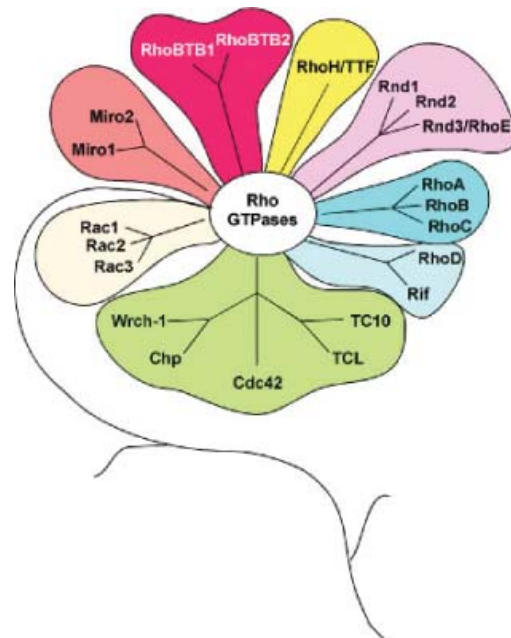


Μεταπτυχιακό πρόγραμμα : Μοριακή Βιολογία και Βιοιατρική

Διατριβή Μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης:

Μηχανισμοί μεταγραφικής ενεργοποίησης της μικρής GTPάσης RhoB



Επιμέλεια εργασίας : Ελευθερία Βασιλάκη

Υπεύθυνος καθηγητής : Δημήτρης Καρδάσης

Σεπτέμβριος 2005
Ηράκλειο Κρήτης

Ο επιβλέπων καθηγητής

Δημήτρης Καρδάσης

Ο επιβλέπων καθηγητής

Χρήστος Στουρνάρας

Να θυμώσεις πρέπει, αλλά να μην εξαντλήσεις το θυμό στο ασήμαντο...
Δώστου φτερά να μετουσιωθεί σε κάτι παραπάνω...
Σε επιστήμη, τέχνη, αγάπη...
Ότι σου είναι δυνατόν...
Ρέα Γαλανάκη

Τη χρονιά 2004-2005 , η χώρα μας γνώρισε ανεπανάληπτες στιγμές και δόξες. Τι να πρωτοθυμηθεί κανείς. Το τιμημένο Euro, τους Ολυμπιακούς αγώνες, το “Number one” της Eurovision ή το χρυσό του Ευρωμπάσκετ ; Τη χρονιά αυτή όμως, εγώ έχω ένα λόγο παραπάνω να πανηγυρίζω. Γιατί αν δεν είναι ανεπανάληπτη χαρά και γιορτή η ολοκλήρωση μιας μεταπτυχιακής διατριβής, τότε τι άλλο μπορεί να είναι; Με αισθήματα λοιπόν εθνικής και προσωπικής υπερηφάνειας, στις επόμενες σελίδες παρουσιάζω τους κόπους και τις εμπειρίες της χρονιάς που πέρασε.

Επειδή όμως κάθε “νίκη”, όσο προσωπική κι αν φαίνεται, κρύβει μέσα της ομαδική δουλειά, δε θα μπορούσα, πρώτα από όλα, παρά να ευχαριστήσω τους συνεργάτες και συνοδοιπόρους μου, όλους εκείνους που με το τρόπο τους με βοήθησαν από την αρχή μέχρι το τέλος της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ τον κ. Δημήτρη Καρδάση, τον Δημήτρη μας, για την τιμή και τη πρόκληση να είμαι ένα από τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας, για τη συνεχή καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία. Τον ευχαριστώ όμως και για το καθημερινό του χαμόγελο, τα συνεχή του πειράγματα και για το μοναδικό τρόπο που έχει να κάνει την αγάπη μου για την επιστήμη ολοένα και μεγαλύτερη.

Ευχαριστώ τη Βέτα, για όλα εκείνα που προσφέρει καθημερινά, για τη βοήθεια, τις συμβουλές αλλά και τη διάθεση της να συμμερίζεται τους προβληματισμούς και τις ανησυχίες μου. Ευχαριστώ την Έφη (Ευσταθία) για όλες εκείνες τις στιγμές που ζούμε εντός και εκτός εργαστηρίου, για όλα όσα κάνει για μένα. Τη συγχαίρω επίσης για την υπομονή και την επιείκεια που δείχνει στις καλλιτεχνικές μου ανησυχίες και στα ατελείωτα πειράγματα μου.

Ευχαριστώ τη Βαρβάρα και τη Σόφη, για τη συνεργασία, τη συμπαράσταση και την ανοχή τους αλλά και το Μάνο, που αν και ήρθε προς το τέλος της διατριβής αυτής, κατάφερε να εισχωρήσει με χαμόγελο και θετική ενέργεια στην καθημερινότητά μου.

Ευχαριστώ επίσης τον κ.Χ.Στουρνάρα για τη συνεργασία και τις υποδείξεις του αλλά και τα μέλη του εργαστηρίου του, ιδιαίτερα την Λίνα, για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση της καθόλη τη διάρκεια της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ την οικογένεια Μανασσάκη και το τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για την επιλογή, τη τιμή και τη προσφορά τους στο πρόσωπο μου, με τη μορφή υποτροφίας.

Μετά την ερευνητική μου οικογένεια, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς και τον αδερφό μου για όσα κάνουν για μένα συνεχώς, για την υποστήριξη τους σε όλους τους τομείς της ζωής μου, για τη κατανόηση που δείχνουν στις επιλογές και τις επιθυμίες μου. Τέλος, αφιερώνω τη διατριβή αυτή μαζί με ένα μεγάλο ευχαριστώ, στονάνθρωπο που μοιράζεται μαζί μου όλες τις χαρές και τις δυσκολίες, που δίνει νόημα και αξία σε ότι κάνω, που φωτίζει το κόσμο μου μ'ένα του χαμόγελο, στο Γιώργο μου.

Βασιλάκη Ελευθερία

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα	3
Περίληψη	8
Abstract	10
Εισαγωγή	13
Πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho	13
Εξελικτικά χαρακτηριστικά	13
Δομικά χαρακτηριστικά	14
Υποομάδες της οικογένειας των Rho GTPασών	16
RhoA-related υποοικογένεια	17
Λειτουργίες των πρωτεϊνών της υποοικογένειας της RhoA	17
Μοναδικά χαρακτηριστικά της RhoB	18
Μεταγραφική ρύθμιση της RhoB πρωτεΐνης	19
Οι πρωτεΐνες Rho ως διαμεσολαβητές στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ	20
Ο βιολογικός ρόλος του TGFβ	23
Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Μετασχηματίζοντα Αυξητικού Παράγοντα β	26
Κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών	28
Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών	28
Sr οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων	29
Δομικά χαρακτηριστικά των Sr παραγόντων	29
Βιολογική λειτουργία του Sp1 παράγοντα	31
Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων της p53	31
Η πρωτεΐνη p73	31
Λειτουργικά χαρακτηριστικά της p73	32
Ερευνητικός στόχος μεταπτυχιακής διατριβής	33
Υλικά και μέθοδοι	35
Υλικά	35
Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών	35
Αδενοιοί	35
Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών	36
Δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal assay) και μέτρηση της	36

δραστικότητα λουσιφεράσης (Luciferase assay),	
Western blotting	36
RNA extraction & RT-PCR	36
Μέθοδοι	38
Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση του υποκινητή της RhoB	38
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)	39
Απομόνωση τμημάτων DNA	39
Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)	40
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων <i>E.coli</i>	41
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini-prep procedure - micro screening)	41
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation)	42
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)	43
Κυτταροκαλλιέργειες	44
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών	44
Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal	46
Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης	46
Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford-Lowry	47
Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών	47
Αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής	48
Χρώση ροδαμίνης φαλλοιδίνης	50
Αποτελέσματα	51
Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ	51
Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB	55
Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ	56
Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ σε κερατινοκύτταρα ανθρώπου	58
Συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ	60
Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB του ανθρώπου	61

Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από τις πρωτεΐνες Smad	64
Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των MAPK κινασών	72
Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον Sp1 μεταγραφικό παράγοντα	74
Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων της p53	77
Συζήτηση	83
Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ	83
Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB	84
Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ	85
Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ σε κερατινοκύτταρα ανθρώπου	86
Συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ	88
Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από τις πρωτεΐνες Smad	89
Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των MAPK κινασών	91
Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον Sp1 μεταγραφικό παράγοντα	92
Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων της p53	93
Μελλοντικοί στόχοι	95
Βιβλιογραφία	97

Περίληψη

Το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες είτε ρυθμίζουν είτε ρυθμίζονται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με μέλη της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho. Μέσω μιας σειράς πολύπλοκων βιοχημικών δικτύων, οι Rho πρωτεΐνες αποτελούν υψηλά συντηρημένους μοριακούς διακόπτες που ελέγχουν πολλές από τις θεμελιώδεις διαδικασίες της βιολογίας του κυττάρου όπως αυτών της μεταγραφικής ρύθμισης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού κατά την μετανάστευση των κυττάρων.

Παράλληλα με τη ρύθμιση της μετατροπής των μορίων αυτών στην ενεργή GTP μορφή, σημαντικό ρόλο για την όλη συμμετοχή τους στις αποκρίσεις των κυττάρων παίζει και η μεταγραφική τους ρύθμιση, η οποία καθορίζει και τα επίπεδα έκφρασής τους στο κύτταρο. Η RhoB είναι το μόνο μέλος της υποοικογένειας των RhoA-related πρωτεϊνών το οποίο υφίσταται μεταγραφική ρύθμιση η οποία φαίνεται να είναι κεφαλαιώδους σημασίας για τη λειτουργία της λόγω του μικρού χρόνου ζωής της μέσα στα κύτταρα. Πράγματι, μια σειρά από πρόσφατες γονιδιωματικές αναλύσεις της δράσης του TGF- β σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση ή η επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή (EMT) κατέστησαν το γονίδιο της RhoB ως έναν από τους κύριους μεταγραφικούς στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β .

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή είχε ως σκοπό αρχικά τον έλεγχο της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από τον TGF- β και στη συνέχεια τη διεξοδική μελέτη του ή των σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία εμπλέκονται άμεσα ή έμμεσα στην ενεργοποίηση αυτή. Επίσης, μελετήθηκε η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από άλλους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Sp1 και μέλη της οικογένειας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας όσον αφορά τη μεταγραφική ρύθμιση από τον TGF β συνοψίζονται ως εξής :

α) Ο TGF β προκαλεί μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB σε διάφορους τύπους κυττάρων όπως τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT, τα κύτταρα ηπατώματος HepG2 και οι ινοβλάστες ποντικού Swiss-3T3. **β)** Στην ενεργοποίηση της μεταγραφής της RhoB από τον TGF β εμπλέκεται τόσο το μονοπάτι των MAPK κινασών και συγκεκριμένα των κινασών ERK1 και 2, όσο

και αυτό των Smad πρωτεϊνών. Τα δύο μονοπάτια αυτά όμως φαίνεται να έχουν διακριτούς και ανεξάρτητους ρόλους. Συγκεκριμένα, η δράση του μονοπατιού των MAPK κινασών είναι πιο άμεση δηλ. παρατηρείται μεταξύ των 3 πρώτων ωρών επίδρασης με TGFβ και ενδεχομένως να είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφικής ρύθμισης. Αντίθετα, η δράση του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών εντοπίζεται μετά από μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επίδρασης με TGFβ και πιθανόν να είναι υπεύθυνη για τη μακρόχρονη διατήρηση της ενεργοποίησης της μεταγραφής της RhoB και κατ'επέκταση του φαινοτύπου της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ. **γ)** Η επίδραση με TGFβ για 24 ώρες προκαλεί ουσιαστική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα HaCaT στα οποία είναι εμφανής η αλλαγή στη μορφολογία και η δημιουργία οργανωμένου δικτύου ινιδίων ακτίνης. Η παρουσία του αναστολέα της MEK κινάσης όχι μόνο δεν φαίνεται να ελαττώνει το φαινόμενο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού από τον TGFβ αλλά μοιάζει να το εντείνει ακόμη περισσότερο. Το αποτέλεσμα αυτό ενδεχομένως σχετίζεται με μια μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoA από τον αναστολέα της MEK κινάσης. **δ)** Η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGFβ μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών προκαλεί αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου αλλά και στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB σε κύτταρα HepG2. **ε)** Η λειτουργική ανάλυση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB του ανθρώπου έδειξε ότι η περιοχή -78/+19 φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. **στ)** Η υπερέκφραση μιας συστασιακά ενεργής μορφής της ογκοπρωτεΐνης Ras ενεργοποιεί τον υποκινητή της RhoB σε αρκετά σημαντικό βαθμό. Η ενεργοποίηση αυτή όμως εμφανίζεται μειωμένη στις μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή της RhoB -227 /+86 και -78 /+86. **ζ)** Δεν παρατηρήθηκε συνεργατική δράση των μονοπατιών των MAPK κινασών και των Smad πρωτεϊνών στη ρύθμιση του υποκινητή της RhoB.

Στο δεύτερο μέρος της μεταπτυχιακής διατριβής, διερευνήθηκε η μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον παράγοντα Sp1. Όπως βρέθηκε από τις πειραματικές αναλύσεις, ο παράγοντας Sp1 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής της RhoB καθώς η मिθραμυκίνη, ένα φάρμακο το οποίο παρεμποδίζει τη πρόσδεση του σε περιοχές πλούσιες σε GC, προκαλεί σημαντική μείωση στα βασικά επίπεδα έκφρασης της RhoB. Η υπερέκφραση του Sp1 προκαλεί ισχυρή ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB

ο οποίος φαίνεται να διαθέτει 3 θέσεις πρόσδεσης του στα σημεία -660, -123 και -104.

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της παρούσας ερευνητικής εργασίας, μελετήθηκε η δράση των μελών της οικογένειας της p53 στη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Βρέθηκε ότι το μόνο μέλος της οικογένειας το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταγραφή της RhoB και μάλιστα να προκαλεί σημαντική ενεργοποίηση στον υποκινητή της είναι η p73. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη ότι μέλη της οικογένειας της p53 έχουν επικαλυπτόμενους αλλά και διακριτούς ρόλους. Η ελάχιστη περιοχή του υποκινητή της RhoB η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από την p73 είναι η -78/+86 . Διαπιστώθηκε η ύπαρξη συνεργατικής δράσης μεταξύ της p73 και του παράγοντα Sp1 στην ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB.

Η μελέτη της ρύθμισης της RhoB τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο πρόκειται να δώσει σημαντικά στοιχεία για τον τρόπο λειτουργίας της και να οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση των ιδιαίτερων λειτουργικών χαρακτηριστικών της. Η μελέτη της συνεργατικής δράσης (cross talk) της ταχείας αλλά και μακροχρόνιας (γενωμικής) ενεργοποίησης της RhoB από τον TGFβ κατά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε συνδυασμό με την γνωστή αντικαρκινική της δράση μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία νέων εργαλείων για την θεραπεία νοσημάτων όπως ο καρκίνος.

ABSTRACT

One percent of the human genome encodes for proteins that regulate or are regulated by members of the Rho-GTPases family. Rho proteins are characterized as molecular switches that control many of the fundamental processes of cell biology like transcriptional regulation, cell growth, apoptosis and cytoskeleton reorganization during cell migration.

Whereas the classical Rho GTPases are regulated by GDP/GTP cycling, in some cases transcriptional regulation, which determines the expression levels of the proteins in the cell, plays also a crucial role in their function. RhoB is the only member of the RhoA-related subfamily that is transcriptionally regulated and this regulation seems to be of high importance for its function due to the short half-life of this protein in the cell. In a series of DNA microarray studies of TGF β -induced cell processes like epithelial-mesenchymal transition (EMT) and apoptosis led to the discovery of RhoB as one of the most critical transcriptional targets of TGF β pathway.

In the present study, we investigated the molecular mechanisms that control RhoB gene expression at the transcriptional level. In the first part, we sought to determine whether RhoB is transcriptionally activated by TGF β and which TGF β -induced pathways are responsible for this upregulation. In the second and third part, we studied the transcriptional regulation of RhoB by other transcription factors such as Sp1 and members of p53 family of tumor suppressor proteins. The results of our study concerning the role of TGF β in RhoB activation are concluded below:

a) TGF β activates transcriptionally the RhoB gene in different cells types such as human keratinocytes (HaCaT), hepatoma cells (HepG2) and mouse fibroblasts (Swiss3T3) b) in this upregulation are involved both the MAP kinase pathway, specifically kinases ERK1/ERK2, and the Smad pathway but the two pathways seem to have independent roles. The pathway of MAP kinases acts during the first 3 hours of TGF β treatment and probably it is responsible for the early events in RhoB transcriptional regulation. On the contrary, the Smad pathway acts at later timepoints and presumably it is responsible for the retention of transcriptional activation of the RhoB gene and by this way retention of the phenotype of actin cytoskeleton reorganization caused by TGF β c) TGF β treatment for 24hours results in obvious reorganization of actin cytoskeleton

(stress fibers) in HaCaT cells. The use of MEK inhibitor U0126 induced this reorganization presumably due to the small transcriptional upregulation of the RhoA gene caused by the MEK inhibitor. d) Overexpression of a constitutively active TGF β receptor type I by the use of recombinant adenoviruses resulted in the upregulation of RhoB at the transcriptional and protein level in HepG2 cells e) A functional characterization of RhoB promoter showed that the region between nucleotides -78 and +19 is necessary and sufficient for transactivation of RhoB promoter by the Smad proteins. f) Overexpression of a constitutively active oncoprotein Ras (Ras ca) transactivates the RhoB promoter (-726 +86). This specific activation is reduced in mutants -227/+86 and -78/+86 of RhoB promoter. g) We didn't observe synergistic interactions between the pathways of MAP kinases and Smad proteins in the regulation of the RhoB promoter.

In the second part of our study, we investigated the role of Sp1 in the transcriptional activation of RhoB gene. Our experimental data showed that Mithramycin, a drug that inhibits the binding of Sp1 to GC-rich motifs in the promoters of genes, has a negative effect on the basal levels of transcription of RhoB gene. Overexpression of Sp1 induces the activity of RhoB promoter. The RhoB promoter consists of three Sp1 binding sites (-660, -123 and -104).

In the third part of this study, we investigated the importance of p53 family in the transactivation of the RhoB promoter. We showed that among the members of this family, only p73 regulates the transcription of RhoB gene by activating its promoter. This observation supports previous observations showing that p53 family members have overlapping but distinct roles on target genes. The minimum region that is responsible for transactivation by p73 is -78 /+86. Finally, we observed synergistic interactions between p73 and Sp1 in transactivation of RhoB promoter.

The study of RhoB regulation at the transcriptional and protein level will provide important information regarding its function and may lead to a deeper understanding of its special functional characteristics. Studying the role of RhoB in actin cytoskeleton reorganization caused by TGF β in addition to its known anticancer action, may lead to the discovery of novel tools for the treatment of diseases such as cancer.

Εισαγωγή

Πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho

Εξελικτικά χαρακτηριστικά

Οι Rho πρωτεΐνες κλωνοποιήθηκαν αρχικά λόγω της ομοιότητας τους με τα ογκογονίδια Ras.



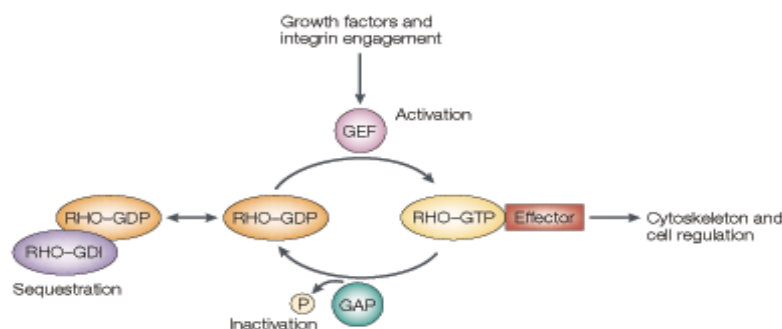
Εικόνα 1 : Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας των Rho GTPασών και αντιπροσωπευτικών μελών της υπεροικογένειας των Ras GTPασών (από αναφορά 1).

Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν τουλάχιστον μια Rho GTPάση. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης ο αριθμός των Rho GTPασών αυξήθηκε φθάνοντας σήμερα τις 20 Rho πρωτεΐνες στο ανθρώπινο γονιδίωμα , τις 7 στη *Drosophila melanogaster* και τις 5 στο *C.elegans* . Όπως σε πολλές άλλες οικογένειες πρωτεϊνών , η οικογένεια των Rho φαίνεται να έχει επεκταθεί κατά τη διάρκεια της εξέλιξης έτσι ώστε να είναι σε θέση να εκτελεί περισσότερο εξειδικευμένες λειτουργίες στους ανώτερους οργανισμούς (1).

Δομικά χαρακτηριστικά

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των Rho GTPασών χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας περιοχής με την ονομασία Rho-type GTPase-like domain, στην οποία και οφείλεται η δράση τους ως GTPάσες. Το δομικό χαρακτηριστικό το οποίο διαχωρίζει της Rho πρωτεΐνες από τις υπόλοιπες μικρές GTPάσες είναι η επονομαζόμενη Rho insert περιοχή η οποία τοποθετείται μεταξύ του πέμπτου β πτυχωτού φύλλου και της τέταρτης α έλικας στην περιοχή της GTPάσης (2).

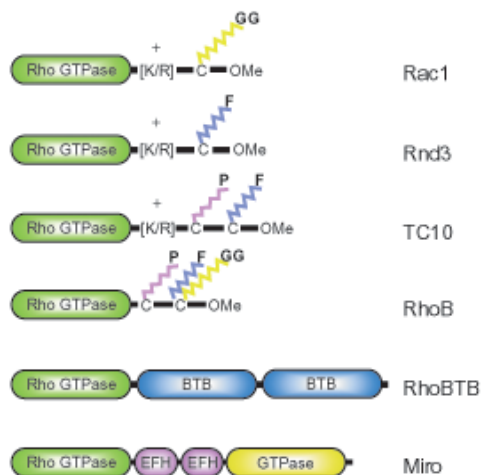
Οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες είναι μικρές (190-250 αμινοξέα) και αποτελούνται μόνο από τη περιοχή GTPάσης και μικρές αμινο- και καρβοξυ-τερματικές προεξοχές. Μέσα στις περιοχές GTPάσης, τα μέλη της οικογένειας εμφανίζουν ομολογία από 40-95%. Όλες οι Rho πρωτεΐνες περιέχουν τα μοτίβα αλληλουχίας τα οποία χαρακτηρίζουν τις πρωτεΐνες που προσδέουν GTP, προσδέονται στο GDP και στο GTP με μεγάλη συγγένεια και εναλλάσσονται συνεχώς μεταξύ μια ενεργής, GTP-προσδεμένης, και μιας ανενεργής GDP-προσδεμένης μορφής. Η πρόσδεση στο GTP επάγεται από RHO guanine nucleotide exchange factors (RHO-GEFs) ενώ η υδρόλυση του GTP καταλύεται από RHO-GTPase-activating proteins (RHO-GAPs) (εικόνα 2).



Εικόνα 2 : Μοντέλο ρύθμισης των Rho πρωτεϊνών. Όταν οι Rho πρωτεΐνες προσδέονται στο GDP κατευθύνονται στο κυτταρόπλασμα μέσω αναστολέων της αποδέσμευσης του GDP (RHO-GDIs) ενώ η ανταλλαγή του GDP με το GTP προάγεται από RHO guanine nucleotide exchange παράγοντες οι οποίοι συχνά σχετίζονται με τη μετατόπιση των Rho πρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες (από αναφορά 3).

Μια ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος έδειξε ότι οι RHO–GEF και RHO–GAP περιοχές βρίσκονται σε πολλές πρωτεΐνες υποδεικνύοντας με το τρόπο αυτό ότι η ρύθμιση των Rho πρωτεϊνών είναι σημαντική σε ποικίλες διεργασίες του κυττάρου. Οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες έχουν μια ενδογενή ικανότητα να υδρολύουν το GTP σε GDP και ανόργανο φώσφορο (P) η οποία ικανότητα όμως ενισχύεται σημαντικά από συγκεκριμένους παράγοντες (RHO–GAPs). Ένα επιπρόσθετο επίπεδο ρύθμισης προέρχεται από τους RHO–GDP dissociation inhibitors (RHO–GDIs), οι οποίοι αναστέλλοντας την αποδέσμευση του GDP οδηγούν τις Rho-GDP πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα και εμποδίζουν τη ροή του κύκλου GDP–GTP . Η ρύθμιση των πρωτεϊνών RND1, RND2 , RND3/RHOE και RHOH οι οποίες δεν μπορούν να υδρολύσουν το GTP φαίνεται να συμβαίνει μέσω μεταβολών σε πρωτεϊνικό επίπεδο ή στην υποκυτταρική τους τοποθέτηση και όχι μέσω πρόσδεσης σε GDP/GTP (3).

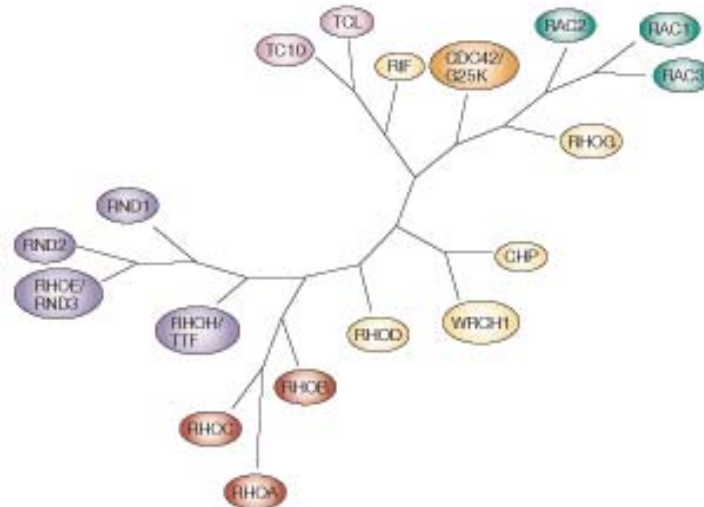
Επιπλέον, η πλειοψηφία των μελών υφίσταται καρβοξυτερματικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από ισοπρενοειδή λιπίδια (εικόνα 3). Παράλληλα με επιπρόσθετες τροποποιήσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα στην καρβοξυτερματική περιοχή, η προσθήκη των ισοπρενοειδών διευκολύνει την υποκυτταρική τοποθέτηση των πρωτεϊνών και την συσχέτιση τους με ειδικές μεμβράνες, ιδιότητα η οποία είναι απαραίτητη για τη λειτουργία τους (3).



Εικόνα 3 : Παρουσίαση των διαφορετικών καρβοξυτερματικών άκρων και των μετα-μεταφραστικών λιπιδικών τροποποιήσεων που συμβαίνουν στις θέσεις αυτές σε διάφορα μέλη της οικογενείας των Rho πρωτεϊνών (από αναφορά 1).

Υποομάδες της οικογένειας των Rho GTPασών

Με βάση την πρωτοταγή αλληλουχία των αμινοξέων, τα δομικά μοτίβα και τη βιολογική λειτουργία η οικογένεια των Rho GTPασών μπορεί να διακριθεί σε έξι κύριες υποοικογένειες οι οποίες εμφανίζουν παρόμοιες αλλά όχι πανομοιότυπες ιδιότητες (εικόνα 4).



Εικόνα 4 : Η οικογένεια των Rho πρωτεϊνών . Οι Rho πρωτεΐνες διακρίνονται σε υποοικογένειες με βάση λειτουργικά, και βιοχημικά δεδομένα. Οι πρωτεΐνες RND και RHOH έχουν τοποθετηθεί στην ίδια υποομάδα λόγω έλλειψης δράσης GTPάσης (από αναφορά 3).

Οι υποομάδες διακρίνονται με βάση το βαθμό ομοιότητας των πρωτεϊνών είτε με τη RHOA, είτε με τη RAC1 είτε με CDC42 οι οποίες και αποτελούν τα 3 πιο αντιπροσωπευτικά και περισσότερο μελετημένα μέλη της οικογένειας. Επιπλέον, η υποομάδα με μέλη τις RND και RHOH χαρακτηρίζεται από έλλειψη δράσης GTPάσης (3).

Επομένως, οι υποοικογένειες στις οποίες διακρίνεται η οικογένεια των Rho πρωτεϊνών είναι οι εξής (εικόνες 1 & 4): **RhoA-related** (RhoA, RhoB & RhoC) , **Rac1-related** (Rac1, Rac2, Rac3 & RhoG), **Cdc42-related** (Cdc42, TC10, TCL, Wrch 1 &2), **Rnd** υποοικογένεια (Rnd1, Rnd2, RhoE & RhoH) και τέλος τις υποοικογένειες **RhoBTB** και **Miro** οι οποίες ταυτοποιήθηκαν πρόσφατα (1,3).

RhoA-related υποοικογένεια

Η υποοικογένεια της RhoA περιλαμβάνει τις RhoA, RhoB και RhoC η αμινοξική αλληλουχία των οποίων εμφανίζει ομολογία η οποία προσεγγίζει το 85%. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και αλληλεπιδρούν με κοινούς παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης RHO–GEFs. Παρόλη όμως την ομοιότητα τους έχουν διακριτούς ρόλους σε πολλές κυτταρικές διεργασίες πιθανόν λόγω διαφορών στο καρβοξυτερματικό τους άκρο οι οποίες και καθορίζουν τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους (4). Η πρωτεΐνη RhoA είναι κυτταροπλασματική με ένα μικρό ποσοστό της να βρίσκεται στη πλασματική μεμβράνη ενώ η RhoB παρατηρείται κυρίως στη πλασματική μεμβράνη αλλά και σε ενδοκυττάρια κυστίδια όπου και συμμετέχει στη μεταφορά των ώριμων ενδοσωμάτων. Τέλος η RhoC είναι κυτταροπλασματική ενώ επιπλέον εντοπίζεται σε μη ταυτοποιημένες προς το παρόν περιπυρηνικές δομές (1,4,5).

Λειτουργίες των πρωτεϊνών της υποοικογένειας της RhoA

Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι οι πρωτεΐνες της οικογένειας των μικρών Rho GTPασών παίζουν σημαντικούς ρόλους σε μια σειρά από φυσιολογικές διεργασίες όπως η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ενώ επίσης εμπλέκονται και στον καρκίνο, με το κάθε μέλος της οικογένειας να συμμετέχει στον ένα ή στον άλλο βαθμό σε διαφορετικά στάδια της καρκινογένεσης (3,6). Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι η μόνιμα ενεργή RhoA έχει ογκογονικές ιδιότητες και ότι αποτελεί σημαντικό συστατικό του μονοπατιού σηματοδότησης που επάγεται από το ογκογονίδιο *ras* και που οδηγεί σε κυτταρικό μετασχηματισμό (7,8) ενώ η RhoC βρέθηκε να είναι βασικός ρυθμιστής της κινητικότητας και της μεταστατικότητας κυττάρων μελανώματος (9).

Από την άλλη πλευρά, σε αντίθεση με τις RhoA και RhoC, η πρωτεΐνη RhoB φαίνεται να παίζει προστατευτικό ρόλο στην καρκινογένεση με το να καταστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη (10,11). Επίσης, βρέθηκε ότι η RhoB απαιτείται για την αποπτωτική δράση αναστολέων των φαρνεσυλτρανσφερασών (FTIs) (12). Παρόλο που τα φάρμακα αυτά είχαν αναπτυχθεί αρχικά ως φάρμακα κατά του ογκογονιδίου *Ras*, φαίνεται τελικά ότι η αντικαρκινική τους δράση

οφείλεται στην επαγωγή μιας μεταστροφής της RhoB από την F στην GG μορφή (13). Πρόσφατες μελέτες σε πρωτογενείς όγκους έχουν δείξει ότι πολλές Rho GTPάσες μεταξύ αυτών η RhoA και η RhoC, βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε διάφορους ιστούς καρκίνου όπως του ορθού, των πνευμόνων και του πανκρέατος (14,15,16). Αντίθετα, η έκφραση της RhoB παρουσιάζεται μειωμένη σε καρκίνους (17) .

Μοναδικά χαρακτηριστικά της RhoB

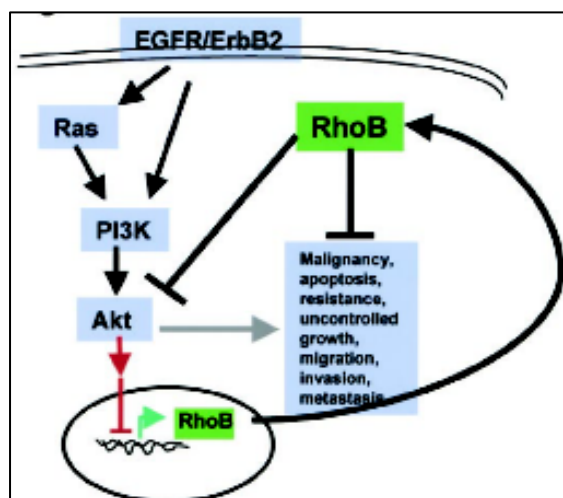
Η πρωτεΐνη RhoB παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που της προσδίδουν ξεχωριστές ιδιότητες και λειτουργίες μεταξύ των άλλων μελών της οικογένειας. Καταρχήν αποτελείται από ένα μόνο εξόνιο (590bp) το οποίο βρίσκεται στο 2^ο χρωμόσωμα στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και συγκεκριμένα 20 λεπτά για το mRNA και 2 ώρες για τη πρωτεΐνη (30). Εκφράζεται είτε σε geranylgeranylated (-GG) είτε σε farnesylated (-F) ισομορφή σε αντίθεση με τις RhoA και RhoC που εκφράζονται μόνο σε (-GG) μορφή και επίσης είναι η μόνη από την υποοικογένεια που τροποποιείται περαιτέρω με τη προσθήκη παλμιτικού οξέος (palmitate fatty acid) (3).

Επιπροσθέτως, η RhoB σε αντίθεση με τις RhoA και RhoC φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά το κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επομένως να έχει αντικαρκινική δράση. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι η έκφραση της RhoB εμφανίζεται μειωμένη σε όγκους (17) ενώ ποντικοί με έλλειψη της αναπτύσσονται φυσιολογικά αλλά εμφανίζουν αυξημένη συχνότητα καρκίνων του δέρματος που προκαλείται από καρκινογόνες ουσίες (18).

Επιπλέον, η RhoB συμμετέχει στο μονοπάτι ενδοκύτωσης του EGF και συγκεκριμένα συντελεί στη καθυστέρηση της μεταφοράς του υποδοχέα από τα όψιμα ενδοσώματα στα λυσοσώματα χωρίς αυτό όμως να έχει επίδραση στη μεταγωγή του σήματος από τον υποδοχέα (31). Επίσης έχει βρεθεί ότι η RhoB καταστέλει την σηματοδότηση μέσω NFκB με το να εμποδίζει την αποδέσμευση και διάσπαση του IκBα (32).

Παράλληλα, η RhoB επηρεάζει την προσκόλληση και τον πολλαπλασιασμό των μετασχηματισμένων κυττάρων. Ωστόσο, το πιο ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της είναι η ικανότητα της να οδηγεί τα κύτταρα αυτά σε απόπτωση. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι μετασχηματισμένα κύτταρα με έλλειψη της RhoB δεν οδηγούνται σε απόπτωση μετά από βλάβη στο DNA ενώ η εκτοπική έκφραση της RhoB διεσώζει το φαινότυπο. Ο μηχανισμός με τον οποίο

δρα η RhoB στην απόπτωση δεν είναι ακόμα γνωστός αλλά κάποιες πρώτες ενδείξεις δείχνουν ότι αναστέλει το μονοπάτι επιβίωσης της Akt κινάσης (protein kinase B) (εικόνα 5). Η RhoB με τη σειρά της ανταγωνίζεται τις ογκογονικές ιδιότητες του Ras/PI3K/Akt μονοπατιού και η εκτοπική έκφραση της εμποδίζει την επαγωγή διαδικασιών όπως του μετασχηματισμού και της μετάστασης ενώ αυξάνει τα επίπεδα της απόπτωσης. Η αρνητική δράση της RhoB στο μονοπάτι της Akt πιθανόν να προέρχεται από καταστολή της φωσφορυλίωσης της Akt από την Pdk1 καθώς αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Pdk1 και της Prk (kinase effector της RhoB) κρίνονται απαραίτητες για την ενεργοποίηση της Akt (36,37).



Εικόνα 5 : Η RhoB καταστέλει τους μηχανισμούς επιβίωσης και μετάστασης των κυττάρων οι οποίοι μεσολαβούνται από το H-Ras/PI3K/Akt μονοπάτι (από αναφορά 37)

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

Μεταγραφική ρύθμιση της RhoB πρωτεΐνης

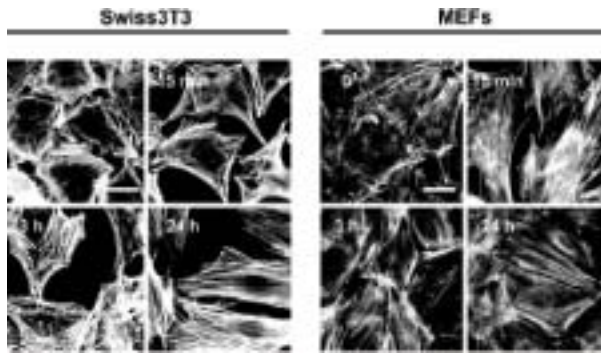
Η μεταγραφική ρύθμιση της RhoB πρωτεΐνης φαίνεται να είναι κεφαλαιώδους σημασίας για τη λειτουργία της λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της μέσα στα κύτταρα. Πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν δείξει ότι η έκφραση της RhoB, η οποία όπως προαναφέρθηκε σε αντίθεση με τις άλλες Rho πρωτεΐνες έχει αντικαρκινική δράση, ρυθμίζεται αρνητικά από ογκογονίδια όπως H-Ras, N-Ras, K-Ras, EGFR και ErbB2 σε κύτταρα ινοβλαστών NIH3T3 και

καρκινικών σειρών πνεύμονα, πανγκρέατος και τραχήλου (25). Η δραστηριότητα του υποκινητή της RhoB επάγεται από χημειοθεραπευτικές ενώσεις όπως η 5-Fluorouracil ενώ η υπερέκφραση του ογκογονιδίου *ras* αναστρέφει αυτή την ενεργοποίηση (34). Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν τον προστατευτικό ρόλο της RhoB ενάντια στην καρκινογένεση και προτείνουν ένα μηχανισμό με τον οποίο ορισμένα ογκογονίδια ξεπερνούν την προστατευτική δράση της RhoB με το να αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου της.

Παράλληλα, έχει βρεθεί ότι το γονίδιο της RhoB αποτελεί γονίδιο το οποίο επάγεται γρήγορα (*immediate-early gene*) από τους EGF και τον PDGF αυξητικούς παράγοντες (17). Επίσης επάγεται από UV και άλλους γενοτοξικούς παράγοντες, η επαγωγή όμως αυτή είναι ανεξάρτητη των μονοπατιών των JNK, ERK και p38 MAPK κινασών. Τέλος, έχει δειχθεί ότι η ίδια η RhoB πρωτεΐνη καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου της (*negative autoregulation*) (35). Στα πολύ πρόσφατα και ανεξερεύνητα δεδομένα έρχεται να προστεθεί και η μεταγραφική της ρύθμιση από τον TGFβ.

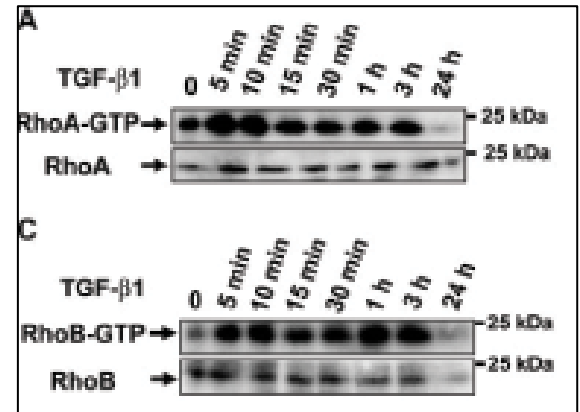
Οι πρωτεΐνες Rho ως διαμεσολαβητές στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ

Όπως έχει μελετηθεί στο παρελθόν, ο TGFβ μπορεί να μεταβάλει την μορφολογία των κυττάρων και την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η δράση του TGFβ οδηγεί σε σχηματισμό ενός πλήρως οργανωμένου δικτύου ινιδίων του στρες (19) υποστρέφοντας με τον τρόπο αυτό τον καρκινικό φαινότυπο επιθηλιακών κυττάρων. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μετάδοση του μηνύματος από τον TGFβ στο κύτταρο είναι οι Rho, Rac1 αλλά και η Jun-N-terminal κινάση. Συγκεκριμένα, στους μετασχηματισμένους H-Ras NIH3T3 ινοβλάστες η επίδραση του TGFβ1 οδηγεί σε πολυμερισμό της ακτίνης και τη δημιουργία εκτεταμένου δικτύου ινιδίων του στρες φαινόμενο που φαίνεται να συνδέεται με την αύξηση της έκφρασης αλλά και την άμεση ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoB (19,20). Στο σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τις Rho πρωτεΐνες και ρυθμίζει της αλλοιώσεις της οργάνωσης του κυτταροσκελετού συμμετέχουν οι πρωτεΐνες ROCK, LimK2, και κοφιλίνη (20) (εικόνες 6 και 7)



Εικόνα 6:

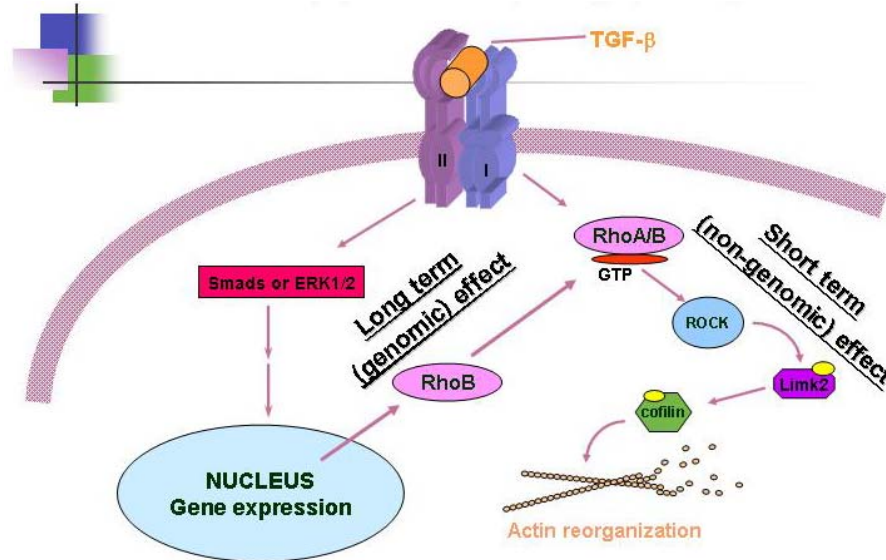
Ο TGF-β1 επάγει γρήγορη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα Swiss3T3 και σε εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs) (από αναφορά 20)



Εικόνα 7 :

Ο TGFβ1 επάγει γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB GTPασών (από αναφορά 18)

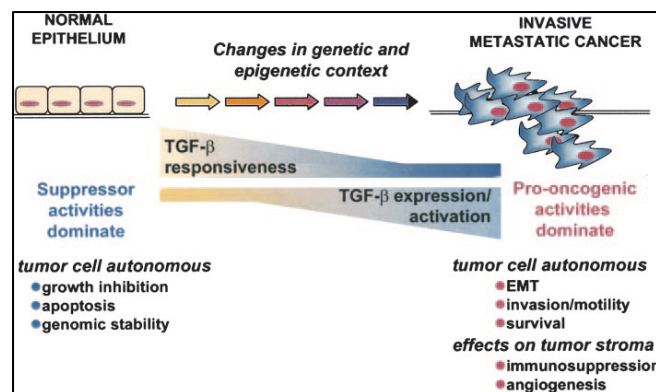
Υπάρχουν κάποιες πρώτες ενδείξεις ότι η μη γενωμική ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών και του σηματοδοτικού μονοπατιού που οδηγεί στην ταχύτερη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι Smad εξαρτώμενη. Το αξιοσημείωτο είναι ότι ενώ η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Rho από τον TGFβ επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα έπειτα από 2 ώρες, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης παραμένει ενεργή για τουλάχιστον 24 ώρες. Το εύρημα αυτό θέτει το ερώτημα ενδεχόμενης ύπαρξης πέραν του μη-γενωμικού μηχανισμού ενεργοποίησης και ενός δεύτερου παράλληλου γενωμικού μηχανισμού ο οποίος ρυθμίζει τη μακροχρόνια δράση του TGFβ στον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Επομένως, σύμφωνα με τα πρόσφατα δεδομένα προκύπτει ότι οι πρωτεΐνες Rho παίζουν κεντρικό ρόλο στον έλεγχο κυτταρικών διεργασιών από τον TGFβ μέσω δυο παράλληλων και πιθανώς συνεργαζόμενων μηχανισμών : ενός μηχανισμού ταχείας, μη-γενωμικής ενεργοποίησης η οποία αποσκοπεί στην έναρξη της διαδικασίας και ενός μηχανισμού μακροχρόνιας γενωμικής ενεργοποίησης η οποία προφανώς ευθύνεται για τη μακροχρόνια διατήρηση του φαινοτύπου (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Συντονισμός και συνεργατικότητα μεταξύ γενωμικής και μη γενωμικής ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Rho από τον TGFβ και ο ρόλος τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης

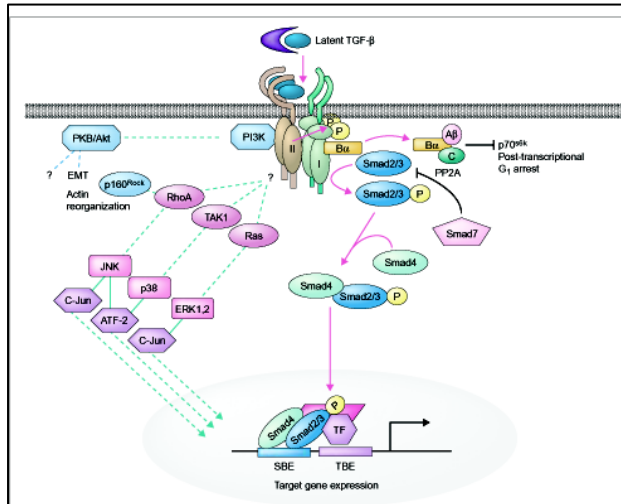
Υπέρ αυτής της υπόθεσης συνηγορεί μια σειρά από πρόσφατες γονιδιωματικές αναλύσεις της δράσης του TGFβ σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση ή η επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή η οποία αποκάλυψε μια σειρά από νέους μεταγραφικούς στόχους του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού. Έναν από αυτούς τους νέους και μη αναμενόμενους μεταγραφικούς στόχους του TGFβ αποτελεί το γονίδιο της RhoB GTPάσης. Συγκεκριμένα δείχθηκε ότι κατά την διαδικασία της επιθηλιακο-μεσεγχυματικής μετατροπής κερατινοκυττάρων (HaCaT) ή επιθηλιακών κυττάρων καρκίνου μαστού (NMuMG) , το γονίδιο της RhoB πρωτεΐνης αρχίζει να επάγεται ισχυρά μετά από μια ώρα επίδρασης με TGFβ και παραμένει ενεργοποιημένο για τουλάχιστον 24 ώρες (21,22). Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι στα κερατινοκύτταρα HaCaT τα οποία υφίστανται επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή από τον TGFβ, η αύξηση των επιπέδων του mRNA του RhoB γονιδίου απαιτεί την ενεργοποίηση της ERK/MAPK κινάσης (εικόνα 9) (20). Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ βρέθηκε επίσης σε αποπτωτικά κύτταρα ηπατώματος Fao (23) καθώς επίσης και σε επιδερμικούς ινοβλάστες (24).

Τις τελευταίες δυο δεκαετίες ο ρόλος του TGFβ για τη προδιάθεση, ανάπτυξη και πρόοδο του καρκίνου έχει υποστεί πολλές αλλαγές και απρόσμενες αναθεωρήσεις. Φαίνεται να παίζει ποικίλους ρόλους στη διαδικασία της ανάπτυξης των όγκων. Αποτελεί δυνητικό καταστολέα της αιμοποιητικής και επιθηλιακής αύξησης των κυττάρων. Ωστόσο, σε κάποιο σημείο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου, η πλειοψηφία των μετασχηματισμένων κυττάρων γίνεται εν μέρει ή ολοκληρωτικά ανθεκτική στην καταστολή της ανάπτυξης από τον TGFβ (37,38,39) ενώ σε όψιμα στάδια του καρκίνου μετατρέπεται από ογκοκαταστολέα σε ογκογονίδιο οδηγώντας σε μετάσταση (εικόνα 10).



Εικόνα 10 : Σε όψιμα στάδια του καρκίνου ο TGFβ μετατρέπεται από ογκοκαταστολέα σε ογκογονίδιο οδηγώντας σε μετάσταση. Η μετάβαση της ασθένειας σε μεταστατικό επίπεδο συνοδεύεται από μειωμένη ή αλλοιωμένη απόκριση σε TGFβ και αυξημένη έκφραση ή ενεργοποίηση του προσδέτη του TGFβ (από αναφορά 37)

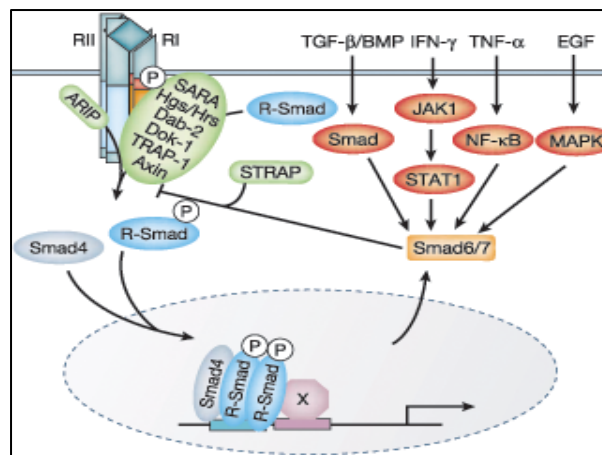
Κατα τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, εδραιώθηκε η θεωρία που παρουσιάζει τις πρωτεΐνες Smad ως κύριους μεταγωγείς του σήματος από τους υποδοχείς των μελών της υπερκοινογένειας του TGFβ στο πυρήνα. Ωστόσο, συνεχώς αυξανόμενες βιοχημικές και αναπτυξιακές ενδείξεις υποστηρίζουν το ενδεχόμενο συμμετοχής στη σηματοδότηση του TGFβ και εναλλακτικών μονοπατιών (πχ MAPK κινασών), πέρα αυτού των Smad πρωτεϊνών (εικόνα 11). Συγκεκριμένα, ο TGFβ μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια των ERK, JNK και p38 MAPK κινασών. Η κινητικά αργή ενεργοποίηση πιθανόν να προέρχεται από Smad-εξαρτώμενες μεταγραφικές αποκρίσεις ενώ η γρήγορη ενεργοποίηση (5-15min) σε άλλες περιπτώσεις υποδηλώνει ανεξαρτησία από τη μεταγραφή.



Εικόνα 11 : TGFβ σηματοδοτικά μονοπάτια (από αναφορά 38)

Τα εναλλακτικά αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν τρεις ενδεχόμενους γενικούς μηχανισμούς με τους οποίους συνεισφέρουν στις φυσιολογικές αποκρίσεις στον TGFβ :

1) τροποποιούν άμεσα (πχ φωσφορυλίωση) τις πρωτεΐνες Smad ρυθμίζοντας με το τρόπο αυτό τη δράση τους. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση της ERK κινάσης από τον EGF υποδοχέα προκαλεί φωσφορυλίωση της MH1 περιοχής της Smad2 και της περιοχής του linker στις Smad1, Smad2, Smad3 η οποία φωσφορυλίωση εμποδίζει τη μεταφορά τους στο πυρήνα και επομένως τη δράση τους ως μεταγραφικούς παράγοντες (40,41). Επίσης η έκφραση της Smad7 η οποία όπως προαναφέρθηκε δρα ανασταλτικά στο Smad μονοπάτι επάγεται από διαφορετικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων των TGFβ και BMP σηματοδοτήσεων μέσω Smad πρωτεϊνών αλλά και μέσω MAPK κινασών (42,43) (εικόνα 12).



Εικόνα 12 : Η ενεργοποίηση των R-Smad πρωτεϊνών μπορεί να ρυθμίζεται από διαφορετικά μονοπάτια (από αναφορά 39)

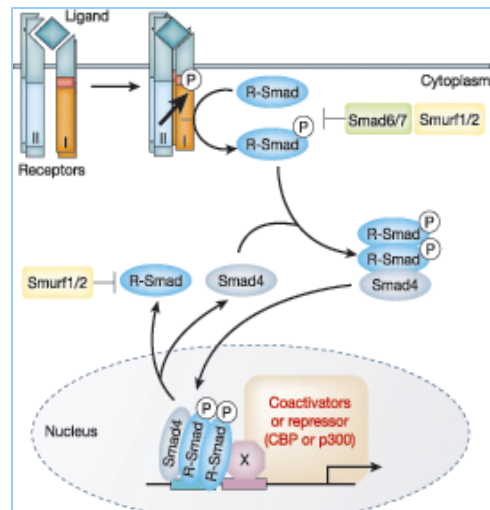
2) οι Smad πρωτείνες αλληλεπιδρούν άμεσα και τροποποιούν τη δράση άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα κινασών μεταφέροντας έτσι τα σήματα σε άλλα μονοπάτια και

3) οι υποδοχείς του TGFβ αλληλεπιδρούν άμεσα ή φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτείνες πέρα των Smad , ξεκινώντας με το τρόπο αυτό παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια το οποίο συνεργάζεται ή ανταγωνίζεται τη δράση του Smad μονοπατιού

Η διττή ικανότητα του TGFβ να δρα μέσω του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών αλλά και μέσω των MAPK κινασών συντελεί στη διαδικασία της επιθηλιακο-μεσεγχυματικής μετατροπής η οποία εξαρτάται εν μέρει από τα μονοπάτια των ERK και/ή p38 MAPK κινασών. Παρόλο που σε αρκετές περιπτώσεις παρατηρείται συνεργασία μεταξύ των TGFβ-επαγόμενων μονοπατιών, συχνά τα διαφορετικά μονοπάτια επηρεάζουν αρνητικά το ένα το άλλο. Επομένως, η ισορροπία μεταξύ άμεσης ενεργοποίησης των Smad και των MAPK μονοπατιών καθορίζει τις αποκρίσεις του κυττάρου στον TGFβ (44).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του Μετασχηματίζοντα Αυξητικού Παράγοντα β (TGFβ)

Μετά από διέγερση με τον TGFβ, ο προσδέτης έρχεται σε επαφή με τον διαμεμβρανικό υποδοχέα τύπου II (**TβRII**) , δημιουργώντας ένα συνδυασμό υποδοχέα-προσδέτη ο οποίος παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τον υποδοχέα τύπου I (**TβRI/ALK5**). Ως αποτέλεσμα σχηματίζεται ένα τετραμερικό σύμπλοκο στο οποίο ο υποδοχέας τύπου II (κινάση τύπου II) φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I σε μια συντηρημένη και πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες περιοχή και τον ενεργοποιεί. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη τύπου I κινάση αναγνωρίζει και φωσφορυλιώνει μέλη του ενδοκυττάρου μονοπατιού σηματοδότησης. Πολλαπλά διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια έχουν βρεθεί να λαμβάνουν χώρα μετά από την ενεργοποίηση των TGFβ υποδοχέων αλλά ωστόσο το πλέον γνωστό και καλά χαρακτηρισμένο είναι το μονοπάτι των **Smad** πρωτεϊνών (εικόνα 13) (29,45).



Εικόνα 13 : Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ. Απεικονίζεται ο γενικός μηχανισμός ενεργοποίησης του TGFβ υποδοχέα και των Smad πρωτεϊνών (από αναφορά 29)

Η τύπου I κινάση προσδένει και φωσφορυλιώνει ένα συντηρημένο SSXS μοτίβο που εντοπίζεται στην MH2 περιοχή των R-Smad. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται στο C άκρο των δυο καταλοίπων σερίνης που βρίσκονται πλησιέστερα στο καρβοξυτελικό άκρο των R-Smads (12). Αυτή η φωσφορυλίωση έχει ως άμεση συνέπεια την αποσύνδεση της R-Smad από τον υποδοχέα και το σχηματισμό ενός ετερομερούς συμπλόκου μεταξύ της R-Smad και της co-Smad Smad4, το οποίο και σταθεροποιείται μέσω των φωσφορυλιωμένων σερινών στις R-Smads. Η ακριβής στοιχειομετρία των συμπλόκων αυτών δεν έχει αναλυθεί λεπτομερειακά ακόμα αλλά η πλέον προτεινόμενη εκδοχή είναι να σχηματίζονται διμερή ή τριμερή (46, 47, 48). Τα σύμπλοκα αυτά μεταβαίνουν στον πυρήνα όπου και συσσωρεύονται με αποτέλεσμα οι R-Smad να εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων στόχων συνήθως σε συνεργασία με άλλους ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στο DNA. Έτσι, οι Smad δρουν είτε ως άμεσοι μεταγραφικοί παράγοντες, είτε ρυθμίζουν τη μεταγραφή ερχόμενες σε επαφή με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, δρώντας ως συνενεργοποιητές ή συνκαταστολείς. Επομένως, η αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας αλλά και με μέλη της πυρηνικής μεταγραφικής μηχανής συντελεί στη διατήρηση της εξειδίκευσης της απόκρισης του κυττάρου και κατ'επέκταση του οργανισμού στον TGFβ (29, 49,50,51).

Κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες Smad εκφράζονται καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και σε όλους τους ιστούς των ενηλίκων ατόμων, ενώ αρκετές από αυτές παράγονται μέσω εναλλακτικά ματισμένων mRNAs (52, 53). Λειτουργικά, οι Smad πρωτεΐνες διακρίνονται σε 3 υποκατηγορίες (εικόνα 14).

α) **R-Smads**, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω φωσφορυλίωσης από τον TGFβ1 υποδοχέα (Receptor-activated Smads). Σε αυτές ανήκουν οι Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 και Smad8.

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

γ) **I-Smads** (inhibitory Smads) οι οποίες δρουν ανασταλτικά μέσω ανταγωνισμού με τις R-Smads ως προς την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα αλλά και συμμετέχοντας στην πρωτεολυτική διάσπαση των υποδοχέων μέσω ουβικιτιλίωσης. Σε αυτές ανήκουν οι Smad6 και Smad7.

Λειτουργικές περιοχές των Smad πρωτεϊνών

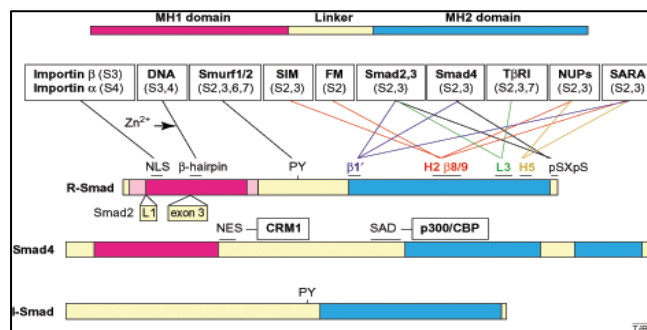
Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο συντηρημένες περιοχές :

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

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

Οι δυο περιοχές αυτές διαχωρίζονται από μια άλλη πλούσια στα αμινοξέα προλίνη/τυροσίνη η οποία ονομάζεται περιοχή σύνδεσης (**linker region**) (εικόνα 14)(50,51,54,55).

Εικόνα 14 : Η οικογένεια των Smad πρωτεϊνών. Διαγραμματική απεικόνιση των δομών των τριών υποομάδων των Smad και παράθεση των πρωτεϊνών με τις οποίες έχουν βρεθεί να αλληλεπιδρούν (από αναφορά 55).



Η MH1 περιοχή εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης στις R-Smads και Co-Smad, σε αντίθεση με τις I-Smads οι οποίες έχουν πολύ λίγη ομοιότητα σε αυτή τη περιοχή και ρυθμίζει την είσοδο στον πυρήνα και τη μεταγραφή μέσω

πρόσδεσης στο DNA, αναγνωρίζοντας την αλληλουχία CAGAC, αλλά και αλληλεπίδρασης με άλλες πυρηνικές πρωτεΐνες. Οι Smad3 και Smad4 προσδένονται απευθείας αλλά με μικρή συγγένεια στα SBEs (Smad-binding elements) τα οποία περιέχουν τη στοιχειώδη αλληλουχία 5'CAGAC3'. Αντιθέτως, η Smad2 δεν μπορεί να προσδεθεί στα SBEs λόγω ενός μοναδικού εξονίου που έχει προστεθεί και αναστέλλει την πρόσδεση στο DNA. Η MH1 περιοχή σχηματίζει μια συμπαγή σφαιρική δομή που αποτελείται από 4 α-έλικες, 6 β-πτυχωτές επιφάνειες και 5 θηλείες. Η πρόσδεση στο DNA πραγματοποιείται μέσω μιας δομής που αποτελείται από μια β φουρκέτα (β hairpin) η οποία έρχεται σε επαφή με την μεγάλη αύλακα του DNA (56).

Η MH2 περιοχή παρουσιάζει υψηλά συντηρημένη μορφή σε όλες τις Smad πρωτεΐνες. Η δομή της περιέχει α-έλικες και θηλείες οι οποίες περιβάλλονται από β-πτυχωτά φύλλα (57,58). Ρυθμίζει τον ολιγομερισμό των Smads, την αναγνώριση από του υποδοχείς TGFβ τύπου I και αλληλεπιδρά με τη πρωτεΐνη SARA, με αρκετούς μεταγραφικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές όπως ο p300 και ο CBP αλλά και συναναστολείς π.χ Ski, SnoN και TGIF(14). Η Smad4 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των Smad συμπλόκων στο πυρήνα μέσω της SAD (Smad-activation domain) περιοχής την οποία διαθέτει αποκλειστικά και η οποία επιτρέπει ισχυρότερη σύνδεση με τους συνενεργοποιητές και προσφέρει ειδική διαμόρφωση στην MH2 περιοχή της Smad4 (59,60).

Sp οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων

Ο Sp1 παράγοντας αντιπροσωπεύει τη πρώτη ταυτοποιημένη και κλωνοποιημένη πρωτεΐνη μια μικρής οικογένειας, η οποία αποτελείται από 8 μέλη τα οποία τοποθετούνται δίπλα στη HOX ομάδα ομοιωτικών γονιδίων (61, 62, 63).

Δομικά χαρακτηριστικά των Sp παραγόντων

Οι Sp1, Sp2, Sp3 και Sp4 παράγοντες, οι οποίοι έχουν ανακαλυφθεί παλαιότερα σε σχέση με τους υπόλοιπους, διαθέτουν παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά γι αυτό και λόγω της ομοιότητας αυτής σχηματίζουν μια μικρή υποομάδα στα ευρύτερα πλαίσια της οικογένειας. Αποτελούνται από τρεις

δαχτύλους ψευδαργύρου (zinc fingers) κοντά στο C –τερματικό άκρο και στις περιοχές πλούσιες σε γλουταμίνη και δίπλα στη περιοχή πλούσια σε σερίνη/θρεονίνη στο N-τερματικό τους άκρο. Τα 81 αμινοξέα της C2H2-τύπου (Cys2His2) δαχτύλων ψευδαργύρου περιοχής τα οποία αντιπροσωπεύουν τη περιοχή πρόσδεσης στο DNA είναι το περισσότερο συντηρημένο τμήμα της πρωτεΐνης. Η σύγκριση αυτής της περιοχής έδειξε ότι οι Sp1, Sp3 και Sp4 σχετίζονται στενότερα μεταξύ τους από ότι με τη Sp2. Τα αμινοξέα KHA στο πρώτο δάχτυλο, RER στο δεύτερο και RHK στο τρίτο είναι συντηρημένα στις Sp1, Sp3 και Sp4 και φαίνεται ότι έρχονται σε επαφή με συγκεκριμένες βάσεις DNA, και γι αυτό ίσως το λόγο οι τρεις παραπάνω πρωτεΐνες αναγνωρίζουν τη κλασική θέση πρόσδεσης Sp1 με την ίδια συγγένεια (64, 65, 66, 67).

Οι Sp1, Sp3 και Sp4 αποτελούνται από δυο περιοχές ενεργοποίησης A και B πλούσιες σε γλουταμίνη οι οποίες είναι απαραίτητες για τη μεταγραφική ενεργοποίηση και δίπλα σε αυτές τοποθετούνται αλληλουχίες πλούσιες σε σερίνη/θρεονίνη οι οποίες είναι ενδεχομένως στόχοι για μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Επίσης οι Sp παράγοντες περιέχουν μια ιδιαίτερα φορτισμένη περιοχή, τη C, η οποία φαίνεται να παίζει αρνητικό εξισορροπιστικό ρόλο καθώς σε μεταλλαγές της αυξάνεται η μεταγραφική ενεργοποίηση. Στην Sp3, η περιοχή C ακετυλιώνεται σε ειδικά κατάλοιπα λυσίνης με αποτέλεσμα τη μεταγραφική απενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Τέλος, υπάρχει μια περιοχή D η οποία είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση μεταξύ μορίων Sp1 στη περίπτωση παρουσίας πολλαπλών θέσεων πρόσδεσης. Συγκεκριμένα, η D περιοχή συμμετέχει κατά κάποιο τρόπο στο σχηματισμό ειδικού συμπλόκου βασικού κατά τη συνεργατική διαδικασία ενεργοποίησης γονιδίων ο υποκινητής των οποίων περιέχει παραπάνω από μια, διαδοχικές ή μη, πλούσιες σε GC περιοχές (65, 66).

Βιολογική λειτουργία του Sp1 παράγοντα

Ο Sp1 παράγοντας εμπλέκεται στην ενεργοποίηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων, ιστοειδικών αλλά και εκφραζόμενων σε ευρεία κλίμακα (housekeeping) και είναι απαραίτητος για τη καταστολή της μεθυλίωσης των CpG νησιδίων (68, 69). Επομένως, αναμενόμενο είναι τα κύτταρα από τα οποία λείπει ο Sp1 να μην επιβιώνουν. Ωστόσο, δε φαίνεται να συμβαίνει κάτι τέτοιο. Σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια και στα οποία πραγματοποιήθηκε αφαίρεση ή μεταλλαγή του γονιδίου για την Sp1, βρέθηκε ότι τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα επιζούν και μάλιστα αναπτύσσουν φυσιολογικά χαρακτηριστικά (70). Όμως, τα Sp1-knockout

έμβρυα παρουσιάζουν καθυστέρηση στην ανάπτυξη και πεθαίνουν μετά την 11η περίπτωση ημέρα ζωής. Ο φαινότυπος τους εμφανίζει αξιοσημείωτη ετερογένεια γεγονός που επισημαίνει την ευρύτερη λειτουργία της Sp1 σε πολλούς τύπους κυττάρων. Άρα ο Sp1 παράγοντας κρίνεται απαραίτητος για τη φυσιολογική εμβρυογένεση στα ποντίκια, ενώ η λειτουργία του είναι καθοριστική για τα διαφοροποιημένα κύτταρα μετά το πρώτο δεκαήμερο της ανάπτυξης.

Τα Sp1-knockout έμβρυα εκφράζουν αρκετά γονίδια στόχους του Sp1 σε φυσιολογικά επίπεδα. Η υπόθεση που επικρατεί είναι ότι άλλα μέλη της Sp-οικογένειας αντικαθιστούν, τουλάχιστον εν μέρει, τη λειτουργία του Sp1 που λείπει στα πρώιμα εμβρυικά στάδια. Ο Sp3 παράγοντας αποτελεί τον περισσότερο δυνητικό υποψήφιο καθώς εκφράζεται και αυτός ευρύτατα, έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί τη μεταγραφή και η ικανότητα πρόσδεσης στο DNA δε διαφέρει ούτε ελάχιστα από αυτή του Sp1.

Οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων της p53

Η πρωτεΐνη p73

Αρκετά χρόνια μετά την ανακάλυψη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53, κλωνοποιήθηκαν δύο ακόμη γονίδια, τα p63 και p73, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια της p53. Οι ακολουθίες των p63 και p73 παρουσιάζουν περισσότερες ομοιότητες μεταξύ τους παρά με αυτή του p53 γονιδίου.

Το p63 γονίδιο περιέχει 15 εξόνια (71) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q27-29, ενώ το p73 έχει μήκος περίπου 65kb, περιέχει 14 εξόνια (72) και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1p36. Υπάρχουν αρκετά κοινά σημεία ανάμεσα στα γονίδια της οικογένειας p53 :

α) Όλα περιέχουν μεγάλα ιντρόνια (73). Το γονίδιο p53 των θηλαστικών περιέχει ένα ιντρόνιο 10,7 kb μεταξύ των εξονίων 1 και 2, ενώ το ανθρώπινο p73 περιέχει 3 μεγάλα ιντρόνια. Το p63, παρομοίως, περιέχει 2 μεγάλα ιντρόνια.

β) Το εξόνιο 1 δεν κωδικοποιεί σε καμιά περίπτωση. Η περιοχή αυτή στο γονίδιο p53, και θεωρητικά και στο p73, κωδικοποιεί μια κατασκευή βρόχου η οποία πιθανά να επηρεάζει τη μετάφραση (72,74).

γ) Η οργάνωση των εξονίων και των ιντρονίων είναι παρόμοια σε όλα τα μέλη της οικογένειας.

Τα γονίδια p63 και p73 παράγουν πολλαπλά mRNA μετάγραφα, που προέρχονται από διαφορετικό μάτισμα. Τα περισσότερα ματίσματα συμβαίνουν στο 3' άκρο και δημιουργούν πρωτεΐνες με διαφορετικά καρβοξυ-τερματικά άκρα. Υπάρχουν τουλάχιστον 6 διαφορετικές p73 πρωτεΐνες (α-ζ) στα φυσιολογικά κύτταρα (72,75,76). Οι β και δ ισομορφές είναι ελλειπίες μορφές της α ενώ η ισομορφή δ δε διαθέτει το μεγαλύτερο τμήμα της καρβοξυ-τερματικής περιοχής, και για το λόγο αυτό μοιάζει περισσότερο με την p53. Η ισομορφή ζ διαθέτει μια εσωτερική απαλοιφή μεταξύ των αμινοξέων 400-496 της μορφής α. Η ισομορφή γ περιέχει ένα μεγάλο εναλλακτικό αναγνωστικό πλαίσιο το οποίο οδηγεί στη δημιουργία ενός διαφορετικού καρβοξυ-τερματικού άκρου μήκους 75 αμινοξέων. Η ισομορφή ε διαθέτει μια καρβοξυ-τερματική περιοχή που αποτελείται από τμήματα των αναγνωστικών πλαισίων των α και γ ισομορφών.

Λειτουργικά χαρακτηριστικά

Η περιοχή της p73 η οποία προσδένεται στο DNA αλληλεπιδρά με θέσεις πρόσδεσης της p53 πρωτεΐνης και ενεργοποιεί τους υποκινητές αρκετών γονιδίων τα οποία θεωρούνται μεταγραφικοί στόχοι της p53 συμπεριλαμβανομένων των *p21WAF1*, *bax*, *mdm2*, *cyclin-G*, *GADD45* και *IGFBP3* (72, 75). Παρόλα αυτά υπάρχουν δεδομένα που υποδεικνύουν την ύπαρξη εξειδικευμένων στόχων αλλά και την διαφορετική απόκριση κάποιων γονιδίων στις p53 και p73 πρωτεΐνες. Επομένως, φαίνεται ότι τα μέλη της οικογένειας της p53 έχουν τόσο επικαλυπτόμενους όσο και διακριτούς βιολογικούς ρόλους .

Η p73 πρωτεΐνη αποτελεί σημαντικό συστατικό του κυττάρου στην απόκριση στη βλάβη του DNA και έχει ογκοκατασταλτική δράση . Κάθε μια από τις ισομορφές εμφανίζει διαφορετική ικανότητα αλληλεπιδράσεων τόσο με άλλες πρωτεΐνες όσο και με το DNA.

Μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης p73 εμφανίζονται σε διάφορους τύπους καρκίνου όπως του παχέος εντέρου και του μαστού (77).

Ερευνητικός στόχος μεταπτυχιακής διατριβής

Το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτείνες οι οποίες είτε ρυθμίζουν είτε ρυθμίζονται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με μέλη της οικογένειας των μικρών GTPασών Rho (1,3). Μέσω μιας σειράς πολύπλοκων βιοχημικών δικτύων, οι Rho πρωτείνες αποτελούν υψηλά συντηρημένους μοριακούς διακόπτες που ελέγχουν πολλές από τις θεμελιώδεις διαδικασίες της βιολογίας του κυττάρου όπως αυτών της μεταγραφικής ρύθμισης, του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της αλλαγής του κυτταροσκελετού κατά την μετανάστευση των κυττάρων.

Παράλληλα με τη ρύθμιση της μετατροπής των μορίων αυτών στην ενεργή GTP μορφή, σημαντικό ρόλο για την όλη συμμετοχή τους στις αποκρίσεις των κυττάρων παίζει και η μεταγραφική τους ρύθμιση, η οποία καθορίζει και τα επίπεδα έκφρασής τους στο κύτταρο. Η RhoB είναι το μόνο μέλος της υποοικογένειας των RhoA-related πρωτεϊνών το οποίο υφίσταται μεταγραφική ρύθμιση η οποία φαίνεται να είναι κεφαλαιώδους σημασίας για τη λειτουργία της λόγω του μικρού χρόνου ημίσειας ζωής της μέσα στα κύτταρα. Πράγματι, μια σειρά από πρόσφατες γονιδιωματικές αναλύσεις της δράσης του TGF- β σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες κατέστησαν το γονίδιο της RhoB ως έναν από τους κύριους μεταγραφικούς στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β . Η TGF β -επαγόμενη σηματοδότηση συμμετέχει στη ρύθμιση της έκφρασης πληθώρας γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης, της ζωής και του θανάτου του κυττάρου.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή αποσκοπεί:

- α) στη μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της μικρής GTPάσης RhoB από τον TGF β και
- β) στη ταυτοποίηση του ή των ενδεχόμενων σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η ρύθμιση αυτή
- γ) στη διερεύνηση πιθανής ρύθμισης της μεταγραφής της RhoB από άλλους παράγοντες οι οποίοι θα προκύψουν από τη σταδιακή μελέτη του υποκινητή του γονιδίου της και την ανακάλυψη πιθανών θέσεων πρόσδεσης τους πάνω σ'αυτόν.

Επίσης πρόκειται να επιχειρηθεί μια διερεύνηση του ρόλου της μικρής GTPάσης RhoB σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες οι οποίες επάγονται από κυτταροκίνες της οικογένειας του TGF β όπως η αναδιοργάνωση του

κυτταροσκελετού της ακτίνης, η κινητικότητα των κυττάρων η οποία αποτελεί και δείκτη μεταστατικότητας και η απόπτωση.

Οι Rho GTPases συνεισφέρουν σε διαφορετικά στάδια της καρκινογένεσης (ανθεκτικότητα σε αποπτωτικά σήματα, μεταστατικότητα των κυττάρων, αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού) και μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις τα μέλη της οικογένειας φαίνεται να έχουν και αντίθετους ρόλους όπως στη περίπτωση της RhoB η οποία είναι η μόνη που εμπλέκεται στη μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ως συνέπεια έχει αντικαρκινική δράση. Για το λόγο αυτό οι Rho GTPases και ιδιαίτερα η RhoB αποτελούν στόχους για την ανάπτυξη ποικίλων χημειοθεραπευτικών αντικαρκινικών παραγόντων. Επομένως, η μελέτη της ρύθμισης της τόσο σε μεταγραφικό όσο και σε πρωτεϊνικό επίπεδο και η συσχέτιση της με την οικογένεια των πολυλειτουργικών κυτοκινών του TGFβ πρόκειται να δώσει σημαντικά στοιχεία για τον τρόπο λειτουργίας της και θα οδηγήσει σε βαθύτερη κατανόηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών της.

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

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών

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

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

Το θρεπτικά υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων LB περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone και yeast extract της εταιρείας Difco. Η αγαρόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα χημικά των εταιρειών Merck και Sigma καθώς και άλλων εμπορικών πηγών. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Kit της εταιρείας Qiagen ενώ για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel Extraction kit της ίδιας εταιρείας αλλά και αυτό της εταιρείας Promega.

Αδενοιοί

Οι αδενοιοί ALK5ca, Smad3, Smad4 dominant negative και LacZ ήταν μια ευγενική προσφορά της Λ.Βαρδούλη από το εργαστήριο του κου Στουρνάρα.

Καλλιέργειες κυτταρικών σειρών

Το θρεπτικό υλικό **Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)**, ο ορός **Fetal Bovine Serum (FBS)**, το ρυθμιστικό διάλυμα **Phosphate Buffered Saline (PBS)**, το ένζυμο **Trypsin - EDTA** καθώς και τα αντιβιοτικά **Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη** αγοράστηκαν από την **Gibco-BRL**. Τα **SL2 (Schneider's)** διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο ειδικό για κύτταρα **Schneider's** εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου μόσχου και **πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη**

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

Ο ο-νιτροφαινυλογαλακτοπυρανοζίτης (**ONPG**), που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη **Sigma**. Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία **Promega**.

Western blotting

Τα μονοκλωνικά αντισώματα από κουνέλι **anti-RhoB** ήταν μια ευγενική προσφορά του κ. Στουρνάρα. και **anti-Flag M2** αγοράστηκαν από την **Sigma**, το ο δευτερεύον **goat anti-mouse (HRP)** αντίσωμα από τη **Chemicon**. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης **Protran** αγοράστηκαν από την εταιρεία **Schleicher & Schuell**. Για την αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (**ECL**) και υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (**ECL-hyperfilm**) της εταιρείας **Pierce και Chemicon**.

RNA extraction & RT-PCR

Ο μετασηματίζων αυξητικός παράγοντας **β1 (TGF-β1)**, που αποτελεί τον συνδέτη (**ligand**) των αντίστοιχων υποδοχέων **TGF-βRI** και **TGF-βRII**, αγοράστηκε από την εταιρεία **R & D Systems**. Ο αναστολέας της δράσης της

MEK U0126 αγοράστηκε από την εταιρεία Upstate biotechnology. Το φάρμακο mithramycin προέρχεται από τη Sigma-Aldrich.

Το Trizol για την εξαγωγή του RNA αγοράστηκε από την εταιρεία Invitrogen. Οι random primers και οι αναστολείς RNAσών (RNasin) που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης αγοράστηκαν από την εταιρεία Promega ενώ το ένζυμο M-MLV Transcriptase από την εταιρεία Gibco-BRL.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση του υποκινητή της RhoB

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 50 µl, στα οποία περιέχονται 100ng από γενωμικό DNA, 50 pmol από κάθε εκκινητή (5µl από αραιώση 10pmol/µl) 5µl από 2 mM συγκέντρωση δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs), 1 U Vent πολυμεράσης και 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου.

DNA template	100ng
10X buffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
Primer sense & antisense 10pmol/µl	5µl
dmsο	1µl
Sterile water	x µl
<u>Vent polymerase</u>	<u>1unit</u>
Τελικός όγκος	50 µl

Στη περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση αντί της Vent στο συνολικό όγκο της αντίδρασης έγινε προσθήκη 3µl MgCl₂ 25mM.

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο :

1. 94⁰ C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
2. 94⁰ C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
3. 62⁰ C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
4. 72 C για 2 λεπτά
5. 35 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 4⁰ C
7. Τέλος

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του υποκινητή της RhoB παρατίθενται στο παρακάτω πίνακα :

Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	Αλληλουχία	Σκοπός
hRhoB -825	5'GGG ATC AGA GTT CAT AGT GAA AAG AG- -3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' εκκινητής για την απομόνωση της -825 περιοχής του υποκινητή της RhoB.
hrhoB +86	5'-GC GAA GCT TCG GCC TAG CTC TCT CCC GGG TCT C-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' εκκινητής για την απομόνωση της +86 περιοχής του υποκινητή της RhoB. Η HindIII θέση είναι πιο έντονη και υπογραμμισμένη.
hRhoB +19	5'- GC GAA GCT TTG CGG TGG CAG ATG AGG GCT G-3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' εκκινητής για την απομόνωση της +19 περιοχής του υποκινητή της RhoB. Η HindIII θέση είναι πιο έντονη και υπογραμμισμένη

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)

Για τις ηλεκτροφορήσεις DNA χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% , 1.5% και 0,5% (παρασκευαστικό gel).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 150ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1,5 gr αγαρόζης (πήκτωμα 1%). Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται 7μl βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική η οποία δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού όταν είναι δεσμευμένη σε διπλοελικωμένο DNA) και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα - φορέα της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση

πραγματοποιείται στα 90-100 Volt, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel γίνεται στα 50-70 Volt.

Απομόνωση τμημάτων DNA

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

Στο δείγμα προστίθενται αρχικά ίσος όγκος από το διάλυμα Membrane binding solution και τοποθετείται στους 55°C για 10 λεπτά μέχρι να λιώσουν τα κομμάτια αγαρόζης. Το δείγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε κολώνα των 2ml. Ακολουθεί επώαση για ένα λεπτό και κατόπιν φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 13.000 στροφές. Το υπερκείμενο αφαιρείται και στη κολώνα προστίθενται 700μl από το διάλυμα Wash solution (με αιθανόλη) και ακολουθεί φυγοκέντρηση για ένα λεπτό σε 13.000 στροφές. Το υγρό απομακρύνεται και το δείγμα προστίθενται 500μl Wash solution και τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση (5 λεπτά, 13.000 στροφές). Το υγρό απομακρύνεται και το δείγμα τίθεται ξανά σε φυγοκέντρηση (1 λεπτό, 13.000 στροφές).

Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 10μl ή 20μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 200-300 ng. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.

Η αντίδραση είχε διάρκεια ~16 ώρες (overnight) εκτός από ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες είχε διάρκεια 4-6 ώρες και έγινε στους 16°C.

Μετά η κολώνα τοποθετείται σε σωλήνα των 1.5ml και προστίθενται στο δείγμα 50μl (για περισσότερο συγκεντρωμένο DNA προτείνεται η χρήση 30μl nuclease free H₂O) H₂O στο κέντρο της κολώνας. Το δείγμα αφήνεται για 1 λεπτό και κατόπιν φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στις 13.000 στροφές. Ο τελικός όγκος στη περίπτωση των 30μl H₂O είναι 28μl.

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων *E.coli* (strain DH10β) (transformation).

Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 100μl βακτηριακών κυττάρων του κατάλληλου strain (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells) και τα 10 μl ή 20 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή του πλασμιδίου που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν το δείγμα υφίσταται θερμικό σοκ στους 42⁰ C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 900μl θρεπτικού LB (LB : 1% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1% NaCl) και το δείγμα επωάζεται στους 37⁰C για μια ώρα. Το τρυβλίο Perti με θρεπτικό LB -άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (50 μg/ml), όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37⁰ C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Στη συνέχεια, 100-150μl από τη καλλιέργεια απλώνονται στο τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 16 - 18 ώρες (overnight).

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

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

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

κατακρημνίζεται με 600 μl κρύας ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται στους -20°C , τουλάχιστον για 20 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13500 στροφές επί 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA κατακρημνίζεται ως ίζημα, ξεπλένεται με 1ml 75% αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 13500 στροφές επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το DNA επαναδιαλύεται σε 20-30 μl (ανάλογα με το μέγεθος της πελέτας) αποστειρωμένου νερού.

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

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

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

Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 4ml από το διάλυμα E1 (+RNase). Κατόπιν προστίθενται 4ml από το E2 διάλυμα, το δείγμα αφήνεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά προστίθενται 4ml από το διάλυμα E3. Το μείγμα μεταφέρεται στο πάγο για 15-20 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στους 4°C στις 3500 στροφές.

Η κολώνα σταντάρεται-εξισσοροπείται με τη προσθήκη 4ml από το E4 διάλυμα. Το υπερκείμενο από τα δείγματα μεταφέρεται στη κολώνα και μετά ξεπλένεται με 2 φορές με 10ml από το E5 διάλυμα. Κατόπιν, η κολώνα τοποθετείται σε πλαστικό σωλήνα των 15ml και προστίθενται 5ml από το E6 (elution buffer). Το δείγμα, αφού γίνει προσθήκη 3.5ml ισοπροπανόλης, μοιράζεται ισότιμα σε σωλήνες των 1.5ml και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στις 13000 στροφές, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθενται στο ίζημα 1ml 70% αιθανόλη με ακόλουθη φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 13000 στροφές. Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλο

όγκο διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8). Η συγκέντρωσή του μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm (UV) ενώ η ποιότητά του εκτιμάται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)

Τα δείγματα μετά από την αντίδραση αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση.

Χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 8.5%, 10.5% ή 12.5% [Stacking gel: ddH₂O 1.8 ml, 30% acrylamide 0.45 ml, stacking buffer (Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8) 0.75 ml, 10% APS 30 μl, TEMED 3 μl. Running gel: ddH₂O 2.3/1.6 ml, 30% acrylamide 1.4/2.1 ml, running buffer (Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8) 1.25 ml, 10% APS 80 μl, TEMED 4 μl].

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 grTris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 200 Volt και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης. Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Poinceau, έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20] [1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με 3 εκπλύσεις με διάλυμα το οποίο περιέχει 1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 1 ώρα με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραιώση με το παραπάνω διάλυμα. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, αραιωμένο 1: 10000 σε TBS-T, δευτερεύον αντίσωμα HRP, γίνεται και πάλι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T, και 1 έκπλυση των 5-10 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε ECL-hyperfilm για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση

κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer : 1% SDS, 1% Triton-X-100, 25mM Glycine) και γρήγορη ανάδευση για 1 ώρα περίπου. Ακολουθούν εκπλύσεις και επωάσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Κυτταροκαλλιέργειες

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HaCaT (ανθρώπινα κερατικοκύτταρα), Swiss3T3 (ινοβλάστες ποντικού) και HepG2 (κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος), SL2 (Schneider cells-εμβρυικά Δροσόφιλας) που προέρχονται από νεφρικά κύτταρα πιθήκου και κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm² και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂. Αποθέματα καλλιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80⁰ C σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτιζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48 - 72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραιώση στις φλάσκες 1 : 10).

Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)

Οι παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης Ca₃(PO₄)₂ με τα εκάστοτε κατάλληλα πλασμίδια. Τα COS-7 αραιώνονται σε 2.5x10⁵ κύτταρα ανά well και σε 5x10⁵ κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και p100, ενώ τα HepG2 σε διπλάσιες ποσότητες αντίστοιχα, την προηγούμενη μέρα της επιμολύνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει 2 μg πλασμιδίου αναφοράς, 6 μg πλασμιδίου έκφρασης ή/και πλασμιδίου συμπλήρωσης (Salmon Sperm DNA), 2 μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της

β-γαλακτοσιδάσης, 31μl CaCl₂ 2M και 195 μl ddH₂O (H₂O for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 10 μg.

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

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο Hepes Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mM Hepes pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες.

Στην περίπτωση των πειραμάτων σε 6-wells τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και συλλέγονται σε 1ml διαλύματος TES. Ακολουθεί αποκόλληση από το πιάτο με ξύστρο και οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από την αφαίρεση του υπερκείμενου στον απαγωγό, στη πελέτα των κυττάρων προστίθενται 100μl Tris (250mM, pH 8). Το δείγμα, μετά από ανάδευση, τοποθετείται στους -80⁰C για ~15 λεπτά και κατόπιν στους 37⁰C μέχρι να ξεπαγώσει (~2 λεπτά). Η παραπάνω διαδικασία (freeze and thaw) πραγματοποιείται τρεις φορές με ενδιάμεση ανάδευση (vortex). Τα δείγματα υφίστανται φυγοκέντρηση 5 λεπτών στις 13000 στροφές και σε θερμοκρασία δωματίου.

Στη περίπτωση των p100, τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και συλλέγονται σε 1ml διαλύματος PBS. Αποκολλώνται από το πιάτο με ξύστρο και οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά στους 4⁰C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μl WCE (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM KCl, 10% Glycerol, και 2 mM DTT και πρωτεϊνικοί αναστολείς που προστίθενται λίγο πριν τη χρήση). Ακολουθεί διαδικασία παγώματος στους - 80⁰ C και ξεπαγώματος σε πάγο (freeze and thaw) για 3 φορές, έτσι ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Μετά την φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά και την απομάκρυνση του debris, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους - 80⁰ C.

Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για τον σκοπό αυτό το μείγμα συγκατακρήμνισης (βλ. παραπάνω) περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal) ή του γονιδίου PGK (Phospho-Glycerate Kinase) (πλασμίδιο pGKβ-gal). Σε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456 μl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3), 132 μl ONPG (8 mg/ml σε 0.1 M Sodium Phosphate buffer), και 6 μl 100x salt (3M KCl, 1M MgCl₂, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd H₂O, τελικός όγκος 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο 37⁰C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200 μl διαλύματος Na₂CO₃ 1 M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)

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

Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford-Lowry

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε πιάτου σε πειράματα μέτρησης της επίδρασης των αδονοϊών στα προς μελέτη γονίδια .

Αρχικά γίνεται αραιώση κάθε δείγματος σε αποστειρωμένο νερό με αναλογία 1:10 και χρησιμοποίηση 10μl από το αραιωμένο δείγμα στην αντίδραση. Από κάθε πιάτο φτιάχνονται τουλάχιστον δύο δείγματα προκειμένου να ληφθεί υπόψη η τιμή του μέσου όρου.

Σε πλαστικό σωλήνα των 1.5ml τοποθετούνται 190μl H₂O, 10μl από την αραιώση 100μl από το αντιδραστήριο A' (1ml A +20μl S) του kit της Biorad και τέλος 800μl από το αντιδραστήριο (reagent) B. Το δείγμα αναδεύεται ελαφρώς και επωάζεται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Το τυφλό αποτελείται από το μείγμα των αντιδραστηρίων με τη διαφορά ότι στη θέση του κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιείται dd H₂O.

Η φωτομέτρηση γίνεται στις πλαστικές κυβέτες, στα 750nm ορατού φάσματος.

Οι τιμές υπολογίζονται με βάση την πρότυπη καμπύλη της BSA:

$$y = \alpha + \beta x \quad y = OD \text{ (τιμή φωτομέτρησης)} \quad x = \mu\text{gr πρωτεΐνης}$$

$$\alpha = 0.02348 \quad \beta = 0.00745$$

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

Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών

Η συλλογή των κυττάρων και η διαδικασία εξαγωγής του RNA πραγματοποιείται κατάλληλα χρονικά διαστήματα μετά την επίδραση με TGFβ (5ng/ml) ή/και τον αναστολέα U0126(10μM). Σε μια σειρά πειραμάτων έγινε χρήση των φαρμάκων 5-FU (50μg/ml) και Mithramycin (200ng/ml).

Η διαδικασία συλλογής των κυττάρων ξεκινάει με την αφαίρεση θρεπτικού και την προσθήκη 1ml Trypsin. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 37°C και

προσθήκη 1ml θρεπτικού. Τα κύτταρα συλλέγονται με την πιπέτα και μεταφέρονται σε 2ml tubes. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 5000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο αφαιρείται. Στη πελέτα των κυττάρων προστίθεται 1ml παγωμένου 1x PBS και κατόπιν γίνεται ανάδευση με τη πιπέτα και μεταφορά τους σε νέα 2ml tubes. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο προστίθεται 1ml Trizol και τα δείγματα αναμιγνύονται με πιπέτα μέχρι να διαλυθεί πλήρως η πελέτα. Μετά από επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 200μl CHCl₃ και ακολουθεί vortex ~10sec μέχρι τα δείγματα να γίνουν ομοιογενή. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται 2-3min σε θερμοκρασία δωματίου και μετά φυγοκεντρώνται στις 12000 στροφές για 15λεπτά στους 4°C όπου και σχηματίζονται δύο φάσεις. Η επάνω φάση μεταφέρεται σε tube του 1.5ml και κατόπιν προστίθενται 500μl ισοπροπανόλη. Τα δείγματα επωάζονται 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά υφίστανται φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 12000 στροφές στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και προστίθεται 1ml 75% αιθανόλη. Ακολουθεί vortex μέχρι να ξεκολλήσει η πελέτα η οποία όμως δεν διαλύεται. Τα δείγματα τίθενται σε φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 12000 στροφές στους 4°C και το υπερκείμενο απομακρύνεται. Κατόπιν πραγματοποιείται στέγνωμα των δειγμάτων για 2-3 λεπτά στο speed vac και οι πελέτες επαναδιαλύονται σε κατάλληλη ποσότητα H₂O (30-50μl) με ελαφριά ανακίνηση.

Για την μέτρηση της ποσότητας του RNA γίνεται φωτομέτρηση στα 260n και ο υπολογισμός των μg του RNA πραγματοποιείται με τη βοήθεια του τύπου :

$$\mu\text{g}/\mu\text{l RNA}=(\text{OD}_{260}\times 40\times 200)/1000$$

Αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής

Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιούνται τα εξής :

- 1μg RNA
- H₂O ως τα 30,5μl
- 3μl oligo-dT random examer primers 100ng/μl
- 10μl 5x Reverse Transcription buffer
- 5μl dNTP's mix 2mM
- Επώαση για 5 λεπτά στους 65°C
- Σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά

- 1μl M-MLV reverse transcriptase
- 0,5μl RNase inhibitor
- Flash spin
- Επώαση για 1-2 ώρες στους 37°C

Τα cDNA που παράγονται μετά την παραπάνω αντίδραση τίθενται σε μετέπειτα αντιδράσεις PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών οι οποίοι περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2 : εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR ανάστροφης μεταγραφής	
Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
hRhoB sense	5'CCCACCGTCTTCGAGAACTA- -3'
hRhoB anti-sense	5'CTTCCTTGGTCTTGGCAGAG- -3'
RhoA sense	5'- CCAGACTAGATGTAGTATTTTTTG-3'
RhoA antisense	5'-ATTAGAGCCAGATGCTTAAGTCC-3'
GAPDH F'	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH R'	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε κυρίως στις αντιδράσεις είναι το εξής:

Πρόγραμμα PCR ανάστροφης μεταγραφής

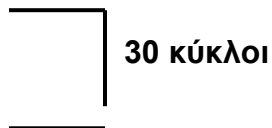
94°C για 4 λεπτά

94°C για 30sec

58 °C για 2 λεπτά

72°C για 2 λεπτά

72°C για 4 λεπτά



Χρώση ροδαμίνης φαλλοιδίνης

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

Τα κύτταρα εκπλένονται μία φορά, για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS. Ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde σε PBS+/, για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές, ώστε η χρωστική να περνά στο εσωτερικό τους, με χρήση διαλύματος 1 ml/well 0.5% Triton-X-100 σε Buffer 1 (10x Buffer 1 : 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO₃, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6.0-6.5). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνονται 3 εκπλύσεις όπως περιγράφονται παραπάνω αλλά σε διάλυμα 1.5 ml/well PBS +1.5% FBS (χρησιμοποιείται για μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης).

Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με 100 μl, η οποία έχει αραιωθεί 1:100 σε διάλυμα PBS + 1.5% FBS. Η επώαση γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον, με ανοικτό το καπάκι του τρυβλίου για 40 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS.

Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας - αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 C⁰ και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus BH-2) και η φωτογράφησή τους με 35 mm Olympus (C-35AD-4) camera.

Η φαλλοιδίνη προσδένεται στη πολυμερισμένη ακτίνη και επομένως με τη χρώση ροδαμίνης φαλλοιδίνης ανιχνεύεται η πολυμερισμένη ακτίνη και τα ινίδια του στρες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

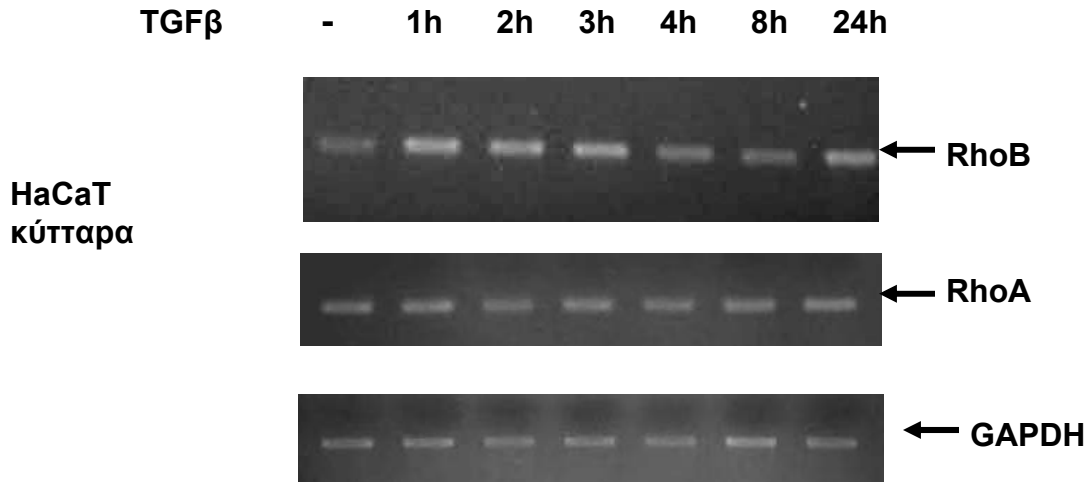
Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ

Όπως προαναφέρθηκε, πρόσφατα δεδομένα από γονιδιωματικές αναλύσεις σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση ή η επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή δείχνουν πιθανή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ.

Το πρώτο μέρος της παρούσας έρευνας είχε ως σκοπό την προσπάθεια επιβεβαίωσης αρχικά και κατόπιν περαιτέρω μελέτης της ρύθμισης της ενεργοποίησης της RhoB από τον TGFβ σε μεταγραφικό επίπεδο. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής στα οποία χρησιμοποιήθηκαν cDNA από διάφορες κυτταρικές σειρές και εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο της RhoB του ανθρώπου.

Συγκεκριμένα, έγινε επίδραση με TGFβ (5ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (0h,1h,2h,3h,4h,8h,24h) και σε ποικίλες κυτταρικές σειρές όπως HaCaT (κερατινοκύτταρα ανθρώπου), HepG2 (κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος) και Swiss3T3 (ινοβλάστες ποντικού). Κατόπιν, συλλέχθηκε το RNA το οποίο τέθηκε σε αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής. Τα cDNA που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε μια σειρά αντιδράσεων PCR μαζί με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoB αλλά και εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoA. Η αφυδρογονάση της 3'-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της ισοδύναμης σύνθεσης cDNA.

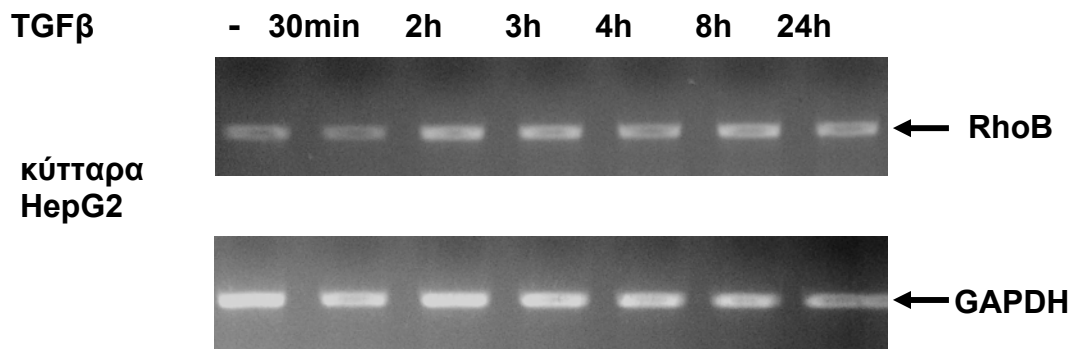
Στην παρακάτω εικόνα, παρατίθεται μια πρώτη σειρά αντιδράσεων PCR ανάστροφης μεταγραφής που πραγματοποιήθηκε με τη χρήση cDNA από κύτταρα HaCaT στα οποία είχε προηγηθεί επίδραση με TGFβ στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα.



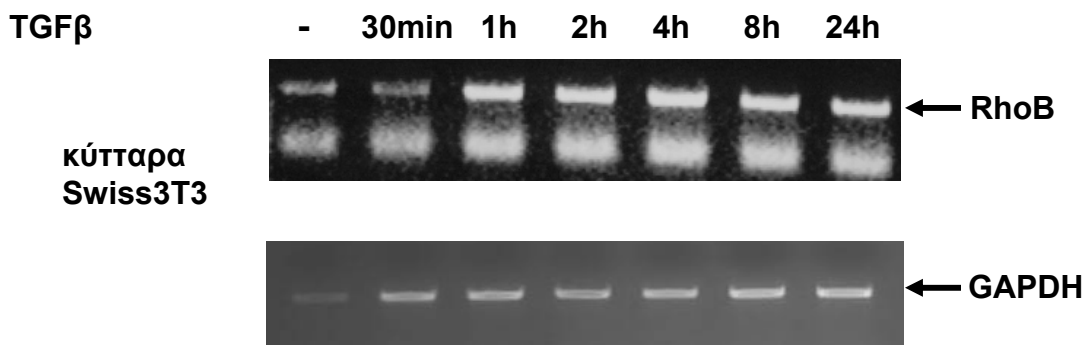
Εικόνα 15 : Ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ. Κύτταρα HaCaT, αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.2%) για 24 ώρες, επεξεργάστηκαν για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα με 5ng/ml TGFβ και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του γονιδίου της RhoB και εκκινητές ειδικούς για το mRNA του γονιδίου της RhoA και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής της RhoB και της RhoA .Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH) τα ίδια χρονικά διαστήματα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 15, σε κύτταρα HaCaT ο TGFβ προκαλεί ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB σε αντίθεση με το γονίδιο της RhoA του οποίου η έκφραση παραμένει σταθερή. Η ενεργοποίηση αυτή ξεκινά μετά από 1 ώρα επίδραση με TGFβ, διατηρείται μέχρι και τις 3 ώρες όπου και φτάνει στο μέγιστο βαθμό της και κατόπιν εμφανίζει σημαντική πτώση και επανέρχεται ουσιαστικά στα βασικά επίπεδα μεταγραφής. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι η μεταγραφή αρχίζει να αυξάνει πάλι μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ.

Τα αποτελέσματα αντίστοιχων πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση cDNA από κύτταρα ηπατώματος ανθρώπου (HepG2) αλλά και από κύτταρα ινοβλαστών ποντικού (Swiss3T3) στα οποία είχε προηγηθεί επίδραση με TGFβ σε κατάλληλα χρονικά διαστήματα παρουσιάζονται στις εικόνες 16 και 17. Όπως φαίνεται και σε αυτή τη περίπτωση ο TGFβ προκαλεί ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB η οποία όμως ξεκινάει μετά από μια ώρα επίδρασης αλλά διατηρείται αμείωτη μέχρι και τις 24 ώρες. Δεν εμφανίζει δηλαδή ανάλογη καμπύλη με αυτή που παρατηρείται στα κύτταρα HaCaT.



Εικόνα 16 : Ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ. Κύτταρα HepG2 αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.5%) για 24 ώρες, επεξεργάστηκαν για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα με 5ng/ml TGFβ και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoB γονιδίου έγινε ο προσδιορισμός των επιπέδων μεταγραφής της RhoB .Στο δεύτερο τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH) τα ίδια χρονικά διαστήματα

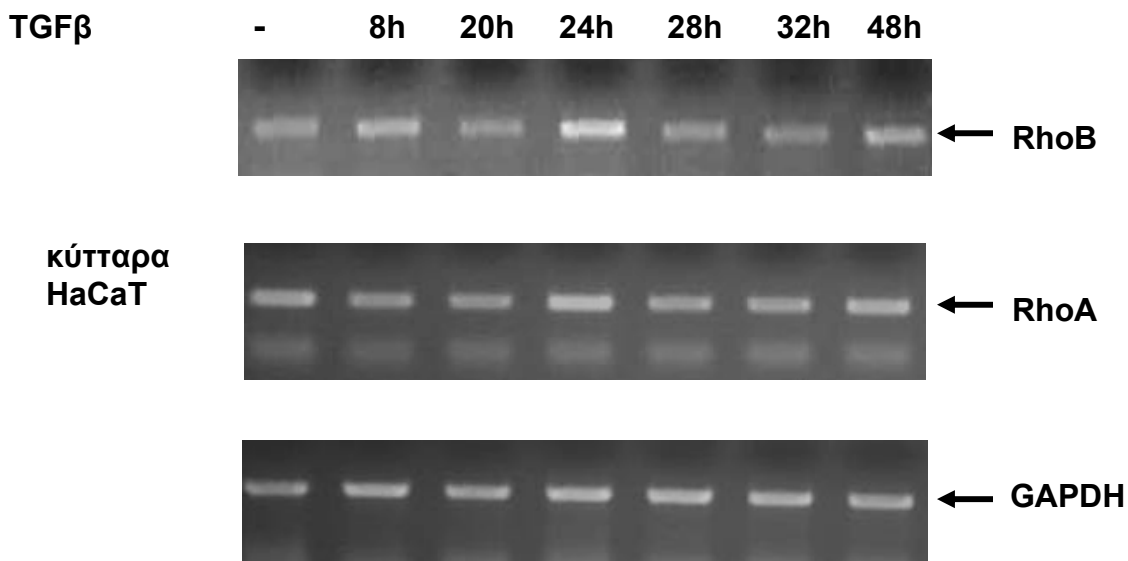


Εικόνα 17 : Ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ. Κύτταρα Swiss3T3 αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό απουσία ορού για 24 ώρες επεξεργάστηκαν για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα με 5ng/ml TGFβ και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoB γονιδίου έγινε ο προσδιορισμός των επιπέδων μεταγραφής της RhoB .Στο δεύτερο τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH) .

Όπως διαπιστώθηκε στα παραπάνω πειράματα στα κύτταρα HaCaT, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB αρχίζει να αυξάνει ξανά στις 24 ώρες επίδρασης με TGFβ συγκριτικά με αυτή των 8 ωρών. Σε μια επόμενη σειρά πειραμάτων, μελετήθηκε η επίδραση του TGFβ για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB προκειμένου να

διαπιστωθεί εάν η ενεργοποίηση αυτή εξακολουθεί να αυξάνει ή εάν φτάνει σε σταθερά επίπεδα.

Συγκεκριμένα, έγινε επίδραση TGFβ (5ng/ml) για τα χρονικά διαστήματα (8h, 20h, 24h, 28h, 32h, 48h) σε κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν συντηρηθεί προηγουμένως σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.2%) για 24 ώρες. Κατόπιν, συλλέχθηκε το RNA το οποίο τέθηκε σε αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής. Τα cDNA που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε μια σειρά αντιδράσεων PCR μαζί με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoB αλλά και εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoA. Ως γονίδιο ελέγχου της ισοδύναμης σύνθεσης cDNA χρησιμοποιήθηκε η αφυδρογονάση της 3'-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH).



Εικόνα 18 : Ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ. Κύτταρα HaCaT ,αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.2%) για 24 ώρες, επεξεργάστηκαν για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα με 5ng/ml TGFβ και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoB γονιδίου και εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoA γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής της RhoB και της RhoA .Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GAPDH) τα ίδια χρονικά διαστήματα

Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, στα κύτταρα HaCaT, η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ παρουσιάζει μια πτώση από τις 8 στις 20 ώρες επίδρασης και εμφανίζει όμως σημαντική αύξηση στις 24 ώρες. Κατόπιν, στα χρονικά διαστήματα των 28 και 32 ωρών η έκφραση αρχίζει πάλι να μειώνεται προσεγγίζοντας τα βασικά επίπεδα. Το αξιοσημείωτο είναι ότι

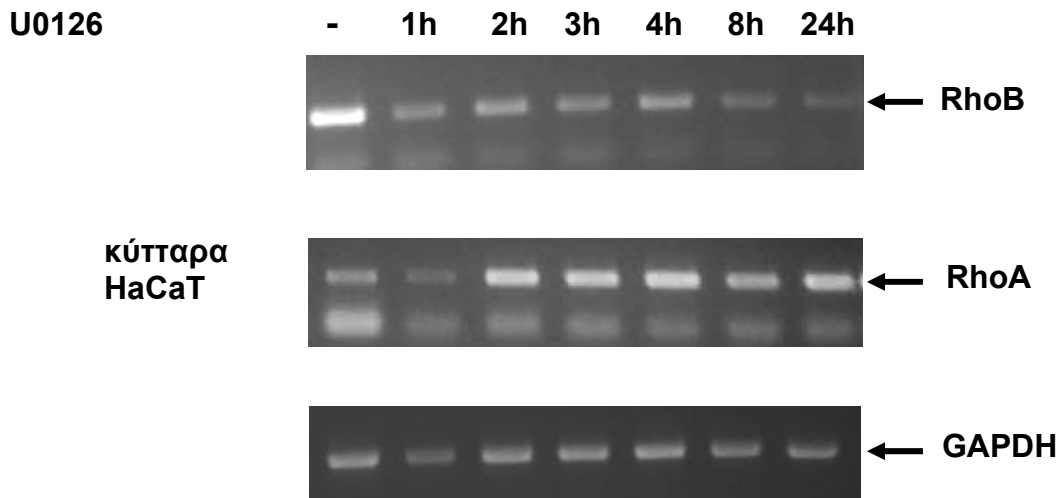
στις 48 ώρες επίδρασης με TGFβ η μεταγραφή του γονιδίου της RhoB εμφανίζει πάλι σημαντική ενεργοποίηση. Αντίθετα όπως παρατηρήθηκε και στα προηγούμενα πειράματα η έκφραση του γονιδίου της RhoA κυμαίνεται σε σχετικά σταθερά επίπεδα.

Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB

Ένα επιπλέον στοιχείο που προέκυψε από τις γονιδιωματικές αναλύσεις, οι οποίες κατέστησαν το γονίδιο της RhoB ως έναν από τους κύριους μεταγραφικούς στόχους του TGFβ, ήταν η ενδεχόμενη συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στην ενεργοποίηση αυτή. Η συγκεκριμένη ένδειξη προήλθε μέσω της χρήσης στις αναλύσεις αυτές ενός δυνητικού αναστολέα της κινάσης MEK ο οποίος ονομάζεται U0126. Ο αναστολέας αυτός δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο της MEK εμποδίζοντας με το τρόπο αυτό τη δράση της ως κινάση και ως επακόλουθο την ενεργοποίηση των ERK1 & ERK2 οι οποίες αποτελούν κύριους μεταγωγείς του σήματος της MEK κινάσης. Όπως προαναφέρθηκε, σύμφωνα με αυξανόμενες βιοχημικές ενδείξεις έχει βρεθεί ότι ο TGFβ μπορεί να ενεργοποιήσει μονοπάτια των ERK, JNK και p38 MAPK κινασών (38).

Ένας πρωταρχικός στόχος που τέθηκε στην παρούσα έρευνα ήταν η διερεύνηση ενός πιθανού ρόλου του μονοπατιού των MAPK κινασών στην μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB απουσία αλλά και παρουσία ενεργοποίησης από τον TGFβ. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής σε κύτταρα HaCaT.

Συγκεκριμένα, σε κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν συντηρηθεί σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.2%) έγινε προσθήκη I του αναστολέα U0126 σε συγκέντρωση 10μM για διάφορα χρονικά διαστήματα (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 8h, 24h) και στη συνέχεια συλλέχθηκε το RNA τους. Τα cDNA που παρασκευάστηκαν μετά από αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε μια σειρά αντιδράσεων PCR μαζί με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoB αλλά και εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoA. Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό πείραμα PCR ανάστροφης μεταγραφής των παραπάνω δειγμάτων.



Εικόνα 19 : Ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τις MAPK κινάσες. Κύτταρα HaCaT συντηρημένα σε θρεπτικό με 0.2% ορό για 24 ώρες επεξεργάστηκαν για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα με 10μM U0126 και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoB γονιδίου και εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoA γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής της RhoB και της RhoA .Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH) .

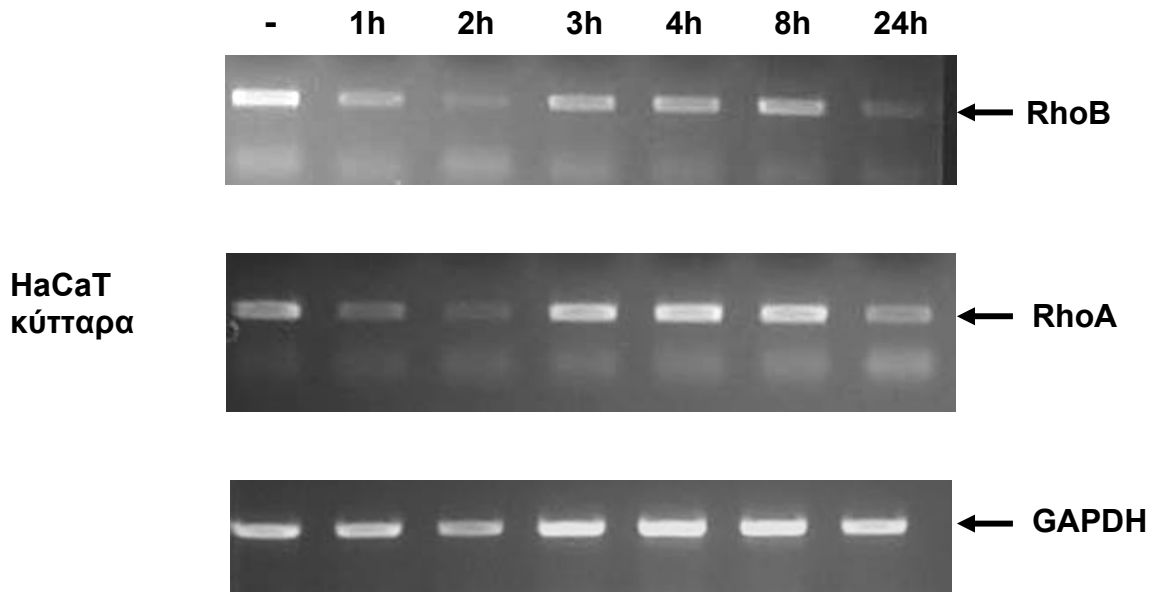
Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, στα κύτταρα HaCaT, η αναστολή του μονοπατιού των MEK και ως συνέπεια των ERK κινασών προκαλεί μείωση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB σε αντίθεση με αυτό της RhoA η έκφραση του οποίου εμφανίζει μικρή αύξηση.

Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ

Η διαπίστωση ότι η δράση του αναστολέα της MEK, U0126, προκαλεί σημαντική πτώση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου της RhoB οδήγησε στη προσπάθεια περαιτέρω μελέτης της επίδρασης του, παρουσία όμως τώρα ενεργοποίησης από τον TGFβ. Το σκεπτικό ήταν ότι σε ενδεχόμενη δράση του TGFβ μέσω του μονοπατιού των MAPK κινασών, ο αναστολέας U0126 πρόκειται να εμποδίσει την μεταγραφική ενεργοποίηση της RhoB η οποία προέρχεται από τον TGFβ.

Στη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν cDNA από κύτταρα HaCaT στα οποία είχε γίνει επίδραση με TGFβ και U0126 για ποικίλα χρονικά διαστήματα (0h,1h,2h,3h,4h,8h,24h).

TGFβ +U0126



Εικόνα 20 : Ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ και τις MAPK κινάσες. Κύτταρα HaCaT ,αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.2%) για 24 ώρες, επεξεργάστηκαν για τα χρονικά διαστήματα που φαίνονται στην εικόνα με 5ng/ml TGFβ και με 10μM U0126 και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoB γονιδίου και εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoA γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής της RhoB και της RhoA .Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH) τα ίδια χρονικά διαστήματα.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, η δράση του αναστολέα U0126 ελαττώνει τα βασικά επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου της RhoB ενώ η ενεργοποίηση από τον TGFβ παρουσία του αναστολέα φαίνεται να καθυστερεί. Ενώ δηλαδή απουσία του αναστολέα U0126 η ενεργοποίηση της RhoB από τον TGFβ εμφανιζόταν στην 1 ώρα μετά την χορήγησή του στα κύτταρα (εικόνα 15), στη περίπτωση αυτή χρειάζεται 3 ώρες επίδρασης προκειμένου να εξισορροπήσει κατά κάποιο τρόπο την αρνητική δράση του αναστολέα και να αυξήσει την έκφραση του

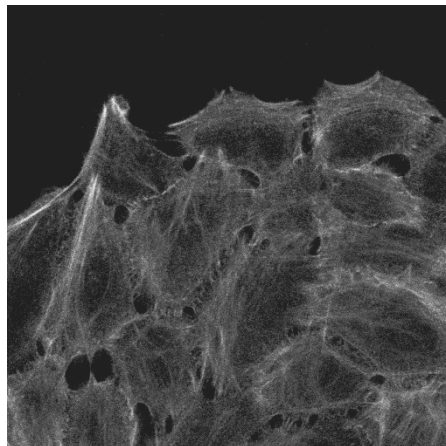
γονιδίου της RhoB . Η διαπίστωση αυτή ενδεχομένως να αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την γρήγορη δράση του TGFβ μέσω του μονοπατιού των MAPK κινασών και για πιο μακρόχρονη (όσον αφορά δηλαδή τα χρονικά διαστήματα επίδρασης πέρα των 3 ωρών) δράση μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών .

Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ σε κερατινοκύτταρα ανθρώπου

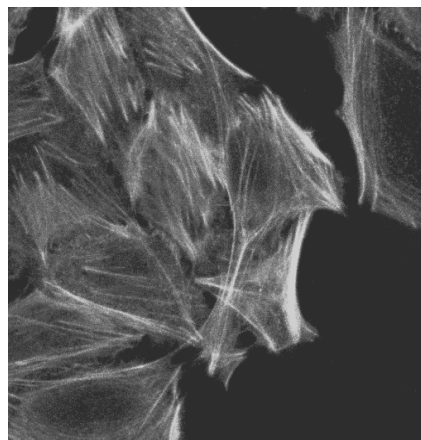
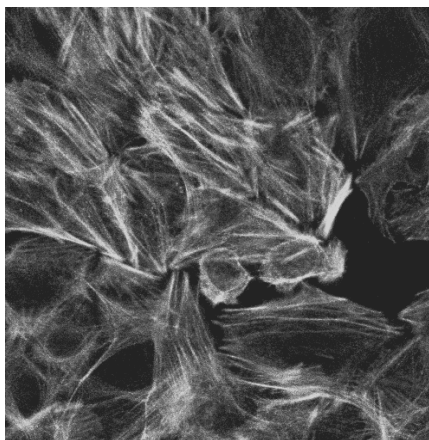
Σε αυτό το σημείο της έρευνας, και αφού σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα ο TGFβ φαίνεται να ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο της RhoB με ένα μηχανισμό στον οποίο εμπλέκεται με κάποιο τρόπο το μονοπάτι των MAPK κινασών, τέθηκε το ερώτημα της επίδρασης του TGFβ αλλά και του αναστολέα της MEK κινάσης στον κυτταροσκελετό της ακτίνης στα κύτταρα HaCaT στα οποία το φαινόμενο της μεταγραφικής ενεργοποίησης ήταν πιο έντονο. Μ'άλλα λόγια έγινε μια προσπάθεια ανίχνευσης τυχόν μεταβολών στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα HaCaT στα οποία είχε προηγηθεί επίδραση με TGFβ παρουσία ή όχι του αναστολέα U0126.

Συγκεκριμένα, σε κύτταρα HaCaT έγινε επίδραση με TGFβ (5ng/ml) για 24 ώρες παρουσία ή όχι του αναστολέα U0126 (10μM) . Οι πιθανές μορφολογικές αλλοιώσεις των μικροινιδίων στα κυτταρικά δείγματα ελέγχθηκαν σε πειράματα έμμεσου φθορισμού με ειδικά αντιδραστήρια όπως η ροδαμίνη-φαλλοιδίνη (για F-ακτίνη, μικροινίδια). Όπως προαναφέρθηκε η φαλλοιδίνη προσδένεται στην πολυμερισμένη ακτίνη και επομένως βάφοντας την με ροδαμίνη ανιχνεύεται η πολυμερισμένη ακτίνη και τα ινίδια του στρες. Η παρατήρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε συμβατικό μικροσκόπιο εφοδιασμένο με σύστημα φθορισμού και σε μικροκόπιο συνεστίασης (confocal). Στην εικόνα 21, παρατίθεται χαρακτηριστική ανιχνεύση των μεταβολών στο κυτταροσκελετό παρουσία του TGFβ.

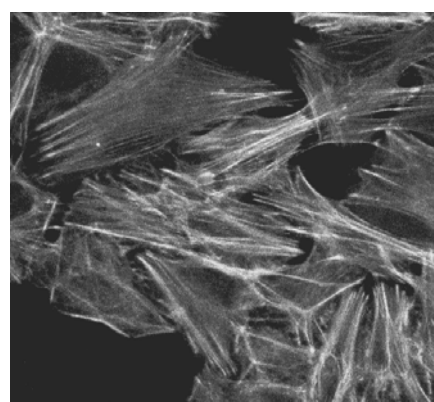
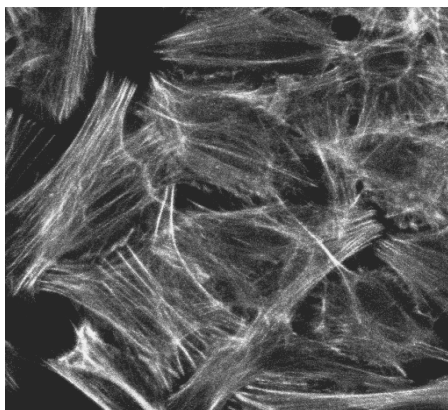
21.1 Control HacaT



21.2 TGFβ 24h



21.3 TGFβ + U0126 24h



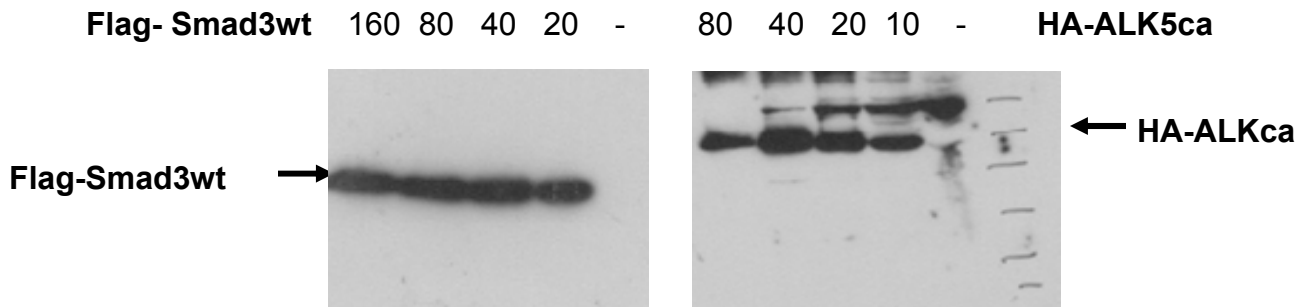
Εικόνα 21 : Ο TGFβ επάγει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα HaCaT η οποία δεν επηρεάζεται από τη παρουσία του αναστολέα U0126. Κύτταρα τα οποία συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (0.2%) έγινε επίδραση με 5ng/ml TGFβ παρουσία ή όχι του αναστολέα U0126 (10μM) για 24 ώρες. Κατόπιν, τα κύτταρα τέθηκαν σε διαδικασία έμμεσου φθορισμού μέσω της χρώσης με ροδαμίνη-φαλλοειδίνη.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 21, η επίδραση με TGFβ για 24 ώρες προκαλεί σημαντική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα HaCaT. Στα κύτταρα αυτά είναι εμφανής η αλλαγή στη μορφολογία και η δημιουργία οργανωμένου δικτύου ινιδίων ακτίνης (ινίδια του στρες) έπειτα από επίδραση με TGFβ. Η παρουσία του αναστολέα της MEK όχι μόνο δεν φαίνεται να ελαττώνει το φαινόμενο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού από τον TGFβ αλλά φαίνεται να το εντείνει ακόμη περισσότερο, γεγονός που ενδεχομένως σχετίζεται με τη μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoA από τον αναστολέα U0126 (εικόνα 19). Επομένως, φαίνεται ότι η μεταβολή αυτή στο κυτταροσκελετό της ακτίνης η οποία επάγεται από τον TGFβ είναι ανεξάρτητη του μονοπατιού των MAPK κινασών και συγκεκριμένα της κινάσης ERK.

Συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ

Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ μελετήθηκε αρχικά μέσω πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι αδενιοί οι οποίοι εκφράζουν είτε τη συστασιακά ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGFβ (ca-ALK5 T204D) είτε την αγρίου τύπου μορφή της Smad3.

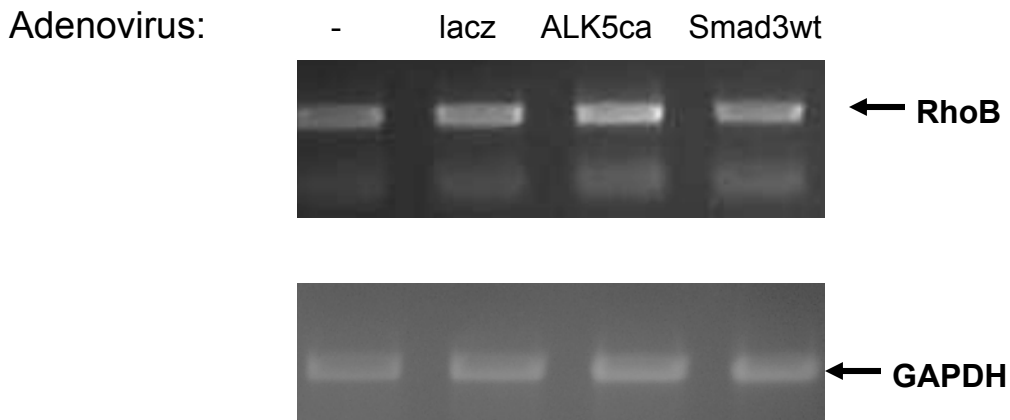
Αρχικά έγινε ο έλεγχος της έκφρασης των αδενίων αυτών σε κύτταρα HepG2 στα οποία 2 ώρες πριν από τη μόλυνση με τους ιούς είχε προηγηθεί αλλαγή του θρεπτικού σε DMEM το οποίο περιείχε 3% ορό. Οι ποσότητες των ολικών πρωτεϊνών μετρήθηκαν με Bradford-Lowry και τα δείγματα τέθηκαν σε ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης με ανοσοαποτύπωση (Western Blot). Στην εικόνα 22 φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των αδενίων.



Εικόνα 22 : Γονιδιακή μεταφορά μέσω αδενοϊών των Smad3 wt και ALK5ca σε κύτταρα HepG2. Κύτταρα HepG2, αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (3%) για 2 ώρες, μολύνθηκαν με τους αντίστοιχους αδενοϊούς στις ποσότητες σε μl που φαίνονται στην εικόνα και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματά τους. Οι ολικές πρωτεΐνες αφού μετρήθηκαν με Bradford-Lowry, αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και μεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυταρίνης. Ακολούθησε Western blot κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη περίπτωση της Smad3 ως πρώτο αντίσωμα το anti-flag (1 : 1000) και στη περίπτωση του ALK5ca ως πρώτο αντίσωμα το anti-Ha (1 : 1000) και ως δεύτερο αντίσωμα και στις δυο περιπτώσεις το anti-mouse HRP (1:5000), στη συνέχεια το σύστημα ECL και αυτοραδιογραφία.

Τα πειράματα PCR ανάστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά Swiss3T3 η οποία εμφανίζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στους αδενοϊούς από την κυτταρική σειρά HepG2. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν cDNA από κύτταρα Swiss3T3 στα οποία είχε γίνει μόλυνση με τους αδενοϊούς οι οποίοι εκφράζουν είτε τη συστασιακά ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGFβ (ca-ALK5 T204D) είτε την αγρίου τύπου μορφή της Smad3 και εκκινήτες ειδικό για το mRNA της RhoB. Σε δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ο αδενοϊός που εκφράζει β-γαλακτοσιδάση.

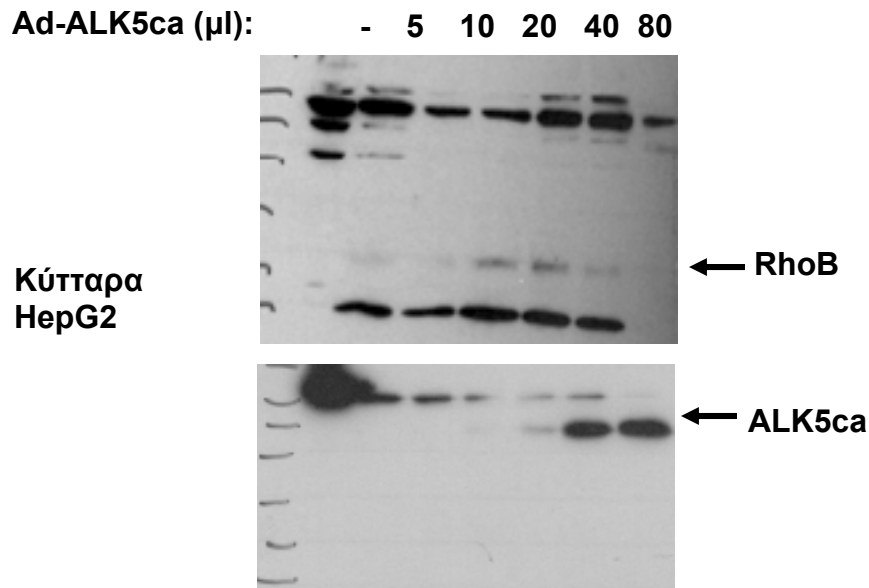
Όπως φαίνεται στην εικόνα 23, η υπερέκφραση της ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGFβ προκαλεί μια μικρή αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου της RhoB διαπίστωση η οποία αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τη συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη ρύθμιση από τον TGFβ.



Εικόνα 23 : Ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Κύτταρα Swiss3T3 ,αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (3 %) για 2 ώρες, μολύνθηκαν με αδενοϊό ο οποίος εκφράζει είτε τη συστασιακά ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGFβ είτε την αγρίου τύπου μορφή της Smad3 και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το mRNA του RhoB γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής της RhoB. Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH) .

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του υποδοχέα τύπου I του TGFβ (ALK5ca) στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB. Συγκεκριμένα, κύτταρα HepG2 μολύνθηκαν με αυξανόμενες συγκεντρώσεις του αδενοϊού που εκφράζει την ενεργή μορφή του ALK5 και τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα τους τέθηκαν σε ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης τόσο του ίδιου του υποδοχέα όσο και της πρωτεΐνης RhoB.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 25, και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η υπερέκφραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGFβ, προκαλεί μια ανάλογη αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης RhoB γεγονός το οποίο δίνει άλλη μια ένδειξη για συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη ρύθμιση της έκφρασης της RhoB.

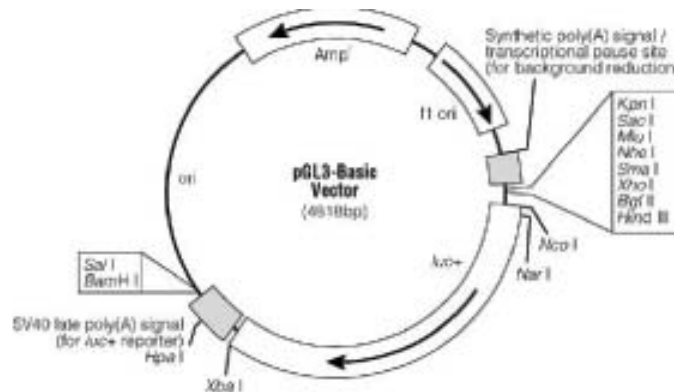


Εικόνα 25 :: Έκφραση της πρωτεΐνης RhoB παρουσία υπερεκφρασμένου υποδοχέα τύπου I του TGFβ. Κύτταρα HepG2, αφού συντηρήθηκαν σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό (3%) για 2 ώρες, μολύνθηκαν αδενιοϊούς ALK5ca στις ποσότητες σε μl που φαίνονται στην εικόνα και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματά τους. Οι ολικές πρωτεΐνες αφού μετρήθηκαν με Bradford-Lowry, τέθηκαν σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση ενώ στη συνέχεια έγινε μεταφορά των πρωτεϊνών (transfer) σε νιτροκυτταρίνη. Ακολούθησε Western blot κατά το οποίο χρησιμοποιήθηκε στη περίπτωση της RhoB ως πρώτο αντίσωμα το anti-RhoB (1 : 100) και στη περίπτωση του ALK5ca ως πρώτο αντίσωμα το anti-Ha (1 : 1000) και ως δεύτερο αντίσωμα στη περίπτωση της RhoB το anti-rabbit (1:10000) και στη περίπτωση του ALK5ca το anti-mouse HRP (1:5000), στη συνέχεια το σύστημα ECL και αυτοραδιογραφία.

Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB του ανθρώπου

Η δεύτερη φάση της μελέτης του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου RhoB από τον TGFβ περιελάμβανε την κλωνοποίηση του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB. Η κλωνοποίηση έγινε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν μια περιοχή αμέσως μετά το σημείο έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου καθώς και μια απομακρυσμένη περιοχή περίπου 1000 βάσεις πρὸς το 5' του σημείου έναρξης της μεταγραφής. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την καταχωρημένη στην GenBank νουκλεοτιδική ακολουθία του γονιδίου της RhoB

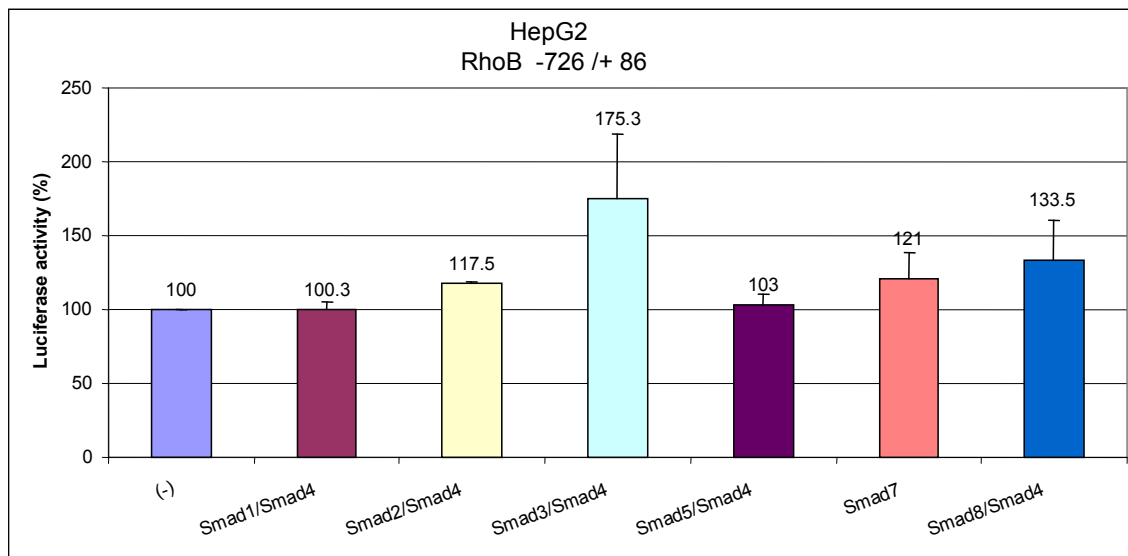
(Accession # BK001671). Σαν εκμαγείο για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από λευκοκύτταρα. Η περιοχή -825/+86 του υποκινητή της RhoB που προέκυψε από την αντίδραση υπεβλήθει σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού HindIII (η HindIII κόβει στη θέση -726 του υποκινητή) και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο αναφοράς pGL3-Basic (Promega Co) το οποίο φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης, ο χάρτης του οποίου παρατίθεται στην εικόνα 26.



Εικόνα 26 :Ο χάρτης του πλασμιδίου αναφοράς pGL3-Basic (Promega Co) το οποίο φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης δίπλα στο οποίο κλωνοποιήθηκε ο υποκινητής του γονιδίου της RhoB.

Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από τις πρωτείνες Smad

Αρχικά μελετήθηκε η ενεργότητα του υποκινητή (luciferase assay) του γονιδίου της RhoB σε διάφορες κυτταρικές σειρές ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί ότι αυτή η περιοχή (-726/+86) ανταποκρίνεται μεταγραφικά στην ενεργοποίηση από τον TGFβ. Η μελέτη ενεργότητας υποκινητή πραγματοποιήθηκε είτε παρουσία εξωγενούς TGFβ είτε μέσω συνεπιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης των Smad πρωτεϊνών ή/και του πλασμιδίου έκφρασης της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGFβ. Ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα στο οποίο ελέγχθηκε η δράση όλων των Smad πρωτεϊνών προκειμένου να βρεθεί ποια από αυτές είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από τον TGFβ παρουσιάζεται στο διάγραμμα της εικόνας 27.

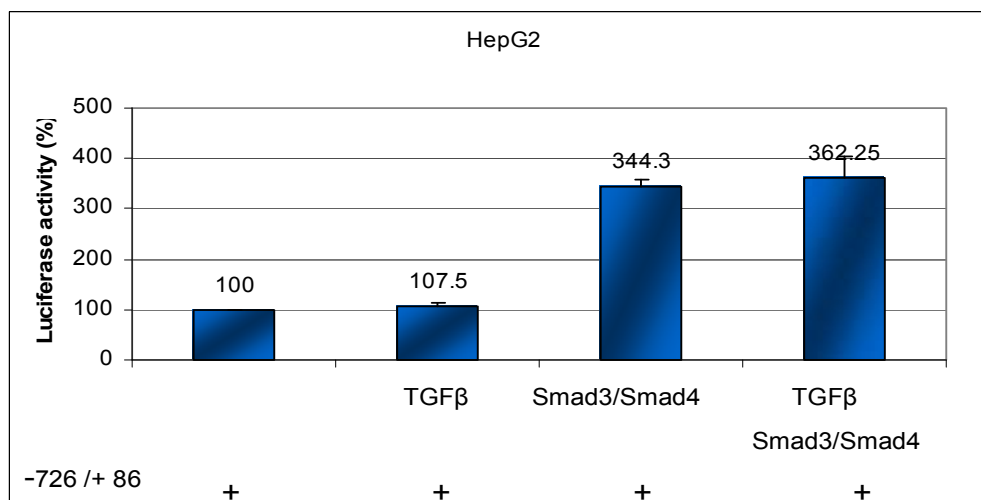


Εικόνα 27 : Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τις Smad πρωτείνες.

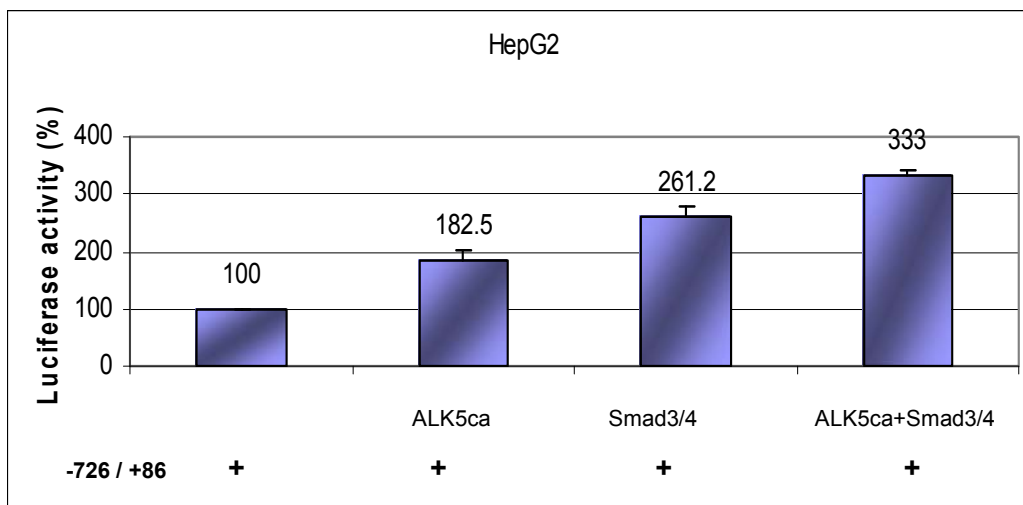
Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (1 µg), και τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad1 (2 µg), Smad2 (2 µg), Smad5 (2 µg), Smad7 (2 µg) και Smad8 (2 µg) σε συνδυασμό με τον φορέα για την Smad4 (2 µg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 µg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 27, από τα διαφορετικά ζεύγη των Smad πρωτεϊνών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση δίνει αυτό των Smad3/Smad4. Επομένως, στη μετέπειτα σειρά πειραμάτων διερευνήθηκε περαιτέρω ο ρόλος του συγκεκριμένου ζεύγους στην ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB.

Σε μια προσπάθεια εύρεσης των κατάλληλων πειραματικών συνθηκών μελέτης της ρύθμισης του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ, βρέθηκε ότι οι Smad πρωτείνες ενεργοποιούν τον υποκινητή της RhoB σε μεγαλύτερο βαθμό όταν τα κύτταρα HepG2 συντηρούνται σε θρεπτικό χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό και συγκεκριμένα σε 0.5% ορό. Δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα μελέτης της δράσης τόσο του εξωγενούς TGFβ όσο και της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 ή/και του υποδοχέα ALK5ca παρατίθενται στις εικόνες 28 και 29.



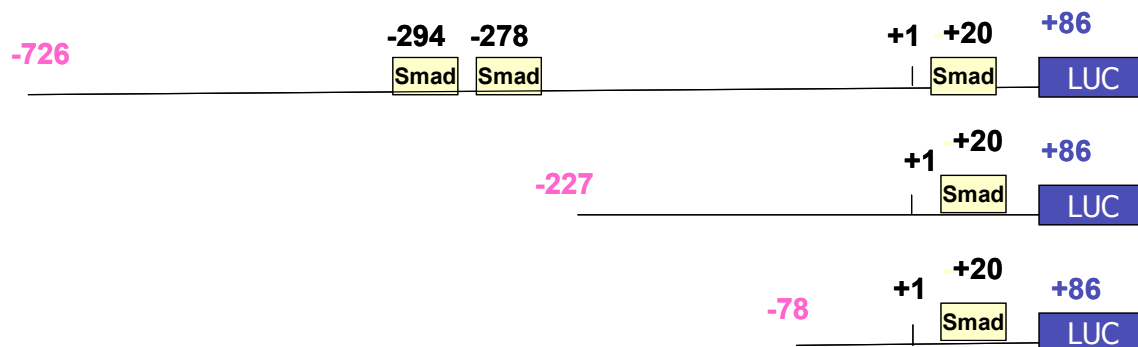
Εικόνα 28 : Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Κύτταρα HepG2 τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό με ορό 0.5%, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (1 µg), απουσία ή παρουσία εξωγενούς TGFβ (5ng/ml) και των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 (2 µg), και Smad4 (2 µg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 µg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 29 : Μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Κύτταρα HepG2, τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό με ορό 0.5%, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (1 µg), απουσία ή παρουσία των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών, CA-ALK5 (2 µg), Smad3 (2 µg), και Smad4 (2 µg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 µg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

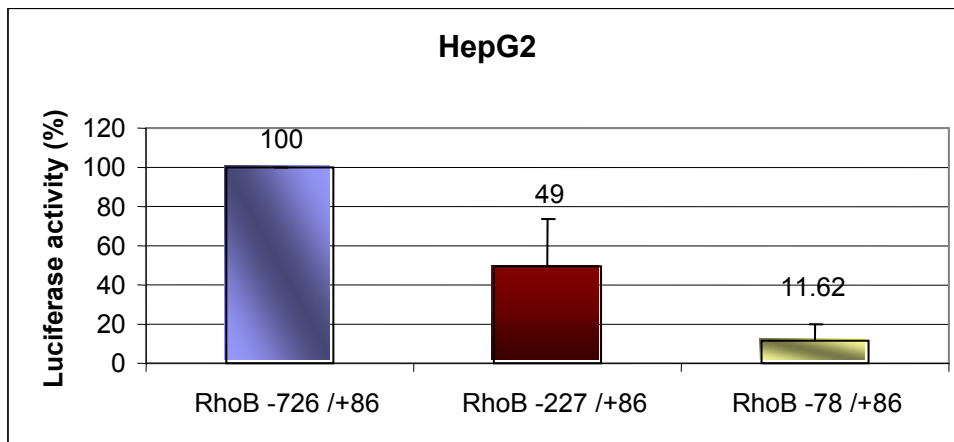
Στη συνέχεια, έγινε μια προσπάθεια χαρτογράφησης της περιοχής του υποκινητή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από τον TGFβ. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε μια σειρά από 5' ελείμματα στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB μέσω της χρήσης κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων τα οποία στην συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGL3-Basic. Μελετήθηκε αρχικά η βασική ενεργότητα τους και κατόπιν η ενεργοποίησή τους από τον TGFβ μέσω των πρωτεϊνών Smad ή πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από το Ras/Raf/ERK μονοπάτι όπως οι MEK και Ras.

Στην εικόνα 30 δείχνονται σχηματικά η πλήρης αλλά και οι δύο μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή της RhoB οι οποίες δημιουργήθηκαν καθώς και οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης γνωστών μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή όπως των Smad πρωτεϊνών και του Sp1 παράγοντα όπως βρέθηκαν με τη χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων ανάλυσης υποκινητών. Η πρώτη μεταλλαγμένη μορφή δημιουργήθηκε με τη χρησιμοποίηση του περιοριστικού ενζύμου KpnI το οποίο κόβει στη θέση -227 του υποκινητή ενώ η δεύτερη μεταλλαγμένη μορφή με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου SacI το οποίο κόβει στη θέση -78 του υποκινητή.



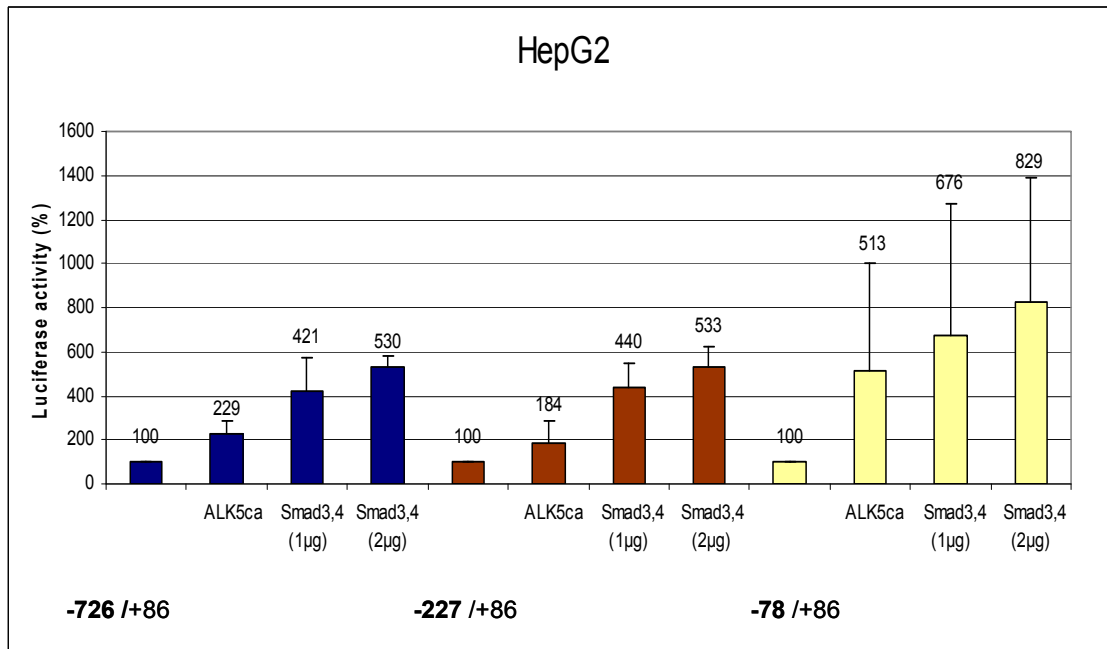
Εικόνα 30 : Αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή του γονιδίου της RhoB μαζί με τις πιθανές θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad .

Στην εικόνα 31 φαίνεται ότι η βασική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου της RhoB μειώνεται σταδιακά στην περίπτωση των ελλειματικών μορφών -227/+86 και -78/+86 σε κύτταρα HepG2.



Εικόνα 31 : Μέτρηση της βασικής ενεργότητας των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή του γονιδίου της RhoB σε σύγκριση με την πλήρη μορφή του. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (0,1 μg), -227/+86 (0,1μg), -78/+86 (0,1μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δρατικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή από τον TGFβ και συγκεκριμένα από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών προκειμένου να χαρτογραφηθεί η περιοχή του υποκινητή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από τον TGFβ. Όπως φαίνεται στην εικόνα 32, η ενεργοποίηση του υποκινητή η οποία προκαλείται από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 και του συστασιακά ενεργού υποδοχέα τύπου I ALK5ca του TGFβ διατηρείται και στις δυο μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή παρόλο που η μικρότερη από αυτές αποτελείται μόνο από 150bp και φαίνεται να περιέχει μόνο μια πιθανή θέση πρόσδεσης των Smad, αυτή που βρίσκεται στη θέση +20.



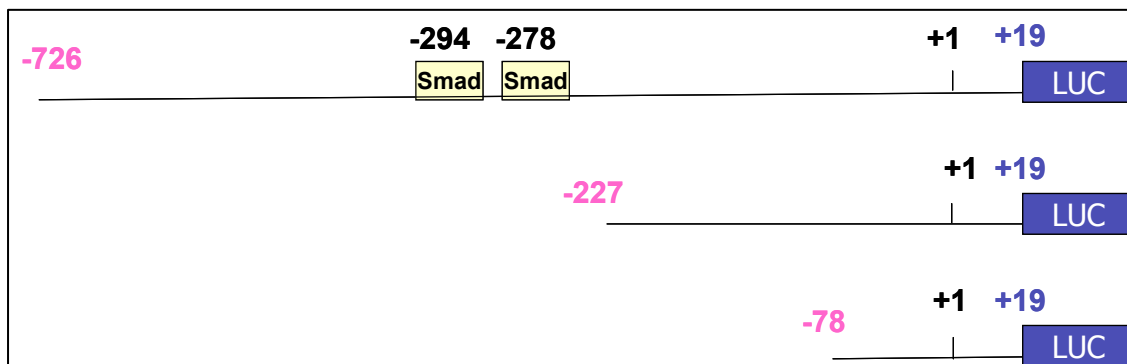
Εικόνα 32 : Μέτρηση ενεργοποίησης των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή της

RhoB από τις πρωτεΐνες Smad. Κύτταρα HepG2, τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό με ορό 0.5%, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (0,1 µg), -227/+86 (0,1µg), -78/+86 (0,1µg) ή/και των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών, CA-ALK5(1µg), Smad3 (1 ή 2 µg), και Smad4 (1ή 2 µg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δρατικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 µg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Η προσπάθεια ανίχνευσης της περιοχής του υποκινητή στην οποία οφείλεται η ενεργοποίηση από τον TGFβ, οδήγησε στην δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών οι οποίες δεν θα περιελάμβαναν την θέση πρόσδεσης των Smad που βρίσκεται στη θέση +20. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές πολλαπλασιάστηκε η περιοχή που βρίσκεται μεταξύ των νουκλεοτιδίων -825 και +19. Σαν εκμαγείο για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε γενωμικό DNA από λευκοκύτταρα. Η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου της RhoB που προέκυψε από την αντίδραση υπεβλήθει σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού HindIII (η HindIII κόβει στη θέση -726 του υποκινητή) και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο αναφοράς pGL3-Basic (Promega Co) το οποίο φέρει το γονίδιο της λουσιφεράσης.

Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν δυο μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή της RhoB μέσω της χρήσης κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων οι οποίες στην συνέχεια κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGL3-Basic. Αναλυτικότερα, όπως και προηγουμένως, η πρώτη μεταλλαγμένη μορφή δημιουργήθηκε με τη χρησιμοποίηση του περιοριστικού ενζύμου KpnI το οποίο κόβει στη θέση -227 του υποκινητή (-227/+19) ενώ η δεύτερη μεταλλαγμένη μορφή δημιουργήθηκε με τη χρησιμοποίηση του ενζύμου SacI το οποίο κόβει στη θέση -78 του υποκινητή (-78/+19). Με τον τρόπο αυτό, έγινε εφικτή η απομόνωση περιοχών του υποκινητή του γονιδίου της RhoB οι οποίες δεν φαίνεται να περιέχουν καμία θέση πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών.

Στην εικόνα 33, παρουσιάζονται σχηματικά οι νέες μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή του γονιδίου της RhoB .

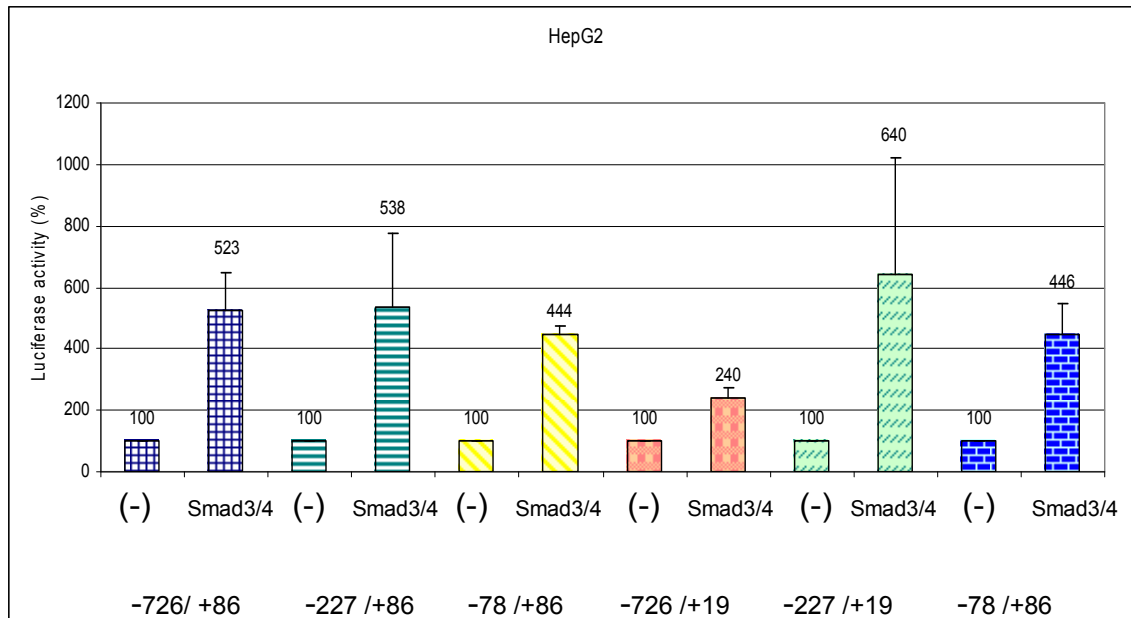


Εικόνα 33 : Αναπαράσταση των νέων μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή του γονιδίου της RhoB μαζί με τις θέσεις πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων Smad .

Οι νέες μεταλλαγμένες μορφές που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα μελέτης ενεργότητας υποκινητή (luciferase assay) παρουσία ή όχι υπερεκφρασμένων Smad3/Smad4 προκειμένου να ανιχνευθεί το ενδεχόμενο διατήρησης ή εξάλειψης της ενεργοποίησης από το μονοπάτι των Smad και κατ'επέκταση από τον TGFβ.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 34, η ενεργοποίηση του υποκινητή από τις Smad πρωτεΐνες διατηρείται σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές ακόμα και στις μορφές εκείνες (-227/+19 και -78/+19) οι οποίες φαίνεται να μην περιέχουν καμία θέση πρόσδεσης των Smad (CAGAC element). Το αξιοσημείωτο και ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι ότι η περιοχή -78/+19 δεν εμφανίζει σημείο πρόσδεσης για

κανένα γνωστό μεταγραφικό παράγοντα, παρόλα αυτά μοιάζει να ενεργοποιείται στον ίδιο βαθμό με τον ολόκληρο υποκινητή (-726/+86).

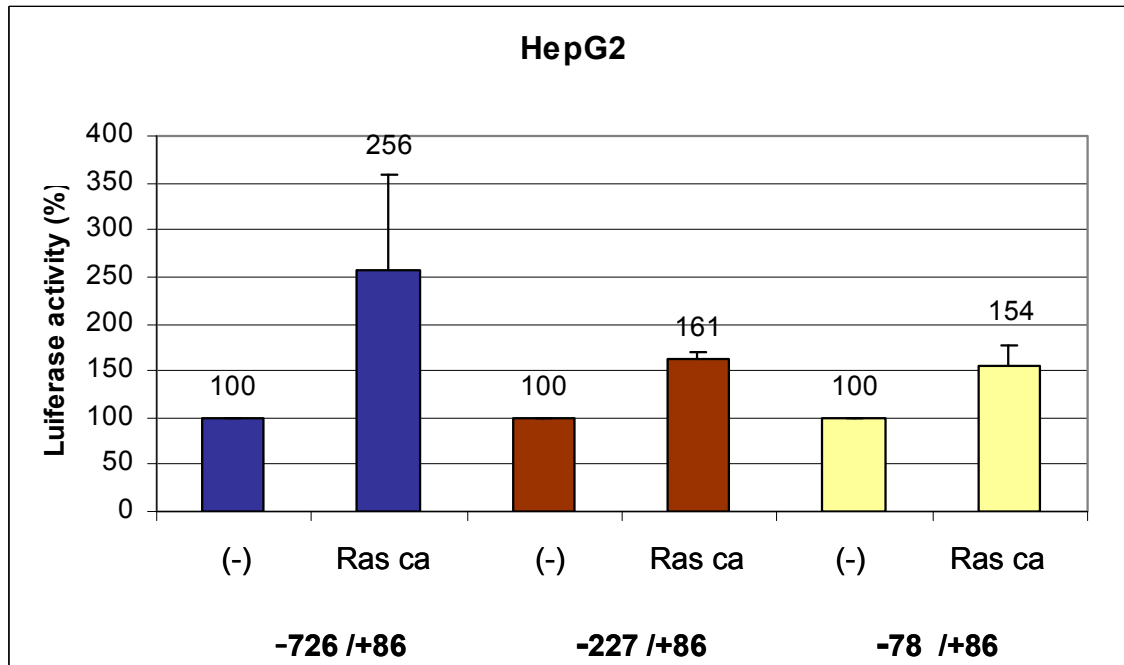


Εικόνα 34: Μέτρηση ενεργοποίησης των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή της RhoB από τις πρωτεΐνες Smad. Κύτταρα HepG2, τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό με ορό 0.5%, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (0,1 μg), -227/+86 (0,1μg), -78/+86 (0,1μg), RhoB -726/+19 (0,1 μg), -227/+19 (0,1 μg), , -78/+19 (0,1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών Smad3 (2 μg) και Smad4 (2 μg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δρατικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των MAPK κινασών

Στη πορεία των πειραματικών μελετών, έγινε μια προσπάθεια διερεύνησης της ενδεχόμενης ρύθμισης του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των MAPK κινασών οι οποίες, καθώς προέκυψε από τις αντιδράσεις PCR ανάστροφης μεταγραφής φαίνεται να εμπλέκονται στη μεταγραφική ρύθμιση του συγκεκριμένου γονιδίου.

Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή του γονιδίου της RhoB σε πειράματα μελέτης της ενεργότητας λουσιφεράσης παρουσία ή όχι μιας σημειακά μεταλλαγμένης μορφής του Ras η οποία είναι συστασιακά ενεργή (Ras ca).



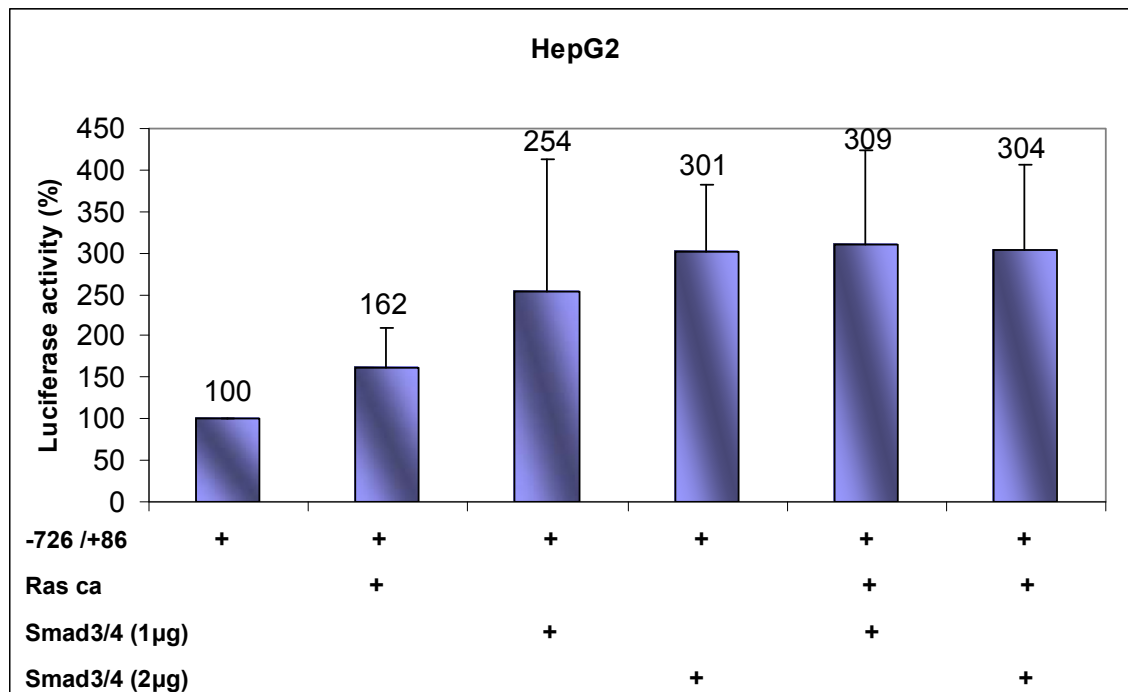
Εικόνα 35: Μέτρηση ενεργοποίησης των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή της RhoB από το Ras ca. Κύτταρα HepG2, τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό με ορό 0.5%, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (0,1 μg), -227/+86 (0,1μg), -78/+86 (0,1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης της πρωτεΐνης Ras ca (1 μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 35, η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής μορφής της πρωτεΐνης Ras προκαλεί ενεργοποίηση (3 fold) στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB -726/+86 η οποία όμως φαίνεται να ελαττώνεται κατά 40% στις μεταλλαγμένες μορφές -227/+86 και -78/+86.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε το ενδεχόμενο συνεργατικής δράσης των μονοπατιών των Smad πρωτεϊνών και των MAPK κινασών στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε

πείραμα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης στο οποίο χρησιμοποιήθηκε η πλήρης μορφή του υποκινητή (-726/+86) παρουσία υπερεκφρασμένων Smad3/Smad4 ή/και της συστασιακά ενεργής Ras πρωτεΐνης (Ras ca).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 36, η ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB που προκαλείται από τις πρωτεΐνες Smad δεν αυξάνει περισσότερο παρουσία του Ras ca γεγονός που αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την έλλειψη συνεργατικής δράσης των δύο μονοπατιών. Δηλαδή, φαίνεται τα μονοπάτια αυτά να εμπλέκονται στην μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB, γεγονός που έχει δειχθεί και μέσω των πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής, παρόλα αυτά παρουσιάζονται να έχουν διακριτούς και ανεξάρτητους ρόλους.

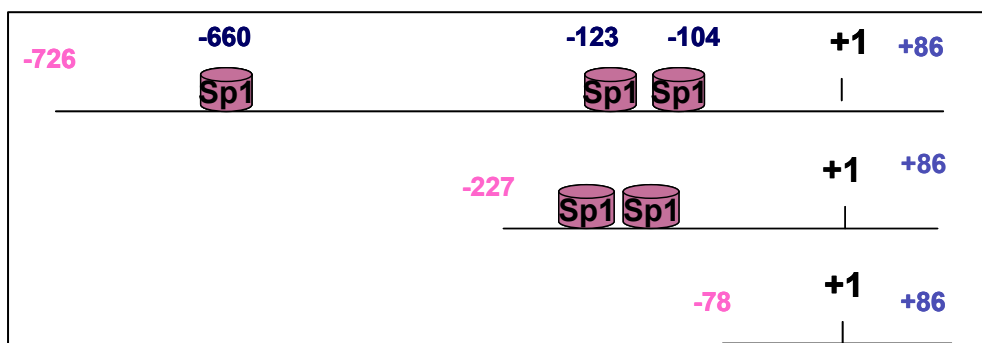


Εικόνα 36: Μέτρηση της συνεργατικότητας των μονοπατιών του Ras και των Smad πρωτεϊνών στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Κύτταρα HepG2, τα οποία βρίσκονταν σε θρεπτικό με ορό 0.5%, επιμολύνθηκαν με το πλασμιδίο αναφοράς pGL3 basic RhoB -726 /+86(0.1µg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών, Smad3 (2 µg), Smad4 (2 µg) και του Ras ca (1µg), όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 µg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον Sp1 μεταγραφικό παράγοντα

Η χρήση υπολογιστικών προγραμμάτων ανάλυσης υποκινητών έδωσε χρήσιμες πληροφορίες για την ύπαρξη πάνω στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, ένας από τους οποίους είναι ο Sp1, βασικό μέλος της οικογενείας των Sp μεταγραφικών παραγόντων.

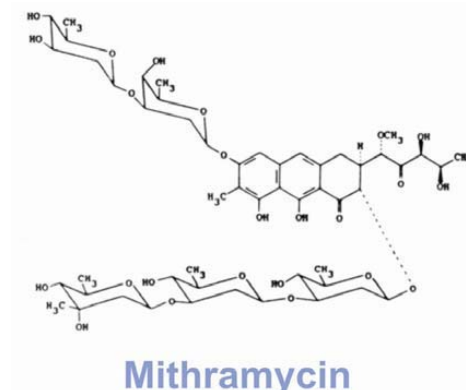
Στην εικόνα 37, παρουσιάζονται σχηματικά οι προβλεπόμενες θέσεις πρόσδεσης του Sp1 στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB.



Εικόνα 37 : Αναπαράσταση των προβλεπόμενων θέσεων πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 πάνω στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB.

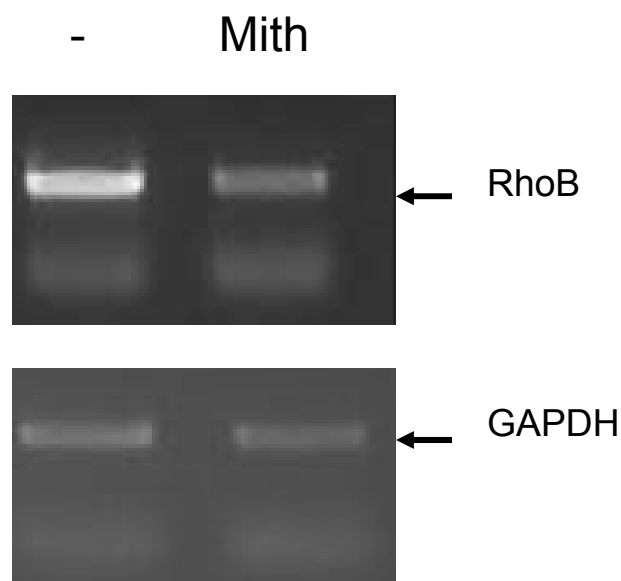
Η προσπάθεια επιβεβαίωσης της σημασίας του Sp1, καθώς και των θέσεων πρόσδεσής του, στην ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB επιτεύχθηκε με τη χρησιμοποίηση της ένωση Μιθραμυκίνης (Mith) ο χημικός τύπος της οποίας παρατίθεται στην εικόνα 38. Η μιθραμυκίνη έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε περιοχές του DNA, πλούσιες σε GC, και να παρεμποδίζει την πρόσδεση παραγόντων όπως ο Sp1 στις περιοχές αυτές .

Εικόνα 38 : Χημικός τύπος Μιθραμυκίνης



Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής στα οποία χρησιμοποιήθηκαν cDNA από κύτταρα HepG2 και εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο της RhoB. Αναλυτικότερα, έγινε επίδραση με μιθραμυκίνη (200ng/ml) για 24 ώρες και στη συνέχεια συλλέχθηκε το RNA το οποίο τέθηκε σε αντίδραση ανάστροφης μεταγραφής. Τα cDNA που παράχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια σε μια σειρά αντιδράσεων PCR μαζί με εκκινητές ειδικούς για το γονίδιο της RhoB. Η αφυδρογονάση της 3'-φωσφορικής γλυκεραλδεύδης (GAPDH) χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας της ισοδύναμης σύνθεσης cDNA.

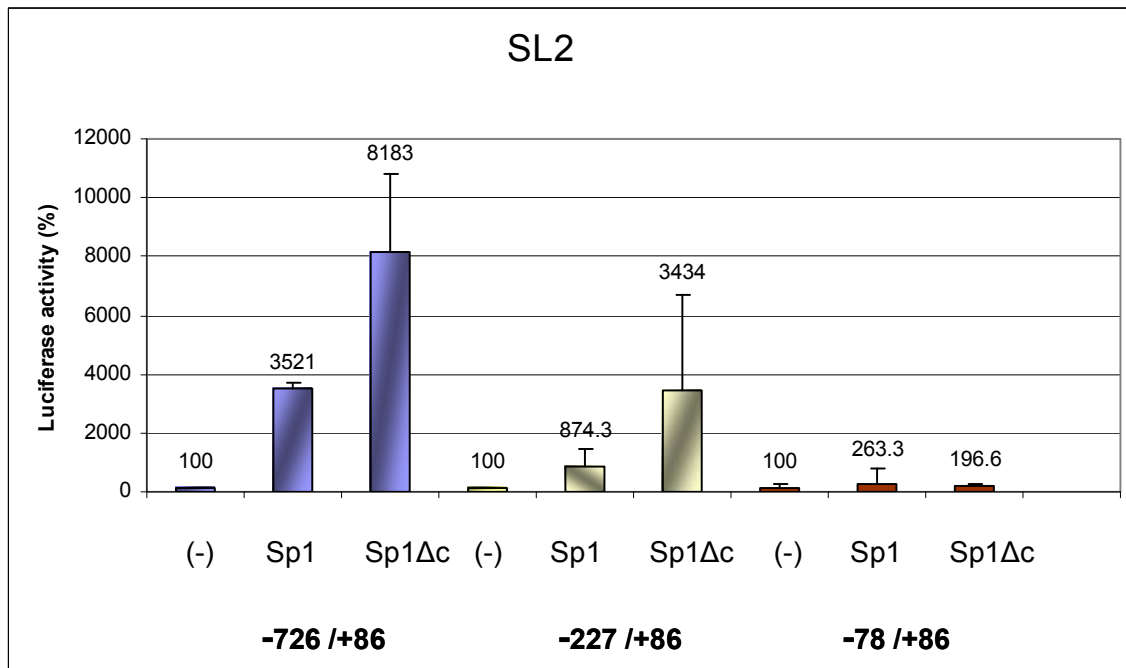
Όπως φαίνεται στην εικόνα 39, η μιθραμυκίνη επιδρά αρνητικά στην μεταγραφή του γονιδίου της RhoB, ελαττώνοντας σε σημαντικό βαθμό τα βασικά επίπεδα έκφρασης. Η διαπίστωση αυτή αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τη δράση του Sp1 παράγοντα στη ρύθμιση της μεταγραφής της RhoB.



Εικόνα 39 : Ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1. Κύτταρα HepG2 επεξεργάστηκαν για 24 ώρες με 200ng/ml Μιθραμυκίνη και στη συνέχεια απομονώθηκε το RNA τους. Με εκκινητές ειδικούς για το cDNA του RhoB γονιδίου και με PCR ανάστροφης μεταγραφής προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγραφής της RhoB. Στο κάτω τμήμα της εικόνας φαίνονται τα επίπεδα μεταγραφής του γονιδίου ελέγχου (GADPH).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο ρόλος του παράγοντα Sp1 στη ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν τα εμβρυικά κύτταρα Δροσόφιλας Schneider (SL2) τα οποία δεν εκφράζουν τον παράγοντα Sp1 και για τον λόγο αυτόν αποτελούν ένα

πρότυπο μοντέλο για την μελέτη των μηχανισμών της δράσης του. Στο διάγραμμα της εικόνα 40, παρουσιάζονται τα δεδομένα ενός πειράματος σε κύτταρα SL2 στο οποίο ανιχνεύθηκε η ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB και των μεταλλαγμένων του μορφών παρουσία ή όχι του Sp1 αλλά και μια μεταλλαγμένη μορφή αυτού στην οποία έχει απαλειφθεί η περιοχή C. Η περιοχή C παίζει έναν αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στη δράση της πρωτεΐνης (79) και η απαλοιφή της έχει ως αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη μορφή να είναι πιο ενεργή από την αγρίου τύπου.



Εικόνα 40: Ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB από τον Sp1 παράγοντα. Κύτταρα SL2, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (1μg), RhoB -227/+86 (1μg) και RhoB -78/+86 (1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης της πρωτεΐνης pPac Sp1 (1μg) και της μεταλλαγμένης μορφής αυτής pPac Sp1 Δc (1μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης hslacz(1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 40, η έκφραση του παράγοντα Sp1 στα κύτταρα SL2 προκάλεσε μια πολύ μεγάλη ενεργοποίηση στον υποκινητή της RhoB η οποία ενεργοποίηση φαίνεται να μειώνεται σταδιακά στις μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή. Η μείωση αυτή της ενεργοποίησης είναι αναμενόμενη καθώς όπως φαίνεται στην εικόνα 37, μειώνονται και οι προβλεπόμενες θέσεις

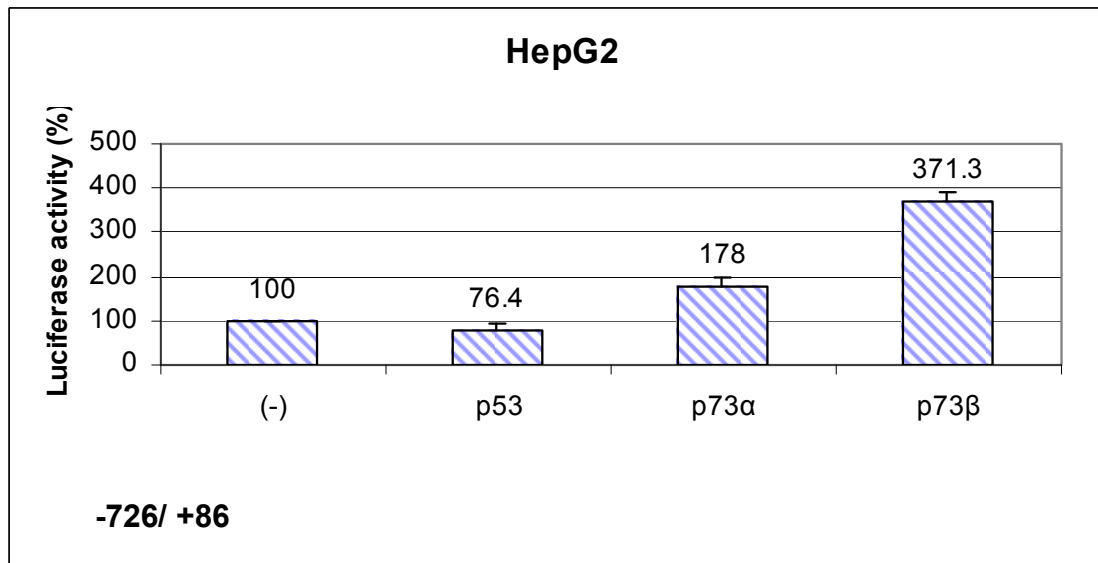
πρόσδεσης του Sp1 στις μεταλλαγμένες μορφές. Συγκεκριμένα, η περιοχή -726/+86 περιέχει τρεις πιθανές θέσεις πρόσδεσης, η περιοχή -227/+86 δύο θέσεις, ενώ η περιοχή -78/+86 δεν περιέχει καμία θέση πρόσδεσης για αυτό και η ενεργοποίηση της από τον Sp1 είναι μηδαμινή σε σύγκριση με αυτή των άλλων δυο περιοχών. Επιπλέον, όπως αναμενόταν η χρησιμοποίηση της μορφής Sp1 ΔC ενίσχυσε την ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB ακόμη περισσότερο.

Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από μέλη της οικογένειας της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από μέλη της οικογένειας της p53. Στις πειραματικές αυτές μελέτες οδήγησαν: α) πρόσφατες δημοσιεύσεις οι οποίες έδειξαν μια μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τη χημειοθεραπευτική ένωση 5- Fluorouracil (5-FU) η οποία προκαλεί βλάβη στο DNA και η οποία επάγει ισχυρά την p53 και β) υπολογιστικά προγράμματα αναλύσεων υποκινητών τα οποία προβλέπουν την ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης της p53 στον υποκινητή της RhoB.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πείραμα μέτρησης της δραστηριότητας λουσιφεράσης στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης της p53 αλλά και των άλλων μελών της οικογένειας των p63 και p73 σε συνεπιμόλυνση με το πλασμίδιο αναφοράς για τον υποκινητή της RhoB (-726/+86).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 41, ο υποκινητής της RhoB ενεργοποιείται από την υπερέκφραση της p73 και μάλιστα περισσότερο από την ισομορφή p73β σε αντίθεση με την p53 η οποία φαίνεται να μην έχει καμία επίδραση στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου.

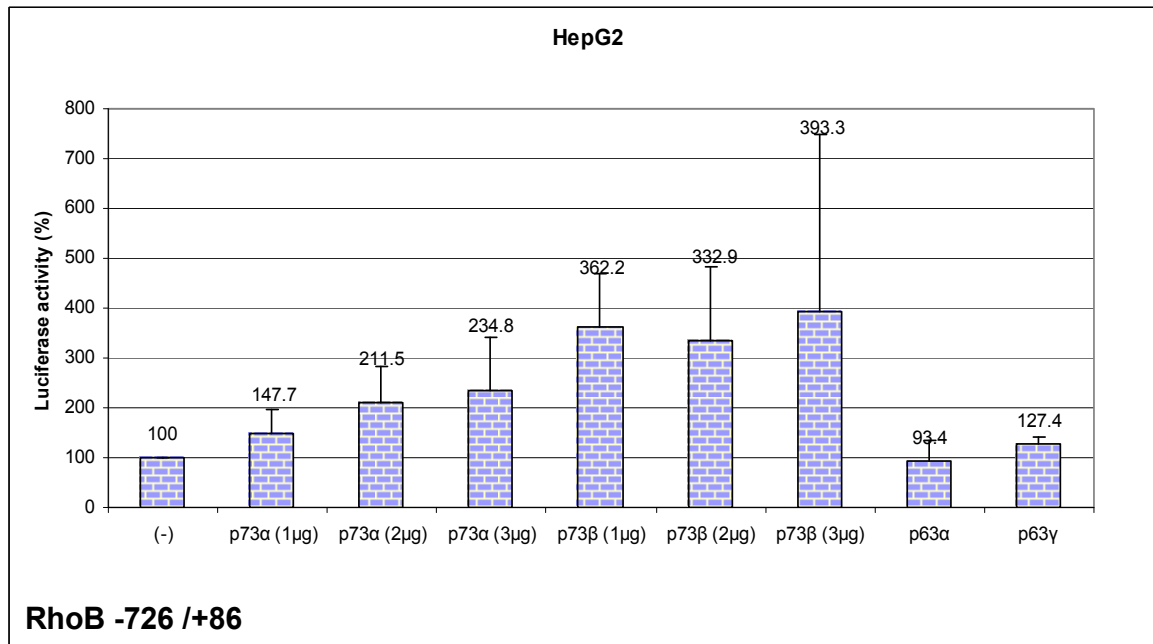


Εικόνα 41: Ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB μέλη της οικογενείας της p53. Κύτταρα HepG2, επιμολύνθηκαν με το πλασμιδίο αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (0.1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών pCMV p53 (2μg), pcDNA3 p73α (2μg) και pcDNA3 p73β (2μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε περαιτέρω η ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από τις δυο ισομορφές της p73 ενώ επιπλέον μελετήθηκε και ενδεχόμενη ενεργοποίηση από το τρίτο μέλος της οικογένειας δηλαδή την p63 και μάλιστα από τις ισομορφές της p63α και p63γ.

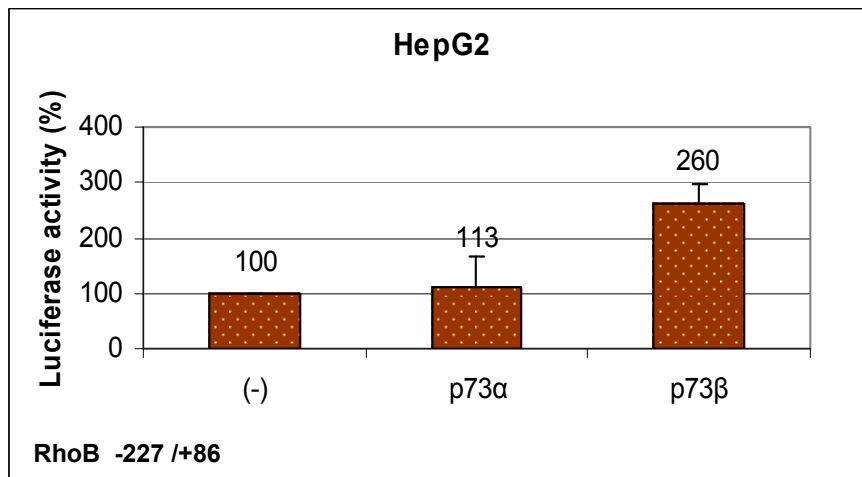
Για το πρώτο σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των ισομορφών α και β της p73. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα της εικόνας 42, η σταδιακή αύξηση στη συγκέντρωση του φορέα της p73α προκαλεί μια σταδιακή αύξηση στην ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB σε αντίθεση με την περίπτωση της p73β όπου η αύξηση στη συγκέντρωση δε φαίνεται να προκαλεί καμία διαφορά στην ενεργοποίηση.

Επιπλέον, σύμφωνα με τα δεδομένα που παρατίθενται στην εικόνα 42, η υπερέκφραση των ισομορφών α και γ της p63 δεν έχει καμία σημαντική επίδραση στην ενεργότητα του υποκινητή της RhoB.

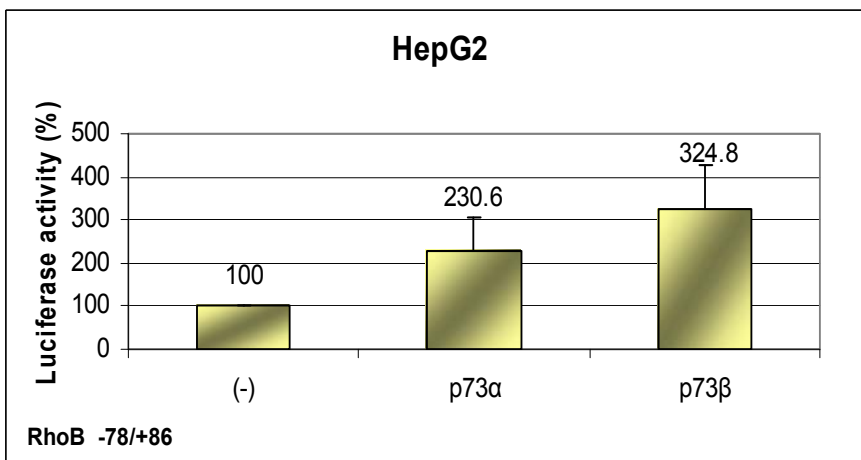


Εικόνα 42 : Ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB μέλη της οικογενείας της p53. Κύτταρα HepG2, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (0.1μg) παρουσία ή όχι αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών pCMV p53 (1-3μg), pcDNA3 p73α (1-3μg), pcDNA3 p73β (1-3μg), pcDNA3 p63α (1μg) και pcDNA3 p63γ (1μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Σε μετέπειτα αναλύσεις διερευνήθηκε η ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή (-227/+86 και -78/+86) του γονιδίου της RhoB από τις ισομορφές α και β της πρωτεΐνης p73.



Εικόνα 43 : Ρύθμιση της ενεργότητας της περιοχής -227/+86 του υποκινητή της RhoB από την πρωτεΐνη p73. Κύτταρα HepG2, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3 basic RhoB -227 +86 (0.1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών pcDNA3 p73α (1μg) και pcDNA3 p73β (1μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 44 : Ρύθμιση της ενεργότητας της περιοχής -78/+86 του υποκινητή της RhoB από την πρωτεΐνη p73. Κύτταρα HepG2, επιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3 basic RhoB -78 +86 (0.1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των πρωτεϊνών pcDNA3 p73α (1μg) και pcDNA3 p73β (1μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 43 και 44, η ενεργοποίηση του υποκινητή από τις ισομορφές της p73 πρωτεΐνης δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από τη δημιουργία των 5' ελειμμάτων του. Η ενεργοποίηση διατηρείται σχεδόν στα ίδια επίπεδα ακόμη και στη μικρότερη μεταλλαγμένη μορφή του υποκινητή, την περιοχή -78/+86 γεγονός που υποδεικνύει είτε την άμεση πρόσδεση της p73 σε κάποια θέση μέσα σε αυτή τη περιοχή είτε την έμμεση δράση μέσω αλληλεπίδρασης με κάποιο άλλο μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος προσδένεται στη συγκεκριμένη περιοχή.

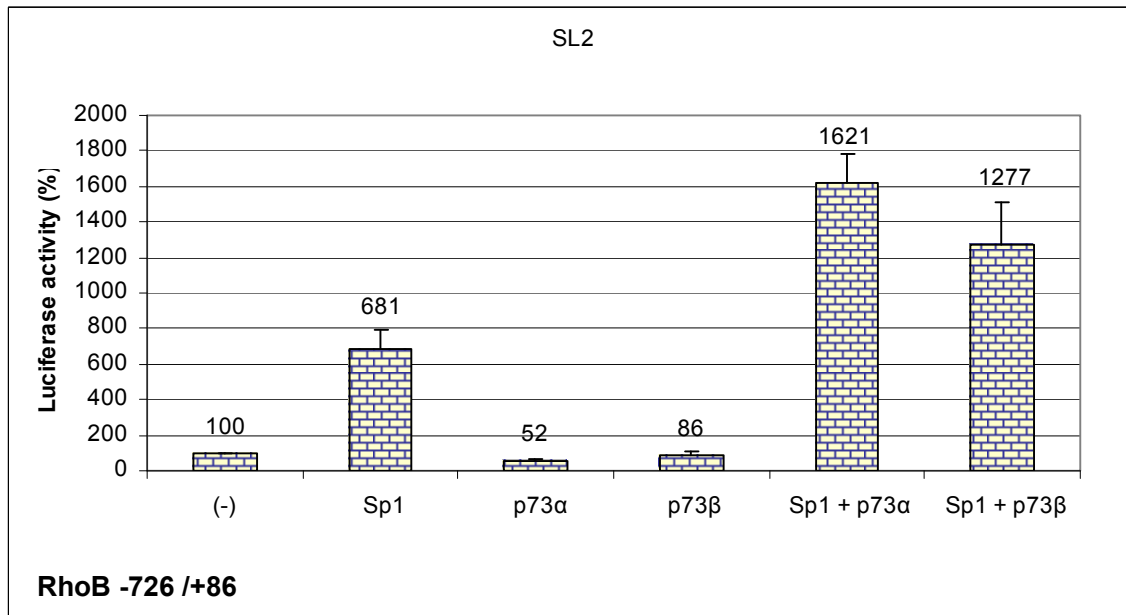
Ωστόσο, θέση πρόσδεσης της p73 στη παραπάνω περιοχή του υποκινητή (-78/+86) αλλά και σε ολόκληρο τον υποκινητή δεν προβλέπεται από υπολογιστικά προγράμματα ανίχνευσης ρυθμιστικών στοιχείων. Επομένως, η έρευνα οδηγήθηκε στην αναζήτηση αλληλεπίδρασης της p73 με κάποιο άλλο παράγοντα με τον οποίο συνεργάζεται και με το τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB.

Μια πρώτη προσέγγιση του παραπάνω ερωτήματος έγινε εφικτή μέσω της μελέτης της συνεργατικότητας μεταξύ της p73 πρωτεΐνης και του μεταγραφικού παράγοντα Sp1. Η επιλογή του Sp1 βασίστηκε σε δύο στοιχεία :

- α) όπως δείχθηκε παραπάνω, ο Sp1 έχει θέσεις πρόσδεσης πάνω στον υποκινητή της RhoB τον οποίο ενεργοποιεί σημαντικά
- β) έχει δειχθεί σε πρόσφατες δημοσιεύσεις (78) ότι ο Sp1 αλληλεπιδρά με την p73 πρωτεΐνη και η συνεργασία τους έχει ταυτοποιηθεί σε υποκινητές όπως αυτός του γονιδίου p21.

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε πείραμα μέτρησης της δραστηριότητας λουσιφεράσης σε κύτταρα SL2 στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης της p73 παρουσία ή όχι του φορέα έκφρασης του Sp1 σε συνεπιμόλυνση πάντα με το πλασμίδιο αναφοράς για τον υποκινητή της RhoB (-726/+86).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 45, οι ισομορφές της πρωτεΐνης p73 α και β, απουσία Sp1, δεν προκαλούν καμία ενεργοποίηση στον υποκινητή της RhoB. Ο Sp1 παράγοντας από μόνος του, όπως αναμενόταν, ενεργοποιεί το γονίδιο της RhoB περίπου επτά φορές. Η ενεργοποίηση αυτή όμως παρουσία υπερεκφρασμένης p73α και β σχεδόν διπλασιάζεται γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη συνεργατικότητας μεταξύ των δύο παραγόντων.



Εικόνα 45: Μελέτη της συνεργατικότητας των πρωτεϊνών p73 και Sp1 στην ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB. Κύτταρα SL2, επιμολύνθηκαν με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3 basic RhoB -726/+86 (1μg) παρουσία ή όχι των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης της πρωτεΐνης pRac Sp1 (1μg) και των πρωτεϊνών pcDNA3 p73α (1μg) και pcDNA3 p73β (1μg) όπως υποδεικνύεται στο κάτω μέρος του γραφήματος.. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου λουσιφεράση δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με τη δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, η οποία εκφράστηκε από τον φορέα έκφρασης hs-lacZ(1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ

Στο πρώτο μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής μελετήθηκε διεξοδικά το ενδεχόμενο μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον μετασχηματίζοντα αυξητικό παράγοντα β (TGFβ). Η πραγματοποίηση μια εκτεταμένης σειράς πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής ήρθε αρχικά να επιβεβαιώσει τα αποτελέσματα πρόσφατων γονιδιωματικών αναλύσεων της δράσης του TGF-β σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες όπως η απόπτωση ή η επιθηλιακο-μεσεγχυματική μετατροπή τα οποία είχαν υποδείξει το γονίδιο της RhoB ως έναν από τους κύριους μεταγραφικούς στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β.

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στις εικόνες 15,16 και 17 ο TGFβ προκαλεί ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB σε όλες τις κυτταρικές σειρές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, όπως HaCaT (κερατινοκύτταρα ανθρώπου), HepG2 (κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος) και Swiss3T3 (ινοβλάστες ποντικού). Αντίθετα η έκφραση του γονιδίου της RhoA κυμαίνεται σε σχετικά σταθερά επίπεδα.

Το ιδιαίτερα ενδιαφέρον όμως παρουσιάζεται στα κύτταρα HaCaT στα οποία η ενεργοποίηση της μεταγραφής δεν αυξάνει σταδιακά, ούτε σταθεροποιείται σε κάποιο συγκεκριμένο επίπεδο αλλά αντίθετα εμφανίζει εναλλαγές και αυξομειώσεις. Αναλυτικότερα, η ενεργοποίηση ξεκινάει μετά από 1 ώρα επίδρασης με TGFβ, διατηρείται μέχρι και τις 3 ώρες όπου και φτάνει στο μέγιστο βαθμό της και κατόπιν εμφανίζει σημαντική πτώση επανερχόμενη ουσιαστικά στα βασικά επίπεδα μεταγραφής. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι η μεταγραφή αρχίζει να αυξάνει πάλι μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGFβ. Το αξιοσημείωτο αυτό φαινόμενο εξακολουθεί και μετά το πέρας των 24 ωρών επίδρασης και μάλιστα όπως φαίνεται στην εικόνα 18, η ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ παρουσιάζει μια πτώση από τις 8 στις 20 ώρες επίδρασης εμφανίζοντας όμως σημαντική αύξηση στις 24 ώρες. Κατόπιν, στα χρονικά διαστήματα των 28 και 32 ωρών η έκφραση αρχίζει πάλι να μειώνεται προσεγγίζοντας τα βασικά επίπεδα ενώ στις 48 ώρες

επίδρασης η μεταγραφή του γονιδίου της RhoB εμφανίζει πάλι σημαντική ενεργοποίηση.

Επομένως, η ενεργοποίηση της RhoB από τον TGFβ σε κύτταρα HaCaT φαίνεται να ακολουθεί ένα κύκλο μεταπτώσεων με καθοριστικό χρονικό σημείο αυτό των 24 ωρών γεγονός που θέτει ερωτηματικά όσον αφορά τη συσχέτιση της RhoB με τον κυτταρικό κύκλο και τη ρύθμιση του.

Η ανίχνευση γρήγορης αλλά και μακροχρόνιας ενεργοποίησης της μεταγραφής της RhoB από τον TGFβ η οποία μάλιστα δεν είναι συνεχής πιθανόν να σχετίζεται με τη συμμετοχή περισσότερων του ενός σηματοδοτικού μονοπατιού μέσω των οποίων δρα ο TGFβ, με συνέπεια ο συνδυασμός τους να προσδίδει στην απόκριση αμεσότητα αλλά και διάρκεια.

Τέλος, το βασικότερο ίσως στοιχείο το οποίο προκύπτει από τις μελέτες είναι ότι η επίδραση του TGFβ στη μεταγραφή των Rho-GTPασών είναι ειδική για τη RhoB καθώς, όπως παρατηρήθηκε, η έκφραση της RhoA δεν επηρεάζεται. Η διαπίστωση αυτή δίνει μια πρώτη ένδειξη για μακροχρόνια δράση του TGFβ στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω μεταγραφικής ρύθμισης της RhoB αλλά και θέτει το ερώτημα για συσχέτιση τους σε επιπρόσθετες κυτταρικές λειτουργίες όπως για παράδειγμα αυτή της απόπτωσης στις οποίες μέχρι τώρα να φαίνεται οι δυο παράγοντες να έχουν ανεξάρτητη δράση.

Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB

Ένα επιπρόσθετο στοιχείο που προέκυψε από τις γονιδιωματικές αναλύσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, ήταν η ενδεχόμενη συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στην ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ. Η συγκεκριμένη ένδειξη προήλθε μέσω της χρήσης, στις αναλύσεις αυτές, ενός δυνητικού αναστολέα της κίνησης MEK ο οποίος ονομάζεται U0126. Ο αναστολέας αυτός δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο της MEK εμποδίζοντας με το τρόπο αυτό τη δράση της ως κίνηση με άμεσο επακόλουθο την αποτυχία ενεργοποίησης των ERK1& ERK2 κινασών.

Ένας πρωταρχικός στόχος που τέθηκε στην παρούσα έρευνα ήταν η διερεύνηση του πιθανού ρόλου του μονοπατιού των MAP κινασών στην μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB. Για την επίτευξη του συγκεκριμένου σκοπού πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής

σε κύτταρα HaCaT η οποία έδειξε ότι η αναστολή του μονοπατιού των MEK και ως συνέπεια των ERK κινασών έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB σε επίπεδα πολύ κατώτερα από τα βασικά (εικόνα 17). Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου της RhoA όχι μόνο δεν επηρεάζεται αρνητικά αλλά εμφανίζει μικρό βαθμό αύξησης (εικόνα 17).

Επομένως, φαίνεται ότι το μονοπάτι των MAPK κινασών εμπλέκεται στη ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB. Αξιοσημείωτο είναι ότι η καταστολή του μονοπατιού αυτού προκαλεί γρήγορη και ραγδαία πτώση στα επίπεδα μεταγραφής της RhoB γεγονός που υποδεικνύει τον άμεσο και ουσιαστικό ρόλο του στην έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου.

Συμμετοχή του μονοπατιού των MAPK κινασών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ

Η διαπίστωση ότι η δράση του αναστολέα της MEK, U0126, προκαλεί σημαντική πτώση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου της RhoB δημιούργησε το ενδιαφέρον για διεξοδικότερη μελέτη της επίδρασης του, παρουσία όμως αυτή τη φορά ενεργοποίησης από τον TGFβ. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, πρόσφατες και συνεχώς αυξανόμενες βιοχημικές ενδείξεις δείχνουν ότι ο TGFβ μπορεί να ενεργοποιήσει εναλλακτικά μονοπάτια από αυτό των Smad πρωτεϊνών και συγκεκριμένα των ERK, JNK και p38 MAPK κινασών (38). Η προσπάθεια ανίχνευσης ενδεχόμενης συσχέτισης της ενεργοποίησης της μεταγραφής της RhoB από τον TGFβ και της καταστολής της από τον αναστολέα της MEK πιθανόν να δώσει σημαντικά στοιχεία για ενδεχόμενη δράση του TGFβ μέσω του μονοπατιού των MAPK κινασών.

Όπως βρέθηκε από μια σειρά πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής στα οποία έγινε ταυτόχρονη επίδραση με TGFβ και με τον αναστολέα U0126 σε κύτταρα HaCaT για διάφορα χρονικά διαστήματα, η μεταγραφή του γονιδίου της RhoB πέφτει σε επίπεδα κατώτερα από τα βασικά τις πρώτες ώρες επίδρασης. Η πτώση αυτή οφείλεται όπως αναμενόταν στη δράση του αναστολέα της MEK. Μετά το πέρας 3 ωρών επίδρασης με τους δυο παράγοντες η μεταγραφή της RhoB αρχίζει να ανακάτ εδαφος, με εμφανή την αύξηση των επιπέδων της τα οποία προσεγγίζουν αρκετά τα βασικά επίπεδα μεταγραφής. Παρατηρείται δηλαδή μια εξισορρόπηση της δράσης του TGFβ και του αναστολέα U0126

μεταξύ των 3 και 8 ωρών επίδρασης, διάστημα κατά το οποίο η μεταγραφή του γονιδίου της RhoB κυμαίνεται σε επίπεδα που πλησιάζουν τα βασικά.

Το αξιοσημείωτο στο σημείο αυτό είναι ότι ενώ ο TGFβ μόνος του προκαλεί γρήγορη ενεργοποίηση της μεταγραφής της RhoB και μάλιστα μετά από 1 ώρα μόνο επίδραση, παρουσία του αναστολέα U0126 η ενεργοποίηση από τον TGFβ φαίνεται να καθυστερεί και μάλιστα από τη 1 ώρα επίδρασης που χρειαζόταν (εικόνα 15), στη περίπτωση αυτή χρειάζεται 3 ώρες επίδρασης (εικόνα 20) προκειμένου να εξισορροπήσει κατά κάποιο τρόπο την αρνητική δράση του αναστολέα και να αυξήσει την έκφραση του γονιδίου της RhoB. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει συμμετοχή των MAPK κινασών στη δράση του TGFβ, η λειτουργία του οποίου σε αντίθετη περίπτωση δε θα επηρεαζόταν από τον αναστολέα.

Συνοπτικά φαίνεται ότι η καταστολή του μονοπατιού των MAPK κινασών ελαττώνει όχι μόνο την ενεργοποίηση που προκαλείται από τον TGFβ αλλά και τα βασικά επίπεδα μεταγραφής γεγονός που καθιστά τη δράση του ιδιαίτερα σημαντική στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για άμεση, γρήγορη δράση του TGFβ μέσω του μονοπατιού των MAPK κινασών και για πιο μακρόχρονη (όσον αφορά δηλαδή τα χρονικά διαστήματα επίδρασης πέρα των 3 ωρών) δράση μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών το οποίο χρειάζεται περισσότερο χρόνο προκειμένου να ενεργοποιηθεί. Το ενδεχόμενο αυτό όμως πρέπει να μελετηθεί βαθύτερα προτού εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα. Μια μετέπειτα αντίστοιχη προσέγγιση θα μπορούσε να αποτελέσει η μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB σε συνθήκες καταστολής του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών.

Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ σε κερατινοκύτταρα ανθρώπου

Σε μια πρόσφατη δημοσίευση (20) έχει δείχθει ότι η επίδραση με TGFβ σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού προκαλεί μια γρήγορη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Στη περίπτωση των κερατινοκυττάρων HaCaT του ανθρώπου στα οποία, σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα της παρούσης διατριβής, ο TGFβ ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο της RhoB με ένα

μηχανισμό στον οποίο εμπλέκεται με κάποιο τρόπο το μονοπάτι των MAPK κινασών, δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με το αποτέλεσμα επίδρασης των παραγόντων αυτών στη μορφολογία του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Για το λόγο αυτό σε ένα επόμενο μέρος της παρούσης μελέτης, τέθηκε προς διερεύνηση η ενδεχόμενη επίδραση του TGFβ αλλά και του αναστολέα της MEK στον κυτταροσκελετό της ακτίνης στα κύτταρα HaCaT στα οποία το φαινόμενο της μεταγραφικής ενεργοποίησης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, έγινε μια προσπάθεια ανίχνευσης τυχόν μεταβολών στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα HaCaT στα οποία είχε προηγηθεί επίδραση με TGFβ παρουσία ή όχι του αναστολέα U0126 για 24 ώρες. Οι πιθανές μορφολογικές αλλοιώσεις των μικροινιδίων στα κυτταρικά δείγματα ελέγχθηκαν σε πειράματα έμμεσου φθορισμού με ειδικά αντιδραστήρια όπως η ροδαμίνη-φαλλοειδίνη (για F-ακτίνη, μικροινίδια). Όπως προαναφέρθηκε η φαλλοειδίνη αποτελεί πρωτεΐνη η οποία προσδένεται στην πολυμερισμένη ακτίνη και επομένως βάφοντας την με ροδαμίνη ανιχνεύεται η πολυμερισμένη ακτίνη και τα ινίδια του στρες.

Με το τρόπο αυτό δείχθηκε ότι η επίδραση με TGFβ για 24 ώρες προκαλεί ουσιαστική αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε κύτταρα HaCaT στα οποία είναι εμφανής η αλλαγή στη μορφολογία και η δημιουργία οργανωμένου δικτύου ινιδίων ακτίνης (ινίδια του στρες). Επιπλέον, φαίνεται ότι η παρουσία του αναστολέα της MEK παράλληλα με τον TGFβ δεν μειώνει το φαινόμενο την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού το οποίο παρατηρείται από τον TGFβ μόνο του. Αντίθετα, η αναδιοργάνωση παρουσιάζεται ακόμη εντονότερη. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να σχετίζεται με τη μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoA η οποία παρατηρείται από την επίδραση του αναστολέα U0126.

Ένα πρώτο συμπέρασμα το οποίο μπορεί να εξαχθεί από τα παραπάνω δεδομένα είναι ότι η μακροχρόνια μεταβολή στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης η οποία επάγεται από τον TGFβ ή μ'άλλα λόγια η διατήρηση της αναδιοργάνωσης αυτής σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα είναι ανεξάρτητη του μονοπατιού των MAPK κινασών. Η διαπίστωση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω των πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής στα οποία η γρήγορη ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB είναι αυτή που πιθανόν να σχετίζεται με τις MAPK κινάσες και η μακρόχρονη μέσω ενός εναλλακτικού μονοπατιού το οποίο θα μπορούσε να είναι αυτό των Smad πρωτεϊνών.

Επιπρόσθετα όμως είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι ο αναστολέας της MEK όχι μόνο φαίνεται να αφήνει ανεπηρέαστη τη μεταγραφή του γονιδίου της RhoA αλλά μοιάζει να έχει αντίθετη δράση από αυτή που παρατηρείται στη RhoB δηλαδή εμφανίζεται να προκαλεί μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση. Δεδομένου ότι τόσο η RhoA όσο και η RhoB έχουν βασικές λειτουργίες στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού πιθανόν η αρνητική δράση του U0126 στη μεταγραφή της RhoB να εξισορροπείται από την θετική δράση στη μεταγραφή της RhoA και επομένως το αποτέλεσμα της επίδρασης του TGFβ στον κυτταροσκελετό της ακτίνης να μην αλλοιώνεται από τη παρουσία του αναστολέα.

Σε μετέπειτα πειράματα, κρίνεται σκόπιμη η μελέτη της σημασίας της ενεργοποίησης και των δύο Rho GTPασών (RhoA και RhoB) και κατ'επέκταση το ενδεχόμενο επάρκειας της RhoA ή της RhoB για την ενεργοποίηση του μονοπατιού που οδηγεί στην δημιουργία ινιδίων του στρες (RhoA/RhoB/LIMK/cofilin). Μια πρώτη ένδειξη μπορεί να προκύψει από την διεξαγωγή πειραμάτων στα οποία θα χρησιμοποιηθεί η επικρατούσα αρνητική μορφή της πρωτεΐνης RhoB ή/και της πρωτεΐνης RhoA μετά από επίδραση με TGFβ και θα μελετηθούν οι μεταβολές στο κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η καταστολή δηλαδή της δράσης της μια εκ των δυο πρωτεϊνών πρόκειται να δώσει στοιχεία για την συμπληρωματική λειτουργία τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού.

Συμμετοχή του μονοπατιού των **Smad** πρωτεϊνών στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που περιγράφηκαν παραπάνω, στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ εκτός από το μονοπάτι των MAPK κινασών το οποίο φαίνεται να εμπλέκεται άμεσα, πρέπει να υπάρχει και εναλλακτικό μονοπάτι στο οποίο να οφείλεται η μακροχρόνη δράση του. Το κυρίαρχο μονοπάτι για το ρόλο αυτό δε θα μπορούσε να είναι άλλο από το κλασικό και καλύτερα χαρακτηρισμένο μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών.

Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ μελετήθηκε αρχικά τόσο σε μεταγραφικό επίπεδο μέσω πειραμάτων PCR ανάστροφης μεταγραφής όσο και σε πρωτεϊνικό με τη χρήση και στις δυο περιπτώσεις

αδενοϊών οι οποίοι εκφράζουν είτε τη συστασιακά ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGFβ (ca-ALK5 T204D) είτε την αγρίου τύπου μορφή της Smad3.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η υπερέκφραση της συστασιακά ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGFβ προκαλεί αύξηση στη μεταγραφή του γονιδίου αλλά και στα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης της RhoB. Οι διαπιστώσεις αυτές δίνουν μια πρώτη ένδειξη για τη συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη ρύθμιση της έκφρασης της RhoB.

Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από τις πρωτεΐνες Smad

Η πορεία της έρευνας οδηγήθηκε στη συνέχεια στη κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB του ανθρώπου. Η κατασκευή του υποκινητή σε σύντηξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκε σε μετρήσεις ενεργότητας λουσιφεράσης σε διάφορες κυτταρικές σειρές προκειμένου να διαπιστωθεί εάν αυτή η περιοχή (-726/+86) ανταποκρίνεται μεταγραφικά στην ενεργοποίηση από τον TGFβ.

Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η περιοχή -726/+86 του υποκινητή ενεργοποιείται από τη συστασιακά ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGFβ ενώ από τα διαφορετικά ζεύγη των Smad πρωτεϊνών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση δίνει αυτό των Smad3/Smad4.

Στη συνέχεια, έγινε μια προσπάθεια χαρτογράφησης της περιοχής του υποκινητή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από τον TGFβ. Για τον σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν οι μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή -227/+86 και -78/+86 οι οποίες αποτελούν 5' ελείμματα της αρχικά κλωνοποιημένης περιοχής -726/+86. Η μελέτη της ενεργότητας των μεταλλαγμένων αυτών μορφών έδειξε μια σταδιακή ελάττωση της ενεργότητας τους η οποία στη περίπτωση της περιοχής -78/+86 προσεγγίζει το 10% της ολόκληρης μορφής -726/+86.

Κατόπιν, μελετήθηκε η ενεργοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών του υποκινητή από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών και όπως φαίνεται από τα πειράματα η ενεργοποίηση του υποκινητή από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad3/Smad4 και του συστασιακά ενεργού υποδοχέα τύπου I ALK5ca δεν ελαττώνεται στις μεταλλαγμένες μορφές αλλά διατηρείται στον ίδιο βαθμό. Ακόμα

και η περιοχή -78/+86 ενεργοποιείται εξίσου καλά με τη περιοχή -726/+86. Το χαρακτηριστικό των δυο αυτών μεταλλαγμένων μορφών είναι ότι φαίνεται να περιέχουν μια θέση πρόσδεσης (CAGAC element) των πρωτεϊνών Smad στη θέση +20 σε αντίθεση με την περιοχή -726/+86 η οποία περιλαμβάνει ακόμη δυο θέσεις πρόσδεσης στα σημεία -294 και -278 του υποκινητή.

Η διερεύνηση του ενδεχόμενου η θέση +20 να είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών και κατ'επέκταση για την ενεργοποίηση από τον TGFβ οδήγησε στη δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών οι οποίες δεν θα περιείχαν την θέση πρόσδεσης τη θέση +20. Τα 5' ελλείματα του υποκινητή τα οποία κατασκευάστηκαν είναι οι περιοχές -726 /+19, -227 /+19 και -78 /+19.

Τα πειράματα μέτρησης της ενεργότητας λουσιφεράσης που ακολούθησαν, έδειξαν ότι η ενεργοποίηση του υποκινητή από τις Smad πρωτεΐνες διατηρείται σε όλες τις μεταλλαγμένες μορφές ακόμα και στις δύο (-227 /+19, -78 /+19) οι οποίες φαίνεται να μην περιέχουν καμία θέση πρόσδεσης των Smad και αναμενόταν να μην παρουσιάζουν ενεργοποίηση από τις Smad.

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα λοιπόν, η χαρτογράφηση του υποκινητή της RhoB κατέληξε στη περιοχή -78 /+19, μια περιοχή μεγέθους 97bp η οποία δεν φαίνεται να περιέχει κάποιο σημείο πρόσδεσης γνωστού μεταγραφικού παράγοντα. Μια επιπλέον αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι η μικρή αυτή μεταλλαγμένη μορφή μοιάζει να ενεργοποιείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών στον ίδιο βαθμό με τον ολόκληρο υποκινητή (-726 +86) παρόλο που η συνολική ενεργότητα του βρίσκεται μόλις στο 10% του ολόκληρου.

Η προσεκτικότερη ανάλυση της μικρής αυτής περιοχής του υποκινητή προκαλεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το λόγο ότι παρόλο του μικρού της μεγέθους είναι επαρκής για την ενεργοποίηση από τις πρωτεΐνες Smad (35) . Ο περαιτέρω χαρακτηρισμός της μπορεί να πραγματοποιηθεί με την μέθοδο της αποτύπωσης με DNase I (DNase I footprinting) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα κυττάρων στα οποία έγινε επίδραση με TGFβ ενώ η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που προσδένονται στη περιοχή αυτή μπορεί να γίνει με αναλύσεις ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πηκτή παρουσία αντισωμάτων ενάντια στις Smad πρωτεΐνες ή καθαρών Smad πρωτεϊνών.

Ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB από το μονοπάτι των MAPK κινασών

Όπως βρέθηκε από τα πειράματα PCR ανάστροφης μεταγραφής, το μονοπάτι των MAPK κινασών φαίνεται να συμμετέχει ενεργά στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB καθώς η καταστολή του ρίχνει την έκφραση του γονιδίου σε επίπεδα πολύ χαμηλότερα από τα βασικά.

Στο σημείο αυτό της παρούσας ερευνητικής εργασίας, έγινε μια διερεύνηση της δράσης των MAPK κινασών στη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB μέσω πειραμάτων μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης παρουσία ή όχι μιας σημειακά μεταλλαγμένης μορφής του Ras η οποία είναι συστασιακά ενεργή (Ras ca).

Τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η υπερέκφραση της μόνιμα ενεργής μορφής του Ras ενεργοποιεί τον υποκινητή της RhoB σε αρκετά σημαντικό βαθμό. Η ενεργοποίηση αυτή όμως φαίνεται να ελαττώνεται σταδιακά με τη δημιουργία των 5' ελλειμάτων του στις μεταλλαγμένες μορφές -227/+86 και -78/+86. Η μεγαλύτερη πτώση στην ενεργοποίηση παρατηρείται από την απαλοιφή της περιοχής -726 /-227.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε το ενδεχόμενο συνεργατικής δράσης των μονοπατιών των Smad πρωτεϊνών και των MAPK κινασών στην ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων μέτρησης της ενεργότητας λουσιφεράσης στα οποία χρησιμοποιήθηκαν η ολόκληρη μορφή του υποκινητή (-726/+86) παρουσία των υπερεκφρασμένων Smad3/Smad4 ή/και του συστασιακά ενεργού Ras (Ras ca).

Η διαπίστωση η οποία προέκυψε από τη διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών ήταν ότι παρουσία του ενεργού Ras, η ενεργοποίηση στον υποκινητή του γονιδίου της RhoB δεν είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται μόνο λόγω της υπερέκφρασης των Smad πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό αποτελεί μια ακόμη ενδείξη για την έλλειψη συνεργατικής δράσης των δύο μονοπατιών τα οποία μπορεί να εμπλέκονται και τα δύο στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ, παρόλα αυτά παρουσιάζονται να έχουν διακριτούς και ανεξάρτητους ρόλους. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η δράση του μονοπατιού των MAPK κινασών είναι πιο άμεση και παρατηρείται μεταξύ των 3 πρώτων ωρών επίδρασης με TGFβ και είναι υπεύθυνη για την έναρξη της μεταγραφικής ρύθμισης ενώ η δράση του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών εντοπίζεται μετά από μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και είναι υπεύθυνη για τη μακρόχρονη

διατήρηση της ενεργοποίησης της μεταγραφής της RhoB και κατ'επέκταση του φαινοτύπου της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής μελετήθηκε η ενδεχόμενη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB από επιπρόσθετους μεταγραφικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, η χρησιμοποίηση υπολογιστικών προγραμμάτων ανάλυσης υποκινητών έδωσε χρήσιμα στοιχεία για την ύπαρξη πάνω στον υποκινητή της RhoB θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, ένας από τους οποίους είναι ο Sp1, βασικό μέλος της οικογενείας των Sp μεταγραφικών παραγόντων. Αναλυτικότερα, ο Sp1 φαίνεται να έχει 3 θέσεις πρόσδεσης στον υποκινητή της RhoB και βρίσκονται στις θέσεις -660, -123 και -104.

Μια πρώτη προσέγγιση του ρόλου του παράγοντα Sp1 στη ρύθμιση της μεταγραφής της RhoB προήλθε μέσω της χρήσης της μιθραμυκίνης η οποία έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε περιοχές του DNA, πλούσιες σε GC, και να παρεμποδίζει την πρόσδεση παραγόντων στις περιοχές αυτές. Πειράματα PCR ανάστροφης μεταγραφής τα οποία πραγματοποιήθηκαν παρουσία μιθραμυκίνης έδειξαν ότι η μιθραμυκίνη ελαττώνει σημαντικά τα βασικά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της RhoB.

Κατόπιν, διερευνήθηκε ο ρόλος του Sp1 παράγοντα και των θέσεων πρόσδεσης του στη ρύθμιση της ενεργότητας του υποκινητή του γονιδίου της RhoB. Για το συγκεκριμένο σκοπό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης σε κύτταρα SL2 τα οποία είναι εμβρυικά κύτταρα Δροσόφιλας που δεν εκφράζουν ενδογενώς Sp1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται ότι ο Sp1 προκαλεί πολύ μεγάλη ενεργοποίηση στον υποκινητή της RhoB η οποία ενεργοποίηση φαίνεται να μειώνεται σταδιακά στις μεταλλαγμένες μορφές του υποκινητή. Η πτώση που παρατηρήθηκε με τη δημιουργία των 5' ελλειμάτων του είναι αναμενόμενη καθώς ενώ ο ολόκληρος υποκινητής (-726/+86) διαθέτει 3 θέσεις πρόσδεσης για τον Sp1, η περιοχή -227/+86 έχει δύο θέσεις, ενώ η περιοχή -78 /+86 δεν περιέχει καμία θέση πρόσδεσης για αυτό και η ενεργοποίηση της από τον Sp1 είναι ελάχιστη συγκριτικά με αυτή των άλλων δυο μορφών του υποκινητή.

Στα παραπάνω πειράματα χρησιμοποιήθηκε επιπλέον μια μεταλλαγμένη μορφή του παράγοντα Sp1, η Sp1 ΔC, η οποία περιέχει απαλοιφή της περιοχής C. Η συγκεκριμένη περιοχή έχει αρνητικό ρυθμιστικό ρόλο στη δράση της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα η μεταλλαγμένη αυτή μορφή να είναι πιο ενεργή από την αγρίου τύπου. Η μέτρηση ενεργότητας του υποκινητή της RhoB παρουσία της μορφής Sp1 ΔC έδειξε, όπως αναμενόταν, ακόμα μεγαλύτερη ενεργοποίηση του από τον Sp1.

Επομένως, όπως βρέθηκε από τα πειράματα, ο παράγοντας Sp1 παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγραφή του γονιδίου της RhoB καθώς απουσία αυτού τα επίπεδα έκφρασης της RhoB είναι πολύ χαμηλά. Επίσης, τα αποτελέσματα συμβαδίζουν με την ύπαρξη των τριών θέσεων πρόσδεσης του στον υποκινητή όπως αυτές είχαν προβλεφθεί.

Ρύθμιση της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB από μέλη της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων της p53

Μια επόμενη οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων της οποίας η δράση μελετήθηκε στη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της RhoB είναι η οικογένεια της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Στην επιλογή της συγκεκριμένης οικογένειας οδήγησαν πρόσφατες δημοσιεύσεις οι οποίες έδειξαν επαγωγή της RhoB από τη χημειοθεραπευτική ένωση 5- Fluorouracil (5-FU) η οποία προκαλεί βλάβη στο DNA και η οποία επάγει ισχυρά την p53 αλλά και υπολογιστικά προγράμματα αναλύσεων υποκινητών τα οποία προβλέπουν την ύπαρξη θέσεων πρόσδεσης της p53 στον υποκινητή της RhoB.

Σύμφωνα με μια σειρά πειραμάτων μέτρησης δραστηριότητας λουσιφεράσης, το μόνο μέλος της οικογένειας το οποίο φαίνεται να ρυθμίζει τη μεταγραφή της RhoB και μάλιστα να προκαλεί σημαντική ενεργοποίηση στον υποκινητή της είναι η p73. Ούτε η p53 αλλά ούτε η p63 (α και γ) φαίνεται να έχουν καμία επίδραση στη ρύθμιση του υποκινητή της RhoB.

Η παραπάνω διαπίστωση είναι σημαντική για το λόγο ότι πολύ λίγα γονίδια στόχοι αποκλειστικά της p73 έχουν βρεθεί. Η εύρεση ακόμα ένα ειδικού στόχου ενισχύει την άποψη ότι τα μέλη της οικογένειας της p53 έχουν επικαλυπτόμενους αλλά και διακριτούς ρόλους.

Η προσπάθεια βαθύτερης διερεύνησης της δράσης της p73 και εύρεσης πιθανών θέσεων πρόσδεσης της στον υποκινητή της RhoB οδήγησε στη μελέτη

ενεργοποίησης των μεταλλαγμένων μορφών του. Όπως φαίνεται από τα πειραματικά δεδομένα, η ενεργοποίηση του υποκινητή από τις ισομορφές τις p73 πρωτεΐνης δεν επηρεάζεται ιδιαίτερα από την απαλοιφή της περιοχής -726/-78.

Ωστόσο, θέση πρόσδεσης της p73 τόσο στη μικρή αυτή περιοχή όσο και στον ολόκληρο υποκινητή δεν φαίνεται να υφίσταται. Επομένως, η p73 πιθανόν να δρα όχι μέσω άμεσης πρόσδεσης στον υποκινητή της RhoB αλλά μέσω αλληλεπίδρασης με κάποιο άλλο μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος να προσδένεται στη συγκεκριμένη περιοχή.

Η ανάγκη εύρεσης του συνεργάτη της p73, η αλληλεπίδραση των οποίων ευθύνεται για την ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB είναι πολύ σημαντική. Ένας πρώτος υποψήφιος για το ρόλο αυτό επιλέχθηκε να είναι ο Sp1 για το λόγο ότι όπως βρέθηκε παραπάνω έχει θέσεις πρόσδεσης πάνω στον υποκινητή της RhoB τον οποίο ενεργοποιεί σημαντικά ακόμα και στην μικρότερη περιοχή του (-78 +86) αλλά και γιατί υπάρχουν δεδομένα αλληλεπίδρασης και συνεργασίας του με την p73 πρωτεΐνη σε άλλα γονίδια στόχους.

Η συνεργασία λοιπόν της p73 με τον παράγοντα Sp1 δείχθηκε σε πειράματα μέτρησης ενεργότητας λουσιφεράσης στα οποία ενώ ο Sp1 παράγοντας από μόνος του, όπως αναμενόταν, ενεργοποιεί σημαντικά τον υποκινητή της RhoB, η ενεργοποίηση αυτή παρουσία υπερεκφρασμένης p73 αυξάνει και μάλιστα διπλασιάζονται τα επίπεδα ενεργότητας του υποκινητή. Η διαπίστωση αυτή αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για τη συνεργατική δράση των δυο μεταγραφικών παραγόντων στη ρύθμιση του υποκινητή του γονιδίου της RhoB.

Μελλοντικοί στόχοι

Η προσπάθεια διερεύνησης του μηχανισμού μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ μπορεί να συνεχιστεί με πειράματα ανάλυσης των επιπέδων mRNA παρουσία τώρα τόσο ειδικών αναστολέων των Smad πρωτεϊνών όσο και αναστολέων του μονοπατιού της ERK/MAPK κινάσης (εκτός από τον U0126). Ως αναστολείς της δράσης των Smad πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν: α) ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που θα εκφράζουν μια μεταλλαγμένη μορφή της Smad4 με κατασταλτική δράση (dominant negative) καθώς επίσης ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που θα εκφράζουν την κατασταλτική πρωτεΐνη Smad7, β) μικρά κατασταλτικά RNA (siRNA) που θα έχουν σαν στόχο την επιλεκτική αποικοδόμηση των Smad2, Smad3 και Smad4 mRNAs. Επίσης η επίδραση με TGFβ μπορεί να γίνει σε κύτταρα *Smad3*^{-/-} (JEG-3 choriocarcinoma) ή *Smad4*^{-/-} (MBA-MB-468). Ως αναστολείς του δράσης του Ras/Raf/ERK μονοπατιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατασταλτικά RNAs που θα δημιουργηθούν ενάντια στις ERK1 και ERK2. Επιπρόσθετα, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση της συμμετοχής του μονοπατιού ROCK / LIMK2 / cofilin με τη χρήση του αναστολέα της ROCK και επακόλουθη μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB.

Επίσης, η περιοχή του υποκινητή (-78/+19) που εντοπίστηκε ως υπεύθυνη για την ενεργοποίηση από τον TGFβ μπορεί χαρακτηριστεί περαιτέρω με την μέθοδο της αποτύπωσης με DNase I (DNase I footprinting) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα κυττάρων στα οποία έγινε επίδραση με TGFβ σε σύγκριση με εκχυλίσματα ελέγχου ούτως ώστε να χαρτογραφηθούν επακριβώς τα ρυθμιστικά στοιχεία στα οποία προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες που επάγονται από το μονοπάτι αυτό. Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που προσδένονται στα παραπάνω ρυθμιστικά στοιχεία θα γίνει με αναλύσεις ηλεκτροφορητικής κινητικότητας σε πηκτή όπου συνθετικά δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια που θα αντιστοιχούν στις περιοχές αποτύπωσης που θα προκύψουν από την ανάλυση με DNase I θα επωασθούν με πυρηνικά εκχυλίσματα από ενεργοποιημένα με TGFβ κύτταρα παρουσία αντισωμάτων ενάντια στις Smad πρωτεΐνες καθώς και σε πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από το Ras/Raf/Erk μονοπάτι (NFκB, AP-1, c-Myc και Ets-1) ή με καθαρές Smad πρωτεΐνες.

Παράλληλα, η *in vivo* μελέτη της πρόσδεσης των πρωτεϊνών Smad ή των πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από το Ras/Raf/ERK μονοπάτι και βρέθηκαν να ενεργοποιούν μεταγραφικά το γονίδιο της RhoB έπειτα από επίδραση TGFβ περιλαμβάνει μια σειρά από αναλύσεις ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (Chromatin immunoprecipitation). Συνοπτικά, θα χρησιμοποιηθούν κύτταρα ανθρώπινων κερατινοκυττάρων HaCaT ή ηπατώματος HepG2 τα οποία θα έχουν υποστεί κατεργασία με TGFβ, αντισώματα ειδικά για φωσφορυλιωμένες μορφές της Smad2 και Smad3 ή των διαμεσολαβητών του Ras/Raf/ERK μονοπατιού και εκκινητές εκατέρωθεν των TGFβ επαγόμενων περιοχών του υποκινητή.

Σε ένα δεύτερο μέρος πειραματικών μελετών κρίνεται σκόπιμο να μελετηθεί ο συντονισμός και η συνεργατικότητα μεταξύ γενωμικής και μη γενωμικής δράσης του TGFβ. Η πραγματοποίηση αναλύσεων στις οποίες θα μελετηθεί η επίδραση του TGFβ σε μια σειρά από κυτταρικές αποκρίσεις όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η κυτταρική κινητικότητα, η απόπτωση, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η επιθηλιο-μεσεγχυματική μετατροπή κάτω από συνθήκες απουσίας μεταγραφικής ενεργοποίησης της RhoB πρωτεΐνης πρόκειται να συντελέσει στην αξιολόγηση της συνεισφοράς της γενωμικής δράσης του TGFβ η οποία μεσολαβείται από την RhoB πρωτεΐνη, στις παραπάνω κυτταρικές διεργασίες. Ένας τρόπος επίτευξης του σκοπού αυτού είναι μέσω της χρησιμοποίησης των ειδικών αναστολέων της δράσης ή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων που θα ταυτοποιηθούν ως ενεργοποιητές της μεταγραφής του γονιδίου της RhoB. Η καταστολή του γενωμικού μονοπατιού η οποία θα προκύψει με τον τρόπο αυτό, πρόκειται να δώσει πληροφορίες για τη δράση και την επάρκεια του μη γενωμικού μονοπατιού σε όλες τις παραπάνω λειτουργίες του κυττάρου στις οποίες εμπλέκονται τα μονοπάτια του TGFβ και των RhoGTPασών.

Τέλος, μπορεί να πραγματοποιηθεί μελέτη των επιπτώσεων της υπερέκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB στις παραπάνω διαδικασίες μέσω της δημιουργίας και χρησιμοποίησης ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν τις αγρίου τύπου πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό γίνεται μια προσπάθεια μίμησης, τουλάχιστον στην περίπτωση της RhoB, της αύξησης της έκφρασης έπειτα από επίδραση με TGFβ

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wennerberg, K., & Der, CJ (2004) *Journal of Cell Science* 117, 1301-1312
2. Valencia, A., Chardin, P., Wittinghofer, A. and Sander, C. (1991) *Biochemistry* 30, 4637-4648
3. Sahai, E., & Marshall, CJ (2002) *Nat.Rev.Cancer* 2, 133-142
4. Adamson, P., Paterson, HF & Hall, A (1992) *J. Cell.Biol* 119, 617-627
5. Gampel, A., Parker, PJ and Mellor H (1999) *Curr.Biol* 9, 955-958
6. Jaffe., AB & Hall A (2002) *Adv.Cancer Res* 84, 57-80
7. Zohn, IM., Campbell, SL., Khosravi-Far, R., Rossman, KL and Der CJ (1998) *Oncogene* 17, 1415-1438
8. Qiu, R., Chen, J., McCormick, F and Symons M (1995), *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 92, 11781-11785
9. Clark, EA., Golub, TR., Lander, ES and Hynes RO (2000) *Nature* 406, 532-535
10. Chen, Z., Sun, J., Pradines, A., Favre, G., Adnane, J and Sebti SM (2000) *J Biol Chem.* 275, 17974-17978
11. Du, W & Prendergast GC (1999) *Cancer Res.* 59,5492-5496
12. Prendergast, GC (2001) *Nat.Rev.Cancer* 1, 162-168
13. Prendergast, GC (2000) *Curr.Opin.Cell.Biol* 12, 166-173
14. Kamai, T., Arai, K., Tsujii, T., Honda, M and Yoshida, K (2001) *BJU Int.* 87, 227-231
15. Fritz G, Just I and Kaina B (1999) *Int. J. Cancer* 81, 682-687
16. Schnelzer, A., Prechtel, D., Kanus, U., Dehne, K., Gerhard, M., Graef, H., Harbeck, N., Schmitt, M and Lengyel E (2000) *Oncogene* 19, 3013-3020.
17. Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S. M. and Munoz-Antonia, T. (2002). *Clin. Cancer Res.* 8, 2225-2232

18. Liu, AX., Rane, N., Liu, JP and Prendergast GC (2001) *Mol.Cell.Biol.* 21,6906-6912
19. Moustakas, A. & Stournaras C (1999) *J .Cell. Science* 112, 1169-1179
20. Vardouli, L., Moustakas, A., Stournaras C. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25;280(12):11448-57
21. Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, YC., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., Bottinger, EP (2001) *Proc Natl Acad Sci USA* Jun 5;98(12):6686-91
22. Xie, L., Law, BK., Aakre, ME., Edgerton, M., Shyr, Y., Bhowmick, NA., Moses, HL (2003) *Breast Cancer Research* ;5(6):R187-98
23. Coyle, B., Freathy, C., Gant, TW., Roberts, RA., Cain K (2003) *J Biol Chem* 21;278(8):5920-8
24. Verrecchia, F., Chu, ML., Mauviel A, (2001) *J Biol Chem* 18;276(20):17058-62
25. Adnane, J., Seijo, E., Chen, Z., Bizouarn, F., Leal, M., Sebti, S and Munoz-Antonia, T (2002) *J. Biol Chem* 277, 8500-8507
26. Fritz, G and Kaina, B (2001) *J.Biol Chem* 276, 3115-3122
27. Roberts, A & Wakefield, L (2003) *PNAs* 100, 8621-8623
28. Roberts, A & Wakefield, L (2002) *Current opinion in Genetics & Development*, 12 : 22-29
29. Derynck, R & Zhang, Y (2003) *Nature* 425, 577-584
30. Lebowitz, PF., Davide, JP and Prendergast, GC (1995) *Moll.Cell.Biol* 15, 6613-6622
31. Wherlock, M., Gampel, A., Futter, C & Mellor H (2004) *Journal of Cell Science* 117, 3221-3231
32. Fritz, G and Kaina B (2001) *J.Biol Chem* 276, 3115-3122
33. Engel, M., Datta, P & Moses, H (1998) *J Biol Chem* 273, 9921-9926
34. Jiang, K., Delarue, FL. & Sebti SM, (2004) *Oncogene* 5;23(5):1136-45
35. Fritz, G & Kaina, B (1997) *J.Biol.Chem* 272, 30637-30644

36. Clark, D. A., and Coker, R., (1998) *Int J Biochem Cell Biol.* 30(3), 293-298
37. Roberts, A & Wakefield L (2003) *PNA's* 100, 8621-8623
38. Roberts, A & Wakefield L (2002) *Current opinion in Genetics & Development*, 12 : 22-29
39. Derynck, R & Zhang Y (2003) *Nature* 425, 577-584
40. Funaba, M., Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 41361–41368
41. Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massague', J. (1999) *Genes Dev.* 13, 804–816
42. Itoh, F. et al. (2001) *EMBO J.* 20, 4132–4142
43. Hanyu, A. et al. (2001) . *J. Cell Biol.* 155, 1017–1027
44. Moustakas, A. and Heldin, CH (2005) *Journal of Cell Science* 118, 3573-3584
45. Dijke P & Hill C, (2004) *Trends in Biochemical Sciences* 29, 265-273
46. Shi Y., Hata A., Lo R.S., Massague J., Pavletich N.P., (1997) *Nature* 388, 87-93.
47. Derynck R., Zhang Y., Feng X-H, (1998) *Cell* 95, 737-740
48. Shi, Y. , (2001) *Bioassays*, 23, 223-232
49. Derynck R & Zhang Y (2003) *Nature* 425, 577-584
50. Massague, J., (1998) *Annu.Rev. Biochem.* 67, 753-791
51. Massague, J. and Wotton D. (2000) *EMBO J.* 19, 1745-1754
52. Funaba, M., Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 41361–41368
53. Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massague', J. (1999) *Genes Dev.* 13, 804–816
54. Heldin C-H, Miyazono K and Dijke P (1997) *Nature* 390, 465-471
55. Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C. H., (2001) *Journal of Cell Science* 114, 4359-4369

56. Shi Y., Wang Y-F., Jayaraman L., Yang H., Massague j., Pavletich N.P., (1998) *Cell* 94 585-594
57. Shi Y., Hata A., Lo R.S., Massague J., Pavletich N.P., (1997) *Nature* 388, 87-93.
58. Shi, Y. , (2001) *Bioassays*, 23, 223-232
59. Chacko, B.M., Qin, B., Correia, J. J., Lam, S.S., de Caestecker, M.P., and Lin, K., (2001) , *Nat. Stryct. Biol.* 8, 248-253
60. de Caestecker, M. P., Yahata, T., Wang, D., Parks., W. T., Huang, S., Hill, C. S., Shioda, T., Roberts, A. B., and Lechleider, R. J., (2000b) *J. Biol. Chem* 275, 2115-2122
61. Suske, G. (1999) *Gene* 238, 291-300
62. Bouwman, P. and Philipsen, S. (2002) *Molecular and Cellular Endocrinology* 195, 27-38
63. Philipsen S. and Suske, G.(1999) *Nucleic Acids Res.* 27, 2991-3000
64. Hagen, G., Muller, S., Beato, M. and Suske, G. (1994) *EMBO J.* 13, 3843-3851
65. Pascal, E. and Tjian, R. (1991) *Genes & Development* 5, 1646-1656
66. Courey, A. J. and Tjian R. (1988) *Cell* 55, 887-898
67. Murata, Y.H.G.K., Rogers, K.T., Udvardia, A.J. and Korowitz, J.M., (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 20674-20861
68. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A. and Cedar, H., (1994) *Nature* 371, 435-438
69. Macleod, D., Charlton, J., Mullins, J. and Bird, A.P. (1994) *Genes Dev.* 8, 2282-2292
70. Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F. and Philipsen, S. (1997) *Cell* 89, 619-628
71. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gilleett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D and McKeon, F. (1998) *Mol. Cell* 2, 305–316

72. Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D. (1997) *Cell* 90, 809–819
73. Mai M., H. Huang, C. Reed, C. Qian, J. Smith, B. Alderete, R. Jenkins, D. Smith, W. Liu, (1998) *Genomics* 51 359-363
74. Mosner J., T. Mumbenbrauer, C. Bauer, G. Sczakiel, F. Grosse, W. Deppert, (1995) *EMBO J.* 14 4442-4449
75. De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M. and Melino, G. (1998) *J. Exp. Med.* 188, 763-1768.
76. Ueda, Y., Hijikata, M., Takagi, S., Chiba, T. and Shimotohno, K. (1999) *Oncogene* 18, 4993-4998
77. Schwab, M., Praml, C., Amler, L. C. (1996) *Genes Chromosomes Cancer* 16, 211-229.
78. Koutsodontis, G., Vasilaki, E., Chou, WC., Papakosta, P. and Kardassis, D. (2005) *Biochem J.* Jul 15;389(Pt 2):443-55
79. Pascal, E. and Tjian R (1991) *Genes Dev.* 9, 1646-56