgf2* ποσοτική PCR. Η *Fgf2* έκφραση ήταν οριακή αλλά ανιχνεύσιμη τόσο στα wt όσο και στα Erf-KO TSCs, ενώ η έκφραση στα Erf-KO TSCs ήταν σημαντικά υψηλότερη. Αξιοσημείωτα, τα *Fgf2* επίπεδα αυξήθηκαν σχεδόν κατά μία τάξη μεγέθους κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των Erf-KO, αλλά όχι των wt TSCs (Εικ.3.7A), προτείνοντας ότι ο ERF μπορεί να καταστείλει την μη επιθυμητή *Fgf2* ενεργοποίηση κατά τη διαφοροποίηση.



**Εικόνα 3.7: Η *Fgf2* έκφραση στα TSCs καταστέλλεται από τον *Erf*.** (A) Wild type (μαύρα τετράγωνα) και *Erf*-KO (άσπρα τετράγωνα) TSCs υποβλήθηκαν στο καθιερωμένο πρωτόκολλο διαφοροποίησης και μετρήθηκαν με qPCR τα επίπεδα του *Fgf2* mRNA σε σχέση με τα επίπεδα του *Gapdh* mRNA. Η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων απεικονίζεται με τρεις ( $p < 0.001$ ) ή τέσσερις ( $p < 0.0001$ ) αστερίσκους. (B) Wild type TSCs (μαύρο), TSCs που υπερεκφράζουν wild-type ERF (ανοιχτό γκρι) και TSCs που υπερεκφράζουν το πυρηνικό ERF μετάλλαγμα M1-7 (σκούρο γκρι), υποβλήθηκαν στο καθιερωμένο πρωτόκολλο διαφοροποίησης και μετρήθηκαν με qPCR τα επίπεδα του *Fgf2* mRNA σε σχέση με τα επίπεδα του *Gapdh* mRNA. Τα γραφήματα απεικονίζουν το μέσο όρο τουλάχιστον πέντε ανεξάρτητων πειραμάτων. Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων ( $p < 0.05$ ).

Στη συνέχεια, κατασκευάσαμε TSC κυτταρικές σειρές που υπερεκφράζουν ERF, προκειμένου να εξετάσουμε περαιτέρω εάν τα επίπεδα και ο πυρηνικός εντοπισμός του ERF, επηρεάζουν την *Fgf2* έκφραση και πιθανώς την TSC διαφοροποίηση και εξειδίκευση της κυτταρικής γενεαλογίας. Τόσο το wild type, όσο και η M1-7 *Erf* μετάλλαξη, που έχει 7 μεταλλαγές Ser/Thr σε Ala στα ERK1/2 σημεία φωσφορυλίωσης και είναι μόνιμως πυρηνική (Polychronopoulos et al. 2006), εισήχθηκαν μέσα σε TSCs μέσω του  $\rho$ CMV πλασμιδιακού φορέα. Τα ERF επίπεδα σε αυτούς τους κλώνους μετρήθηκαν με ποσοτική PCR, και έδειξαν μέτρια υπερέκφραση κατά 4



περίπου φορές για το wt ERF και κατά 2 φορές για το πυρηνικό ERF μετάλλαγμα, προτείνοντας ότι τα υψηλά *Erf* επίπεδα μπορεί να είναι επιβλαβή για τα TSCs (Εικ.3.8). Παρά τα οριακά επίπεδα έκφρασης του *Fgf2*, τα κύτταρα με το πυρηνικό ERF μετάλλαγμα είχαν πάντα σημαντικά χαμηλότερη έκφραση, τόσο σε θρεπτικό υλικό διατήρησης-πολλαπλασιασμού, όσο και διαφοροποίησης (Εικ.3.7B). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι ο ERF μπορεί να καταστείλει ακόμη και την οριακή *Fgf2* έκφραση στα TSCs και ότι αυτή η καταστολή είναι ακόμη πιο σημαντική κατά τη διαφοροποίηση.

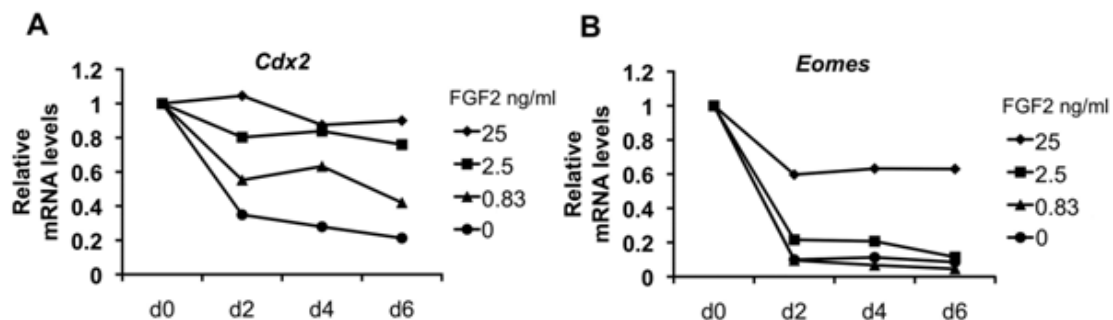
**Εικόνα 3.8: Η δημιουργία των TSC κυτταρικών σειρών που υπερεκφράζουν wild type ERF ή το πυρηνικό του μετάλλαγμα.** Οι κυτταρικές σειρές δημιουργήθηκαν μετά από επιμόλυνση με πλασμίδια που εκφράζουν είτε τον wild type ERF είτε το πυρηνικό του μετάλλαγμα M1-7, και επιλέχθηκαν με αντιβιοτικό ανθεκτικότητας. **(A)** Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από μη επιμολυσμένα TSCs (WT), και TSCs που υπερεκφράζουν wild-type ERF (ERF) ή ERF-M1-7 (M1-7) αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με το ειδικό για τον ERF αντίσωμα S17S (πάνω πλαίσιο) ή με αντίσωμα ειδικό για τις ERK1/2 (κάτω πλαίσιο) σαν δείγμα ίσου φορτώματος. **(B)** Εικόνες φάσης-αντίθεσης αραιής καλλιέργειας σε συνθήκες διατήρησης αδιαφοροποίητης κατάστασης των πατρικών TSCs (WT) ή των κλώνων που υπερεκφράζουν wt ERF (ERF) ή το M1-7 πυρηνικό ERF μετάλλαγμα (M1-7).

### **Ακόμη και χαμηλά επίπεδα *Fgf2* επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των TSCs**

Η αυτό-ανανέωση των TSCs στην καλλιέργεια εξαρτάται από τον FGF4 (Tanaka et al. 1998, Himeno et al. 2008). Δεδομένου της δομικής και λειτουργικής ομοιότητας μεταξύ FGF2 και FGF4, και της διαφαινόμενης ενεργοποίησης του *Fgf2*, κατά την απουσία του *Erf*, εξετάσαμε την ικανότητα του FGF2 στη διατήρηση της αυτό-ανανέωσης των ποντικίσσιων TSCs. Προκειμένου να υπολογίσουμε την αποτελεσματικότητα του FGF2 στη διατήρηση των TSCs, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες διατήρησης παρουσία μίας συγκρίσιμης του FGF4 συγκέντρωσης των 25ng/ml, καθώς επίσης και 10 και 30 φορές λιγότερο στα 2.5, 0.8 και 0 ng/ml FGF2 για 6 ημέρες, και μετρήθηκε με qPCR η έκφραση των δεικτών των τροφοβλαστικών κυττάρων *Eomes* και *Cdx2*. Τα *Cdx2* επίπεδα παρέμειναν υψηλά με 25 ή 2.5 ng/ml FGF2 (Εικ.3.9A). Αντίθετα, τα *Eomes* επίπεδα παρέμειναν σχετικά



υψηλά μόνο στα 25 ng/ml FGF2 (Εικ.3.9B). Η διαφαινόμενη μικρή μείωση των *Eomes* επιπέδων με 25 ng/ml FGF2, δε φαίνεται να είναι αποτέλεσμα διαφοροποίησης, καθώς παρέμεινε σταθερό, ενώ δεν παρατηρήσαμε οποιοδήποτε διαφοροποιημένο κύτταρο μετά από 6 ημέρες καλλιέργειας. Διαφοροποιημένα κύτταρα παρατηρήθηκαν με ευκρίνεια στα 2.5 ng/ml FGF2 και κάτω. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι ακόμη και *risograms* του FGF2 μπορούν αποτελεσματικά, έστω και εν μέρει, να συμβάλουν στη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των TSCs, μπλοκάροντας ή καθυστερώντας τη διαδικασία της διαφοροποίησης, κάτι που συμφωνεί και με τα πρόσφατα ευρήματα των Ohinata και Tsukiyama, που έδειξαν ότι ο FGF2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην απομόνωση των TSCs από τη βλαστοκύστη ποντικού (Ohinata and Tsukiyama 2014).



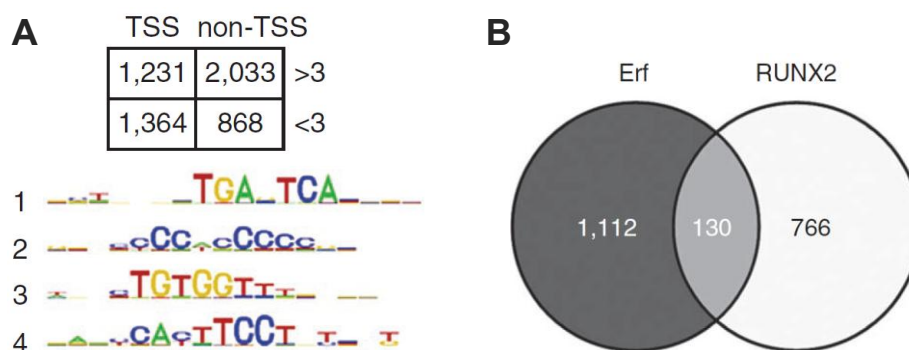
**Εικόνα 3.9: Ο ERF μπορεί να συμβάλει στη διατήρηση των TSCs.** Τροφοβλαστικά κύτταρα καλλιιεργήθηκαν για 6 ημέρες παρουσία 25 ng/ml (ρόμβοι), 2.5 ng/ml (τετράγωνα), 0.8 ng/ml (τρίγωνα) ή απουσίας του FGF2 (κύκλοι). Τα mRNA επίπεδα των *Cdx2* (A) και *Eomes* (B) μετρήθηκαν με qPCR και εκφράστηκαν σε σχέση με τα επίπεδα των κυττάρων που μεγάλωσαν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες διατήρησης με 25 ng/ml FGF4 (d0). Τα γραφήματα δείχνουν το μέσο όρο τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. Χρησιμοποιώντας two-way ANOVA, σχεδόν όλες οι κατά ζεύγη συγκρίσεις, μεταξύ διαφορετικών FGF2 συγκεντρώσεων της ίδιας ημέρας, ήταν στατιστικά σημαντικά διαφορετικές (δεν απεικονίζεται στο γράφημα). Στατιστικά μη σημαντικές διαφορές για τα *Cdx2* επίπεδα (A) ήταν μεταξύ 25 ng/ml και 2.5 ng/ml καθώς επίσης και 0.8 ng/ml και 0 ng/ml στη d2 και d6 και μεταξύ 25 ng/ml και 2.5 ng/ml, 25 ng/ml ή 2.5 ng/ml και 0.8 ng/ml στη d4. Για το *Eomes* (B), η μόνη στατιστικά μη σημαντική διαφορά ήταν μεταξύ 0.8 ng/ml και 0 ng/ml στη d2 και 2.5 ng/ml και 0 ng/ml στη d6.

## ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΕΣ ΔΟΣΕΙΣ *ERF* ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ ΚΑΙ ΣΤΟ ΠΟΝΤΙΚΙ

Στα πλαίσια μίας μεγάλης ευρύτερης μελέτης, που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριό μας στο “Nature Genetics” και αναδεικνύει το ρόλο του *Erf* στην οστεογένεση και συγκεκριμένα την επίδρασή του στο κλείσιμο των κρανιακών ραφών και την κρανιοσυνοστέωση μέσω συνεργασίας με το *Runx2*, τόσο στον άνθρωπο, όσο και στο ποντίκι (Twigg et al. 2013), πραγματοποιήθηκε από τη μεριά μου ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) σε ποντικίστους εμβρυϊκούς ινοβλάστες (MEFs, E13.5), με χρήση αντισώματος έναντι του ERF (S17S α-ERF), όταν αυτός είναι κυτταροπλασματικός (παρουσία FCS) ή πυρηνικός (απουσία FCS για 4h), δρώντας πλέον ως μεταγραφικός καταστολέας. Στη συνέχεια, επακολούθησε ευρείας κλίμακας αλληλούχιση (ChIP-seq), όπου με κατάλληλους εμπλουτισμούς αλληλουχιών, ταυτοποιήθηκαν σήματα που αντιστοιχούν σε περιοχές δυναμικής πρόσδεσης του ERF, με ένταση τρεις φορές μεγαλύτερη όταν είναι πυρηνικός, σε σχέση με όταν είναι κυτταροπλασματικός. Ακολούθως, τα σήματα αυτά δυναμικής πρόσδεσης διαχωρίστηκαν με βάση την απόστασή τους από TSS (Transcriptional Start Sites) σε “TSS” όταν η απόσταση ήταν μέχρι 1kb (πιθανός υποκινητής) και “non-TSS” όταν η απόσταση ήταν μεγαλύτερη από 1kb (πιθανός ενισχυτής) (Εικ.3.20Α). Μετά από MEME ανάλυση, ταυτοποιήθηκαν εμπλουτισμένες δύο κυρίαρχες αλληλουχίες κοντά στα TSSs, όπου η μία αντιστοιχεί σε ETS-binding περιοχή και η άλλη σε περιοχή που προσδένεται από *Ronin-Hcfc1*. Αυτά τα μοτίβα είναι ταυτόσημα με αυτά που βρίσκονται σε υποκινητές και προσδένονται από ETS1. Στα “non-TSSs”, όπου πιστεύεται να ανιχνευτούν ιστο-ειδικές αλληλεπιδράσεις των ETS παραγόντων, τα τρία περισσότερο ειδικά μοτίβα αλληλουχίας ήταν 5'-TGANTCA-3', 5'-TGTGG-3' και 5'-TTCCT-3', όπου N αντιπροσωπεύει οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, τα οποία αντιστοιχούν στα συντηρημένα μοτίβα για AP-1, RUNX και ETS παράγοντες, αντιστοίχως (Εικ.3.20Α). Τα δεδομένα αυτά προτείνουν ότι οι ERF-binding περιοχές συχνά βρίσκονται κοντά σε περιοχές πρόσδεσης άλλων μεταγραφικών παραγόντων όπως των AP-1 και RUNX. Η μη τυχαιότητα των παραπάνω συσχετισμών επιβεβαιώθηκε

δείχνοντας ότι στενά γειτονικές AP-1-ETS και RUNX-ETS περιοχές εμφάνισαν πολικότητα, που ήταν σύμφωνη με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ζευγών των μεταγραφικών παραγόντων, όταν αυτοί προσδένονταν στο DNA με συγκεκριμένη κατεύθυνση και απόσταση. MetaCore ανάλυση των “non-TSS” ChIP-seq στόχων με αναλογία πρόσδεσης  $>3$  ( $n=2,003$ ) ταυτοποίησε το EMT ως τη βιολογική διαδικασία με το μεγαλύτερο εμπλουτισμό και τοποθέτησε το RAS-MEK-ERK μονοπάτι και τους καθοδικούς AP-1 παράγοντες στο κέντρο αυτού του δικτύου. Η παραπάνω ανάλυση επιβεβαιώνεται και από το πρώτο μέρος της διατριβής αυτής, όπου ο ERF ταυτοποιήθηκε πειραματικά ως αρνητικός ρυθμιστής του EMT φαινομένου (Allegra et al. 2012).

Η ταυτοποίηση συχνών RUNX μοτίβων πρόσδεσης σε μακρινές περιοχές (non-TSS) ERF στόχων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς ο Runx2 είναι ένας κύριος ρυθμιστής της κρανιακής οστεογένεσης (Lou et al. 2009). Τα δεδομένα από το ChIP-seq ανέδειξαν δύο θέσεις δυναμικής πρόσδεσης του ERF μέσα σε ιντρόνια του *Runx2*, κάτι που μπορεί να σημαίνει άμεση ρύθμιση της μεταγραφής του. Εναλλακτικά, ο *Erf* μπορεί να ρυθμίζει την οστεογένεση αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών συμπλόκων που σχηματίζονται σε DNA στόχους των Runx2 και άλλων Ets πρωτεϊνών (όπως Ets2). Έτσι, προσπαθώντας να διασαφηνίσουμε την παραπάνω υπόθεση, συγκρίναμε δεδομένα από το δικό μας *Erf* ChIP-seq με δεδομένα 1,603



**Εικόνα 3.20: Αναλύσεις από ChIP-seq που έγινε σε MEFs χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα για τον ERF. (A)** Επάνω, δείχνεται ο αριθμός των κορυφών που ταυτοποιήθηκαν σύμφωνα με το εάν βρίσκονταν εντός 1kb από το TSS και εάν χανόταν η πρόσδεση όταν ο ERF ήταν κυτταροπλασματικός (-FCS/+FCS $>3$ ). Κάτω, μετά από MEME ανάλυση των 2,033 non-TSS κορυφών δυναμικής πρόσδεσης (-FCS/+FCS $>3$ ), ταυτοποιήθηκε ο εμπλουτισμός μοτίβων που αντιστοιχούν σε περιοχές πρόσδεσης για AP-1 (μοτίβο 1, 5'-TGANTCA-3'), RUNX (μοτίβο 3, 5'-TGTGG-3') και ETS (μοτίβο 4, 5'-TTCCCT-3'). Το μοτίβο 2 παρατηρήθηκε επίσης και σε TSS κορυφές. **(B)** Αλληλεπικαλυπτόμενοι μεταγραφικοί στόχοι των *Erf* και RUNX2 που ταυτοποιήθηκαν από ChIP-seq. Συγκεκριμένα, γίνεται σύγκριση των non-TSS ποντικίστιων *Erf* στόχων με -FCS/+FCS $>3$  που ταυτοποιήθηκαν εδώ ( $n=2,033$ ) με ορθόλογους ανθρώπινους RUNX2 στόχους που ταυτοποιήθηκαν από τον Little *et al.* ( $n=1,603$ ). Για να βελτιώσουμε την ειδικότητα της «σύνδεσης» με τα ρυθμιζόμενα γονίδια, αποκλείστηκαν οι ChIP-seq κορυφές που ήταν μακρύτερα από 40kb από το κοντινότερο RefSeq γονίδιο. Οι κορυφές αποδόθηκαν στο γονίδιο με το πλησιέστερο εξόνιο.

RUNX2-δεσμευμένων περιοχών σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Little et al. 2012). Από τη σύγκριση αυτή, υπήρχαν 130 ομόλογα γονίδια τα οποία ήταν πλησίον και είχαν σήματα σε απόσταση μέχρι 40kb από CHIP-seq κορυφή καθενός εκ των δύο CHIP-seq σετ δεδομένων, μία ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική επικάλυψη ( $P=4 \times 10^{-11}$ , hypergeometric test) (Εικ.3.20B). Επιπλέον, ο Little et al. ανίχνευσε εμπλουτισμό ενός υβριδικού ETS-RUNX μοτίβου πρόσδεσης, αρκετά παρόμοιου με την αλληλουχία (5'-GGATGTGG-3') του δικού μας σετ δεδομένων. Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν πιθανές αλληλεπιδράσεις του Etf και Runx2 σε μία πληθώρα στόχων.

# 4. Συζήτηση

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΕΠΙΘΗΛΙΟ-ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΒΑΣΗ (EMT)

Το EMT είναι μια πολύ σημαντική αναπτυξιακή διαδικασία, με ξεκάθαρο ρόλο στην καρκινογένεση και τη μετάσταση, και έχει μελετηθεί εκτενώς σε μία ποικιλία συστημάτων, αν και κάποιες φορές με αντιφατικά αποτελέσματα. Στα περισσότερα συστήματα, το TGFβ είναι απαραίτητο για το EMT (Waerner et al. 2006). Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις όμως, είναι επίσης απαραίτητη η ογκογόνος ή αυξημένη Ras σηματοδότηση (Waerner et al., 2006; Lahsnig et al., 2008). Επιπλέον, μία ποικιλία σηματοδοτικών μονοπατιών και μεταγραφικών παραγόντων συνεισφέρουν στο EMT, συχνά εξαρτώμενα από τον κυτταρικό τύπο και τις συνθήκες καλλιέργειας (Huber et al., 2005; Waerner et al., 2006), εμποδίζοντας έτσι την ολοκληρωμένη ανάλυση του μηχανισμού κλειδιού για το EMT. Η χρήση του Ets-σχετιζόμενου μεταγραφικού καταστολέα Erf, ενός καθιερωμένου παράγοντα του Ras-επαγόμενου Erk/MAPK μονοπατιού, το οποίο είναι χρήσιμο για το EMT (Janda et al. 2002a), δημιουργεί την πιθανότητα εύρεσης άμεσων και έμμεσων ρόλων του μεταγραφικού ελέγχου κατά την επαγωγή του EMT. Με τη χρήση διαφόρων μεθόδων καλλιέργειας, μας δόθηκε η δυνατότητα να μελετήσουμε την επαγωγή του EMT, κάτω από συνθήκες στις οποίες εξωκυτταριοί παράγοντες και παράγοντες διακυτταρικής επαφής ποικίλουν. Τελικά, με ανάλυση μεταγραφικού προτύπου μας επιτράπηκε να ανιχνεύσουμε παράγοντες καθοδικά του Erf, που μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση του EMT από τον Erf. Τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι η έκφραση του ERF μπορεί να αναστείλει το TGFβ-επαγόμενο EMT, πρωτίστως μπλοκάροντας την έκφραση της Semaphorin-7a και την επαγωγή του από το TGFβ, και ότι μαζί ο Erf και η Semaphorin-7a μπορεί να έχουν ρόλο στη ρύθμιση του EMT.

Πρόσφατα δείξαμε (Tarcic et al. 2012) ότι ο κυτταροπλασματικός Erf μπορεί να παίζει ρόλο στην επιθηλιακή κυτταρική κινητικότητα, ενώ η επίδραση κατά του πολλαπλασιασμού ήταν μία από τις πρώτες λειτουργίες του πυρηνικού Erf που ανιχνεύτηκαν. Αυτές οι ενέργειες μπορούν να συγκρουστούν με το EMT και να ενισχύσουν ή να αποσιωπήσουν τον

διαφαινόμενο φαινότυπο. Η 5 με 10 φορές υπερέκφραση του wt ή μεταλλαγμένου ERF σε ErRas κύτταρα, ενός καθιερωμένου συστήματος για ανάλυση του EMT, ήταν αρκετή για να επηρεάσει την ικανότητα επαγωγής του TGFβ-επαγόμενου EMT, παρόλο που ο φαινότυπος επηρεαζόταν από διαφορετικές πλευρές της λειτουργίας του Erf. Η αυξημένη πυρηνική τοπολογία του ERF σε κύτταρα που μεγάλωναν μέσα σε πηκτική κολλαγόνου (3D) προτείνει ότι η μεταγραφική καταστολή μπορεί να είναι η πρωταρχική λειτουργική ενέργεια, μέσω της οποίας ο Erf καταστέλλει το TGFβ-επαγόμενο EMT. Αντίθετα, οι διαφορές στην κινητικότητα φαίνεται να σχετίζονται πρωταρχικά με την ικανότητα του Erf να αλληλεπιδρά με τις Erks, παρόλο που ένα μεταγραφικό στοιχείο δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Τα δεδομένα από το πρότυπο μεταγραφικής έκφρασης και της ανάλυσης γονιδίων στόχων της TGFβ σηματοδότησης υπέδειξαν ότι το TGFβ/Smad μονοπάτι παραμένει ακέραιο μετά την υπερέκφραση του ERF. Το *Sema7a* ήταν το μόνο γονίδιο που πληρούσε όλα τα κριτήρια. Συγκεκριμένα, το *Sema7a* επαγόταν από TGFβ στα πατρικά κύτταρα (ErRas) αλλά όχι στις ERF-εκφραζόμενες κυτταρικές σειρές, μειωνόταν απουσία TGFβ σε όλες τις ERF σειρές συγκρινόμενο με τα πατρικά κύτταρα, και ήταν χαμηλότερο σε όλες τις ERF σειρές παρουσία TGFβ συγκρινόμενο με τα πατρικά κύτταρα.

Οι semaphorins είναι εξωκυττάρια ή/και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη λεμφοκυτταρική και νευρική ανάπτυξη (Kruger *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2008), καθώς επίσης και τον καρκίνο (Neufeld *et al.*, 2005; Bielenberg and Klagsbrun, 2007), αλλά και την ανάπτυξη και ομοιοστάση των οστών (Lallier 2004, Spencer and Lallier 2009). Σηματοδοτούν μέσω πρόσδεσής τους με plexins και integrins και εκτελούν ποικίλες κυτταρο-ειδικές πρωτεΐνο-ειδικές λειτουργίες (Zhou *et al.* 2008). Η Semaphorin-7a, το μοναδικό μέλος μίας οικογένειας που αντιπροσωπεύει ιϊκές semaphoring-like πρωτεΐνες, έχει επίσης εμπλακεί στη λεμφοκυτταρική (Czopik *et al.*, 2006) και νευρική ανάπτυξη (Pasterkamp *et al.*, 2007). Αξιοπρόσεκτα, η *Sema7a* βρέθηκε να ρυθμίζεται από TGFβ και να απαιτείται για τη Smad3-ανεξάρτητη TGFβ σηματοδότηση στην πνευμονική ίνωση (Kang *et al.* 2007) και την ηπατική ίνωση (Minicis *et al.* 2013). Η έκφραση της *Semaphorin-7a* φαίνεται να είναι αυστηρά εξαρτημένη από την ενεργότητα της Erk. Ο ERF αναστέλλει

τη μεταγραφή της *Sema7a* σε πειράματα παροδικής επιμόλυνσης, και η επανα-έκφρασή της σε ERF-εκφραζόμενα ErRas κύτταρα επαναφέρει το EMT. Η Erf-ανεξάρτητη καταστολή της Semaphorin-7a σε ErRas κύτταρα καταργεί την ικανότητά τους να υφίστανται EMT (Εικ.3.4). Έτσι, η Semaphorin-7a φαίνεται να παίζει ένα ρόλο κλειδί στη διεργασία.

Στη TGFβ-επαγόμενη πνευμονική ίνωση, που πιθανώς δε συμπεριλαμβάνει υπερ-ενεργοποιημένη Ras σηματοδότηση, η Semaphorin-7a προστατεύει τα κύτταρα από την απόπτωση, μέσω ενεργοποίησης του PI3K μονοπατιού (Kang et al. 2007). Δεν ήταν έκπληξη που η *Sema7a* δεν είχε κάποια επίδραση στην επιβίωση των ErRas κυττάρων (αδημοσίευτα αποτελέσματα), αφού τα ErRas κύτταρα προστατεύονται ισχυρά από την απόπτωση μέσω της συνεργατικής υπερ-ενεργοποίησης των Erk και PI3K (Janda et al. 2002a). Πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι η *Sema7a* παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα μέσω αλληλεπίδρασης με την integrin-β1 (Messina et al. 2011) και στη μετάσταση μέσω Plexin-C1 σηματοδότησης (Lavoza et al. 2009; Scott et al. 2009). Τα δικά μας αποτελέσματα δείχνουν ότι η *Sema7a* μπορεί να έχει ανάλογο ρόλο στην εκδήλωση του EMT, παρόλο που συμπεριλαμβάνει διαφορετικούς υποδοχείς, καθώς η Plexin-C1 δεν εκφράζεται στα ErRas κύτταρα.

Δεν είναι ξεκάθαρο εάν ο Erf ρυθμίζει τη μεταγραφή της *Sema7a* άμεσα ή έμμεσα. Πειράματα ενεργοποίησης του υποκινητή έδειξαν πιθανή άμεση ρύθμιση, και η εξάρτηση της *Sema7a* από την Erk ενεργότητα ενισχύει την άμεση ρύθμιση από τον Erf. Ωστόσο, η παρατηρούμενη αναστολή, συγκρινόμενη με την μεταγραφική καταστολή του Erf σε άλλους υποκινητές σε ανάλογα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης (Sgouras et al. 1995), είναι κάπως περιορισμένη. Επιπλέον, τόσο οι πυρηνικές όσο και οι μετακινούμενες στον πυρήνα μορφές του Erf εμφάνισαν λίγες διαφοροποιήσεις. Τέλος, δε μπορέσαμε να ανιχνεύσουμε στατιστικά σημαντικές διαφορές πρόσδεσης του ERF στη γενωμική περιοχή του *Sema7a*, μέσω πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης χρωμαίνης (αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επομένως, δε μπορεί να αποκλειστεί μία έμμεση ρύθμιση και επιπλέον πειράματα χρειάζονται να ξεκαθαρίσουν τον ακριβή μηχανισμό της ρύθμισης του *Sema7a* από τον Erf.



Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι η αυστηρή απαίτηση της υπερ-ενεργοποίησης της Ras σηματοδότησης για την TGFβ-επαγόμενη EMT (Janda et al. 2002b) μπορεί να είναι απλώς μερική, λόγω προστασίας από την TGFβ-επαγόμενη απόπτωση μέσω PI3K σηματοδότησης, και ότι η υπερ-ενεργή Erk/MAPK σηματοδότηση μπορεί επίσης να είναι απαραίτητη για το EMT, καθώς εμποδίζει την καταστολή γονιδίων που είναι απαραίτητα για το EMT, όπως η Semaphorin-7a.

## **Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΟΓΚΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

Σχετικά με τη μελέτη του ρόλου του ERF στην ογκογένεση, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε ειδικότερα το ρόλο του στην ανάπτυξη και τον καρκίνο του μαστού, έχοντας αρκετά δεδομένα που να τον υπονομεύουν. Ανοδικά κύρια μόρια του σηματοδοτικού μονοπατιού στο οποίο συμμετέχει ο ERF, όπως υποδοχείς κινάσης τυροσίνης RTKs (Andrechek and Muller 2000) και το RAS (Giltane and Balko 2014, Stamatakos et al. 2010), συμμετέχουν ποικιλοτρόπως στον καρκίνο του μαστού. Επίσης, το ίδιο ισχύει και με πολλά μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων ETS, όπως ELF5 (Piggin et al. 2016, Chakrabarti et al. 2012), ELK3 (Heo et al. 2015), ETV3 και ELF3 (Mesquita et al. 2013), PDEF (Sabherwal et al. 2013), ETS1 (Kalet et al. 2013) και ELK1 (Lalotitis et al. 2013). Στο πρώτο μέρος της διατριβής, μελετήθηκε η καταστολή του EMT φαινομένου από τον ERF μέσω της Semaphorin-7a και για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα του μαστού (ErH4-Ras) (Allegra et al. 2012). Είναι ευρέως γνωστό ότι το φαινόμενο του EMT συμβαίνει μεταξύ άλλων κατά την ογκογένεση και οδηγεί στη μετάσταση (Huber, Kraut, Beug 2005) και ότι εμπλέκεται και στον καρκίνο του μαστού (Blick et al. 2010). Ακόμη, και η Semaphorin-7a έχει βρεθεί πρόσφατα να βοηθάει στην πρόοδο του καρκίνου στο μαστό (Black et al. 2016, Garcia-Areas et al. 2014). Στο δεύτερο μέρος της διατριβής αυτής αποδείχθηκε η εμπλοκή του ERF, μέσω του FGF2, στο σχηματισμό του λαβυρίνθου του πλακούντα και στη διαφοροποίηση των TSCs, και παλιότερες έρευνες έχουν αναδείξει το σπουδαίο ρόλο του FGF2 στη μορφογένεση αλλά

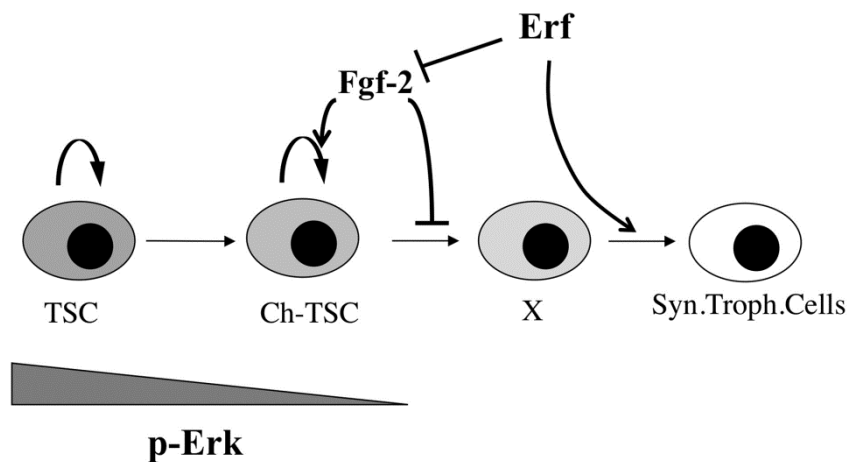
και καρκίνο του μαστού (Soultou, Hamelin and Crepin 1994; Soufla et al. 2006; Penfei et al. 2008). Επιπλέον, ο ERF παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των κρανιακών ραφών και στην κρανιοσυνοστέωση, σε συνεργασία με το *Runx2* (Twigg et al, 2013), ενώ ταυτόχρονα έχει βρεθεί ο ρόλος του RUNX2 στην κανονική λειτουργία αλλά και καρκίνο του μαστού (Pratap et al. 2009; Shore 2005). Τέλος, στο παρελθόν στο εργαστήριο εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης του ERF mRNA σε ένα περιορισμένο αριθμό ανθρώπινων δειγμάτων όγκων του μαστού, δείχνοντας κατά 85% μείωση της έκφρασής του στους όγκους, υποδηλώνοντας ότι η ελαττωμένη έκφραση μπορεί να σχετίζεται με την ογκογένεση, Γνωρίζοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω, προχωρήσαμε στη μελέτη της απουσίας του ERF από το μαστό του ποντικού, τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo*, καθώς υπάρχει σοβαρή υποψία εμπλοκής του στην ανάπτυξη ή/και ογκογένεση του μαστού. Από τη μελέτη αυτή όμως δε μπορούμε ακόμη να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα και βρίσκεται ακόμη σε εξέλιξη, καθώς έχουν γίνει μόνο κάποια πρώτα αναγνωριστικά πειράματα που χρίζουν επανάληψης, βελτίωσης και εμπλουτισμού.

## **Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΟΝ ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ ΚΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**

Ο ERF είναι ένας πανταχού παρών μεταγραφικός καταστολέας, που ρυθμίζεται αποκλειστικά από την ERK1/2 μέσω φωσφορυλίωσης και επακόλουθης πυρηνικής εξόδου (Polychronopoulos et al. 2006). Ο ERF φαίνεται να επηρεάζει ποικίλες κυτταρο-ειδικές βιολογικές διεργασίες, περιλαμβάνοντας κάθε φορά συγκεκριμένους στόχους και συμπαράγοντες. Μπορεί να επηρεάσει τον πολλαπλασιασμό και την ογκογένεση, ρυθμίζοντας το *c-Myc* με τη μεσολάβηση των E2Fs (Verykokakis et al. 2007), το EMT ρυθμίζοντας το *Sema7a* (Allegra et al. 2012), την κυτταρική κινητικότητα μέσω συνεργασίας του Egr1 (Tarcic et al. 2012) και την ανάπτυξη των κρανιακών ραφών και κρανιοσυνοστέωσης μέσω συνεργασίας του *Runx2* (Twigg et al. 2013). Η απαλοιφή του *Erf* στα ποντίκια προκαλεί εμβρυϊκό θάνατο τη μέρα E10.5, λόγω αποτυχίας στον πλακούντα χοριακής τροφοβλαστικής διαφοροποίησης και απουσίας χοριοαλλαντοϊκής σύντηξης (Papadaki et al.

2007). Ωστόσο, δεν ήταν ξεκάθαρο ο τρόπος που ο *Erf* συνεισφέρει στη διαφοροποίηση των κυττάρων του χορίου. Μεγάλη ανάλυση γονιδιώματος των DNA θέσεων πρόσδεσης του ERF σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες (Twigg et al. 2013), πρότεινε μία δυνατή αλληλεπίδραση του ERF με το *Fgf2*. Η FGF σηματοδότηση είναι γνωστό ότι έχει κυρίαρχο ρόλο στη διαφοροποίηση των TSCs. Η FGF4 έκφραση από το ICM (Inner Cell Mass) είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του TE (Arman et al. 1998), ενώ η διατήρηση των ποντικίστων TSCs απαιτεί FGF4 (Tanaka et al. 1998) ή FGF2 (Ohinata and Tsukiyama 2014). Επιπλέον, απαιτείται η διακοπή της FGF2 σηματοδότησης για τη διαφοροποίηση των TSCs στους ανθρώπους (Sudheer et al. 2012). Έτσι, η ρύθμιση του *Fgf2* θα μπορούσε να είναι ένας πιθανός μηχανισμός δράσης του ERF. Επιβεβαιώσαμε ότι η αλληλεπίδραση που ανιχνεύτηκε στα MEFs, ήταν γεγονός και στα TSCs και μάλιστα ήταν ενισχυμένη όταν τα κύτταρα οδηγούνταν προς διαφοροποίηση. Σε συμφωνία με τη λειτουργία του ERF ως καταστολέα, πειράματα αναφοράς έδειξαν ότι η μεταγραφή από τον *Fgf2* υποκινητή θα καταστέλλεται από τον ERF. Επιπλέον, τα ενδογενή *Fgf2* mRNA επίπεδα στα TSCs ήταν αυξημένα απουσία του ERF και μειωμένα παρουσία του πυρηνικού ERF. Η ρύθμιση του *Fgf2* από τον ERF θα ήταν επίσης σύμφωνη με το γνωστό ρόλο των Ets γονιδίων στη ρύθμιση της *Fgf* σηματοδότησης (Tsang and Dawid 2004). Έτσι, προτείνουμε ένα μοντέλο όπου ο ERF καταστέλλει την έκφραση του *Fgf2*, προκειμένου οι χοριακοί τροφοβλάστες να διαφοροποιηθούν προς συγκυτιοτροφοβλάστες (Εικ.4.1). Αυτό το μοντέλο είναι σύμφωνο με το προηγούμενο προτεινόμενο μοντέλο μας (Paradaki et al. 2007) και τώρα υποδεικνύει το στάδιο όπου η απενεργοποίηση του *Fgf2* μπορεί να είναι σημαντική για κατάλληλη διαφοροποίηση. Προτείνουμε ότι η μειωμένη ενεργότητα της Erk στον πλακούντα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, μπορεί να προκαλεί αυξημένο πυρηνικό εντοπισμό του *Erf*, όπου με τη σειρά του μπορεί να καταστείλει την έκφραση του *Fgf2*, μειώνοντας περαιτέρω την Erk ενεργότητα και επιτρέποντας την κατάλληλη διαφοροποίηση.

Πολλά μέλη της *Fgf* οικογένειας εκφράζονται σε διάφορα επίπεδα στον πλακούντα διαφορετικών ειδών (Pfarrer et al. 2006, Zhong et al. 2006). Η *Fgf2* έκφραση είναι οριακή στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ η πολύπλοκη μετα-μεταφραστική ρύθμισή της και οι ποικίλες ισομορφές της (Prats et al.



**Εικόνα 4.1:** Ένα μοντέλο της λειτουργίας του ERF στην ανάπτυξη του πλακούντα. Σχηματική αναπαράσταση του ρόλου των FGF2 και ERF στην τροφοβλαστική διαφοροποίηση. Κατά τη μείωση της ERK ενεργότητας, ο ERF μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή του *Fgf2*, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση των χοριακών τροφοβλαστών προς συγκυτιοτροφοβλάστες.

1992, Touriol et al. 2000) και η πιθανή αυτοκρινής ή παρακρινής λειτουργία της (Presta et al. 2000, Chlebova et al. 2009) κάνει δύσκολο τον ακριβή προσδιορισμό των κυττάρων που εκφράζουν FGF2 και των κυττάρων που ρυθμίζονται από τη FGF2 σηματοδότηση. Ωστόσο, το πρότυπο της *Fgf2* και *Erf* έκφρασης στον αναπτυσσόμενο πλακούντα θα ήταν σύμφωνο με την υπόθεση ότι ο ERF καταστέλλει την παρακρινή λειτουργία του FGF2, καθώς η ERK1/2 ενεργοποίηση από τον FGF θα ανέστειλε την ικανότητα του ERF να δράσει ως μεταγραφικός καταστολέας. Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατό να επιβεβαιώσουμε, με διπλό ISH (in situ hybridization) ή ανοσοανίχνευση, εάν πράγματι ο *Erf* και ο *Fgf2* εκφραζόταν σε συγκεκριμένα κύτταρα του χορίου, εξαιτίας των πολύ χαμηλών επιπέδων *Fgf2* έκφρασης, όπου έκανε την ανίχνευση αδύνατη στην περίπτωση πολλαπλής σήμανσης/χρώσης.

Τα δεδομένα μας προτείνουν ότι ακόμη και χαμηλά επίπεδα FGF2 είναι επαρκή για να καθυστερήσουν ή ακόμη και να μπλοκάρουν τη διαφοροποίηση των TSCs ex vivo και μπορούν να εξηγήσουν την καθυστερημένη διαφοροποίηση που είχαμε παρατηρήσει στα *Erf* KO TSCs (Papadaki et al. 2007). Αναφέρθηκε παλιότερα ότι τα TSCs διαφοροποιούνται ex vivo αυθόρμητα προς γιγαντιαία κύτταρα και σπογγιοτροφοβλάστες, αλλά η διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστες απαιτεί τη συντονισμένη ενέργεια διαφόρων γονιδίων (Hughes et al. 2004, Simmons et al. 2008). Έχει αναφερθεί ότι η Activin προάγει τη διαφοροποίηση των χοριακών

τροφοβλαστών προς συγκυτιοτροφοβλάστες απουσία FGF4 (Natale et al. 2009) και έχει δειχθεί στο πρώτο μέρος της διατριβής αυτής ότι ο *Erf* επηρεάζει τη PI3K-διαμεσολαβούμενη TGFβ σηματοδότηση μέσω της *Semaphorin7a* (Allegra et al. 2012), κατά την επιθηλιο-μεσεγχυματική μετάβαση (EMT). Είναι αντιληπτό ότι ο πυρηνικός ERF μπορεί να επηρεάζει τις semaphorins στον πλακούντα, διευκολύνοντας τη διαφοροποίηση προς SynT. Το *SEMA7A* εκφράζεται παντού στον ανθρώπινο πλακούντα (Saben et al. 2014) και δεν είναι ξεκάθαρο εάν θα μπορούσε να επηρεάσει ειδικά τη διαφοροποίηση. Έχει αναφερθεί ότι το *SEMA3A* παρέχει ένα χημειοαποκρινόμενο σήμα από τον ομφάλιο λώρο (Marzioni et al. 2004) αλλά είναι ασαφές εάν έχει κάποιο ρόλο στα κύτταρα του πλακούντα. Το *SEMA3B* μπορεί να εμπλέκεται σε μερικές περιπτώσεις προεκλαμψίας (Zhou et al. 2013, Kaitu'u-Lino et al. 2014). Ωστόσο, και για αυτές τις semaphorins, λίγα είναι γνωστά για τον πιθανό τους ρόλο στον ποντικίσιο πλακούντα. Περαιτέρω πειράματα χρειάζονται για να διασαφηνιστεί η επαγωγή του SynT φαινοτύπου από τον ERF σε σχέση με activins και semaphorins.

## Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ERF ΣΤΗΝ ΟΣΤΕΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΤΗΝ ΚΡΑΝΙΟΣΥΝΟΣΤΕΩΣΗ

Οι ERK1/2 είναι πρωτεΐνες κλειδιά που διαμεσολαβούν τη MAPK σηματοδότηση καθοδικά του RAS και η φωσφορυλίωσή τους οδηγεί στον πυρηνικό εντοπισμό μεταγραφικών παραγόντων και την τροποποίηση πολλών διαφορετικών στόχων [1]. Εδώ, δείχνουμε ότι μειωμένες δόσεις του ERF, ενός ανασταλτικού ETS μεταγραφικού παράγοντα που προσδένεται άμεσα με τις ERK1/2 [3,6,7], προκαλεί σύνθετη κρανιοσυνοστέωση (πρώρο κλείσιμο κρανιακών ραφών) στον άνθρωπο και το ποντίκι. Χαρακτηριστικά αυτής της νέας αναγνωρισμένης κλινικής διαταραχής περιλαμβάνουν τη συνοστέωση ποικίλων κρανιακών ραφών, τη δυσμορφία κρανίου και προσώπου, τη δυσμορφία Chiari και γλωσσική καθυστέρηση. Ποντίκια με λειτουργικά επίπεδα του *Erf* μειωμένα στο 30% του κανονικού εκδηλώνουν “multiple-suture synostosis” μετά τη γέννηση. Αντίθετα, η ανάπτυξη των εμβρυϊκών κρανίων φαίνεται ελαφρώς καθυστερημένη.

Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε και στα αποτελέσματα, μετά από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης σε ποντικίστους εμβρυϊκούς ινοβλάστες και μεγάλης κλίμακας αλληλούχιση, βρήκαμε ότι ο ERF προσδένεται κατά προτίμηση σε γενωμικά στοιχεία μακριά από υποκινητές, που περιλαμβάνουν RUNX και AP1 μοτίβα πρόσδεσης στο DNA. Η ταυτοποίηση συχνών RUNX μοτίβων πρόσδεσης σε μακρινές περιοχές (non-TSS) ERF στόχων είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς ο Runx2 είναι ένας κύριος ρυθμιστής της κρανιακής οστεογένεσης (Lou et al. 2009). Από τα δεδομένα μας προκύπτει ότι ο ERF μπορεί είτε να ρυθμίζει άμεσα τη μεταγραφή του *Runx2*, ή εναλλακτικά, να ρυθμίζει την οστεόγνεση αλλάζοντας την ισορροπία μεταξύ θετικών και αρνητικών συμπλόκων που σχηματίζονται σε DNA στόχους των Runx2 και άλλων Ets πρωτεϊνών (όπως Ets2), ανταγωνιζόμενος τη RUNX2-μεσολαβούμενη ενεργοποίηση. Δεδομένου ότι τα ChIP-seq δεδομένα έδειξαν πιθανές αλληλεπιδράσεις του ERF και Runx2 σε πληθώρα στόχων, θα χρειαστεί περαιτέρω δουλειά για την ταυτοποίηση κρίσιμων παραγόντων στην απορύθμιση της οστεογένεσης σε περιπτώσεις *ERF* ή *RUNX2* απλοανεπάρκειας.

Οι γενετικές παρατηρήσεις μας στους ανθρώπους και στα ποντίκια θα ανανεώσει το ενδιαφέρον για το ρόλο των Ets παραγόντων στη ρύθμιση της οστεογένεσης, ο οποίος παρόλο που έχει καταγραφεί, δεν είναι καλά ξεκαθαρισμένος [36,37,39]. Η άμεση Erk1/2-μεσολαβούμενη φωσφορυλίωση έχει συνδεθεί στο παρελθόν με σταθεροποίηση ή/και ενεργοποίηση του Runx2 [40,41]. Θεωρούμε ότι επιπλέον έμμεση ρύθμιση της Runx2 δράσης από τις Erk1/2 [42], μπορεί να διαμεσολαβείται από τον κυτταρικό εντοπισμό του ERF. Τα δεδομένα μας παρέχουν μια βασισμένη σε σηματοδοτικό μονοπάτι φαινοτυπική σύνδεση με *FGFR2* μεταλλαγές, καθώς πολλοί ασθενείς με *ERF*-σχετιζόμενη κρανιοσυνοστέωση διαγιγνώσκονταν προηγουμένως με σύνδρομο Crouzon [14,15]. Η θέση του ERF καθοδικά του RAS-MEK-ERK μονοπατιού και η καθυστερημένη έναρξη της οστεοποίησης των ραφών που σχετίζεται με *ERF* απλοανεπάρκεια, κάνει τον ERF έναν ελκυστικό στόχο για θεραπευτική παρέμβαση.

# 5. Βιβλιογραφία

- Aleskandarany, Mohammed A et al. 2014. "Epithelial Mesenchymal Transition in Early Invasive Breast Cancer: An Immunohistochemical and Reverse Phase Protein Array Study." *Breast cancer research and treatment* 145(2): 339–48.
- Allegra, M. et al. 2012. "Semaphorin-7a Reverses the ERF-Induced Inhibition of EMT in Ras-Dependent Mouse Mammary Epithelial Cells." *Molecular Biology of the Cell* 23(19): 3873–81.
- Andrechek, E R, and W J Muller. 2000. "Tyrosine Kinase Signalling in Breast Cancer: Tyrosine Kinase-Mediated Signal Transduction in Transgenic Mouse Models of Human Breast Cancer." *Breast cancer research : BCR* 2(3): 211–16.
- Arman, E et al. 1998. "Targeted Disruption of Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor 2 Suggests a Role for FGF Signaling in Pregastrulation Mammalian Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(9): 5082–87.
- Athanasiou, M et al. 2000. "Suppression of the Ewing's Sarcoma Phenotype by FLI1/ERF Repressor Hybrids." *Cancer gene therapy* 7(8): 1188–95.
- Athanasiou, Meropi, Donald G Blair, and George Mavrothalassitis. 2003. "ERF, an ETS-Related Transcriptional Repressor, Can Induce Erythroid Differentiation." *Anticancer research* 23(3A): 2143–53.
- Bain, Mark, Marc Mendelson, and John Sinclair. 2003. "Ets-2 Repressor Factor (ERF) Mediates Repression of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Promoter in Undifferentiated Non-Permissive Cells." *The Journal of general virology* 84(Pt 1): 41–49.
- Barcellos-Hoff, M H, J Aggeler, T G Ram, and M J Bissell. 1989. "Functional Differentiation and Alveolar Morphogenesis of Primary Mammary

- Cultures on Reconstituted Basement Membrane.” *Development (Cambridge, England)* 105(2): 223–35.
- Ben-Chetrit, Nir, Gabi Tarcic, and Yosef Yarden. 2013. “ERK-ERF-EGR1, a Novel Switch Underlying Acquisition of a Motile Phenotype.” *Cell adhesion & migration* 7(1): 33–37.
- Bielenberg, Diane R., and Michael Klagsbrun. 2007. “Targeting Endothelial and Tumor Cells with Semaphorins.” *Cancer and Metastasis Reviews* 26(3–4): 421–31.
- Bierie, Brian, and Harold L Moses. 2006. “Tumour Microenvironment: TGFbeta: The Molecular Jekyll and Hyde of Cancer.” *Nature reviews. Cancer* 6(7): 506–20.
- Black, S A et al. 2016. “Semaphorin 7a Exerts Pleiotropic Effects to Promote Breast Tumor Progression.” *Oncogene* 35(39): 5170–78.
- Blair, Donald G, and Meropi Athanasiou. 2000. “Ets and Retroviruses—transduction and Activation of Members of the Ets Oncogene Family in Viral Oncogenesis.” *Oncogene* 19(55): 6472–81.
- Blick, Tony et al. 2010. “Epithelial Mesenchymal Transition Traits in Human Breast Cancer Cell Lines Parallel the CD44(hi)/CD24 (Lo/-) Stem Cell Phenotype in Human Breast Cancer.” *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 15(2): 235–52.
- Boguski, M S, and F McCormick. 1993. “Proteins Regulating Ras and Its Relatives.” *Nature* 366(6456): 643–54.
- Brisken, C et al. 1999. “Prolactin Controls Mammary Gland Development via Direct and Indirect Mechanisms.” *Developmental biology* 210(1): 96–106.
- Chakrabarti, Rumela et al. 2012. “Elf5 Inhibits the Epithelial–mesenchymal Transition in Mammary Gland Development and Breast Cancer Metastasis by Transcriptionally Repressing Snail2.” *Nature Cell Biology* 14(11): 1212–22.
- Charlot, Céline et al. 2010. “A Review of Post-Translational Modifications and Subcellular Localization of Ets Transcription Factors: Possible Connection with Cancer and Involvement in the Hypoxic Response.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 647: 3–30.
- Chlebova, K. et al. 2009. “High Molecular Weight FGF2: The Biology of a Nuclear Growth Factor.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(2): 225–



- 35.
- Choi, Yoomi et al. 2013. "Epithelial-Mesenchymal Transition Increases during the Progression of in Situ to Invasive Basal-like Breast Cancer." *Human pathology* 44(11): 2581–89.
- Coley, Helen M. 2008. "Mechanisms and Strategies to Overcome Chemotherapy Resistance in Metastatic Breast Cancer." *Cancer treatment reviews* 34(4): 378–90.
- Comijn, J et al. 2001. "The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion." *Molecular cell* 7(6): 1267–78.
- Cooper, Christopher D O, Joseph A Newman, and Opher Gileadi. 2014. "Recent Advances in the Structural Molecular Biology of Ets Transcription Factors: Interactions, Interfaces and Inhibition." *Biochemical Society transactions* 42(1): 130–38.
- Corson, Laura Beth, Yojiro Yamanaka, Ka-Man Venus Lai, and Janet Rossant. 2003. "Spatial and Temporal Patterns of ERK Signaling during Mouse Embryogenesis." *Development (Cambridge, England)* 130(19): 4527–37.
- Cross, J C. 2000. "Genetic Insights into Trophoblast Differentiation and Placental Morphogenesis." *Seminars in cell & developmental biology* 11(2): 105–13.
- Cross, J C, M Hemberger, Y Lu et al. 2002. "Trophoblast Functions, Angiogenesis and Remodeling of the Maternal Vasculature in the Placenta." *Molecular and cellular endocrinology* 187(1–2): 207–12.
- Cross, J C. 2003. "The Genetics of Pre-Eclampsia: A Feto-Placental or Maternal Problem?" *Clinical genetics* 64(2): 96–103.
- Cross, J C. 2005. "How to Make a Placenta: Mechanisms of Trophoblast Cell Differentiation in Mice--a Review." *Placenta* 26 Suppl A: S3-9.
- Czopik, Agnieszka K. et al. 2006. "Semaphorin 7A Is a Negative Regulator of T Cell Responses." *Immunity* 24(5): 591–600.
- Daniel, C W, J J Berger, P Strickland, and R Garcia. 1984. "Similar Growth Pattern of Mouse Mammary Epithelium Cultivated in Collagen Matrix in Vivo and in Vitro." *Developmental biology* 104(1): 57–64.
- Daniel, C W, and K B Deome. 1965. "Growth of Mouse Mammary Glands in

- Vivo After Monolayer Culture.” *Science (New York, N.Y.)* 149(3684): 634–36.
- Daniel, C W, S Robinson, and G B Silberstein. 1996. “The Role of TGF-Beta in Patterning and Growth of the Mammary Ductal Tree.” *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 1(4): 331–41.
- Daniel, C W, L J Young, D Medina, and K B DeOme. 1971. “The Influence of Mammogenic Hormones on Serially Transplanted Mouse Mammary Gland.” *Experimental gerontology* 6(1): 95–101.
- Daoud, Georges et al. 2005. “ERK1/2 and p38 Regulate Trophoblasts Differentiation in Human Term Placenta.” *The Journal of physiology* 566(Pt 2): 409–23.
- Darnell, James E. 2002. “Transcription Factors as Targets for Cancer Therapy.” *Nature reviews. Cancer* 2(10): 740–49.
- Day, R N et al. 1998. “Selective Inhibition of Prolactin Gene Transcription by the ETS-2 Repressor Factor.” *The Journal of biological chemistry* 273(48): 31909–15.
- Delorme, Guillaume et al. 2005. “Expression and Function of Semaphorin 7A in Bone Cells.” *Biology of the Cell* 97(7): 589–97.
- Dennler, S et al. 1998. “Direct Binding of Smad3 and Smad4 to Critical TGF Beta-Inducible Elements in the Promoter of Human Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 Gene.” *The EMBO journal* 17(11): 3091–3100.
- Derynck, Rik, and Rosemary J Akhurst. 2007. “Differentiation Plasticity Regulated by TGF-Beta Family Proteins in Development and Disease.” *Nature cell biology* 9(9): 1000–1004.
- Derynck, Rik, Baby Periyanyaki Muthusamy, and Koy Y Saeteurn. 2014. “Signaling Pathway Cooperation in TGF- $\beta$ -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition.” *Current opinion in cell biology* 31: 56–66.
- Dhanasekaran, N, and E Premkumar Reddy. 1998. “Signaling by Dual Specificity Kinases.” *Oncogene* 17(11 Reviews): 1447–55.
- Dieplinger, Benjamin et al. 2007. “The Transcriptional Corepressor TPA-Inducible Sequence 7 Regulates Adult Axon Growth through Cellular Retinoic Acid Binding Protein II Expression.” *European Journal of Neuroscience* 26(12): 3358–67.
- Ten Dijke, Peter, Marie-José Goumans, Fumiko Itoh, and Susumu Itoh. 2002.

- “Regulation of Cell Proliferation by Smad Proteins.” *Journal of cellular physiology* 191(1): 1–16.
- Donovan, Shane, Kevin M Shannon, and Gideon Bollag. 2002. “GTPase Activating Proteins: Critical Regulators of Intracellular Signaling.” *Biochimica et biophysica acta* 1602(1): 23–45.
- Douglas, Gordon C et al. 2009. “Trophoblast Stem Cells: Models for Investigating Trophectoderm Differentiation and Placental Development.” *Endocrine reviews* 30(3): 228–40.
- Downs, K M. 1998. “The Murine Allantois.” *Current topics in developmental biology* 39: 1–33.
- Downs, K M. 2002. “Early Placental Ontogeny in the Mouse.” *Placenta* 23(2–3): 116–31.
- Downs, K M, and R L Gardner. 1995. “An Investigation into Early Placental Ontogeny: Allantoic Attachment to the Chorion Is Selective and Developmentally Regulated.” *Development (Cambridge, England)* 121(2): 407–16.
- Engel, M E, M A McDonnell, B K Law, and H L Moses. 1999. “Interdependent SMAD and JNK Signaling in Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Transcription.” *The Journal of biological chemistry* 274(52): 37413–20.
- Erlebacher, Adrian, Kelly A Price, and Laurie H Glimcher. 2004. “Maintenance of Mouse Trophoblast Stem Cell Proliferation by TGF-Beta/activin.” *Developmental biology* 275(1): 158–69.
- Feldman, B et al. 1995. “Requirement of FGF-4 for Postimplantation Mouse Development.” *Science (New York, N.Y.)* 267(5195): 246–49.
- Fendrick, J L, A M Raafat, and S Z Haslam. 1998. “Mammary Gland Growth and Development from the Postnatal Period to Postmenopause: Ovarian Steroid Receptor Ontogeny and Regulation in the Mouse.” *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 3(1): 7–22.
- Findlay, Victoria J et al. 2013. “Understanding the Role of ETS-Mediated Gene Regulation in Complex Biological Processes.” *Advances in cancer research* 119: 1–61.
- Frey, R S, and K M Mulder. 1997. “TGFbeta Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Human Breast Cancer Cells.” *Cancer letters* 117(1): 41–50.

- Furth, P A, U Bar-Peled, and M Li. 1997. "Apoptosis and Mammary Gland Involution: Reviewing the Process." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 2(1): 19–24.
- Le Gallic, L, D Sgouras, G Beal, and G Mavrothalassitis. 1999. "Transcriptional Repressor ERF Is a Ras/mitogen-Activated Protein Kinase Target That Regulates Cellular Proliferation." *Molecular and cellular biology* 19(6): 4121–33.
- Le Gallic, Lionel et al. 2004. "ERF Nuclear Shuttling, a Continuous Monitor of Erk Activity That Links It to Cell Cycle Progression." *Molecular and cellular biology* 24(3): 1206–18.
- Garcia-Areas, Ramon et al. 2014. "Semaphorin7A Promotes Tumor Growth and Exerts a pro-Angiogenic Effect in Macrophages of Mammary Tumor-Bearing Mice." *Frontiers in Physiology* 5.
- Ge, C. et al. 2009. "Identification and Functional Characterization of ERK/MAPK Phosphorylation Sites in the Runx2 Transcription Factor." *Journal of Biological Chemistry* 284(47): 32533–43.
- Georgiades, P, A C Ferguson-Smith, and G J Burton. 2002. "Comparative Developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae." *Placenta* 23(1): 3–19.
- Giltane, Jennifer M, and Justin M Balko. 2014. "Rationale for Targeting the Ras/MAPK Pathway in Triple-Negative Breast Cancer." *Discovery medicine* 17(95): 275–83.
- Gjorevski, Nikolce, and Celeste M Nelson. 2010. "Endogenous Patterns of Mechanical Stress Are Required for Branching Morphogenesis." *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2(9): 424–34.
- Gjorevski, Nikolce, and Celeste M Nelson. 2011. "Integrated Morphodynamic Signalling of the Mammary Gland." *Nature reviews. Molecular cell biology* 12(9): 581–93.
- Gotzmann, J et al. 2006. "A Crucial Function of PDGF in TGF-Beta-Mediated Cancer Progression of Hepatocytes." *Oncogene* 25(22): 3170–85.
- Greenfield, C et al. 1989. "Epidermal Growth Factor Binding Induces a Conformational Change in the External Domain of Its Receptor." *The EMBO journal* 8(13): 4115–23.

- Grünert, Stefan, Martin Jechlinger, and Hartmut Beug. 2003. "Diverse Cellular and Molecular Mechanisms Contribute to Epithelial Plasticity and Metastasis." *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(8): 657–65.
- Guaita, Sandra et al. 2002. "Snail Induction of Epithelial to Mesenchymal Transition in Tumor Cells Is Accompanied by MUC1 Repression and ZEB1 Expression." *The Journal of biological chemistry* 277(42): 39209–16.
- Guo, Wenjun, and Filippo G Giancotti. 2004. "Integrin Signalling during Tumour Progression." *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(10): 816–26.
- Gutierrez-Hartmann, Arthur, Dawn L Duval, and Andrew P Bradford. 2007. "ETS Transcription Factors in Endocrine Systems." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 18(4): 150–58.
- Guzman-Ayala, Marcela, Nadav Ben-Haim, Séverine Beck, and Daniel B Constam. 2004. "Nodal Protein Processing and Fibroblast Growth Factor 4 Synergize to Maintain a Trophoblast Stem Cell Microenvironment." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15656–60.
- Hartsough, M T, and K M Mulder. 1995. "Transforming Growth Factor Beta Activation of p44mapk in Proliferating Cultures of Epithelial Cells." *The Journal of biological chemistry* 270(13): 7117–24.
- Hayakawa, Koji, Emi Himeno, Satoshi Tanaka, and Tilo Kunath. 2015. "Isolation and Manipulation of Mouse Trophoblast Stem Cells." In *Current Protocols in Stem Cell Biology*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1E.4.1-1E.4.32.
- Heldin, C H. 1995. "Dimerization of Cell Surface Receptors in Signal Transduction." *Cell* 80(2): 213–23.
- Hemberger, M, and J C Cross. 2001. "Genes Governing Placental Development." *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 12(4): 162–68.
- Heo, Sun-Hee, Je-Yong Lee, Kyung-Min Yang, and Kyung-Soon Park. 2015. "ELK3 Expression Correlates With Cell Migration, Invasion, and Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells." *Gene Expression* 16(4): 197–203.

- Hernandez-Aya, Leonel F, and Ana M Gonzalez-Angulo. 2013. "Adjuvant Systemic Therapies in Breast Cancer." *The Surgical clinics of North America* 93(2): 473–91.
- Hill, Cheryl A, Thomas E Sussan, Roger H Reeves, and Joan T Richtsmeier. 2009. "Complex Contributions of Ets2 to Craniofacial and Thymus Phenotypes of Trisomic "Down Syndrome" Mice." *American journal of medical genetics. Part A* 149A(10): 2158–65.
- Hocevar, B A, T L Brown, and P H Howe. 1999. "TGF-Beta Induces Fibronectin Synthesis through a c-Jun N-Terminal Kinase-Dependent, Smad4-Independent Pathway." *The EMBO journal* 18(5): 1345–56.
- Hollenhorst, Peter C, David A Jones, and Barbara J Graves. 2004. "Expression Profiles Frame the Promoter Specificity Dilemma of the ETS Family of Transcription Factors." *Nucleic acids research* 32(18): 5693–5702.
- Hollenhorst, Peter C, Lawrence P McIntosh, and Barbara J Graves. 2011. "Genomic and Biochemical Insights into the Specificity of ETS Transcription Factors." *Annual review of biochemistry* 80: 437–71.
- Hsu, Tien, Maria Trojanowska, and Dennis K. Watson. 2004. "Ets Proteins in Biological Control and Cancer." *Journal of Cellular Biochemistry* 91(5): 896–903.
- Hua, X, X Liu, D O Ansari, and H F Lodish. 1998. "Synergistic Cooperation of TFE3 and Smad Proteins in TGF-Beta-Induced Transcription of the Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene." *Genes & development* 12(19): 3084–95.
- Huber, Margit A, Norbert Kraut, and Hartmut Beug. 2005. "Molecular Requirements for Epithelial–mesenchymal Transition during Tumor Progression." *Current Opinion in Cell Biology* 17(5): 548–58.
- Hughes, Martha et al. 2004. "The Hand1, Stra13 and Gcm1 Transcription Factors Override FGF Signaling to Promote Terminal Differentiation of Trophoblast Stem Cells." *Developmental biology* 271(1): 26–37.
- Itoh, Susumu et al. 2003. "Elucidation of Smad Requirement in Transforming Growth Factor-Beta Type I Receptor-Induced Responses." *The Journal of biological chemistry* 278(6): 3751–61.
- Janda, Elzbieta, Gabi Litos, et al. 2002b. "Oncogenic Ras/Her-2 Mediate

- Hyperproliferation of Polarized Epithelial Cells in 3D Cultures and Rapid Tumor Growth via the PI3K Pathway.” *Oncogene* 21(33): 5148–59.
- Janda, Elzbieta, Kerstin Lehmann, et al. 2002a. “Ras and TGFβ Cooperatively Regulate Epithelial Cell Plasticity and Metastasis.” *The Journal of Cell Biology* 156(2): 299–314.
- Janesick, Amanda et al. 2013. “ERF and ETV3L Are Retinoic Acid-Inducible Repressors Required for Primary Neurogenesis.” *Development (Cambridge, England)* 140(15): 3095–3106.
- Janknecht, Ralf. 2005. “EWS-ETS Oncoproteins: The Linchpins of Ewing Tumors.” *Gene* 363: 1–14.
- Jechlinger, Martin et al. 2006. “Autocrine PDGFR Signaling Promotes Mammary Cancer Metastasis.” *The Journal of clinical investigation* 116(6): 1561–70.
- Kaitu’u-Lino, T.J. et al. 2014. “Placental SEMA3B Expression Is Not Altered in Severe Early Onset Preeclampsia.” *Placenta* 35(12): 1102–5.
- Kalet, Brian T. et al. 2013. “Transcription Factor Ets1 Cooperates with Estrogen Receptor α to Stimulate Estradiol-Dependent Growth in Breast Cancer Cells and Tumors” ed. Jean-Marc Vanacker. *PLoS ONE* 8(7): e68815.
- Kalluri, Raghu. 2003. “Basement Membranes: Structure, Assembly and Role in Tumour Angiogenesis.” *Nature reviews. Cancer* 3(6): 422–33.
- Kan, Shih-hsin et al. 2002. “Genomic Screening of Fibroblast Growth-Factor Receptor 2 Reveals a Wide Spectrum of Mutations in Patients with Syndromic Craniosynostosis.” *The American Journal of Human Genetics* 70(2): 472–86.
- Kang, Hye-Ryun, Chun Geun Lee, Robert J Homer, and Jack A Elias. 2007. “Semaphorin 7A Plays a Critical Role in TGF-beta1-Induced Pulmonary Fibrosis.” *The Journal of experimental medicine* 204(5): 1083–93.
- Kar, Adwitiya, and Arthur Gutierrez-Hartmann. 2013. “Molecular Mechanisms of ETS Transcription Factor-Mediated Tumorigenesis.” *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 48(6): 522–43.
- Kleinberg, D L, M Feldman, and W Ruan. 2000. “IGF-I: An Essential Factor in Terminal End Bud Formation and Ductal Morphogenesis.” *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5(1): 7–17.

- Kodandapani, R et al. 1996. "A New Pattern for Helix-Turn-Helix Recognition Revealed by the PU.1 ETS-Domain-DNA Complex." *Nature* 380(6573): 456–60.
- Kolch, Walter. 2005. "Coordinating ERK/MAPK Signalling through Scaffolds and Inhibitors." *Nature reviews. Molecular cell biology* 6(11): 827–37.
- Kowanetz, Marcin et al. 2004. "Id2 and Id3 Define the Potency of Cell Proliferation and Differentiation Responses to Transforming Growth Factor Beta and Bone Morphogenetic Protein." *Molecular and cellular biology* 24(10): 4241–54.
- Kretzschmar, M, J Doody, I Timokhina, and J Massagué. 1999. "A Mechanism of Repression of TGFbeta/ Smad Signaling by Oncogenic Ras." *Genes & development* 13(7): 804–16.
- Kruger, Robert P., Jennifer Aurandt, and Kun-Liang Guan. 2005. "Semaphorins Command Cells to Move." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6(10): 789–800.
- Kubaczka, Caroline et al. 2014. "Derivation and Maintenance of Murine Trophoblast Stem Cells under Defined Conditions." *Stem cell reports* 2(2): 232–42.
- Kunath, T., D. Strumpf, and J. Rossant. 2004. "Early Trophoblast Determination and Stem Cell Maintenance in the Mouse—A Review." *Placenta* 25: S32–38.
- Kutz, S M, J Hordines, P J McKeown-Longo, and P J Higgins. 2001. "TGF-beta1-Induced PAI-1 Gene Expression Requires MEK Activity and Cell-to-Substrate Adhesion." *Journal of cell science* 114(Pt 21): 3905–14.
- Lahsnig, C et al. 2009. "ILEI Requires Oncogenic Ras for the Epithelial to Mesenchymal Transition of Hepatocytes and Liver Carcinoma Progression." *Oncogene* 28(5): 638–50.
- Lajeunie, Elisabeth et al. 2006. "Mutation Screening in Patients with Syndromic Craniosynostoses Indicates That a Limited Number of Recurrent FGFR2 Mutations Accounts for Severe Forms of Pfeiffer Syndrome." *European Journal of Human Genetics* 14(3): 289–98.
- Laliotis, Aggelos et al. 2013. "Immunohistochemical Study of pElk-1 Expression in Human Breast Cancer: Association with Breast Cancer Biologic Profile and Clinicopathologic Features." *The Breast* 22(1): 89–



- 95.
- Lallier, T E. 2004. "Semaphorin Profiling of Periodontal Fibroblasts and Osteoblasts." *Journal of dental research* 83(9): 677–82.
- Lazova, Rossitza, Bonnie E Gould Rothberg, David Rimm, and Glynis Scott. 2009. "The Semaphorin 7A Receptor Plexin C1 Is Lost During Melanoma Metastasis." *The American Journal of Dermatopathology* 31(2): 177–81.
- Lebrun, Jean-Jacques. 2012. "The Dual Role of TGF $\beta$  in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis." *ISRN molecular biology* 2012: 381428.
- Levayer, Romain, and Thomas Lecuit. 2008. "Breaking down EMT." *Nature cell biology* 10(7): 757–59.
- Li, M et al. 1997. "Mammary-Derived Signals Activate Programmed Cell Death during the First Stage of Mammary Gland Involution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(7): 3425–30.
- Little, G. H. et al. 2012. "Genome-Wide Runx2 Occupancy in Prostate Cancer Cells Suggests a Role in Regulating Secretion." *Nucleic Acids Research* 40(8): 3538–47.
- Liu, D et al. 1997. "ERF: Genomic Organization, Chromosomal Localization and Promoter Analysis of the Human and Mouse Genes." *Oncogene* 14(12): 1445–51.
- Liu, Fang. 2006. "Smad3 Phosphorylation by Cyclin-Dependent Kinases." *Cytokine {&} growth factor reviews* 17(1–2): 9–17.
- Liu, Jeffrey C et al. 2002. "Activation of Go-Coupled Dopamine D2 Receptors Inhibits ERK1/ERK2 in Pituitary Cells. A Key Step in the Transcriptional Suppression of the Prolactin Gene." *The Journal of biological chemistry* 277(39): 35819–25.
- Liu, Tong et al. 2013. "Dysregulated Expression of Slug, Vimentin, and E-Cadherin Correlates with Poor Clinical Outcome in Patients with Basal-like Breast Cancer." *Journal of surgical oncology* 107(2): 188–94.
- Lou, Yang et al. 2009. "A Runx2 Threshold for the Cleidocranial Dysplasia Phenotype." *Human molecular genetics* 18(3): 556–68.
- Lu, Pengfei, Andrew J. Ewald, Gail R. Martin, and Zena Werb. 2008a. "Genetic Mosaic Analysis Reveals FGF Receptor 2 Function in Terminal

- End Buds during Mammary Gland Branching Morphogenesis.”  
*Developmental Biology* 321(1): 77–87.
- Lu, Pengfei, Andrew J Ewald, Gail R Martin, and Zena Werb. 2008b. “Genetic Mosaic Analysis Reveals FGF Receptor 2 Function in Terminal End Buds during Mammary Gland Branching Morphogenesis.” *Developmental biology* 321(1): 77–87.
- Macias, Hector, and Lindsay Hinck. 2012. “Mammary Gland Development.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1(4): 533–57.
- Maeda, Masato, Keith R Johnson, and Margaret J Wheelock. 2005. “Cadherin Switching: Essential for Behavioral but Not Morphological Changes during an Epithelium-to-Mesenchyme Transition.” *Journal of cell science* 118(Pt 5): 873–87.
- Malassiné, A, J L Frendo, and D Evain-Brion. 2003. “A Comparison of Placental Development and Endocrine Functions between the Human and Mouse Model.” *Human reproduction update* 9(6): 531–39.
- Marzioni, Daniela et al. 2004. “Restricted Innervation of Uterus and Placenta during Pregnancy: Evidence for a Role of the Repelling Signal Semaphorin 3A.” *Developmental Dynamics* 231(4): 839–48.
- Maschler, Sabine et al. 2005. “Tumor Cell Invasiveness Correlates with Changes in Integrin Expression and Localization.” *Oncogene* 24(12): 2032–41.
- Massagué, J, and D Wotton. 2000. “Transcriptional Control by the TGF-beta/Smad Signaling System.” *The EMBO journal* 19(8): 1745–54.
- Massagué, Joan, Joan Seoane, and David Wotton. 2005. “Smad Transcription Factors.” *Genes & development* 19(23): 2783–2810.
- Matsushita, T. et al. 2009. “Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) and ERK2 Play Essential Roles in Osteoblast Differentiation and in Supporting Osteoclastogenesis.” *Molecular and Cellular Biology* 29(21): 5843–57.
- Mavrothalassitis, G, and J Ghysdael. 2000. “Proteins of the ETS Family with Transcriptional Repressor Activity.” *Oncogene* 19(55): 6524–32.
- McDermott, Kimberly M, Bob Y Liu, Thea D Tlsty, and Gregory J Pazour. 2010. “Primary Cilia Regulate Branching Morphogenesis during Mammary Gland Development.” *Current biology : CB* 20(8): 731–37.

- Medina, D, M L Li, C J Oborn, and M J Bissell. 1987. "Casein Gene Expression in Mouse Mammary Epithelial Cell Lines: Dependence upon Extracellular Matrix and Cell Type." *Experimental cell research* 172(1): 192–203.
- Mesquita, Bárbara et al. 2013. "Frequent Copy Number Gains at 1q21 and 1q32 Are Associated with Overexpression of the ETS Transcription Factors ETV3 and ELF3 in Breast Cancer Irrespective of Molecular Subtypes." *Breast Cancer Research and Treatment* 138(1): 37–45.
- Messina, A. et al. 2011. "Dysregulation of Semaphorin7A/ 1-Integrin Signaling Leads to Defective GnRH-1 Cell Migration, Abnormal Gonadal Development and Altered Fertility." *Human Molecular Genetics* 20(24): 4759–74.
- De Minicis, Samuele et al. 2013. "Semaphorin 7A Contributes to TGF- $\beta$ -Mediated Liver Fibrogenesis." *The American Journal of Pathology* 183(3): 820–30.
- Miyazono, Kohei. 2009. "Transforming Growth Factor-Beta Signaling in Epithelial-Mesenchymal Transition and Progression of Cancer." *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 85(8): 314–23.
- Montagut, Clara, and Jeff Settleman. 2009. "Targeting the RAF-MEK-ERK Pathway in Cancer Therapy." *Cancer letters* 283(2): 125–34.
- Montesano, R, J V Soriano, I Fialka, and L Orci. 1998. "Isolation of EpH4 Mammary Epithelial Cell Subpopulations Which Differ in Their Morphogenetic Properties." *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 34(6): 468–77.
- Moustakas, A, S Souchelnytskyi, and C H Heldin. 2001. "Smad Regulation in TGF-Beta Signal Transduction." *Journal of cell science* 114(Pt 24): 4359–69.
- Moustakas, Aristidis, and Carl-Henrik Heldin. 2005. "Non-Smad TGF-Beta Signals." *Journal of cell science* 118(Pt 16): 3573–84.
- Moustakas, Aristidis, and Carl-Henrik Heldin. 2007. "Signaling Networks Guiding Epithelial-Mesenchymal Transitions during Embryogenesis and Cancer Progression." *Cancer science* 98(10): 1512–20.
- Mroue, Rana, and Mina J Bissell. 2013. "Three-Dimensional Cultures of

- Mouse Mammary Epithelial Cells." *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 945: 221–50.
- Mucsi, I, K L Skorecki, and H J Goldberg. 1996. "Extracellular Signal-Regulated Kinase and the Small GTP-Binding Protein, Rac, Contribute to the Effects of Transforming Growth Factor-beta1 on Gene Expression." *The Journal of biological chemistry* 271(28): 16567–72.
- Nagy, Tamas et al. 2007. "Mammary Epithelial-Specific Deletion of the Focal Adhesion Kinase Gene Leads to Severe Lobulo-Alveolar Hypoplasia and Secretory Immaturity of the Murine Mammary Gland." *The Journal of biological chemistry* 282(43): 31766–76.
- Natale, David R C, Myriam Hemberger, Martha Hughes, and James C Cross. 2009. "Activin Promotes Differentiation of Cultured Mouse Trophoblast Stem Cells towards a Labyrinth Cell Fate." *Developmental biology* 335(1): 120–31.
- Neufeld, Gera et al. 2005. "Semaphorins in Cancer." *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10: 751–60.
- Nguyen, D A, and M C Neville. 1998. "Tight Junction Regulation in the Mammary Gland." *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 3(3): 233–46.
- Nussinov, Ruth, Chung-Jung Tsai, and Carla Mattos. 2013. "'Pathway Drug Cocktail': Targeting Ras Signaling Based on Structural Pathways." *Trends in molecular medicine* 19(11): 695–704.
- Ohinata, Yasuhide, and Tomoyuki Tsukiyama. 2014. "Establishment of Trophoblast Stem Cells under Defined Culture Conditions in Mice." *PLoS one* 9(9): e107308.
- Papadaki, Chara et al. 2007. "Transcriptional Repressor Erf Determines Extraembryonic Ectoderm Differentiation." *Molecular and cellular biology* 27(14): 5201–13.
- Pardali, Katerina, and Aristidis Moustakas. 2007. "Actions of TGF-Beta as Tumor Suppressor and pro-Metastatic Factor in Human Cancer." *Biochimica et biophysica acta* 1775(1): 21–62.
- Park, O.-J. et al. 2010. "FGF2-Activated ERK Mitogen-Activated Protein Kinase Enhances Runx2 Acetylation and Stabilization." *Journal of Biological Chemistry* 285(6): 3568–74.

- Pasterkamp, R Jeroen, Sharon M Kolk, Anita JCGM Hellemons, and Alex L Kolodkin. 2007. "Expression Patterns of semaphorin7A and plexinC1 during Rat Neural Development Suggest Roles in Axon Guidance and Neuronal Migration." *BMC Developmental Biology* 7(1): 98.
- Peinado, Héctor, Francisco Portillo, and Amparo Cano. 2004. "Transcriptional Regulation of Cadherins during Development and Carcinogenesis." *The International journal of developmental biology* 48(5–6): 365–75.
- Peinado, Hector, Miguel Quintanilla, and Amparo Cano. 2003. "Transforming Growth Factor Beta-1 Induces Snail Transcription Factor in Epithelial Cell Lines: Mechanisms for Epithelial Mesenchymal Transitions." *The Journal of biological chemistry* 278(23): 21113–23.
- Perez-Moreno, Mirna, Colin Jamora, and Elaine Fuchs. 2003. "Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions." *Cell* 112(4): 535–48.
- Perkins, Kelly J et al. 2007. "Ets-2 Repressor Factor Silences Extrasynaptic Utrophin by N-Box Mediated Repression in Skeletal Muscle." *Molecular biology of the cell* 18(8): 2864–72.
- Pfarrer, C. et al. 2006. "Fibroblast Growth Factor (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF Receptors Are Uniformly Expressed in Trophoblast Giant Cells During Restricted Trophoblast Invasion in Cows." *Placenta* 27(6–7): 758–70.
- Piek, E, C H Heldin, and P Ten Dijke. 1999. "Specificity, Diversity, and Regulation in TGF-Beta Superfamily Signaling." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13(15): 2105–24.
- Piggin, Catherine L. et al. 2016. "ELF5 Isoform Expression Is Tissue-Specific and Significantly Altered in Cancer." *Breast Cancer Research* 18(1): 4.
- Plotnikov, Alexander, Eldar Zehorai, Shiri Procaccia, and Rony Seger. 2011. "The MAPK Cascades: Signaling Components, Nuclear Roles and Mechanisms of Nuclear Translocation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813(9): 1619–33.
- Polychronopoulos, Sarantis et al. 2006. "The Transcriptional ETS2 Repressor Factor Associates with Active and Inactive Erks through Distinct FXF Motifs." *The Journal of biological chemistry* 281(35): 25601–11.

- Pratap, J. et al. 2009. "Ectopic Runx2 Expression in Mammary Epithelial Cells Disrupts Formation of Normal Acini Structure: Implications for Breast Cancer Progression." *Cancer Research* 69(17): 6807–14.
- Prats, A C, S Vagner, H Prats, and F Amalric. 1992. "Cis-Acting Elements Involved in the Alternative Translation Initiation Process of Human Basic Fibroblast Growth Factor mRNA." *Molecular and cellular biology* 12(10): 4796–4805.
- Presta, M et al. 2000. "Examining New Models for the Study of Autocrine and Paracrine Mechanisms of Angiogenesis through FGF2-Transfected Endothelial and Tumour Cells." *Advances in experimental medicine and biology* 476: 7–34.
- Ramanathan, Palaniappan et al. 2007. "Genomewide Analysis of Secretory Activation in Mouse Models." *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 12(4): 305–14.
- Rangel, Maria Cristina et al. 2016. "Developmental Signaling Pathways Regulating Mammary Stem Cells and Contributing to the Etiology of Triple-Negative Breast Cancer." *Breast Cancer Research and Treatment* 156(2): 211–26.
- Repasky, Gretchen A, Emily J Chenette, and Channing J Der. 2004. "Renewing the Conspiracy Theory Debate: Does Raf Function Alone to Mediate Ras Oncogenesis?" *Trends in cell biology* 14(11): 639–47.
- Richert, M M, K L Schwertfeger, J W Ryder, and S M Anderson. 2000. "An Atlas of Mouse Mammary Gland Development." *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 5(2): 227–41.
- Risau, W. 1997. "Mechanisms of Angiogenesis." *Nature* 386(6626): 671–74.
- Roarty, Kevin, and Rosa Serra. 2007. "Wnt5a Is Required for Proper Mammary Gland Development and TGF-Beta-Mediated Inhibition of Ductal Growth." *Development (Cambridge, England)* 134(21): 3929–39.
- Romano, L A, and R B Runyan. 2000. "Slug Is an Essential Target of TGFbeta2 Signaling in the Developing Chicken Heart." *Developmental biology* 223(1): 91–102.
- Rosen, J M, S L Wyszomierski, and D Hadsell. 1999. "Regulation of Milk Protein Gene Expression." *Annual review of nutrition* 19: 407–36.
- Rossant, J, and J C Cross. 2001. "Placental Development: Lessons from

- Mouse Mutants." *Nature reviews. Genetics* 2(7): 538–48.
- Saben, J. et al. 2014. "A Comprehensive Analysis of the Human Placenta Transcriptome." *Placenta* 35(2): 125–31.
- Sabherwal, Yamini, Nitin Mahajan, and Ming Zhang. 2013. "Epigenetic Modifications of Prostate-Derived Ets Transcription Factor in Breast Cancer Cells." *Oncology reports* 30(4): 1985–88.
- Salh, Baljinder et al. 2002. "Dysregulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Downstream Effectors in Human Breast Cancer." *International Journal of Cancer* 98(1): 148–54.
- Samatar, Ahmed A, and Poulikos I Poulikakos. 2014. "Targeting RAS-ERK Signalling in Cancer: Promises and Challenges." *Nature reviews. Drug discovery* 13(12): 928–42.
- Schmierer, Bernhard, and Caroline S Hill. 2007. "TGFbeta-SMAD Signal Transduction: Molecular Specificity and Functional Flexibility." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(12): 970–82.
- Scott, Glynis A., Lindy A. McClelland, Alex F. Fricke, and Anne Fender. 2009. "Plexin C1, A Receptor for Semaphorin 7A, Inactivates Cofilin and Is a Potential Tumor Suppressor for Melanoma Progression." *Journal of Investigative Dermatology* 129(4): 954–63.
- Sementchenko, V I, and D K Watson. 2000. "Ets Target Genes: Past, Present and Future." *Oncogene* 19(55): 6533–48.
- Seth, Arun, and Dennis K Watson. 2005. "ETS Transcription Factors and Their Emerging Roles in Human Cancer." *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41(16): 2462–78.
- Sethi, Seema et al. 2011. "Molecular Markers of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Are Associated with Tumor Aggressiveness in Breast Carcinoma." *Translational oncology* 4(4): 222–26.
- Sgouras, D N et al. 1995. "ERF: An ETS Domain Protein with Strong Transcriptional Repressor Activity, Can Suppress Ets-Associated Tumorigenesis and Is Regulated by Phosphorylation during Cell Cycle and Mitogenic Stimulation." *The EMBO journal* 14(19): 4781–93.
- Shah, Rajal B., and Arul M. Chinnaiyan. 2009. "The Discovery of Common Recurrent Transmembrane Protease Serine 2 (TMPRSS2)-Erythroblastosis Virus E26 Transforming Sequence (ETS) Gene Fusions

- in Prostate Cancer.” *Advances in Anatomic Pathology* 16(3): 145–53.
- Sharrocks, A D. 2001. “The ETS-Domain Transcription Factor Family.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 2(11): 827–37.
- Shemanko, Carrie S. 2008. “Mammary Epithelial Stem and Progenitor Cells and the Prolactin Pathway.” *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13: 3940–50.
- Shi, Yigong, and Joan Massagué. 2003. “Mechanisms of TGF-Beta Signaling from Cell Membrane to the Nucleus.” *Cell* 113(6): 685–700.
- Shin, I et al. 2001. “Transforming Growth Factor Beta Enhances Epithelial Cell Survival via Akt-Dependent Regulation of FKHRL1.” *Molecular biology of the cell* 12(11): 3328–39.
- Shore, Paul. 2005. “A Role for Runx2 in Normal Mammary Gland and Breast Cancer Bone Metastasis.” *Journal of cellular biochemistry* 96(3): 484–89.
- Siegel, Peter M, and Joan Massagué. 2003. “Cytostatic and Apoptotic Actions of TGF-Beta in Homeostasis and Cancer.” *Nature reviews. Cancer* 3(11): 807–21.
- Silberstein, G B. 2001. “Postnatal Mammary Gland Morphogenesis.” *Microscopy research and technique* 52(2): 155–62.
- Simmons, D. G. et al. 2008. “Early Patterning of the Chorion Leads to the Trilaminar Trophoblast Cell Structure in the Placental Labyrinth.” *Development* 135(12): 2083–91.
- Soncin, Francesca, David Natale, and Mana M Parast. 2015. “Signaling Pathways in Mouse and Human Trophoblast Differentiation: A Comparative Review.” *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72(7): 1291–1302.
- Sørli, T et al. 2001. “Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19): 10869–74.
- Sotiriou, Christos et al. 2003. “Breast Cancer Classification and Prognosis Based on Gene Expression Profiles from a Population-Based Study.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(18): 10393–98.
- Soufla, Giannoula et al. 2006. “Transcriptional Deregulation of VEGF, FGF2,



- TGF- $\beta$ 1, 2, 3 and Cognate Receptors in Breast Tumorigenesis." *Cancer Letters* 235(1): 100–113.
- Souttou, B, R Hamelin, and M Crépin. 1994. "FGF2 as an Autocrine Growth Factor for Immortal Human Breast Epithelial Cells." *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 5(6): 615–23.
- Stamatakos, Michael et al. 2010. "Recapitulation of Ras Oncogene Mutations in Breast Cancer." *Onkologie* 33(10): 6–6.
- Sternlicht, M D, and Z Werb. 2001. "How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior." *Annual review of cell and developmental biology* 17: 463–516.
- Streuli, C H et al. 1995. "Laminin Mediates Tissue-Specific Gene Expression in Mammary Epithelia." *The Journal of cell biology* 129(3): 591–603.
- Streuli, C H, N Bailey, and M J Bissell. 1991. "Control of Mammary Epithelial Differentiation: Basement Membrane Induces Tissue-Specific Gene Expression in the Absence of Cell-Cell Interaction and Morphological Polarity." *The Journal of cell biology* 115(5): 1383–95.
- Su, Ying, Kartik Shankar, Omar Rahal, and Rosalia C.M. Simmen. 2011. "Bidirectional Signaling of Mammary Epithelium and Stroma: Implications for Breast Cancer—preventive Actions of Dietary Factors." *The Journal of Nutritional Biochemistry* 22(7): 605–11.
- Sudheer, Smita et al. 2012. "FGF Inhibition Directs BMP4-Mediated Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Syncytiotrophoblast." *Stem Cells and Development* 21(16): 2987–3000.
- Suzuki, Kazuhiro, Atsushi Kumanogoh, and Hitoshi Kikutani. 2008. "Semaphorins and Their Receptors in Immune Cell Interactions." *Nature Immunology* 9(1): 17–23.
- Tanaka, S et al. 1998. "Promotion of Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4." *Science (New York, N.Y.)* 282(5396): 2072–75.
- Tarcic, Gabi et al. 2012. "EGR1 and the ERK-ERF Axis Drive Mammary Cell Migration in Response to EGF." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26(4): 1582–92.
- Thiery, Jean Paul, and Jonathan P Sleeman. 2006. "Complex Networks

- Orchestrate Epithelial-Mesenchymal Transitions.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 7(2): 131–42.
- Thuault, Sylvie et al. 2006. “Transforming Growth Factor-Beta Employs HMGA2 to Elicit Epithelial-Mesenchymal Transition.” *The Journal of cell biology* 174(2): 175–83.
- Touriol, C et al. 2000. “Alternative Translation Initiation of Human Fibroblast Growth Factor 2 mRNA Controlled by Its 3'-untranslated Region Involves a Poly(A) Switch and a Translational Enhancer.” *The Journal of biological chemistry* 275(25): 19361–67.
- Tsang, M., and I. B. Dawid. 2004. “Promotion and Attenuation of FGF Signaling Through the Ras-MAPK Pathway.” *Science Signaling* 2004(228): pe17-pe17.
- Turner, David P., Victoria J. Findlay, Omar Moussa, and Dennis K. Watson. 2007. “Defining ETS Transcription Regulatory Networks and Their Contribution to Breast Cancer Progression.” *Journal of Cellular Biochemistry* 102(3): 549–59.
- Twigg, Stephen R F et al. 2013. “Reduced Dosage of ERF Causes Complex Craniosynostosis in Humans and Mice and Links ERK1/2 Signaling to Regulation of Osteogenesis.” *Nature genetics* 45(3): 308–13.
- Ullrich, A, and J Schlessinger. 1990. “Signal Transduction by Receptors with Tyrosine Kinase Activity.” *Cell* 61(2): 203–12.
- Uy, Gary D, Karen M Downs, and Richard L Gardner. 2002. “Inhibition of Trophoblast Stem Cell Potential in Chorionic Ectoderm Coincides with Occlusion of the Ectoplacental Cavity in the Mouse.” *Development (Cambridge, England)* 129(16): 3913–24.
- Valderrama-Carvajal, Hector et al. 2002. “Activin/TGF-Beta Induce Apoptosis through Smad-Dependent Expression of the Lipid Phosphatase SHIP.” *Nature cell biology* 4(12): 963–69.
- Vandewalle, Cindy et al. 2005. “SIP1/ZEB2 Induces EMT by Repressing Genes of Different Epithelial Cell-Cell Junctions.” *Nucleic acids research* 33(20): 6566–78.
- Vary, Calvin P.H. et al. 2000. “Involvement of Ets Transcription Factors and Targets in Osteoblast Differentiation and Matrix Mineralization.” *Experimental Cell Research* 257(1): 213–22.

- Verykokakis, Mihalis et al. 2007. "The RAS-Dependent ERF Control of Cell Proliferation and Differentiation Is Mediated by c-Myc Repression." *The Journal of biological chemistry* 282(41): 30285–94.
- Vietor, I. 2005. "TIS7 Regulation of the -Catenin/Tcf-4 Target Gene Osteopontin (OPN) Is Histone Deacetylase-Dependent." *Journal of Biological Chemistry* 280(48): 39795–801.
- Waerner, Thomas et al. 2006. "ILE1: A Cytokine Essential for EMT, Tumor Formation, and Late Events in Metastasis in Epithelial Cells." *Cancer Cell* 10(3): 227–39.
- Wai, P. Y. 2006. "Ets-1 and Runx2 Regulate Transcription of a Metastatic Gene, Osteopontin, in Murine Colorectal Cancer Cells." *Journal of Biological Chemistry* 281(28): 18973–82.
- Wang, Hong-Rui et al. 2003. "Regulation of Cell Polarity and Protrusion Formation by Targeting RhoA for Degradation." *Science (New York, N.Y.)* 302(5651): 1775–79.
- Watson, Dennis K. et al. 2010. "ETS Transcription Factor Expression and Conversion During Prostate and Breast Cancer Progression." *The Open Cancer Journal* 3(1): 24–39.
- Watson, Erica D, and James C Cross. 2005. "Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta." *Physiology (Bethesda, Md.)* 20: 180–93.
- Wei, Gong-Hong et al. 2010. "Genome-Wide Analysis of ETS-Family DNA-Binding in Vitro and in Vivo." *The EMBO journal* 29(13): 2147–60.
- Wicks, S J et al. 2000. "Inactivation of Smad-Transforming Growth Factor Beta Signaling by Ca(2+)-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II." *Molecular and cellular biology* 20(21): 8103–11.
- Wiesen, J F, P Young, Z Werb, and G R Cunha. 1999. "Signaling through the Stromal Epidermal Growth Factor Receptor Is Necessary for Mammary Ductal Development." *Development (Cambridge, England)* 126(2): 335–44.
- Wright, Edward et al. 2005. "Ets-2 Repressor Factor Recruits Histone Deacetylase to Silence Human Cytomegalovirus Immediate-Early Gene Expression in Non-Permissive Cells." *The Journal of general virology* 86(Pt 3): 535–44.

- Wu, Yanyuan, Marianna Sarkissyan, and Jaydutt V Vadgama. 2016. "Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer." *Journal of clinical medicine* 5(2).
- Yakymovych, I, P Ten Dijke, C H Heldin, and S Souchelnytskyi. 2001. "Regulation of Smad Signaling by Protein Kinase C." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(3): 553–55.
- Yamamoto, Takuya et al. 2006. "Continuous ERK Activation Downregulates Antiproliferative Genes throughout G1 Phase to Allow Cell-Cycle Progression." *Current biology : CB* 16(12): 1171–82.
- Yan, Chunhong, and Paul J Higgins. 2013. "Drugging the Undruggable: Transcription Therapy for Cancer." *Biochimica et biophysica acta* 1835(1): 76–85.
- Yang, Shen-Hsi, Ellis Jaffray, Ron T Hay, and Andrew D Sharrocks. 2003. "Dynamic Interplay of the SUMO and ERK Pathways in Regulating Elk-1 Transcriptional Activity." *Molecular cell* 12(1): 63–74.
- Yingling, Jonathan M, Kerry L Blanchard, and J Scott Sawyer. 2004. "Development of TGF-Beta Signalling Inhibitors for Cancer Therapy." *Nature reviews. Drug discovery* 3(12): 1011–22.
- Yu, Li, Mindy C Hébert, and Ying E Zhang. 2002. "TGF-Beta Receptor-Activated p38 MAP Kinase Mediates Smad-Independent TGF-Beta Responses." *The EMBO journal* 21(14): 3749–59.
- Zavadil, Jiri, and Erwin P Böttinger. 2005. "TGF-Beta and Epithelial-to-Mesenchymal Transitions." *Oncogene* 24(37): 5764–74.
- Zavadil, Jiri, Lukas Cermak, Noemi Soto-Nieves, and Erwin P Böttinger. 2004. "Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch Signalling in Epithelial-to-Mesenchymal Transition." *The EMBO journal* 23(5): 1155–65.
- Zhang, Hong-Zheng et al. 2002. "Estrogen Mediates Mammary Epithelial Cell Proliferation in Serum-Free Culture Indirectly via Mammary Stroma-Derived Hepatocyte Growth Factor." *Endocrinology* 143(9): 3427–34.
- Zhang, Ying E. 2009. "Non-Smad Pathways in TGF-Beta Signaling." *Cell research* 19(1): 128–39.
- Zhong, W. et al. 2006. "FGF Ligand Family mRNA Expression Profile for

Mouse Preimplantation Embryos, Early Gestation Human Placenta, and Mouse Trophoblast Stem Cells.” *Molecular Reproduction and Development* 73(5): 540–50.

Zhou, Yan et al. 2013. “Reversal of Gene Dysregulation in Cultured Cytotrophoblasts Reveals Possible Causes of Preeclampsia.” *Journal of Clinical Investigation* 123(7): 2862–72.

Zhou, Yeping, Rou-Afza F. Gunput, and R. Jeroen Pasterkamp. 2008. “Semaphorin Signaling: Progress Made and Promises Ahead.” *Trends in Biochemical Sciences* 33(4): 161–70.