

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ:
«Η ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ:

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A
ΣΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TGF-β»**

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΦΩΤΑΚΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΔΑΣΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2008

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
A. Ο ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΖΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ β (TGF- β)	6
B. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΕΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ TGF- β ΚΑΙ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ	9
Γ. ΟΙ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Η ΔΟΜΗ ΤΟΥΣ	12
Δ. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΘΕΣΗ ΤΩΝ SMADS	14
Ε. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΟΛΙΓΟΜΕΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ SMADS	15
ΣΤ. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΤΙΣ SMADS	18
Ζ. ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ SMADS	23
Η. Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ LINKER ΤΩΝ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	27
Θ. ΟΙ ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ SCP1, SCP2 ΚΑΙ SCP3	31
Ι. Η ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TGF- β ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ	33
Κ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	36

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	37
<u>A) ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ DNA</u>	38
A1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	38
A2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA	39
A3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ WIZARD SV GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM ΤΗΣ PROMEGA	41
A4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	42
A5. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA	43
A6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ DNA ΜΕ ΦΟΡΕΑ (LIGATION)	43
A7. ΥΓΡΟ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ LB	44
A8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ	45
A9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΜΙΚΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MINIPREPS)	46
A10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΜΕΣΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MEDIPREPS)	47
A11. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ (HaCaT) ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ cDNA (RT-PCR)	49

<u>B) ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</u>	53
B1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)	53
B2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ (TRANSFER) ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ	54
B3. WESTERN BLOT	55
B4. STRIPPING ΚΑΙ BLOCKING ΤΩΝ HRP ΜΕ NaN_3	57
B5. ΛΥΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ CO-IP LYSIS BUFFER	58
B6. ΚΑΝΟΝΟΚΟΠΟΙΗΣΗ LOWRY-BRADFORD	59
B7. Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΤΗΣ (LUCIFERASE & β -GAL ASSAY)	60
B8. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ	62
B9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ DNA ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ: ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΕ ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΜΕΝΟ ΟΛΙΓΟ-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ (DNAP)	63
B10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗ	64
B11. ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ	65
<u>Γ) ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</u>	68
Γ1. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ	68
Γ2. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	69

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
A. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ pcDNA3-6myc	74
B. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A ΣΕ HEK293T	76
Γ. ΟΙ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A ΩΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ ΤΟΥ LINKER Ή ΤΟΥ C-TERMINUS ΤΩΝ R-SMADS	76
Δ. Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ LINKER ΤΗΣ SMAD2 ΑΠΟ ΤΙΣ CDK2/4, ERK ΚΑΙ JNK ΚΙΝΑΣΕΣ	83
Ε. Η ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ LINKER ΤΗΣ SMAD2 ΚΑΙ Η ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ	85
ΣΤ. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ SCP1 ΣΤΟ ΔΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΗΣ SMAD3 ΜΕ ΤΗ SMAD4	87
Ζ. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ SCP1 ΣΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΗΣ SMAD3 ΣΤΟ DNA	89
Η. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ	90
Θ. ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΚΕΦΡΑΣΜΕΝΗΣ SCP1	106
Ι. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TGF-β ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A	110
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	130

ABSTRACT

Transforming growth factor β (TGF- β) belongs to a superfamily of cytokines playing important role in fundamental processes of the metazoan cells such as cell proliferation, differentiation, migration, adhesion and death. TGF- β regulates transcriptional responses via the cytoplasmic effector proteins termed Smads. The TGF- β signaling pathway includes the binding of TGF- β to transmembrane receptors, the activation of Smads through phosphorylation, the homo- or hetero-oligomerization of Smads, their translocation to the nucleus and their interaction with other nuclear factor for the transcription of gene-targets.

The linker region of R-Smads contains many serine/threonine phosphorylation sites which are considered to play a very important role in TGF- β signaling. The phosphorylation of the linker by MAPKs and CDKs is the point of convergence between the TGF- β signaling pathway and the EGF/FGF/Ras signaling pathways. The result of this convergence as well as the general effect of the linker phosphorylation of R-Smads on the TGF- β pathway is still under study.

The SCPs (Small CTD phosphatases) were initially identified as phosphatases of the CTD region of RNAPII. Recent studies have associated them with the dephosphorylation of the linker region of Smad1/2/3 and the SXS motif of Smad1. The effect of this interaction was the attenuation of the BMP signaling but the enhancement of TGF- β -induced transcriptional responses. The last one is opposed to the general repression of the transcriptional machinery that had been so far observed by SCPs.

In the present study we examined the effect of the dephosphorylation of the linker region of Smad2/3 on the TGF- β signaling pathway. Initially, we performed a series of titrations using increasing concentrations of expression vectors carrying the SCP1, SCP2, SCP3 and PPM1A phosphatases in HEK293T cells. The aim of these experiments was to examine the ability of the phosphatases to dephosphorylate the Ser245/250/255 linker residues and the SXS motif of Smad2/3. The results showed that all SCPs could equally dephosphorylate the linker of Smad2/3 in contrast to PPM1A which did not exhibit such ability. We also demonstrated for the first time that SCPs can dephosphorylate the SXS motif of Smad2/3 which is phosphorylated by

TGF- β receptor type I. Moreover, we confirmed that the MAP kinases JNK and ERK are responsible for the phosphorylation of the Smad2 linker region.

Consecutively, we investigated the effect of SCP1 on Smad functions such as the dimerization between Smad3 and Smad4, the binding of Smad3 to the DNA and the transcriptional activation of reporter genes. The results indicated that the dephosphorylation of the Smad3 linker region attenuates the dimerization with Smad4 but does not influence the binding to DNA. Furthermore, it was shown a decrease in the transcriptional activity of Smad2/3 in the presence of even very small amounts of SCPs, which is in contrast with previous studies.

Finally, we demonstrated that TGF- β does not have an effect on the transcription of the SCPs and PPM1A genes in HaCaT cells.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β (TGF- β) ανήκει σε μία υπεροικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών που παίζουν σημαντικό ρόλο στα κύτταρα των μεταζώων συμμετέχοντας σε βασικές τους λειτουργίες όπως κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση, μετανάστευση, προσκόλληση, οργάνωση και θάνατο. Ο TGF- β και τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας δρουν ως εξωκυττάριοι σηματοδότες που έχουν τη δυνατότητα μέσω ενδοκυττάρων διαμεσολαβητών να ρυθμίζουν τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων στόχων. Τα βασικά χαρακτηριστικά της σηματοδότησης του TGF- β περιλαμβάνουν τη πρόσδεση του TGF- β σε μεμβρανικούς υποδοχείς που έχουν δραστικότητα κινάσης σερίνης-θρεονίνης, την ενεργοποίηση των ενδοκυττάρων Smads μέσω φωσφορυλίωσης, τον ομο- και ετερο-ολιγομερισμό των Smads, την μετάβασή των Smads στο πυρήνα και την αλληλεπίδρασή τους με πυρηνικούς βοηθητικούς παράγοντες για τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων.

Η περιοχή του linker των Smads περιέχει πάρα πολλά σημεία φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης που τα τελευταία χρόνια αναδεικνύονται σε σημαντικό ρυθμιστή της σηματοδότησης του TGF- β . Η φωσφορυλίωση του linker από MAPKs και CDKs αποτελεί σημείο αναφοράς για την σύγκλιση της σηματοδότησης του TGF- β με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως των EGF/FGF/Ras. Το αποτέλεσμα αυτής της σύγκλισης καθώς και η γενικότερη επίδραση που έχει η φωσφορυλίωση του linker στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β παραμένει αμφιλεγόμενο.

Οι SCPs (Small CTD Phosphatases) αναγνωρίστηκαν αρχικά ως φωσφατάσες της καρβοξυτερματικής περιοχής (CTD) της RNAPII. Πρόσφατες έρευνες όμως τις ανέδειξαν σε φωσφατάσες του linker των Smad1/2/3 καθώς και του μοτίβου SXS της Smad1. Η δράση τους στο linker των Smads είχε σαν αποτέλεσμα την καταστολή της BMP σηματοδότησης αλλά την ενίσχυση της επαγόμενης μεταγραφής από τον TGF- β , το τελευταίο από τα οποία έρχεται σε αντίθεση με τη γενικότερη κατασταλτική δράση των SCPs στη μεταγραφική μηχανή.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της αποφωσφορυλίωσης του linker των Smad2/3 στη σηματοδότηση του TGF- β . Αρχικά, έγινε μια σειρά από τιτλοδοτήσεις χρησιμοποιώντας αυξανόμενες συγκεντρώσεις φορέων έκφρασης των φωσφατασών SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A σε κύτταρα HEK293T με σκοπό να

μελετηθεί η εξειδίκευση των φωσφατασών ως προς τα κατάλοιπα Ser245/250/255 και προς το μοτίβο SXS των Smad2/3. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλες οι SCPs αποφωσφορυλιώνουν τον linker των Smad2/3 στον ίδιο βαθμό σε αντίθεση με την PPM1A η οποία δεν τον αποφωσφορυλιώνει. Δείχτηκε για πρώτη φορά ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις, οι SCPs έχουν την ικανότητα να αποφωσφορυλιώνουν το SXS μοτίβο των Smad2/3 το οποίο φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα τύπου I του TGFβ. Επίσης δείχθηκε ότι οι MAP κινάσες JNK και ERK είναι υπεύθυνες για τα βασικά επίπεδα φωσφορυλίωσης του linker της Smad2.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η επίδραση της SCP1 στις λειτουργίες των Smads όπως ο διμερισμός της Smad3 με τη Smad4, η πρόσδεση της Smad3 στο DNA και η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad3 μειώνει το διμερισμό της με τη Smad4 αλλά δεν επηρεάζει την πρόσδεσή της στο DNA. Επίσης, δείχτηκε η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των Smad2/3 παρουσία των SCPs ακόμη και σε πάρα πολύ μικρές ποσότητες το οποίο έρχεται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες.

Τέλος, δείξαμε ότι ο TGF-β δεν έχει καμία επίδραση στην μεταγραφή των γονιδίων των SCPs και της PPM1A1 σε κύτταρα HaCaT.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

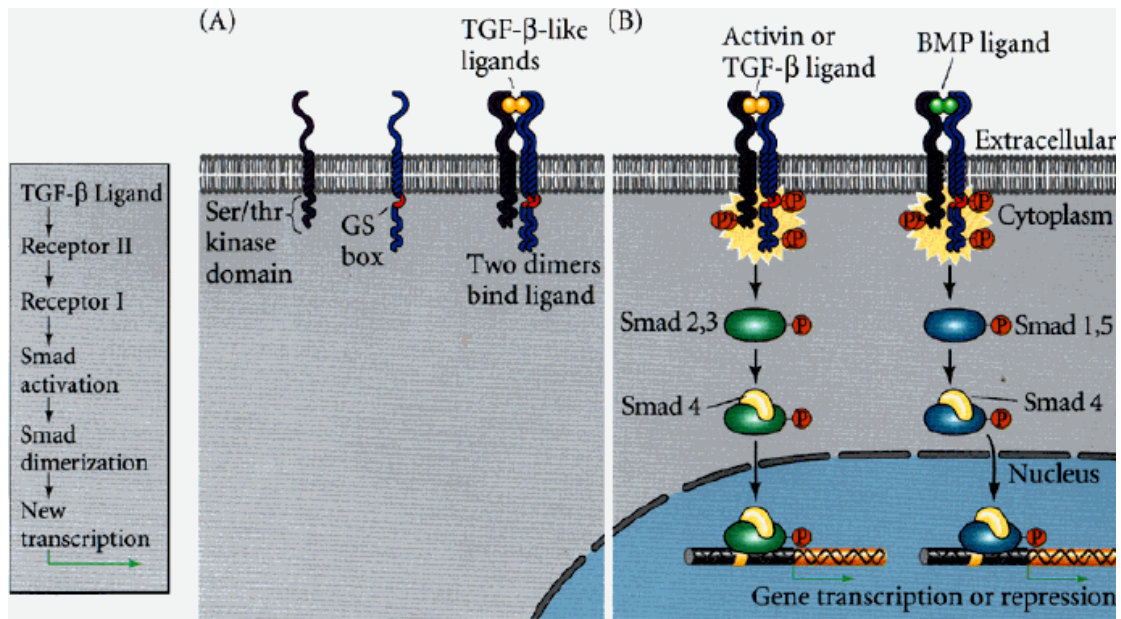
A. Ο ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΖΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ β (TGF- β)

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας (TGF- β) αποτελεί το πρωταρχικό μέλος και δίνει το όνομα του σε μία υπερικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών που επίσης περιλαμβάνει τις nodals, activins, inhibins, bone morphogenetic proteins (BMPs), growth and differentiation factors (GDFs), myostatins, anti-Mullerian hormone (AMH) και άλλες. Ο TGF- β και τα υπόλοιπα μέλη δρουν ως εξωκυττάριοι σηματοδότες που έχουν τη δυνατότητα μέσω ενδοκυττάρων διαμεσολαβητών να ρυθμίζουν τη μεταγραφή εκατοντάδων γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στα κύτταρα των μεταζώων συμμετέχοντας σε βασικές τους λειτουργίες όπως κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση, μετανάστευση, προσκόλληση, οργάνωση και θάνατο. Εκφράζονται από τα περισσότερα κύτταρα του οργανισμού με συγκεκριμένα ιστοειδικά πρότυπα και μπορούν να δρουν ενδοκρινώς, παρακρινώς και αυτοκρινώς. Η συμβολή τους είναι απαραίτητη τόσο στην εμβρυική ανάπτυξη όσο και στην ενήλικη ζωή και είναι αξιοσημείωτος ο πολλαπλός ρόλος που μπορεί να διαδραματίσουν στον οργανισμό. Για παράδειγμα, ο TGF- β , ένα από τα πιο μελετημένα σηματοδοτικά μόρια, ευνοεί τη μορφογένεση και την αύξηση των ιστών στο έμβρυο αλλά ενεργοποιεί κυτταροστατικές και αποπτωτικές διαδικασίες των κυττάρων σε ενήλικους ιστούς. Ουσιαστικά η ανταπόκριση του κυττάρου στη δράση του TGF- β είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από τη σχετική συγκέντρωση που βρίσκεται, τη διαφορική μεταγραφική ρύθμιση που προκαλεί και τις μη-μεταγραφικές επιδράσεις στις οποίες εμπλέκεται. Όλα αυτά επίσης εξαρτώνται από το φυσιολογικό περιβάλλον του κυττάρου και από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 60 μέλη της υπερικογένειας του TGF- β και περίπου 42 κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα (Feng & Derynck, 2005; Massague & Gomis, 2006; Massague *et al.*, 2005).

Συγκεκριμένα, ο TGF- β περιλαμβάνει τρεις ισομορφές (TGF- β 1, TGF- β 2 και TGF- β 3 με μεγέθη 390, 412 και 412 αμινοξέα αντίστοιχα) που παράγονται αρχικά ως πρόδρομες μη ενεργές πρωτεΐνες. Τα βασικά χαρακτηριστικά της πρόδρομης μορφής είναι το αμινοτελικό προπεπτίδιο, που περιλαμβάνει 20-30 αμινοξέα που δρουν ως σινιάλο για έκκριση από το κύτταρο και τη περιοχή LAP (latency associated peptide), και το καρβοξυτελικό ώριμο πολυπεπτίδιο μεγέθους 112-114 αμινοξέων. Η ενεργή μορφή του TGF- β αποτελείται από ένα διμερές μεγέθους 25 kDa που συνδέεται με

δισουλφιδικό δεσμό. Δύο αντίγραφα του προπεπτιδίου παραμένουν ενωμένα στην ώριμη μορφή του TGF- β και την καθιστούν ανενεργή σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που ονομάζεται LTBP (latent TGF- β binding complex). Στον εξωκυττάριο χώρο τα προπεπτίδια πρωτεολύονται και ενεργοποιείται ο TGF- β , με αυτή τη πρωτεόλυση να αποτελεί έναν τρόπο ρύθμισης της δράσης του (Annes *et al.*, 2003). Η ενεργή μορφή του TGF- β σταθεροποιείται από υδρόφοβους και δισουλφιδικούς δεσμούς και περιέχει πολλά συντηρημένα μοτίβα. Το πιο σημαντικό είναι 9 κυστεΐνες από τις οποίες οι 8 σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και δημιουργούν τον κυστεΐνικό κόμπο που είναι χαρακτηριστικό όλων των μελών της υπερικογένειας του TGF- β . Η ένατη κυστεΐνη σχηματίζει δισουλφιδικό δεσμό που είναι υπεύθυνος για τη σταθεροποίηση του διμερούς (Daopin *et al.*, 1992).

Σε γενικές γραμμές το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β περιλαμβάνει την πρόσδεση των συνδετών σε μεμβρανικούς υποδοχείς, την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων διαμεσολαβητών και τη ρύθμιση γονιδίων μέσω αυτών. Η πρόσδεση του TGF- β και των υπόλοιπων μελών της υπερικογένειας γίνεται σε ένα σύμπλοκο υποδοχέων που περιλαμβάνει δύο ζευγάρια υπομονάδων γνωστά ως υποδοχείς τύπου I και II. Οι δύο αυτοί τύποι υποδοχέων έχουν μία περιοχή με δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Επιπρόσθετα ο υποδοχέας I περιέχει και μια συντηρημένη περιοχή πλούσια σε γλυκίνη/σερίνη (GS). Η πρόσδεση του TGF- β επιτρέπει τη σταθεροποίηση του συμπλόκου των υποδοχέων και την φωσφορυλίωση του GS του υποδοχέα I από τον συστατικά ενεργό υποδοχέα II. Αυτό επάγει την ενεργότητα του υποδοχέα I ως κινάση σερίνης/θρεονίνης και με τη σειρά του αυτοφωσφορυλιώνεται. Ο ενεργός υποδοχέας I φωσφορυλιώνει μέσα στο κύτταρο τις ρυθμιστικές Smads (R-Smads) οι οποίες σχηματίζουν ολιγομερή με τη Smad4 (co-Smad). Οι δύο βασικοί κλάδοι σηματοδότησης χωρίζονται στον κλάδο του TGF- β και του BMP. Ο πρώτος περιλαμβάνει συνδέτες όπως οι TGF- β , activin, nodal ή myostatin και ενεργοποιεί τις Smad2/3 ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει τις BMPs και GDFs και ενεργοποιεί τις Smad1/5/8. Το σύμπλοκο των R-Smads/Co-Smad μπαίνει στο πυρήνα και έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει ρυθμιστικές αλληλουχίες σε γονίδια-στόχους και με τη βοήθεια συνενεργοποιητών ή συγκαταστολέων να ρυθμίζει τη μεταγραφή τους (Εικόνα 1) (Moustakas *et al.*, 2001; Derynck and Zhang, 2003; Shi & Massague, 2003; Feng & Derynck, 2005).



Εικόνα 1. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της υπερικογένειας του TGF-β. (A) Οι συνδέτες του TGF-β σχηματίζουν σύμπλοκο με το ετεροτετραμερές των υποδοχών τύπου I και II. (B) Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει τις R-Smads οποίες ολιγομερίζονται με την Smad4 και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων στο πυρήνα. Οι διαμεσολαβητές του TGF-β είναι οι Smad2/3 και των BMPs οι Smad1/5/8 (<http://info.med.yale.edu/obgyn/reproimmuno/courses/class4/sld020.htm> by Dr. Gil Mor).

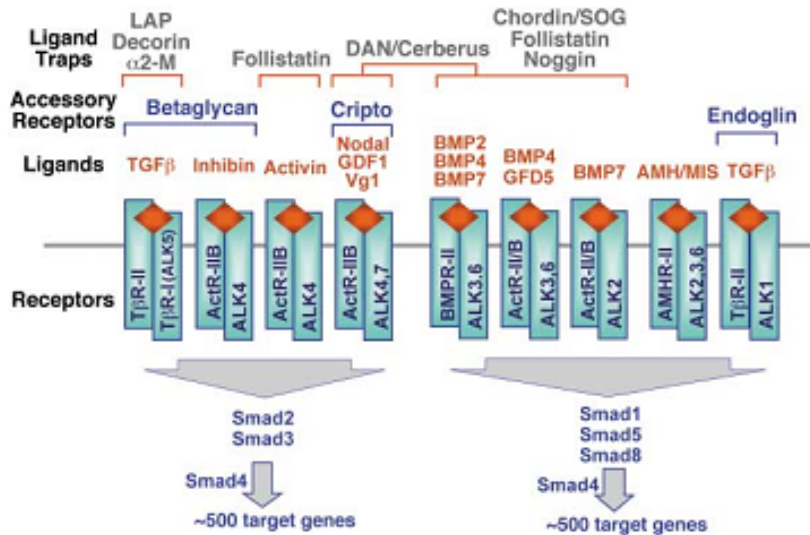
Αν και οι Smad πρωτεΐνες αποτελούν τον κύριο διαμεσολαβητή στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β, έχουν αναφερθεί και άλλοι διαμεσολαβητές όπως οι κινάσες ERK, JNK, p38, PI3K, οι φωσφατάσες PP2A και μέλη της οικογένειας των Rho πρωτεϊνών (Moustakas & Heldin; 2005; Derynck & Zhang, 2003). Αυτά τα εναλλακτικά μονοπάτια, σε συνδυασμό με τις συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων στα ολιγομερή σύμπλοκα και με τον μεγάλο αριθμό των μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν οι Smads συμβάλουν στην μεγάλη ποικιλία των κυτταρικών αποκρίσεων του TGF-β. Το εκπληκτικό βέβαια αλλά ακόμη αναπάντητο ερώτημα είναι πως μέσω του TGF-β μπορούν και ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται ταυτόχρονα εκατοντάδες γονίδια στο ίδιο κύτταρο και μάλιστα κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες.

B. ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΙΚΕΓΕΝΕΙΑΣ ΤΟΥ TGF- β ΚΑΙ Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥΣ

Όπως προαναφέρθηκε υπάρχουν δύο τύποι υποδοχέων (I και II) των οποίων βασικό χαρακτηριστικό είναι ότι έχουν ενεργότητα κινασών σερίνης/θρεονίνης. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί στα θηλαστικά 7 υποδοχείς τύπου I (ALK 1-7: Activin receptor like kinases) και 5 υποδοχείς τύπου II (ActRII, ActRIIB, T β RII, BMPRII και AMHRII). Οι υποδοχείς I και II είναι γλυκοπρωτεΐνες με μέγεθος 55 και 70 kDa αντίστοιχα και εκτείνονται σε όλο το μήκος της πλασματικής μεμβράνης σχηματίζοντας ομοδιμερή μεταξύ τους. Η πρόσδεση κάποιου συνδέτη έχει ως αποτέλεσμα να σταθεροποιούνται και να σχηματίζουν ένα ετεροτετραμερές. Το τελικό σύμπλοκο λοιπόν αποτελείται από το συνδέτη και από τέσσερις υποδοχείς (ετεροτετραμερές) που ανά δύο σχηματίζουν ομοδιμερή. Οι τρόποι με τους οποίους μπορούν να συνδυαστούν παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία προσφέροντας ευελιξία στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Οι κύριοι συνδυασμοί περιλαμβάνουν την οικογένεια των TGF- β s να ενεργοποιεί τον ολιγομερισμό των T β RII/ALK5, οι activins τους ActRII, IIB/ALK4, οι nodals τους ActRII, IIB/ALK7 και οι BMPs, GDFs και AMH τους BMPRII, ActRII,IIB, AMHRII/ALK1,2,3,6 (Εικόνα 2) (Feng & Derynck, 2005). Υπάρχουν όμως και δευτερεύοντες εναλλακτικοί συνδυασμοί που προσδίδουν ακόμη μεγαλύτερη ποικιλία όπως για παράδειγμα η ανταγωνιστική δράση του ALK1 απέναντι στον ALK5 για πρόσδεση στον T β RII (Goumans *et al.*, 2003).

Η προσέγγιση των δύο τύπων υποδοχέων διαφέρει ανάμεσα στους δύο βασικούς κλάδους σηματοδότησης των TGF- β s/activins και των BMPs. Στην πρώτη περίπτωση οι συνδέτες TGF- β και activin αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα τύπου II αλλά όχι με τον υποδοχέα τύπου I. Μόλις δημιουργηθεί ένα ισχυρό σύμπλοκο μεταξύ του συνδέτη και του υποδοχέα τύπου II, τότε μπορεί να έρθει και να ενσωματωθεί σε αυτό και ο υποδοχέας τύπου I (Massague, 1998; Hart *et al.*, 2002). Η ενσωμάτωση του υποδοχέα τύπου I στο σύμπλοκο γίνεται είτε επειδή οι συνδέτες αλλάζουν στερεοδιαμόρφωση όταν προσδένονται στον υποδοχέα τύπου II και αποκαλύπτουν περιοχές πρόσδεσης για τον υποδοχέα τύπου I, είτε επειδή ο υποδοχέας αναγνωρίζει μία ευρύτερη περιοχή πρόσδεσης που περιλαμβάνει τόσο τον συνδέτη όσο και τον υποδοχέα τύπου II (Hart *et al.*, 2002). Αντίθετα στην περίπτωση των BMPs η

πρόσδεση γίνεται πρώτα στον υποδοχέα τύπου I και αυτό το σύμπλοκο μπορεί με τη σειρά του να ενσωματώσει και τον υποδοχέα τύπου II (Kirsch *et al.*, 2000).



Εικόνα 2. Οι υποδοχείς της υπερικογένειας του TGF-β. Η δράση των υποδοχέων ρυθμίζεται στον εξωκυττάριο χώρο από διάφορους παράγοντες που μπορεί είτε να βοηθούν είτε να εμποδίζουν την πρόσδεση των συνδετών στους υποδοχείς (Shi & Massague, 2003).

Όπως προαναφέρθηκε οι δύο τύποι υποδοχέων περιέχουν ενδοκυττάριας περιοχές που τους επιτρέπουν να λειτουργήσουν ως κινάσες σερίνη/θρεονίνης. Οι κινάσες είναι μονίμως ενεργές στον υποδοχέα τύπου II αλλά όχι στον υποδοχέα τύπου I. Η δημιουργία του ετεροτετραμερούς των υποδοχέων δίνει τη δυνατότητα στον υποδοχέα τύπου II να φωσφορυλιώσει την περιοχή του GS στον υποδοχέα τύπου I. Η περιοχή GS, χαρακτηριστική μόνο του υποδοχέα τύπου I, βρίσκεται μέσα στο κύτταρο, αμινοτελικά της περιοχής της κινάσης και περιέχει σερίνες και θρεονίνες στο μοτίβο TTSGSGSG. Η φωσφορυλίωσή της από τον υποδοχέα τύπου II ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I που αποκτά και αυτός ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Massague, 1998). Το αποτέλεσμα είναι αφενός η απομάκρυνση

των αναστολέων FKBP12 και FKBP12.6 που προσδέονται στη μη φωσφορυλιωμένη GS και εμποδίζουν τη σηματοδότηση του TGF-β και αφετέρου η ικανότητα του υποδοχέα να προσδέσει στο GS και να φωσφορυλιώσει τις R-Smads (Huse *et al.*, 2001).

Η σηματοδότηση του TGF-β μπορεί να ρυθμιστεί στον εξωκυττάριο χώρο από μια ποικιλία παραγόντων (Εικόνα 2). Καταρχήν υπάρχουν τα LAP προπεπτίδια του TGF-β που όπως προαναφέρθηκε τον καθιστούν ανενεργό. Επιπρόσθετα όμως υπάρχουν και άλλοι ανταγωνιστές του TGF-β όπως οι decorin, α2-macroglobulin, follistatin, noggin, chordin/SOG και DAN/Cerberus. Ο μηχανισμός λειτουργίας τους είναι να προσδέουν τους συνδέτες, να εμποδίζουν τη σύνδεσή τους στους υποδοχείς και έτσι να μπλοκάρουν το σηματοδοτικό μονοπάτι. Οι decorin και α2-macroglobulin προσδέουν τον TGF-β, η follistatin τις activins και τις BMPs και οι noggin, chordin/SOG και DAN/Cerberus επίσης τις BMPs. Η λειτουργία τους είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον οργανισμό. Για παράδειγμα, έχει δείχτεί ότι η ταυτόχρονη απώλεια των noggin, follistatin και chordin από το έμβρυο του *Xenopus* δημιουργεί σοβαρά προβλήματα στην μορφογένεση (Khokha *et al.*, 2005). Ένας άλλος τρόπος παρεμπόδισης του μονοπατιού στον εξωκυττάριο χώρο γίνεται από τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη BAMBI (BMP and Activin receptor membrane bound inhibitor). Η BAMBI παρουσιάζει 53% ομοιότητα με τον ALK3 στο *Xenopus* αλλά δεν έχει την περιοχή με ενεργότητα κινάσης. Ο τρόπος που δρα είναι να ανταγωνίζεται με τον ALK3 στη δημιουργία του ετεροτετραμερούς υποδοχέα με το συνδέτη (Onichtchouk *et al.*, 1999). Ακόμη, υπάρχουν διαλυτές μορφές των υποδοχέων τύπου I και II που μπορεί να προσδέσουν τους συνδέτες και να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση τους με τις διαμεμβρανικές μορφές των υποδοχέων λειτουργώντας έτσι αρνητικά στη σηματοδότηση (Natsume *et al.*, 1997, Lin *et al.*, 1995). Από την άλλη μεριά υπάρχουν και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που βοηθούν στην πρόσδεση των συνδετών στους υποδοχείς (Εικόνα 2). Αυτές είναι οι betaglycan, endoglin, cripto, CTGF και DRAGON. Η betaglycan (ή αλλιώς TGF-β υποδοχέας τύπου III) βοηθά την πρόσδεση του TGF-β στον TβRII και των inhibins στον ActRII, IIB (Massague, 1998). Ιδιαίτερα στην περίπτωση των inhibins και του TGF-β2 έχει σημαντικό ρόλο καθώς αυτές δεν παρουσιάζουν από μόνες τους ισχυρή έλξη προς τον υποδοχέα. Η endoglin έχει παρόμοιο ρόλο με τη betaglycan και στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων προάγει την αλληλεπίδραση TGF-β/ALK1 αντί για TGF-β/ALK5 προκαλώντας αυξημένη αγγειογένεση και κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Lebrin *et al.*,

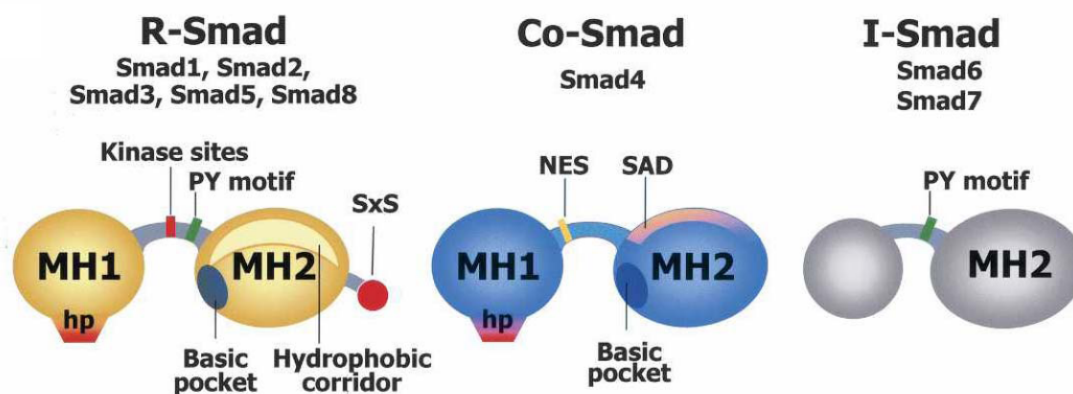
2005). Η cripto παράγεται ως εκκρινόμενη αλλά και ως μεμβρανική πρωτεΐνη και βοηθά την αλληλεπίδραση των Nodal, Vg1 και GDF1 στους ActRII, IIB (Cheng *et al.*, 2003). Η CTGF έχει το διπλό ρόλο να ευνοεί την πρόσδεση του TGF-β στους υποδοχείς του αλλά ταυτόχρονα να εμποδίζει τη πρόσδεση του BMP4 (Abreu *et al.*, 2002). Τέλος η DRAGON προσδένεται στις BMP2, BMP4, ALK2, ALK3, ALK6, ActRII και ActRIIB και ενισχύει την σηματοδότηση από τις BMPs (Samad *et al.*, 2005).

Γ. ΟΙ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Η ΔΟΜΗ ΤΟΥΣ

Οι Smad πρωτεΐνες έχουν μέγεθος περίπου ~500 αμινοξέα και αποτελούν τους κύριους διαμεσολαβητές του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β. Στον ανθρώπινο οργανισμό κωδικοποιούνται 8 Smad πρωτεΐνες και αυτές είναι οι Smad1-8. Οι Smad1/2/3/5/8 είναι οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες R-Smads (Regulatory Smads) και ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση από του υποδοχείς της υπεροικογένειας του TGF-β. Οι Smad1/5/8 συμμετέχουν στη σηματοδότηση των BMPs/GDFs/AMH ενώ οι Smad2/3 στη σηματοδότηση των TGF-βs/activins/nodals. Η Smad4 ή co-Smad ολιγομερίζεται με τις ενεργοποιημένες R-Smads και σχηματίζει με αυτές ένα σύμπλοκο που είναι απαραίτητο για τη Smad-επαγόμενη μεταγραφή. Οι Smad6/7 είναι γνωστές και ως I-Smads (Inhibitory Smads) και έχουν την ικανότητα να διακόπτουν το σηματοδοτικό μονοπάτι.

Οι Smads απαρτίζονται από τις περιοχές MH1 και MH2 που συνδέονται μεταξύ τους από την περιοχή του linker (Shi & Massague, 2003). Η αμινοτελική MH1 περιοχή είναι πολύ συντηρημένη μεταξύ των R-Smads και της Smad4, αλλά δεν υπάρχει στις I-Smads, και μπορεί να προσδένεται στο DNA μέσω μίας δομής β-φουρκέτας που σχηματίζει. Πρέπει να σημειωθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της Smad2 παράγεται σε μια ισομορφή που δεν προσδένεται άμεσα στο DNA εξαιτίας ενός ενθέματος στην MH1 που κωδικοποιείται από το εξώνιο 3. Αντίθετα η ισομορφή της Smad2 που δεν περιέχει αυτό το ένθεμα (Smad2ΔE3) μπορεί να προσδένεται άμεσα στο DNA. Η MH2 περιοχή είναι επίσης πολύ συντηρημένη μεταξύ των Smads

και έχει πολλαπλές λειτουργίες. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της MH2 των R-Smads είναι το καρβοξυτελικό μοτίβο SXS που φωσφορυλιώνεται από τους υποδοχείς με αποτέλεσμα την ενεργοποίησή τους. Επίσης χάρη σε αυτό το φωσφορυλιωμένο μοτίβο η Smad4 αναγνωρίζει τις R-Smads και ολιγομερίζεται με αυτές. Για τις δύο παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι απαραίτητη μια σειρά από βασικά αμινοξέα που βρίσκονται στην MH2. Η MH2 περιλαμβάνει επίσης αλληλουχίες, που σχηματίζουν τον «υδροφοβικό διάδρομο», για την αλληλεπίδραση με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την παραμονή των Smads στο κυτταρόπλασμα, με τις νουκλεοπορίνες για την εισαγωγή τους στο πυρήνα και με συμπαράγοντες πρόσδεσης στο DNA. Η περιοχή SAD (Smad activation domain) που εκτείνεται μερικώς στο MH2 και στον linker βοηθά στην αλληλεπίδραση με μεταγραφικούς παράγοντες. Τέλος, ο linker είναι λιγότερο συντηρημένος μεταξύ των Smads και στις R-Smads και I-Smads περιέχει το μοτίβο PY που αποτελεί σημείο πρόσδεσης για τις λιγάσες ουβικιτίνης Smurf (Smad ubiquitination-related factor). Ο linker των R-Smads περιέχει επίσης πολλά σημεία φωσφορυλίωσης από διάφορες κινάσες όπως MAPKs και CDKs ενώ στο linker της Smad4 υπάρχει σινιάλο εξόδου από τον πυρήνα (NES: Nuclear export signal) (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. Η δομή των Smad πρωτεϊνών (Massague *et al.*, 2005).

Δ. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΥΡΗΝΙΚΗ ΘΕΣΗ ΤΩΝ SMADS

Οι R-Smads ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς, ολιγομερίζονται με τη Smad4 και ρυθμίζουν τη μεταγραφή στο πυρήνα. Επομένως η θέση τους είναι τόσο στο πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Στη βασική τους κατάσταση όπου το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β είναι ανενεργό βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα (Pierreux *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000). Γι' αυτό ευθύνονται κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις R-Smads και τις διατηρούν στο κυτταρόπλασμα. Από αυτές, η πρωτεΐνη SARA (Smad anchor for receptor activation) είναι από τις πιο μελετημένες και αλληλεπιδρά με τις Smad2/3 (Tsukazaki *et al.*, 1998). Η SARA περιέχει την αλληλουχία πρόσδεσης σε λιπίδια FYVE που την οδηγεί στα ενδοσώματα (Di Guglielmo *et al.*, 2003). Επίσης περιέχει μία αλληλουχία πρόσδεσης στις Smads (SBD: Smad binding domain) που αλληλεπιδρά με τον «υδροφοβικό διάδρομο» της MH2 περιοχής των Smad2/3 (Wu *et al.*, 2000). Επειδή η ίδια περιοχή της MH2 χρησιμοποιείται για αλληλεπίδραση με τις νουκλεοπορίνες και μεταγραφικούς συμπράγοντες, το σύμπλοκο Smad2/3-SARA δε μπορεί να μεταβεί στο πυρήνα και να σχηματίσει μεταγραφικά σύμπλοκα (Randall *et al.*, 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι Smads μπορούν να μπουν με δύο τρόπους στο πυρήνα. Πρώτον, αλληλεπιδρούν κατευθείαν με τις νουκλεοπορίνες τόσο για να εισαχθούν στο πυρήνα όσο και για να εξαχθούν από αυτόν (Xu *et al.*, 2002). Δεύτερον, έχουν μια περιοχή στο MH1 που μοιάζει με NLS (Nuclear localization signal) και επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους με ιμπορτίνες (εκτός από τη Smad2 εξαιτίας του ενθέματος από το εξώνιο 3) για την εισαγωγή στον πυρήνα (Kurisaki *et al.*, 2001). Η αλληλεπίδραση με τις νουκλεοπορίνες είναι σαφέστατα πιο διαδεδομένη ενώ η εισαγωγή μέσω ιμπορτινών χρησιμοποιείται πολύ λιγότερο (Xu *et al.*, 2003). Όταν το SXS είναι φωσφορυλιωμένο η SARA δεν προσδένεται αποτελεσματικά στις Smads2/3 με αποτέλεσμα να μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις νουκλεοπορίνες και να εισέλθουν στο πυρήνα (Wu *et al.*, 2001). Παράλληλα η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων FoxH και Mixer στον «υδροφοβικό διάδρομο» των Smad2/3 παρατείνουν την παραμονή τους στο πυρήνα (Xu *et al.*, 2002). Η αποφωσφορυλίωση του SXS επιτρέπει την αποσύνδεση των μεταγραφικών συμπλόκων από τις Smad2/3 και την εξαγωγή τους από τον πυρήνα (Inman *et al.*, 2002).

Η Smad4 στη βασική της κατάσταση βρίσκεται εξίσου στο πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα (Pierreux *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000). Οι ενεργοποιημένες R-Smads δημιουργούν ολιγομερή με τη Smad4 και μεταβαίνουν στον πυρήνα (Chacko *et al.*, 2004). Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη εάν τα ολιγομερή των R-Smads/Smad4 σχηματίζονται στο κυτταρόπλασμα ή στο πυρήνα μετά την εισαγωγή των R-Smads και πιθανόν αυτό να διαφέρει ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο κύτταρο. Το σίγουρο είναι ότι όταν το σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ενεργό τότε η Smad4 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου. Σε αντίθεση με τις Smad2/3, η Smad4 περιέχει NES στον linker που αναγνωρίζεται από την CRM1, μια πρωτεΐνη που ο ρόλος της είναι να εξάγει άλλες από το πυρήνα. Η CRM1 λοιπόν μπορεί να εξάγει τη Smad4 από τον πυρήνα εκτός αν αυτή είναι σε σύμπλοκο με τις R-Smad που τότε η CRM1 δεν έχει πρόσβαση στο NES. Όταν οι R-Smads αποφωσφορυλιωθούν στο SXS, η Smad4 δεν σχηματίζει πια σύμπλοκο μαζί τους και μπορεί να βγει από το πυρήνα (Pierreux *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2000; Inman *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005).

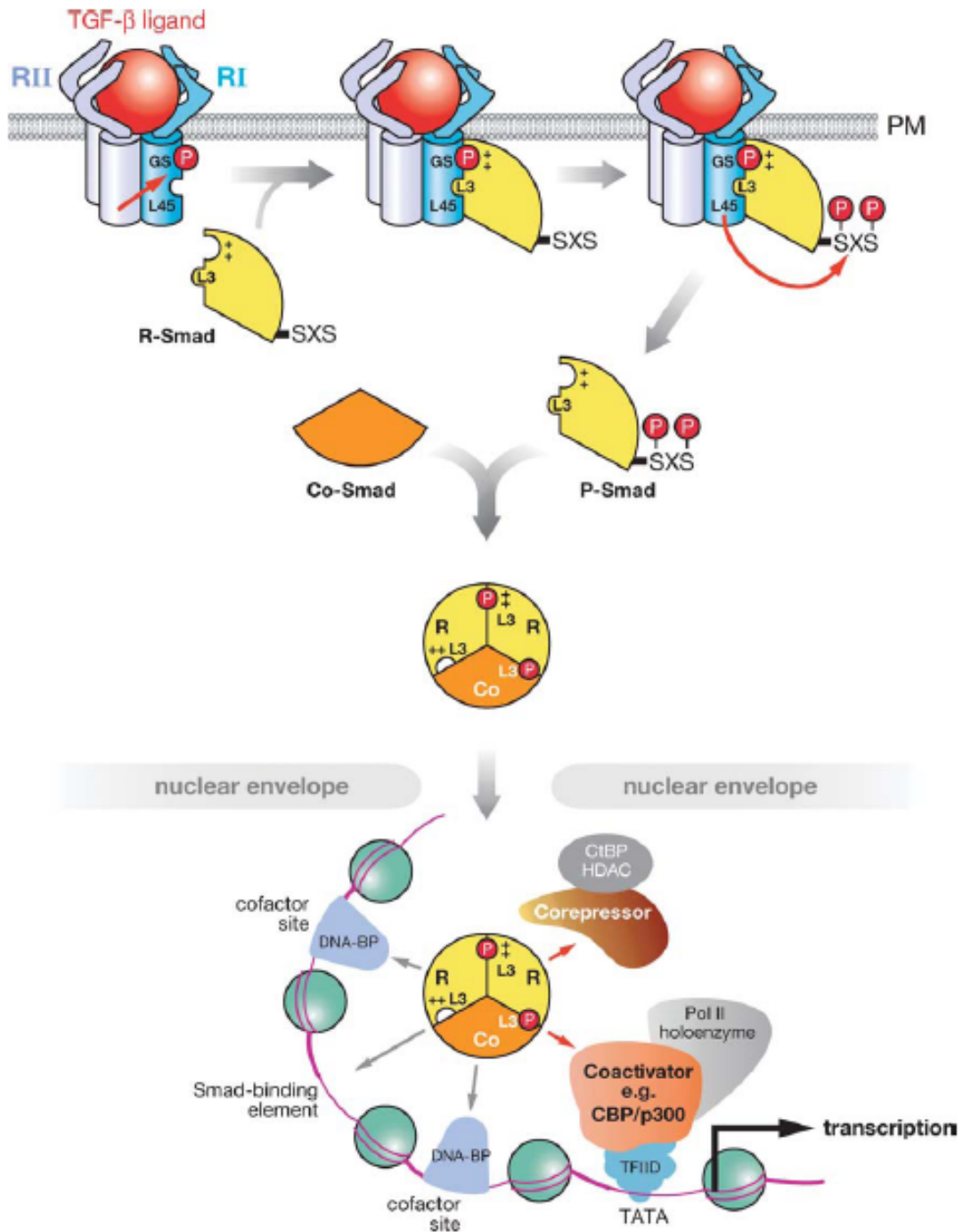
Το συμπέρασμα είναι ότι τον κυριότερο ρόλο για την θέση των Smads μέσα στο κύτταρο παίζει η φωσφορυλίωση του SXS των R-Smads. Όταν το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β είναι ενεργό τότε οι Smads βρίσκονται στο πυρήνα καθώς ο στόχος τους είναι η ρύθμιση της μεταγραφής συγκεκριμένων γονιδίων. Σε αντίθετη περίπτωση δεν χρειάζεται να βρίσκονται στο πυρήνα επομένως διατηρούνται στο κυτταρόπλασμα.

E. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΟΛΙΓΟΜΕΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ SMADS

Η ενεργοποίηση των μη φωσφορυλιωμένων R-Smads ξεκινά με την πρόσδεσή τους στη GS περιοχή του ενεργού υποδοχέα τύπου I (Huse *et al.*, 2001). Ο υποδοχέας φωσφορυλιώνει τις R-Smads στο SXS με αποτέλεσμα την αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση των R-Smads και την αποσυμπλοκή τους από τον υποδοχέα. Οι Smad2/3 φωσφορυλιώνονται από τους ALK4/5/7 και οι Smad1/5/8 από τους ALK1/2/3/6. Αυτή η ειδικότητα έγκειται σε χαρακτηριστικές δομές τόσο στους υποδοχείς τύπου I όσο και στην περιοχή MH2 των R-Smads που ονομάζονται

βρόγχοι L45 και L3 αντίστοιχα (Εικόνα 4). Ο βρόγχος L45 βρίσκεται στην περιοχή της κινάσης του υποδοχέα τύπου I και περιλαμβάνει 9 αμινοξέα. Η αλληλουχία του L45 διαφέρει μεταξύ των υποδοχέων τύπου I και προσφέρει την ειδικότητα απέναντι στην Smad που θα ενεργοποιηθεί. Έτσι, οι ALK4 και ALK5 έχουν πανομοιότυπο L45 που όμως διαφέρει κατά 4 αμινοξέα από τον L45 των ALK3/6 και κατά 7 αμινοξέα από τον L45 των ALK1/2 (Chen et al., 1998a). Μάλιστα ένας ALK5 που περιέχει τον L45 ενός ALK6 μπορεί να ενεργοποιήσει τις Smad1/5/8 και αντίστροφα ένας ALK6 με τον L45 ενός ALK5 μπορεί να ενεργοποιεί τις Smad2/3 (Chen et al., 1998a). Παρόμοια στοιχεία ισχύουν και για το βρόγχο L3 που βρίσκεται στην MH2 των R-Smads. Η αλληλουχία του L3 μεταξύ των Smad2/3 είναι ίδια ενώ και μεταξύ των Smad1/5/8 είναι ίδια. Τώρα οι L3 μεταξύ των δύο αυτών ομάδων διαφέρουν σε 2 αμινοξέα. Επίσης μια μεταλλαγμένη Smad1 που φέρει τον L3 της Smad2 αλληλεπιδρά με τον ALK5 και μια μεταλλαγμένη Smad2 που περιέχει τον L3 της Smad1 δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον ALK5 (Lo et al., 1998). Για την σταθεροποίηση βέβαια του συμπλόκου υποδοχέα-Smad είναι απαραίτητες και γειτονικές αλληλουχίες του L3 που αλληλεπιδρούν με το GS του υποδοχέα (Lo et al., 1998). Ορισμένες πρωτεΐνες έχουν προταθεί ότι παίζουν βοηθητικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των Smads με τους υποδοχείς. Για παράδειγμα η SARA εκτός του ότι διατηρεί τις R-Smads στο κυτταρόπλασμα, υποβοηθά και την αλληλεπίδρασή τους με τους υποδοχείς (Tsukazaki et al., 1998). Η Dab2 (Disabled-2) σταθεροποιεί την αλληλεπίδραση του ALK5 με τις Smad2/3 και η απουσία της καθιστά τα κύτταρα λιγότερο ευαίσθητα στον TGF-β (Hocenaar et al., 2001). Τέλος η Dok-1 αλληλεπιδρά με τη Smad3 και ίσως βοηθά την ενεργοποίηση μέσω activins (Yamakawa et al., 2002).

Η Smad4 αναγνωρίζει το φωσφορυλιωμένο SXS των R-Smads και ολιγομερίζεται με αυτά (Εικόνα 4). Ο ολιγομερισμός με την Smad4 είναι μάλλον περισσότερο αναγκαίος για την δημιουργία μεταγραφικών συμπλόκων παρά για την εισαγωγή των R-Smads στο πυρήνα. Η Smad4 είναι απαραίτητη σε όλες τις περιπτώσεις μεταγραφικής ρύθμισης από τις Smads αν και ο πιο σοβαρός *Smad2^{-/-}* φαινότυπος σε σχέση με τον *Smad4^{-/-}* στα ποντίκια ίσως υποδηλώνει την ικανότητα ρύθμισης απουσία της Smad4 (Chu et al., 2004). Η στοιχειομετρία του συμπλόκου δεν είναι ξεκάθαρη με επικρατέστερη να είναι αυτή των τριμερών δηλαδή 2 R-Smads με μία Smad4. Οι R-Smads μπορεί να είναι ίδιες (π.χ. Smad3/Smad3 ή Smad1/Smad1) ή διαφορετικές (π.χ. Smad3/Smad2, Smad1/Smad5 ή πιθανόν και Smad1/Smad3).



Εικόνα 4. Η ενεργοποίηση των R-Smads από του υποδοχείς και ο ολιγομερισμός τους με τη Smad4. Η αμοιβαία αναγνώριση των R-Smads με τους υποδοχείς γίνεται μέσω των βρόγχων L45 και L3. Οι φωσφορυλιωμένες στο SXS R-Smads ολιγομερίζονται με τη Smad4 και μεταβαίνουν στον πυρήνα για να ρυθμίσουν την μεταγραφή διαφόρων γονιδίων (Feng & Derynck, 2005).

Για τη σταθεροποίηση του συμπλόκου είναι απαραίτητη η φωσφορυλιωμένη SXS και ο βρόγχος L3 της MH2 περιοχής (Chacko *et al.*, 2001, 2004). Εκτός από τα τριμερή έχουν γίνει αναφορές και για διμερή κυρίως μεταξύ Smad2/Smad4 ενώ έχουν εντοπιστεί τόσο διμερή όσο και τριμερή Smads στους υποκινητές γονιδίων (Inman & Hill, 2002). Το συμπέρασμα είναι ότι η πολυπλοκότητα που παρουσιάζει το τριμερές αλλά και η ύπαρξη διμερών ίσως έχει να κάνει με το γονίδιο-στόχο ή τους εκάστοτε μεταγραφικούς συμπαράγοντες και υποδηλώνει μία ευελιξία και ποικιλία στην δυνατότητα της μεταγραφικής ρύθμισης από τις Smads.

ΣΤ. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΤΙΣ SMADS

Το σύμπλοκο R-Smads/Smad4 επιστρατεύει διάφορους συμπαράγοντες στον πυρήνα και ρυθμίζει την καταστολή ή την ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων. Για την πρόσδεση στο DNA είναι απαραίτητη η περιοχή MH1. Οι Smad4 και όλες οι R-Smads έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA με εξαίρεση την μεγάλη ισομορφή της Smad2 που περιέχει το εξόνιο 3. Αν και η Smad2ΔE3 μπορεί να προσδένεται άμεσα στο DNA, παράγεται σε πολύ μικρότερες ποσότητες από την Smad2 στα κύτταρα. Παρόλα αυτά η Smad2ΔE3 είναι απαραίτητη στον οργανισμό και είναι χαρακτηριστικό ότι ενώ τα *Smad2*^{-/-} ποντίκια παρουσιάζουν θνησιγενή εμβρυικό φαινότυπο, τα διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν μόνο τη Smad2ΔE3 ισομορφή επιζούν και είναι γόνιμα (Dunn *et al.*, 2005). Πιθανολογείται πάντως ότι το σύμπλοκο Smad2/Smad4 μπορεί να προσδεθεί στο DNA μέσω της Smad4. Το πιο χαρακτηριστικό στοιχείο πρόσδεσης στο DNA που αναγνωρίζεται από την MH1 των Smads (SBE: Smad-binding element) είναι το 5'-CAGAC-3'. Το στοιχείο αυτό περιέχεται σε ένα ή περισσότερα αντίτυπα στους υποκινητές των γονιδίων που ρυθμίζονται από τις Smads (Shi *et al.*, 1998). Επειδή η εγγενής δυνατότητα των Smads να προσδένονται στο DNA είναι χαμηλή, χρειάζεται η ύπαρξη πολλαπλών SBEs που ενισχύουν την πρόσδεση. Όμως ακόμη και όταν υπάρχουν μέχρι και 4 SBEs είναι απαραίτητη η παρουσία συμπαράγοντων στο σύμπλοκο R-Smads/Smad4 για αποτελεσματική πρόσδεση στο DNA (Seoane *et al.*, 2004). Τόσο η ύπαρξη

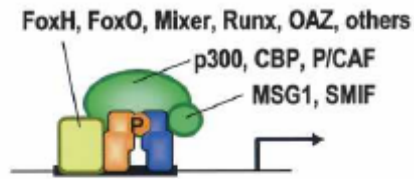
πολλαπλών SBEs αλλά και η συμμετοχή διαφόρων συμπαραγόντων πρόσδεσης προσφέρει τη δυνατότητα της ρύθμισης πολλαπλών γονιδίων από τις Smads. Εκτός όμως από το 5'-CAGAC-3' έχουν βρεθεί και άλλα στοιχεία πρόσδεσης των Smads όπως το 5'-GGCTT-3' αλλά και περιοχές πλούσιες σε GC (Chen *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003a). Ορισμένες φορές μάλιστα έχουμε την συνύπαρξη αυτών των αλληλουχιών με το CAGAC σε έναν υποκινητή (Kang *et al.*, 2003a).

Η πρόσδεση διαφόρων συμπαραγόντων στο σύμπλοκο των R-Smads/Smad4 εκτός του ότι προσφέρει καλύτερη πρόσδεση στο DNA, δίνει τη δυνατότητα ποικίλης μεταγραφικής ρύθμισης. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι ανάλογα με τους συμπάροντες που έχουν προσδεθεί ρυθμίζονται διαφορετικά γονίδια ή ομάδες γονιδίων. Η ποικιλία αυτή προσφέρεται σε 4 επίπεδα. Πρώτον, στο επίπεδο του γονιδίου, διαφορετικοί συμπάροντες αναγνωρίζουν και διαφορετικά στοιχεία πρόσδεσης στο DNA όπως αυτά που αναφέρθηκαν πιο πάνω. Δεύτερον, στο επίπεδο του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smads, διαφορετικοί συμπάροντες αναγνωρίζουν και διαφορετικά ολιγομερή των Smads (π.χ. Smad1/Smad5/Smad4 ή Smad3/Smad3/Smad4). Τρίτον, στο επίπεδο του κυττάρου, παράγονται διαφορετικοί συμπάροντες από κύτταρο σε κύτταρο διαφοροποιώντας έτσι την μεταγραφή γονιδίων ανάλογα με το κυτταρικό τύπο. Τέταρτο, στο επίπεδο της μεταγραφής, οι συμπάροντες μπορεί είτε να επάγουν είτε να καταστείλουν την έκφραση ενός γονιδίου. Από τους πιο γνωστούς μεταγραφικούς συμπάροντες των Smads για την πρόσδεσή τους στο DNA είναι η οικογένεια πρωτεϊνών forkhead. Από αυτές η FoxH1 αλληλεπιδρά με την MH2 της Smad2 στο σύμπλοκο FoxH1/Smad2/Smad4 το οποίο με τη σειρά του προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *Mix2* και ρυθμίζει την μεταγραφή του (Chen *et al.*, 1997). Επίσης οι FoxO1, FoxO3 και FoxO4 συνδέονται με το MH1 της Smad3 και ενεργοποιούν ορισμένα γονίδια όπως το *p21^{Cip1}* (Seoane *et al.*, 2004) ενώ παρουσία και του C/EBPβ ενεργοποιούν διαφορετικά γονίδια όπως το *p15^{INK4β}* (Gomis *et al.*, 2006a,b). Άλλα γνωστά σύμπλοκα είναι το OAZ/Smad1/Smad4 που ενεργοποιεί το γονίδιο *Vent2* στο *Xenopus* (Hata *et al.*, 2000), τα σύμπλοκα της οικογένεια των RUNX παραγόντων όπως το Runx/Smad2,3/Smad4 που ρυθμίζει το *IgCa* (Zhang & Derynck, 2000), τα E2F/Smad3/Smad4 που καταστέλλουν το *c-Myc* στα επιθηλιακά κύτταρα (Chen *et al.*, 2002) και το ATF3/Smad3/Smad4 που καταστέλλει το *Id1* (Kang *et al.*, 2003a) (Εικόνα 5, 6).

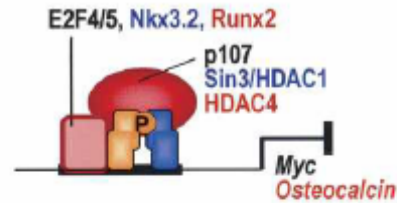
Εκτός από τους συμπαραγόντες πρόσδεσης στο DNA που αναφέρθηκαν πιο πάνω, υπάρχουν και άλλοι που δρουν ως συνενεργοποιητές για τη μεταγραφή γονιδίων. Οι γενικοί συνενεργοποιητές p300 και CBP αλληλεπιδρούν με τις Smad1/2/3/4 στην MH2 περιοχή και επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων πιθανόν προκαλώντας ανακατατάξεις στη χρωματίνη (Massague & Wotton, 2000) (Εικόνα 6). Επίσης είναι αξιοσημείωτη η συνεργασία στην σηματοδότηση των BMP2 και LIF (leukemia inhibitor factor) μέσω του p300. Συγκεκριμένα, οι διαμεσολαβητές τους Smad1 και STAT3 προσδένονται συνεργατικά σε διαφορετικά σημεία του p300 και επάγουν τη μεταγραφή του *Gfap* (glial fibrillary acidic protein) για την διαφοροποίηση των αστροκυττάρων (Nakashima *et al.*, 1999). Άλλοι γενικοί συνενεργοποιητές είναι ο P/CAF που συνδέεται με τους p300/CBP και με την MH2 περιοχή των R-Smads (Itoh *et al.*, 2000) αλλά και ο ARC105 που αλληλεπιδρά επίσης με την MH2 (Kato *et al.*, 2002). Υπάρχουν βέβαια και πιο ειδικοί συνενεργοποιητές για τις Smads όπως ο SMIF και ο Swift που σε αντίθεση με τους παραπάνω έχουν αυτό το ρόλο μόνο όταν συνδυάζονται αποκλειστικά με τις Smads (Shimizu *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2002).

Από την άλλη μεριά το σύμπλοκο R-Smads/Smad4 επιστρατεύει και συγκαταστολείς για την απενεργοποίηση γονιδίων και μάλιστα η καταστολή γονιδίων αποτελεί περίπου το 25% των μεταγραφικών ρυθμίσεων από τις Smads. Η καταστολή του *c-Myc* είναι από τις πιο σημαντικές στο κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGF-β. Στην περίπτωση αυτή σχηματίζεται σύμπλοκο μεταξύ των Smad3 και Smad4, του E2F4 συμπαραγόντα πρόσδεσης στο DNA και του συγκαταστολέα p107 και αναγνωρίζεται η περιοχή TIE (TGF-β inhibitory element) στον υποκινητή του *c-Myc* (Chen *et al.*, 2002). Το γονίδιο *Id1* καταστέλλεται από το σύμπλοκο ATF3/Smad3/Smad4 με την ATF3 να λειτουργεί ταυτόχρονα ως συμπαραγόντας πρόσδεσης στο DNA και ως συγκαταστολέας (Kang *et al.*, 2003a). Η καταστολή γίνεται σε δύο βήματα καθώς με το ερέθισμα από τον TGF-β αυξάνονται πρώτα τα επίπεδα της ATF3 και στη συνέχεια καταστέλλεται το *Id1* (Εικόνα 5). Ομοίως υπάρχουν και συγκαταστολείς στη σηματοδότηση των BMPs όπως ο Nkx3.2 (προσδένεται και στο DNA) που αλληλεπιδρά με τα σύμπλοκα Smad1/Smad4 και mSin3/HDAC, ρυθμίζοντας τη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, και ο Schnurri που αλληλεπιδρά με τις Smad1/Smad4 στη *Drosophila* για την καταστολή του *Brinker* (Muller *et al.*, 2003) (Εικόνα 5, 6).

A. Primary Activation

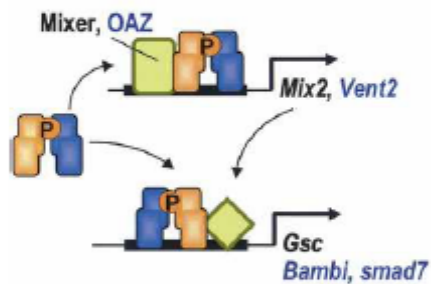


B. Primary Repression

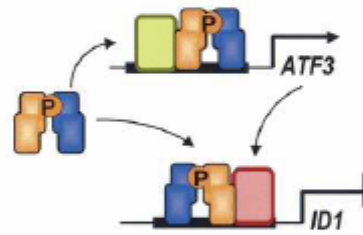


C. Self-Enabling Gene Responses

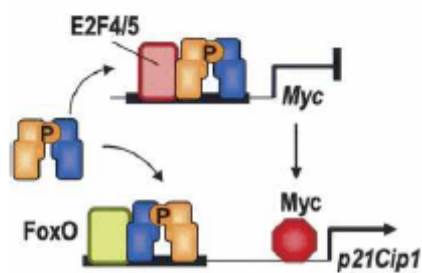
1. Induction of activator cofactor



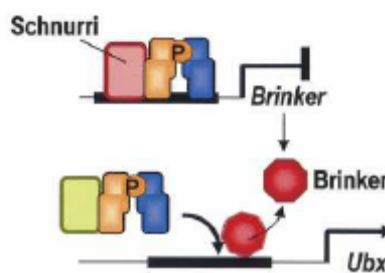
2. Induction of repressor cofactor



3. Repression of an opponent



4. Repression and eviction of opponent



Εικόνα 5. Μοντέλα μεταγραφικής ρύθμισης από τις Smads. (A) Ενεργοποίηση της μεταγραφής από τις Smads. Το μεταγραφικό σύμπλοκο αποτελείται από τις R-Smads/Smad4, παράγοντες πρόσδεσης στο DNA (FoxH, FoxO κτλ), συνενεργοποιητές (p300, CBP, P/CAF) και πρωτεΐνες προσαρμογής (MSG1, SMIF). (B) Καταστολή της μεταγραφής από τις Smads. Το σύμπλοκο καταστολής αποτελείται από τις R-Smads/Smad4, παράγοντες πρόσδεσης στο DNA (E2F4/5 κτλ), συγκαταστολείς (p107 κτλ). (C) Συνεργασία άμεση και έμμεση μεταγραφικής απόκρισης των Smads. Σε αρκετές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η αρχική ρύθμιση κάποιων γονιδίων από τις Smads που θα επιτρέψει σε δεύτερη φάση την ρύθμιση άλλων γονιδίων (Massague *et al.*, 2005).

Summary of Smad interacting proteins and their reported Smad partner(s)

Smad interacting protein	Class of protein	Reported Smad partner(s)	Mapped Smad-interaction domain
FoxH1a, FoxH1b	Forkhead transcription factor	Smad2/Smad3	MH2 via FM and SIM motifs
Mixer, Milk, Bix3	Mix transcription factor	Smad2/Smad3	MH2 via SIM motif
FoxO	Forkhead transcription factor	Smad2/Smad3, Smad4	MH1
C/EBPβ	Leucine-zipper transcription factor	Smad3, Smad4	MH1 and MH2
ATF3	Leucine-zipper transcription factor	Smad3	MH2
Schnurri	Zinc finger transcription/scaffolding factor	Smad1, Smad4	Not described
Runx1, Runx2, Runx3	α-Subunits of the PEBP2 transcription factor	Smad1/Smad5/Smad2/Smad3	MH1 and MH2 (of Smad3)
Smurf1	HECT domain E3 ligase	Smad1/Smad5, Smad6/Smad7	PPXY motif within the linker
Smurf2	HECT domain E3 ligase	Smad1/Smad5/Smad2/Smad3, Smad6/Smad7	PPXY motif within the linker, amino terminal domain of Smad7
NEDD4-2	HECT domain E3 ligase	Smad2/Smad3, Smad6/Smad7, Smad1/Smad5 (weak)	PPXY motif within the linker
WWP1/TiuL1	HECT domain E3 ligase	Smad1/Smad5/Smad2/Smad3, Smad6/Smad7	PPXY motif within the linker
Roc1	RING finger protein component of the SCF E3 ligase complex	Smad3	MH2
Arkadia	RING finger E3 ligase	Smad2/Smad3, Smad6/Smad7	MH2 (for Smad7)
UbcH7	E2-ubiquitin conjugating enzyme	Smad7	Amino terminal domain
β-TrCP1	F-box protein component of SCF E3 ligase complex	Smad4	Not mapped
Ectodermin	E3 ubiquitin ligase	Smad4, Smad2/Smad3	MH2 domain of Smad2
UCH37	Deubiquitinating enzyme (DUB)	Smad7, Smad2/Smad3 (weak)	Not mapped
Ubc9	E2 SUMO conjugating enzyme	Smad4	MH1
PIASy	SUMO ligase	Smad1/Smad2/Smad3, Smad6/Smad7, Smad4 (weak)	MH2
PIAS3	SUMO ligase	Smad2/Smad3, Smad4 (weak)	MH2
hZimp10	SUMO ligase	Smad3, Smad4	MH2
p300 and CBP	Histone acetyltransferase (HAT) and factor acetyltransferase (FAT)	Smad1/Smad2/Smad3, Smad4, Smad7	MH2
P/CAF	Histone acetyl transferase (HAT)	Smad2/Smad3	MH2
GCN5	Histone acetyl transferase (HAT)	Smad2/Smad3	MH2
HDAC4, HDAC5, HDAC6	Class II histone deacetylases (HDAC)	Smad3 (HDAC4/5), Smad7 (HDAC5/6)	MH2 (for Smad3)
HDAC1, HDAC3	Class I histone deacetylases (HDAC)	Smad7	MH2
ARC105/MED15	Component of the mediator complex	Smad2/Smad3, Smad4	MH2
MSG1	Nuclear factor/co-activator	Smad4	MH2
SRC1	Steroid receptor co-activator	Smad3	Not mapped
Ski	Transcriptional co-repressor	Smad1/Smad2/Smad3, Smad4	MH2
SnoN	Transcriptional co-repressor	Smad2/Smad3, Smad4	MH2
TGIF	Homeodomain co-repressor	Smad2/Smad3, Smad1 (weakly)	Not mapped
Evi-1	Zinc-finger co-repressor	Smad1/Smad2/Smad3	MH2
Brg1	ATPase component of SWI/SNF chromatin remodelling complex	Smad2/Smad3	MH2 + linker
BAF155, BAF170	Component of the SWI/SNF chromatin remodelling complex	Smad2/Smad3	MH2 + linker

Εικόνα 6. Λίστα με πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις Smads. Στην πρώτη στήλη αναγράφεται η πρωτεΐνη, στη δεύτερη στήλη το είδος της, στη τρίτη στήλη οι Smads με τις οποίες αλληλεπιδρά και στη τέταρτη στήλη η περιοχή της αλληλεπίδρασης (Ross & Hill, 2008).

Τα μεταγραφικά σύμπλοκα των Smads μπορούν να δρουν άμεσα στην καταστολή ή την ενεργοποίηση γονιδίων, όμως δε λείπουν και οι περιπτώσεις που δρουν πιο έμμεσα (Εικόνα 5). Για παράδειγμα προαναφέρθηκε ότι τα Smads επάγουν την μεταγραφή του ATF3 και στη συνέχεια σχηματίζουν σύμπλοκο μαζί του για την καταστολή του *Id1*. Με παρόμοιο τρόπο τα Smads μπορούν πρώτα να επάγουν τη μεταγραφή κάποιου συνενεργοποιητή και με τη βοήθειά του να ενεργοποιούν άλλα γονίδια. Τέλος, μπορούν και να καταστέλλουν την έκφραση διάφορων πρωτεϊνών που λειτουργούν ως καταστολείς στην έκφραση άλλων γονιδίων ή και να τις

απομακρύνουν από υποκινητές, ώστε με τη σειρά τους να επάγουν την μεταγραφή αυτών των γονιδίων. Αυτές οι περιπτώσεις συνήθως θέλουν λίγο πιο παρατεταμένη σηματοδότηση από τον TGF-β και δεν ενεργοποιούνται όταν το ερέθισμα είναι στιγμιαίο, οπότε είναι άλλη μια καλή μέθοδος που προσδίδει ποικιλία στην αντίδραση του κυττάρου στο ερέθισμα του TGF-β. Επίσης δίδεται η δυνατότητα με τέτοιους μηχανισμούς να ελέγχονται ολόκληρα σετ συνεκφραζόμενων γονιδίων.

Z. ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ SMADS

Η καταστολή της σηματοδότησης από τις Smad πρωτεΐνες συμβαίνει σε πολλά επίπεδα στο κύτταρο. Ήδη αναφέρθηκαν οι περιπτώσεις καταστολής έξω από το κύτταρο όπως η περίπτωση της BAMBI. Επίσης αναφέρθηκε και η περίπτωση ανταγωνισμού της FKBP12 με τις R-Smads για πρόσδεση στους υποδοχείς τύπου I. Άλλοι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την αποικοδόμηση των υποδοχέων του TGF-β αλλά και των ίδιων των Smad πρωτεϊνών, την παρεμπόδιση τους από τις I-Smads, την παρεμπόδιση της λειτουργίας τους στο πυρήνα από άλλες πρωτεΐνες και τροποποιήσεις των R-Smads με βασικότερη όλων την αποφωσφορυλίωση του μοτίβου SXS.

Οι I-Smads περιλαμβάνουν τις Smad6 και Smad7 και διαφέρουν από τις υπόλοιπες στο ότι δεν έχουν MH1 (ή τουλάχιστον παρόμοιο με αυτό των R-Smads και Smad4) και επίσης απουσιάζει το SXS μοτίβο που φωσφορυλιώνεται από τους υποδοχείς. Η Smad6 ειδικεύεται στην παρεμπόδιση της σηματοδότησης των BMPs (Hata *et al.*, 1998) ενώ η Smad7 δεν κάνει διάκριση ανάμεσα στη σηματοδότηση των BMPs και TGF-βs/activins (Nakao *et al.*, 1997). Όταν υπερεκφράζονται βέβαια εμποδίζουν το ίδιο αποτελεσματικά και τα δύο μονοπάτια. Η Smad6 λειτουργεί ως ανταγωνιστής της Smad4 για την πρόσδεση στην ενεργοποιημένη Smad1 εμποδίζοντας τον ολιγομερισμό της Smad1/Smad4 (Hata *et al.*, 1998). Επίσης συνδέεται με τον συγκαταστολέα CtBP στο πυρήνα και αυτό έχει προταθεί ότι παίζει κατασταλτικό ρόλο στην Smad-επαγόμενη μεταγραφή (Lin *et al.*, 2003). Τέλος, συνδέεται με την

λιγάση ουβικιτίνης Smurf1 και οι δύο μαζί οδηγούν τους BMP υποδοχείς προς αποικοδόμηση (Murakami *et al.*, 2003). Η Smad7 προσδένεται στους ενεργοποιημένους TGF-β και BMP υποδοχείς ανταγωνιστικά με τις R-Smads (Nakao *et al.*, 1997). Επίσης συνδέεται με την λιγάση ουβικιτίνης Smurf1 και Smurf2 και οδηγεί τους BMP και TGF-β υποδοχείς αντίστοιχα προς αποικοδόμηση (Murakami *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2002). Τα I-Smads λειτουργούν με ένα μηχανισμό αναδραστικής αναστολής στην σηματοδότηση του TGF-β καθώς έχει βρεθεί πρώτον ότι η έκφρασή τους ενεργοποιείται από την TGF-β/BMP σηματοδότηση μέσω των Smads (Nakao *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 2000) και δεύτερον ο TGF-β υπαγορεύει τη μετατόπιση της Smad7 από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (Itoh *et al.*, 1998). Πρόσφατα έχουν γίνει και αναφορές ότι οι I-Smads εμποδίζουν τον σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ των Smad και του DNA (Zhang *et al.*, 2007).

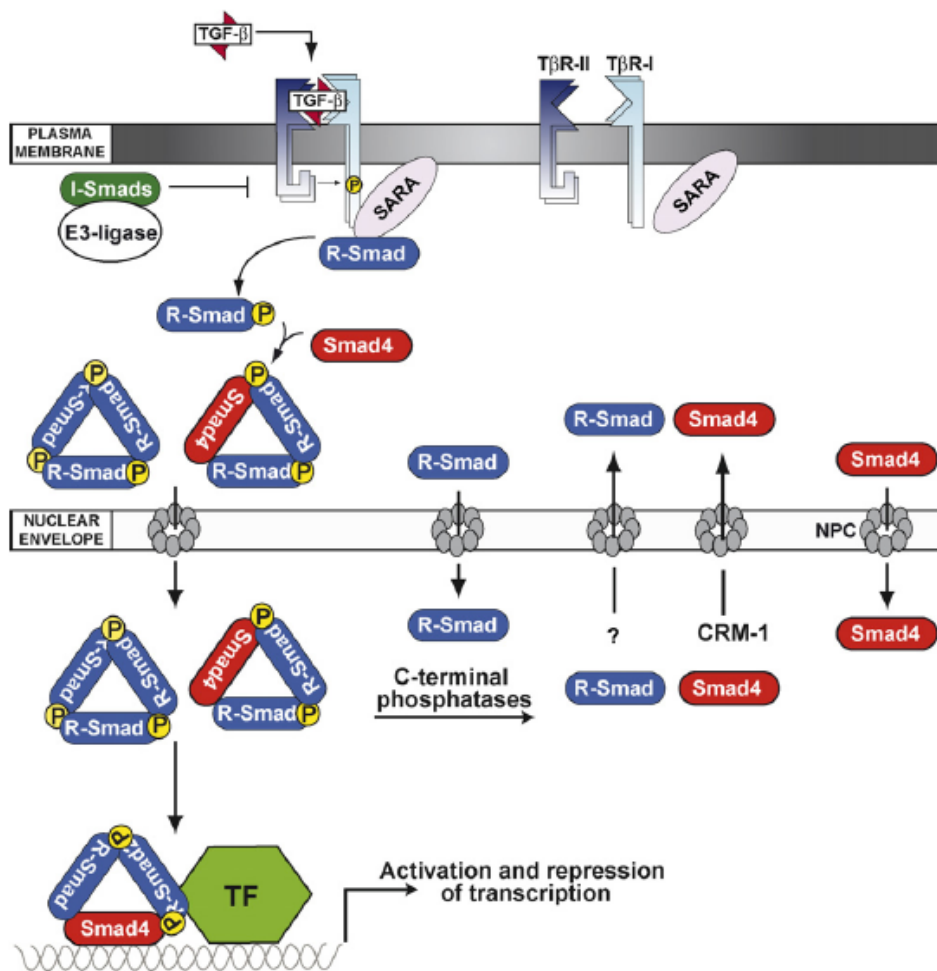
Οι R-Smads μπορούν επίσης να καταστραφούν από το 26S πρωτεάσωμα είτε είναι φωσφορυλιωμένες είτε όχι. Αυτό επιτρέπει τόσο την καταστολή της σηματοδότησης όσο και την ποσοτική οριοθέτηση των Smads για την ενεργοποίησή τους. Η Smurf1 είναι υπεύθυνη για την ουβικιτινυλίωση και την καταστροφή των Smad1/2 και η Smurf2 για τις Smad1/2/3 (Zhu *et al.*, 1999; Izzi & Attisano, 2004). Η πρωτεΐνη Tiu11 που επίσης ανήκει στην οικογένεια των Smurf συμβάλλει στην αποικοδόμηση της Smad2 (Seo *et al.*, 2004). Το μοτίβο PY στο linker των R-Smads αλλά και των I-Smads αποτελεί σημείο πρόσδεσης για τις λιγάσες ουβικιτίνης Smurf (Izzi & Attisano, 2004; Chong *et al.*, 2006). Η Smad4 δεν περιέχει τέτοιο μοτίβο αλλά μπορεί έμμεσα να ουβικιτινυλιωθεί και να αποικοδομηθεί μέσω των Smurf όταν είναι σε σύμπλοκο με τις R-Smads (Moren *et al.*, 2005). Πρόσφατα επίσης αναφέρθηκε ότι η φωσφορυλίωση του linker της Smad1 μπορεί να λειτουργεί ως σήμα για αναγνώριση από τη Smurf1 και καταστροφή της Smad1 (Sapkota *et al.*, 2007). Αυτό σημαίνει ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPKs ίσως επάγει την καταστροφή των Smads. Άλλες λιγάσες ουβικιτίνης που συμμετέχουν στη αποικοδόμηση των Smads είναι οι SCF/Roc1, NEDD4-2 και HsN3 (Izzi & Attisano, 2004). Η SCF/Roc1 ενώνεται με τη Smad3 στο πυρήνα και την οδηγεί στο κυτταρόπλασμα για αποικοδόμηση (Fukuchi *et al.*, 2001) ενώ η ενεργοποιημένη Smad2 ουβικιτινυλιώνεται στο πυρήνα αλλά δεν είναι ξεκάθαρο που γίνεται η αποικοδόμησή της (Lo & Massague, 1999).

Μέσα στο πυρήνα υπάρχουν πρωτεΐνες που προσδένονται στις Smads και λειτουργούν ως γενικοί καταστολείς στη δυνατότητα τους να ρυθμίσουν τη μεταγραφή των γονιδίων. Οι πιο μελετημένες είναι η TGFI που προσδένεται στις

Smad2/3 και στρατολογεί πάνω τους ένα κατασταλτικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει τις CtBP και mSin3/HDAC (Wotton *et al.*, 1999), η Evi-1 που προσδένεται στη Smad3 και επίσης στρατολογεί τις CtBP και HDAC (Izutsu *et al.*, 2001) και οι Ski/SnoN που λειτουργούν είτε στρατολογώντας σύμπλοκα καταστολής στις Smads είτε μπλοκάροντας τον ολιγομερισμό των R-Smads/Smad4 (Luo *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002) (Εικόνα 6).

Ο πιο σημαντικός τρόπος καταστολής της σηματοδότησης των Smads είναι η αποφωσφορυλίωση του μοτίβου SXS. Η φωσφορυλίωση στο SXS αποτελεί την βάση στην σηματοδότηση των Smads και την προϋπόθεση για την πραγματοποίηση των περισσότερων γεγονότων που έχουν περιγραφεί πιο πάνω. Επομένως η αποφωσφορυλίωση του SXS είναι το σήμα που καθοδηγεί την παύση της σηματοδότησης από τον TGF-β και «ενημερώνει» τα R-Smads ότι η δουλειά τους έχει πια τελειώσει. Ήδη έχει αναφερθεί ως ο πιθανότερος μηχανισμός παύσης της σηματοδότησης του TGF-β (Inman *et al.*, 2002; Schmierer & Hill, 2005). Για πολλά χρόνια αποτελούσε μυστήριο για το ποιες φωσφατάσες είναι υπεύθυνες για την αποφωσφορυλίωση του SXS. Πρόσφατα ανακαλύφθηκαν δύο τέτοιες φωσφατάσες των R-Smads. Η πρώτη είναι η PDP που αποφωσφορυλιώνει τη MAD στη *Drosophila* (ορθόλογη των Smads) και την Smad1 στα θηλαστικά (Chen *et al.*, 2006) και η δεύτερη είναι η PPM1A που αποφωσφορυλιώνει τις Smad2/3 (Lin *et al.*, 2006) και τις Smad1/5/8 (Duan *et al.*, 2006). Η PDP εντοπίστηκε σε όλη την έκταση των S2 κυττάρων της *Drosophila* και έχει την ικανότητα να αποφωσφορυλιώνει τη MAD και να καταστέλλει την DPP σηματοδότηση. Η αλληλεπίδραση με τη MAD είναι άμεση και ενισχύεται όταν η MAD είναι φωσφορυλιωμένη (Chen *et al.*, 2006). Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν με τεχνικές siRNA ότι οι ορθόλογες φωσφατάσες PDP1 και PDP2 στα θηλαστικά παίζουν ρόλο στην αποφωσφορυλίωση της Smad1 αλλά όχι των Smad2/3. Η PPM1A είναι μία συντηρημένη φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης της οικογενείας των μέταλλο-εξαρτώμενων PPM φωσφατασών. Οι Lin *et al.* (2006) έδειξαν ότι η φωσφατάση PPM1A είναι πυρηνική, αλληλεπιδρά άμεσα με τις Smad2/3 και αποφωσφορυλιώνει το SXS μοτίβο μέσα στο πυρήνα με αποτέλεσμα την έξοδό τους από το πυρήνα (Εικόνα 7). Επίσης η υπερέκφραση της PPM1A οδηγεί στην ελάττωση των κυτταρικών αποκρίσεων για τις οποίες είναι υπεύθυνος ο TGF-β ενώ η καταστολή της ενδογενούς PPM1A κάνει τις κυτταρικές αποκρίσεις στον TGF-β πιο ευαίσθητες. Τέλος η υπερέκφραση της PPM1A σε έμβρυα *Zebrafish* ανταγωνίζεται τη σηματοδότηση των TGF-βs/nodals και των αναπτυξιακών

αποτελεσμάτων που έχουν όπως η ραχαιοποίηση (dorsalization) του εμβρύου. Η ίδια εργαστηριακή ομάδα έδειξε ότι η PPM1A αποφωσφορυλιώνει και το SXS των Smad1/5/8 (Duan *et al.*, 2006). Η αποφωσφορυλίωση οφείλεται και εδώ σε άμεση αλληλεπίδραση της PPM1A με τη Smad1. Επίσης η υπερέκφραση της PPM1A καταστέλλει τη σηματοδότηση των BMPs ενώ η παρεμπόδιση της μέσω RNAi βελτιώνει την σηματοδότηση των BMPs.



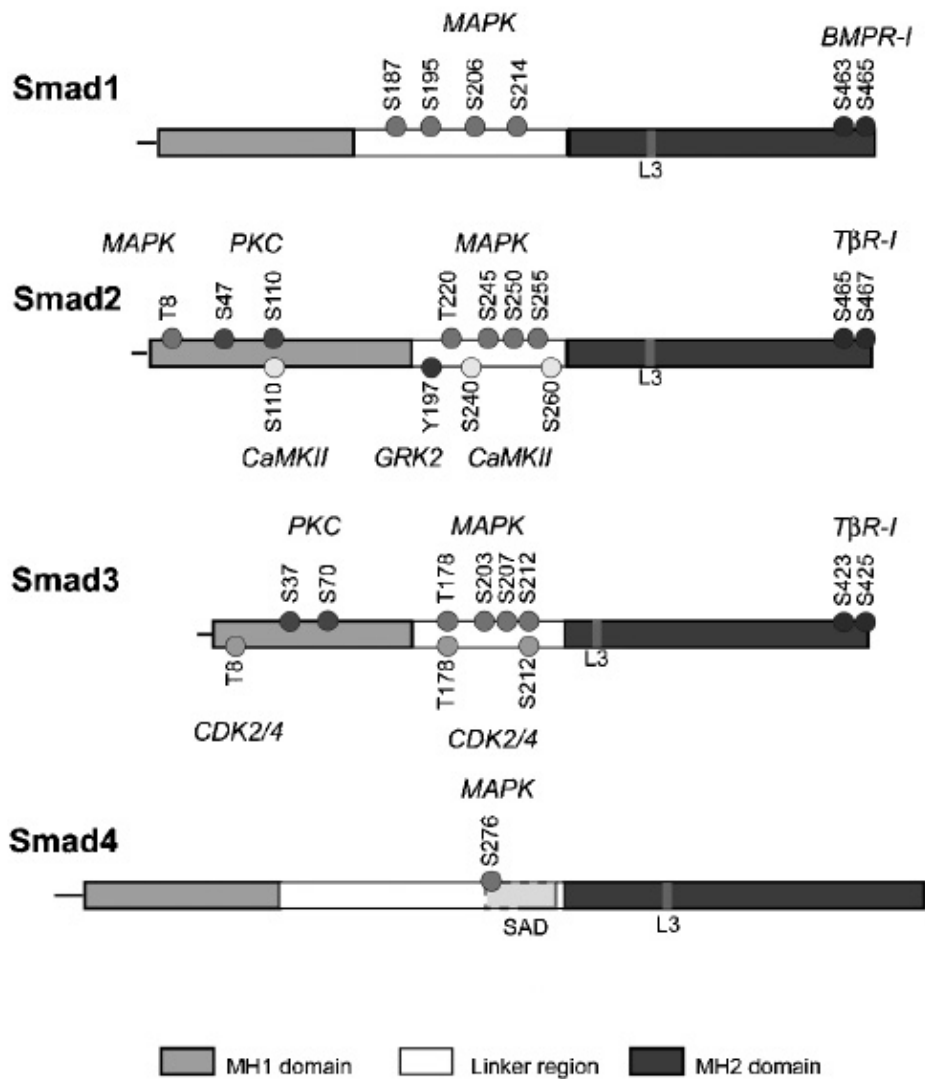
Εικόνα 7. Το μονοπάτι του TGF-β και το μοντέλο λειτουργίας της PPM1A. Οι R-Smads φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς, ολιγομερίζονται με τη Smad4 και μεταβαίνουν στο πυρήνα για να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων. Η πυρηνική φωσφατάση PPM1A αποφωσφορυλιώνει το μοτίβο SXS εμποδίζοντας έτσι τις R-Smads να διατηρήσουν το σύμπλοκο με τη Smad4 και με μεταγραφικούς παράγοντες. Με αυτό τον τρόπο τερματίζει και η σηματοδότηση από τον TGF-β (Ross & Hill, 2008).

Επομένως, η PPM1A λειτουργεί ως μια γενική φωσφατάση των Smads στα θηλαστικά για την ολοκλήρωση της σηματοδότησης του TGF-β (Εικόνα 7). Οι φωσφατάσες λοιπόν του SXS είναι κύριοι ρυθμιστές της TGF-β και BMP σηματοδότησης και η διερεύνηση των συνθηκών και του τρόπου που λειτουργούν θα αποκαλύψει πολλά για τον ρόλο αυτών των μονοπατιών σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις.

Η. Η ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ LINKER ΤΩΝ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

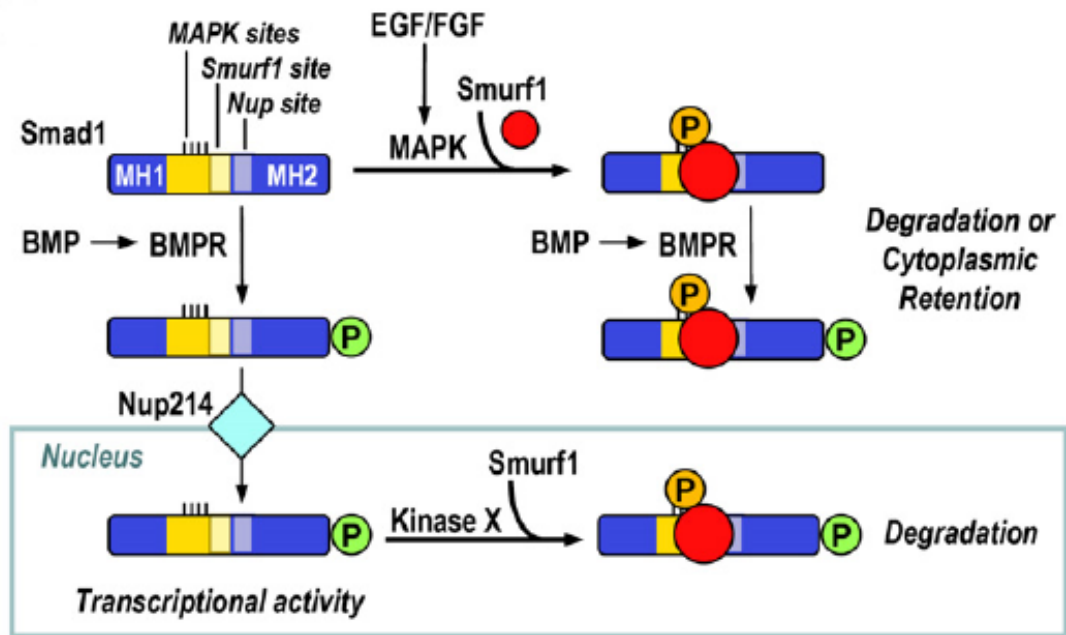
Ο linker των Smads είναι η περιοχή που συνδέει τις MH1 και MH2 και είναι λιγότερο συντηρημένη σε σχέση με αυτές. Πολλά δεδομένα όμως δείχνουν ότι ο linker εμφανίζει πολύ σημαντικές ιδιότητες που τον καθιστούν απαραίτητο για την σωστή ρύθμιση της δραστηριότητας των Smads. Ο linker παίζει ρόλο στην αποικοδόμηση των Smads εξαιτίας του PY μοτίβου που περιέχει (Izzi & Attisano, 2004) και στην έξοδο της Smad4 από το πυρήνα εξαιτίας του NES (Inman *et al.*, 2002). Ακόμη παρουσιάζει μεταγραφική ενεργότητα σε συνδυασμό με την MH2 περιοχή (de Caestecker *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005; Prokova *et al.*, 2005). Ο linker των R-Smads περιέχει πάρα πολλά σημεία φωσφορυλίωσης σερίνης/θρεονίνης με ρόλους που είναι ακόμη κάτω από εκτεταμένη έρευνα. Τα σημεία αυτά δεν φωσφορυλιώνονται από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς όπως το μοτίβο SXS αλλά από MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) και CDKs (Cyclin-dependant kinases). Η ενεργοποιημένη Erk από τους FGF ή EGF μπορεί να φωσφορυλιώσει κατάλοιπα σερίνης που βρίσκονται σε μοτίβα S/TP ή PXS/TP στο linker των R-Smads (Kretzschmar *et al.*, 1999). Συγκεκριμένα, η Erk φωσφορυλιώνει τα κατάλοιπα Thr220, Ser245, Ser250, Ser255 του linker της Smad2 και τα κατάλοιπα Thr178, Ser203, Ser207 και Ser212 (ή Ser204, Ser208 και Ser213 όπως αναφέρονται διορθωτικά από τους Wrighton *et al.*) του linker της Smad3 (και Thr8 που είναι εκτός του linker των Smad2/3) (Kretzschmar *et al.*, 1999). Επίσης φωσφορυλιώνει τη Smad1 στα κατάλοιπα του linker Ser187, Ser195, Ser206 και Ser214 (Kretzschmar *et*

al., 1997). Οι p38 MAPK και η ROCK φωσφορυλιώνουν τη Smad3 στις Ser203, Ser207 και Ser212 (Kamaraju and Roberts, 2005). Επίσης η JNK φωσφορυλιώνει τις Smad2/3 στα κατάλοιπα Ser250/255 και Ser207/212 αντίστοιχα (Mori *et al.*, 2004). Εκτός από τις MAPKs, ο linker της Smad3 φωσφορυλιώνεται στα κατάλοιπα Thr178 και Ser212 από τις CDK2/4 (Matsuura *et al.*, 2004) και η Smad2 στο κατάλοιπο Tyr197 από τη GRK2 (G-coupled receptor kinase 2) (Ho *et al.*, 2005) και στις Ser240, Ser260 από τη CaMKII(Ca²⁺/Calmodulin dependant CaM kinase II) (Wicks *et al.*, 2000) (Εικόνα 8). Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του linker των R-Smads παραμένει ακόμη αναπάντητο ερώτημα. Έρευνες δείχνουν ότι πρώτον αδυνατίζει τη σηματοδότηση του TGF-β εμποδίζοντας την εισαγωγή των R-Smads στο πυρήνα σε βαθμό που εξαρτάται από το κυτταρικό τύπο, δεύτερον ότι αυξάνει την αποικοδόμησή τους και τρίτον ότι μεταλλάξεις στα σημεία φωσφορυλίωσης ενισχύουν τη μεταγραφική δεινότητα των Smads (Calonge and Massague, 1999; Kretschmar *et al.*, 1997,1999; Wicks *et al.*, 2000; Grimm and Gurdon, 2002; Matsuura *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Fuentealba *et al.*, 2007). Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση του linker της Smad1 μέσω EGF/FGF αυξάνει την ουβικιτινυλίωση της Smad1 εξαιτίας της αυξημένης αλληλεπίδρασης της με την Smurf1. Η πρόσδεση της Smurf1 εμποδίζει επιπλέον την αλληλεπίδραση της Smad1 με τη νουκλεοπορίνη Nup214 (Sapkota *et al.*, 2007). Το αποτέλεσμα αυτών είναι η αυξημένη αποικοδόμηση της Smad1 αλλά και η διατήρησή της στο κυτταρόπλασμα αφού δεν μπορεί πλέον να εισαχθεί στο πυρήνα. Στην ίδια έρευνα παρουσιάζονται και δεδομένα που υποστηρίζουν την BMP-επαγόμενη φωσφορυλίωση του linker αλλά αυτή συμβαίνει από κάποια κινάση μόνο αφού εισέλθει η Smad1 στον πυρήνα και το αποτέλεσμά της είναι πάλι η καταστροφή της μέσω της Smurf1 (Sapkota *et al.*, 2007) (Εικόνα 9). Από την άλλη μεριά, άλλες μελέτες δεν έχουν παρατηρήσει προβλήματα στον πυρηνικό εντοπισμό των Smads μετά από επαγόμενη φωσφορυλίωση του linker και σε μερικές περιπτώσεις η φωσφορυλίωση ήταν απαραίτητη για την βέλτιστη επαγόμενη μεταγραφή από τα Smads (ίσως σε συνδυασμό με τη φωσφορυλίωση στη Thr8 του MH1) (Brown *et al.*, 1999; de Caestecker *et al.*, 1998; Funaba *et al.*, 2002; Hayashida *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2004; Kamaraju and Roberts, 2005). Πρέπει να αναφερθεί ότι και η Smad4 φωσφορυλιώνεται από την Erk2 στο κατάλοιπο Thr276 του linker και το αποτέλεσμα είναι η πυρηνική συσσώρευση της Smad4 και η ενίσχυση της σηματοδότησης των Smads (Roelen *et al.*, 2003).



Εικόνα 8. Τα σημεία φωσφορυλίωσης των R-Smads και Smad4 και οι κινάσες που τα φωσφορυλιώνουν (modified from Yakymovych & Souchelnytskyi, 2006).

Επίσης είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο TGF- β μπορεί να προκαλέσει ενεργοποίηση των MAPKs (Kamaraju and Roberts, 2005; Nohe *et al.*, 2004) και αξίζει να μελετηθεί σε πιο βαθμό συμπλέκονται τα Smad και Ras/MAPK σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τις έρευνες των Pera *et al* κατά την ανάπτυξη του εμβρίου *Xenopus*, το Ras/MAPK μονοπάτι καθοδηγεί την φωσφορυλίωση του linker της Smad1 με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό της από το



Εικόνα 9. Το μοντέλο της φωσφορυλίωση και της λειτουργίας του linker της Smad1. Η φωσφορυλίωση του linker της Smad1 από MAPKs λειτουργεί ως σήμα για ουβικιτινυλίωση από τη Smurf1 και την καταστροφή της. Επίσης η προσδεμένη Smurf1 εμποδίζει την αλληλεπίδραση της Smad1 με την νουκλεοπορίνη Nup214 και αποκλείει την εισαγωγή της στο πυρήνα ανεξάρτητα από την φωσφορυλίωσή της στο SXS. Απουσία των MAPKs, η BMP επάγει την πυρηνική μετατόπιση της Smad1. Ακολουθεί όμως μία BMP-επαγόμενη φωσφορυλίωση του linker της Smad1 στο πυρήνα που επιτρέπει την πρόσδεση της Smurf1 και την αποικοδόμηση της. Αυτός ο αναδραστικός μηχανισμός συμβάλει στον τερματισμό της BMP σηματοδότησης συνδυαστικά με την αποφωσφορυλίωση στο SXS από την πυρηνική φωσφατάση PPM1A (Sapkota et al., 2007).

πυρήνα και την καταστολή της BMP σηματοδότησης και της κοιλιοποίησης του μεσοδέρματος (Pera *et al.*, 2003; Massague, 2003). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου του παχέως εντέρου η Smad3 είναι σημαντικά φωσφορυλιωμένη στις Ser207/212 υποδηλώνοντας ότι η φωσφορυλίωση του linker μπορεί να βοηθά τον καρκινοπροαγόμενο ρόλο του TGF-β σε προχωρημένη καρκινογένεση (Yamagata *et al.*, 2005) Αυτά τα διαφορούμενα αποτελέσματα μεταξύ αυτών των μελετών ίσως να οφείλονται σε διαφορές στις πειραματικές διαδικασίες αλλά ίσως και να αντικατοπτρίζουν μία ποικιλότητα στη βιολογική σημασία του

linker. Αυτό σημαίνει ότι η φωσφορυλίωση του linker επηρεάζει διαφορετικά τη λειτουργία των R-Smads ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο κύτταρο ή στον ευρύτερο ιστό. Είναι επίσης πολύ πιθανό να συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες στη δράση των R-Smads μετά τη φωσφορυλίωση του linker.

Θ. ΟΙ ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ SCP1, SCP2 ΚΑΙ SCP3

Οι φωσφατάσες SCP (Small CTD phosphatases) χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα στην παρούσα εργασία, λόγω της ικανότητάς τους να αποφωσφορυλιώνουν τον linker των R-Smads. Οι SCPs ανήκουν στην οικογένεια των FCP1 φωσφατασών με χαρακτηριστικό γνώρισμα την περιοχή FCPH που περιέχει ένα DXDX(T/V) μοτίβο και 11 πολύ συντηρημένα καταλυτικά αμινοξέα αλλά δεν περιέχουν την BRCT περιοχή της FCP1 (Yeo *et al.*, 2003). Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα οι SCP1, SCP2 και SCP3 με πάνω από 90% ομολογία και η έκφραση τους εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς αν και σε διαφορετικά επίπεδα. Στο κύτταρο μέσα οι SCP1 και SCP2 εντοπίζονται στον πυρήνα (Yeo *et al.*, 2003; Knockaert *et al.*, 2006) ενώ η SCP3 κυρίως στο κυτταρόπλασμα (Kashuba *et al.*, 2004).

Ο πρωταρχικός ρόλος που αναγνωρίστηκε στην SCP1, λόγω και της ομοιότητας της με την FCP1, είναι η ικανότητά της να αποφωσφορυλιώνει τη CTD περιοχή της RNAPII (Yeo *et al.*, 2003). Η CTD είναι μια περιοχή της μεγάλης υπομονάδας της RNAPII και περιέχει πολλαπλές επαναλήψεις του επταπεπτιδίου YSPTSPTS. Ανάλογα με το πρότυπο φωσφορυλίωση του επταπεπτιδίου η RNAPII έχει τη δυνατότητα να επιστρατεύει διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Palancade & Bensaude, 2003). Η SCP1 αποφωσφορυλιώνει τη Ser5 του επταμερούς στα θηλαστικά με αποτέλεσμα να ρυθμίζει την μεταγραφική δεινότητα της RNAPII (Yeo *et al.*, 2003). Για να αξιολογηθεί αυτή η λειτουργία της SCP1 έγιναν μια σειρά από πειράματα λουσιφεράσης με μια ποικιλία γονιδίων αναφοράς που έδειξαν τη μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης σε όλες τις περιπτώσεις που υπερεκφράστηκε η SCP1 (Yeo *et al.*, 2003, 2005; Thompson *et al.*, 2006). Το αποτέλεσμα αυτών των πειραμάτων αποδόθηκε στην ανικανότητα της RNAPII να περάσει στο στάδιο της

επιμήκυνσης κατά τη μεταγραφή εξαιτίας της υποφωσφορυλίωσης στη Ser5 του CTD. Παρόμοια δράση παρουσίασε και η SCP2 (Thompson *et al.*, 2006).

Μία σειρά από μελέτες το 2006 ενέπλεξαν τα SCPs στη σηματοδότηση των TGF- β s και BMPs. Συγκεκριμένα αναφέρθηκε ότι αποφωσφορυλιώνουν τη Smad1 στο μοτίβο SXS και στη περιοχή του linker εξασθενώντας τη σηματοδότηση των BMPs και αποφωσφορυλιώνουν τις Smad2/3 μόνο στη περιοχή του linker ενισχύοντας τις κυτταρικές αποκρίσεις του TGF- β (Knockaert *et al.*, 2006; Sapkota *et al.*, 2006; Wrighton *et al.*, 2006). Αναλυτικότερα, οι Knockaert *et al.* (2006) ανέφεραν πρώτοι την αποφωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού SXS της Smad1 από τις SCPs. Όταν έκαναν μικροένεση με mRNA της SCP2 στην ακραία κοιλιακή ζώνη του εμβρύου του *Xenopus* επάχθηκε σε κάποιο βαθμό η δημιουργία του δευτερογενούς άξονα εξαιτίας της αποφωσφορυλίωσης της Smad1 και της καταστολής της BMP σηματοδότησης. Έδειξαν επίσης ότι σε κύτταρα θηλαστικών, οι SCPs μπορούσαν να προσδεθούν στη Smad1 και να την αποφωσφορυλιώσουν ενώ η αποσιώπηση των SCPs μέσω siRNA αύξησε την φωσφορυλίωση της Smad1. Αντίθετα, οι SCPs δεν επηρέασαν καθόλου τη φωσφορυλίωση του SXS των Smad2/3. Οι Sapkota *et al.* (2006) έδειξαν ότι οι SCPs αποφωσφορυλιώνουν τον linker των Smad1 και Smad2/3 σε κύτταρα θηλαστικών και σε έμβρυα του *Xenopus* ενώ επιβεβαίωσαν ότι οι SCPs δεν αποφωσφορυλιώνουν το SXS των Smad2/3 όπως κάνουν για τη Smad1 ή όπως κάνει η PPM1A για όλες τις R-Smads (Lin *et al.*, 2006; Duan *et al.*, 2006). Επίσης ανέφεραν ότι η αποσιώπηση των SCP1/2 με siRNA αύξησε τη φωσφορυλίωση της Smad2 στο linker αλλά εξασθένησε την σηματοδότηση του TGF- β . Οι Wrighton *et al.* (2006) επικέντρωσαν την έρευνά τους στις SCPs σε σχέση με τις Smad2/3. Έδειξαν ότι οι SCPs αλληλεπιδρούν άμεσα με τις Smad2/3 και αποφωσφορυλιώνουν τα κατάλοιπα Ser245, Ser250, Ser255 αλλά όχι Thr220 στο linker της Smad2 και τα κατάλοιπα Ser204, Ser208, Ser213 (παλαιότερα έχουν αναφερθεί ως Ser203, 207 και 212) αλλά όχι Thr179 στο linker της Smad3. Επίσης αποφωσφορυλιώνουν και το αμινοτελικό κατάλοιπο Thr8 της MH1. Σε πειράματα λουσιφεράσης με διάφορα γονίδια αναφοράς του TGF- β (Smad binding elements-luc) έδειξαν ότι η υπερέκφραση των SCPs αυξάνει την επαγόμενη από το TGF- β μεταγραφική ενεργοποίηση. Αυτό αποτελεί και το πρώτο παράδειγμα που τα SCPs αυξάνουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση και έρχεται σε αντίθεση με αυτά που αναφέρθηκαν προηγουμένως για την κατασταλτική δράση των SCPs στη μεταγραφική μηχανή. Φαίνεται λοιπόν ότι οι SCPs αποφωσφορυλιώνοντας τον linker των Smad2/3

ενισχύουν την σηματοδότηση του TGF- β και αντισταθμίζουν τη παρεμποδιστική δράση που έχει η φωσφορυλίωση του linker από τις MAPKs.

I. Η ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TGF- β ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΣΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ

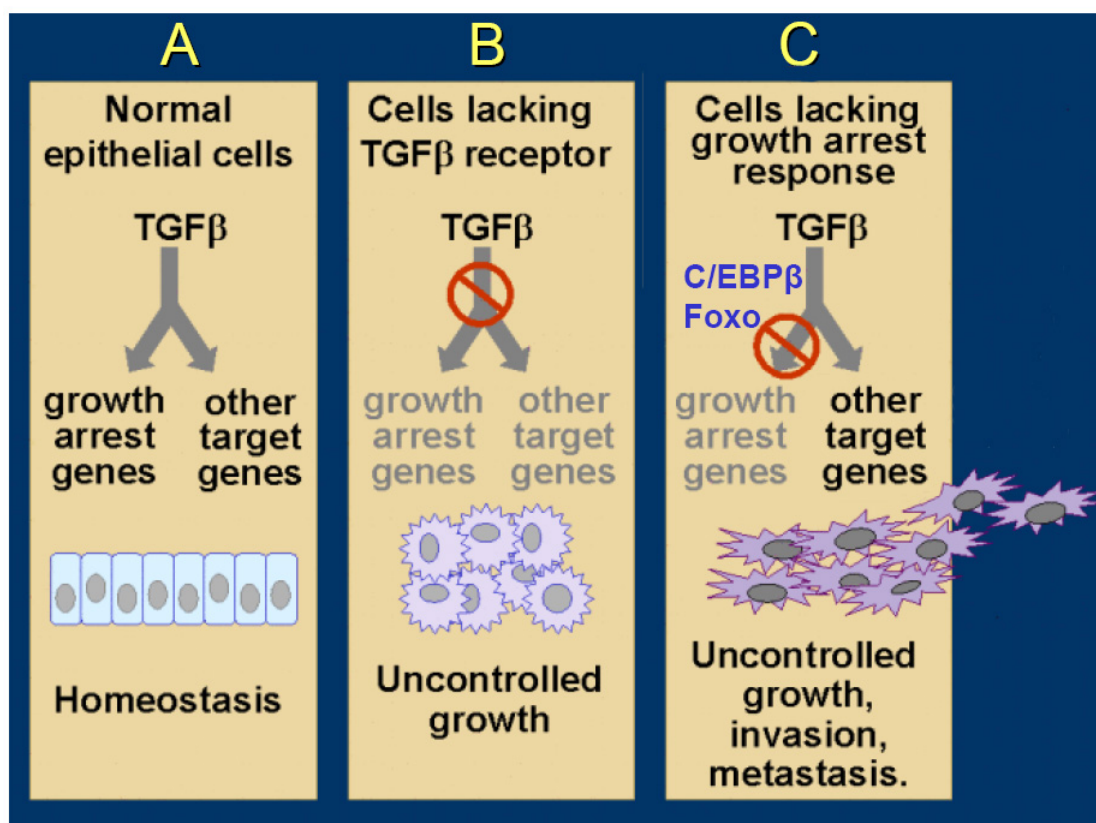
Μία από τις βασικότερες λειτουργίες του μονοπατιού του TGF- β είναι να προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και να οδηγεί τα κύτταρα προς διαφοροποίηση ή απόπτωση (Siegel & Massague 2003; Massague & Gomis, 2006). Αυτό το καταφέρει μέσα από το κυτταροστατικό του πρόγραμμα που περιλαμβάνει τη ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων που αναστέλλουν το κυτταρικό κύκλο στη φάση G1. Αν και το πρόγραμμα αυτό μπορεί να ενεργοποιηθεί και μετά τη φάση G1 από τον TGF- β , δεν μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου αν αυτό έχει ξεπεράσει το σημείο ελέγχου της φάσης G1. Τα βασικότερα μεταγραφικά γεγονότα που συμβαίνουν στο κυτταροστατικό πρόγραμμα είναι ενεργοποίηση των γονιδίων *p21* και *p15* σε συνδυασμό με τη καταστολή του *c-Myc*, *ID1*, *ID2* και *ID3* (Massague & Gomis, 2006). Οι *p21* και *p15* είναι αναστολείς των CDKs (CDK2/4/6) οι οποίες προωθούν τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S. Η *c-Myc* προωθεί την κυτταρική αύξηση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ οι IDs είναι πυρηνικοί παράγοντες που εμποδίζουν τη κυτταρική διαφοροποίηση. Το σύμπλοκο FoxO-Smad3-Smad4 είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του *p21* (Seoane *et al.*, 2004) και το σύμπλοκο C/EBP β -Smad3-Smad4 είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση του *p15* (Gomis *et al.*, 2006a,b). Από τη άλλη μεριά το σύμπλοκο E2F/Smad3/Smad4/p107 καταστέλλει το *c-Myc* (Chen *et al.*, 2002) και το ATF3/Smad3/Smad4 καταστέλλει το *Id1* (Kang *et al.*, 2003a). Να σημειωθεί ότι η *c-Myc* όταν βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο κύτταρο προσδέεται στον υποδοχέα των *p21* και *p15* και καταστέλλει τη μεταγραφή τους. Επομένως, ο TGF- β εκτός του ότι επάγει άμεσα την μεταγραφή των *p21* και *p15*, καταστέλλει και τη *c-Myc* που την εμποδίζει. Εκτός από την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου ο TGF- β προκαλεί απόπτωση

σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Αυτό το κάνει ενεργοποιώντας μέσω των Smads γονίδια που έχουν αποπτωτική δράση όπως το *TIEG1* στα επιθηλιακά κύτταρα, το *DAPK* σε κύτταρα του ηπατώματος και το *SHIP* σε αιμοποιητικά κύτταρα. Επίσης το κάνει και με μονοπάτια ανεξάρτητα των Smads όπως μέσω της ενεργοποίηση των πρωτεϊνών DAXX (death associated protein) και ARTS (apoptosis related protein in the TGF-β signaling pathway) (Siegel & Massague 2003).

Βάσει των παραπάνω λειτουργιών του TGF-β είναι φανερό ότι λειτουργεί ως ελεγκτικός μηχανισμός για τον άκρατο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και είναι εύλογο το ότι έχουν βρεθεί συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο σηματοδοτικό του μονοπάτι που οδηγούν σε καρκίνο. Οι μεταλλάξεις αφορούν κυρίως τους TGF-β υποδοχείς I και II καθώς και τις Smad2 και Smad4. Για παράδειγμα στον καρκίνο του παχέως εντέρου που χαρακτηρίζεται από αστάθεια μικροδορυφορικών περιοχών (MSI: microsatellite instability) είναι μεταλλαγμένος ο TβR-II υποδοχέας (Markowitz *et al.*, 1995). Οι μεταλλάξεις αυτές τον καθιστούν ουσιαστικά ανενεργό. Επίσης έχουν βρεθεί και μεταλλάξεις σε υποδοχείς τύπου I σε περιπτώσεις καρκίνου που αφορούν τις ωσθήκες, το πάγκρεας και το στήθος (Chen *et al.*, 1998b; Goggins *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Στο επίπεδο των Smads, μεταλλάξεις στη Smad4 έχουν συσχετιστεί με πολλές μορφές καρκίνου αλλά ιδιαίτερα με τους καρκίνους του παγκρέατος, του παχέως εντέρου και των πνευμόνων (Goggins *et al.*, 1998; Grady *et al.*, 1999). Τέλος και η Smad2 εμφανίζεται συχνά μεταλλαγμένη σε καρκίνους του παχέως εντέρου και του πνεύμονα (Uchida *et al.*, 1996; Eppert *et al.*, 1996).

Τα κύτταρα που έχουν ξεφύγει από τον κυτταροστατικό έλεγχο του TGF-β έχουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν τον TGF-β για να εξελιχθούν σε πιο επιθετικές καρκινικές μορφές (Εικόνα 10). Έτσι λοιπόν σε προχωρημένα καρκινικά στάδια ο TGF-β επάγει την μετάβαση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT: epithelial to mesenchymal transition), προάγει την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, δημιουργεί ένα ανοσοπροστατευτικό περιβάλλον για τον καρκίνο, προάγει την αγγειογένεση και βοηθά στη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Siegel & Massague 2003). Η EMT είναι υπεύθυνη για τη απώλεια των συνδέσμων μεταξύ των κυττάρων και το αποτέλεσμα της είναι η δυνατότητα της αποκόλλησης τους από τον όγκο για τη μετανάστευσή τους. Σε πολλούς καρκίνους καταστέλλεται η E-cadherin που είναι κατεξοχήν υπεύθυνη για τη σύνδεση των κυττάρων (Thiery, 2002). Ο TGF-β επίσης προωθεί τη δημιουργία ενός δικτύου αγγείων στον όγκο για τη τροφοδοσία του. Αυτό το κάνει επάγοντας την έκφραση των VEGF (Vascular endothelial growth

factor) και CTGF (Connective-tissue growth factor) για την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (Hasegawa *et al.*, 2001) αλλά και επάγοντας την έκκριση μεταλλοπρωτεϊνών στον εξωκυττάριο χώρο που επιτρέπει την απελευθέρωση ενδοθηλιακών κυττάρων από τη βασική μεμβράνη (Derynck *et al.*, 2001). Μία από τις λειτουργίες του TGF- β στα θηλαστικά είναι η ισχυρή ανοσοκαταστολή. Αυτή τη λειτουργία εκμεταλλεύονται τα καρκινικά κύτταρα και αποτρέπουν την καταστροφή τους από τα κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (Torre-Amione *et al.*, 1990). Τέλος, η επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων *IL11* και *CTGF* από τον TGF- β βοηθά τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Kang *et al.* 2003b).



Εικόνα 10. Σύνοψη της δράσης του TGF- β πριν το καρκίνο και σε προχωρημένα στάδια. (A) Αρχικά το κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGF- β εμποδίζει τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό. (B) Στα πρώτα στάδια του καρκίνου τα κύτταρα έχουν ξεφύγει από τον κυτταροστατικό έλεγχο του TGF- β και πολλαπλασιάζονται. (C) Σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου ο TGF- β λειτουργεί προς όφελος του καρκινικού όγκου συμβάλλοντας στη δημιουργία αγγειακού δικτύου και στη μετάστασή του. Έτσι λοιπόν ο όγκος εξελίσσεται σε πιο επιθετικές μορφές.

Κ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η περιοχή του linker των R-Smads έχει αποκτήσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην μελέτη της σηματοδότησης του TGF-β. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις της περιοχής αυτής όπως η φωσφορυλίωση αναδεικνύονται σε σημαντικό ρυθμιστή της δράσης των Smad πρωτεϊνών στο κύτταρο. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αποφωσφορυλίωση της περιοχής του linker των Smad2/3 και η επίδραση της στην λειτουργία τους. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως εργαλεία οι φωσφατάσες SCP1, SCP2 και SCP3 που έχουν την ικανότητα να αποφωσφορυλιώσουν τη περιοχή του linker. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκαν western blot για τη διερεύνηση της αποφωσφορυλίωσης των Smad2/3 από τις SCPs, της επίδρασης που έχουν στον ολιγομερισμό των R-Smads/Smad4 και της επίδρασης που έχουν στην πρόσδεση των Smads στο DNA. Επίσης έγιναν πειράματα ελέγχου μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων αναφοράς από τις Smads παρουσία των SCPs για να δούμε την επίδραση που έχει η αποφωσφορυλίωση του linker στη μεταγραφική ικανότητα των Smads. Ακόμη, πραγματοποιήθηκαν RT-PCR για τη διερεύνηση της ικανότητας του TGF-β να επάγει τη μεταγραφή των *SCPs* και έγινε ανοσοφθορισμός για τον εντοπισμό της υπερεκφρασμένης SCP1 για να διαπιστώσουμε τις περιοχές που μπορεί να δρα μέσα στο κύτταρο. Σε μικρότερο βαθμό μελετήθηκε και η ικανότητα της PPM1A να αποφωσφορυλιώνει το μοτίβο SXS των Smad2/3, την επίδραση που έχει στην μεταγραφική τους ενεργοποίηση και την ικανότητα του TGF-β να επάγει την μεταγραφή του *PPM1A*. Οι πληροφορίες που εξήχθησαν στην παρούσα εργασία θα βοηθήσουν στην ανάλυση του ρόλου της περιοχής του linker στη δράση των Smads και στη περαιτέρω διαλεύκανση των μηχανισμών που διέπουν τη σηματοδότηση του TGF-β.

**ΥΛΙΚΑ
&
ΜΕΘΟΔΟΙ**

A) ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ DNA

A1. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν με PCR οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των φωσφατασών SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A με κατάλληλους primer (Εικόνα 11) ως εξής:

Υλικά

Μητρικό DNA από HaCaT cDNA (3 μ l)

PCR εκκινητές 10 pm/ μ l (1 μ l από κάθε εκκινητή)

dNTPs 2 mM (2.5 μ l)

MgCl₂ 25 mM (1.5 μ l)

DMSO (1 μ l)

GoTaq πολυμεράση (5 μ l)

5x GoTaq buffer (0.25 μ l)

Νερό/WFI (9.75 μ l)

Οι συνθήκες των PCR που πραγματοποιήθηκαν είναι:

Για τα SCP1/SCP2

94⁰C 4 min

94⁰C 30 sec

62⁰C 90 sec

72⁰C 2 min

72⁰C 4 min

} 35 κύκλοι

Για τα SCP3/PPM1A

94⁰C 4 min

94⁰C 30 sec

58⁰C 90 sec

72⁰C 2 min

72⁰C 4 min

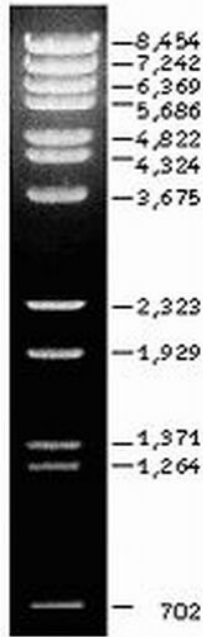
} 35 κύκλοι

	Εκκινητές	Προϊόν PCR (bp)
SCP1		
forward	5'- cgcg <u>gaattc</u> atgg acagctcgggcgcattac-3'	783 bp
reverse	5'- <u>ttg</u> cgggccgcctagctccctggcctggc-3'	
SCP2		
forward	5'-cgcg <u>gaattc</u> atggaaacagggtccatcatcacc-3'	816 bp
reverse	5'- <u>ttg</u> cgggccgcctaaggggcccgcagctg-3'	
SCP3		
forward	5'-cgcg <u>gaattc</u> atggacggcccggccatc-3'	831 bp
reverse	5'- <u>ttg</u> cgggccgcctacctattgcagagtctgtg-3'	
PPM1A		
forward	5'-ccgctcgagatgggagcatttttagacaagc-3'	1149 bp
reverse	5'- <u>tgct</u> ctagattaccacatatcatctgtgatgtag-3'	

Εικόνα 11. Οι primers των SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A και το μέγεθος του προϊόντος της PCR. Σε bold είναι η συμπληρωματική αλληλουχία με το αντίστοιχο cDNA. Επίσης έχουν προστεθεί (με υπογράμμιση) αλληλουχίες κοπής με EcoRI (gaattc), NotI (cgggccgcc), XhoI (ctcgag) και XbaI (tctaga) καθώς και ένα τρινουκλεοτίδιο στην αρχή του κάθε εκκινητή που βοηθά τα περιοριστικά ένζυμα να κόψουν. Οι εκκινητές παρασκευάστηκαν από το εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB).

A2. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ DNA

Για την κατασκευή πηκτώματος αгарόζης 1% λειώνουμε σε υψηλή θερμοκρασία 1% αгарόζη σε συγκεκριμένο όγκο 1x TAE (π.χ. 1 gr αгарόζη σε 100 ml TAE) και προσθέτουμε 5 μl βρωμιούχο εθίδιο (EtBr) το οποίο προσδένεται στο DNA και το κάνει να φθορίζει κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία. Η συγκέντρωση της αгарόζης μπορεί να ποικίλει από αραιή για διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA ή πυκνή για διαχωρισμό μικρών τμημάτων DNA. Το διάλυμα τοποθετείται να πήξει σε ειδικό εκμαγείο με κτένα για το σχηματισμό των πηγαδιών φορτώματος του DNA. Αφού πήξει το τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης μέσα σε διάλυμα 1x TAE. Το DNA το τοποθετούμε στα πηγάδια του πηκτώματος μαζί με ειδική χρωστική (blue juice ή orange G/φικόλλη) η οποία καθλώνει το DNA στα πηγάδια και μας επιτρέπει να ελέγχουμε τη κινητική της ηλεκτροφόρησης.



Fragment	Size (bp)	Mass (ng) (1 μ g total λ DNA)
1	8454	174
2	7242	149
3	6369	131
4	5686	117
5	4822	99
6	4324	89
7	3675	76
8	2323	48
9	1929	40
10	1371	28
11	1264	26
12	702	14
13	224	5
14	117	2

Εικόνα 12. Πρότυπο ζωνών γονιδιώματος του λ φάγου κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο BstEII σε πήκτωμα αγαρόζης (0,7%). Η συνολική ποσότητα του DNA είναι 1 μ g και δίπλα στη κάθε ζώνη αναγράφεται μέγεθος σε bp (από την εικόνα λείπουν οι δύο τελευταίες ζώνες). Στο διπλανό πίνακα αναγράφονται οι ποσότητες DNA που αντιστοιχούν σε κάθε ζώνη σε σχέση με την ολική ποσότητα του ενός μ g.

Η διαδικασία της ποσοτικοποίησης μπορεί να γίνει με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία δείκτη μοριακών μεγεθών γνωστής συγκέντρωσης, όπως του λ /BstEII. Ο δείκτης αυτός αποτελείται από γονιδίωμα λ φάγου το οποίο το έχουμε τεμαχίσει με το περιοριστικό ένζυμο BstEII και ο οποίος δίνει στο gel ζώνες DNA γνωστής ποσότητας και μεγέθους, όπως φαίνεται στην εικόνα 12. Η ποσότητα του DNA που τρέξαμε υπολογίζεται το μέγεθος και τη φωτεινότητα της ζώνης του λ /BstEII.

Α3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ WIZARD SV GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM ΤΗΣ PROMEGA

Υλικά

Wizard SV Gel and PCR Clean-up System της Promega για απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Διαδικασία

1. Εξαγωγή της ζώνης με το DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με αποστειρωμένο νυστέρι κάτω από UV ακτινοβολία.
2. Ζύγισμα της ζώνης του πηκτώματος.
3. Προσθήκη ίσου όγκου membrane binding solution.
4. Επώαση στους 55⁰C μέχρι να λιώσει η αγαρόζη (vortex ενδιάμεσα).
5. Πέρασμα του δείγματος από κολώνα SV minicolumn μέχρι τα 700μl.
6. Επώαση 1min σε θερμοκρασία δωματίου (RT).
7. Φυγοκέντριση για 1 min στις 13000 rpm σε RT.
8. Απομάκρυνση του flowthrough και επανατοποθέτηση του φίλτρου στη κολώνα.
9. Προσθήκη 700 μl membrane wash solution.
10. Φυγοκέντριση για 1min στις 13000 rpm σε RT.
11. Απομάκρυνση του flowthrough και επανατοποθέτηση του φίλτρου στη κολώνα.
12. Προσθήκη 500 μl membrane wash solution.
13. Φυγοκέντριση για 5 min στις 13000 rpm σε RT.
14. Απομάκρυνση flowthrough.
15. Φυγοκέντριση για 1 min στις 13000 rpm σε RT χωρίς καπάκι στη φυγόκεντρο για απομάκρυνση αιθανόλης.
16. Τοποθέτηση του φίλτρου σε καθαρό eppendorf και προσθήκη 50 μl nuclease-free water στο κέντρο της μεμβράνης.
17. Επώαση 1 min σε RT.

18. Φυγοκέντριση για 1 min στις 13000 rpm σε RT.
19. Στο eppendorf συγκεντρώνεται το DNA και από αυτό τρέχουμε σε πήκτωμα αγαρόζης μικρή ποσότητα για να σιγουρευτούμε ότι δε χάθηκε κατά τη διαδικασία
20. Αποθήκευση στους -20°C .

A4. ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι αντιδράσεις πέψης που έγιναν αποτελούνταν από το DNA προς κοπή, ένα ή παραπάνω περιοριστικά ένζυμα, το ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης, BSA και αποστειρωμένο νερό. Στην εικόνα 13 παρατίθενται πληροφορίες για τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για τις κλωνοποιήσεις των SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A.

Ένζυμο	θερμοκρασία	Ρυθμιστικό διάλυμα	Αλληλουχία DNA που κόβει
EcoRI	37°C	High buffer (EcoRI buffer)	5'-G/AATTC-3' 3'-CTTAA/G-5'
NotI	37°C	NEB3	5'-G/CGGCCGC-3' 3'-CGCCGGC/G-3'
XhoI	37°C	High buffer (XhoI buffer)	5'-C/TCGAG-3' 3'-GAGCT/C-5'
XbaI	37°C	NEB2	5'-T/CTAGA -3' 3'-AGATC/T-3'

Εικόνα 13. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση των SCPs και PPM1A στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3-6myc. Επίσης φαίνονται οι θερμοκρασίες και τα ρυθμιστικά διαλύματα των ενζύμων. Για τη διπλή πέψη με EcoRI και NotI χρησιμοποιήθηκε EcoRI buffer ενώ για τη διπλή πέψη με XhoI και XbaI χρησιμοποιήθηκε NEB2 buffer.

A5. ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ DNA

Αυτή η διαδικασία γίνεται για να καθαρίσουμε το DNA από άλατα και ένζυμα μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

Υλικά

CH₃COONa 3M

Αιθανόλη (100% & 75%)

T.E. (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) ή νερό

Διαδικασία

1. Στο eppendorf που έχουμε το DNA προσθέτουμε 1/10 του όγκου CH₃COONa 3M και 2^{1/2} του όγκου αιθανόλη.
2. Αφήνουμε στους -80°C για 30 min ή στους -20°C ολονύκτια.
3. Φυγοκέντριση για 15 min στις 13000 rpm σε RT και aspiration υπερκείμενου.
4. Προσθήκη 500 μl 75% αιθανόλης (παγωμένη).
5. Φυγοκέντριση για 5 min στις 13000 rpm σε RT και aspiration υπερκείμενου.
6. Στέγνωμα πελέτας σε HOOD.
7. Προσθήκη 30 μl T.E. ή νερού και αφήνουμε να επαναδιαλυθεί σε πάγο.

A6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ DNA ΜΕ ΦΟΡΕΑ (LIGATION)

Για την σύνδεση του γραμμικού πλασμιδιακού φορέα μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα με το ένθεμα χρησιμοποιείται το ένζυμο T4 DNA ligase. Ο φυσιολογικός ρόλος αυτού του ενζύμου στο βακτηριοφάγο T4 είναι να δημιουργεί φωσφοδιεστερικό δεσμό ανάμεσα στην υδροξυλική ομάδα του 3'-άκρου και στη φωσφορική ομάδα του 5'-άκρου σε δίκλινα μόρια DNA ή RNA. Η ταχύτητα συγκόλλησης ενός άκρου DNA με ένα άλλο κάτω από σταθερές συνθήκες εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση των συμβατών άκρων του DNA, ανεξάρτητα από το αν

αυτά τα άκρα ανήκουν στο ίδιο μόριο ή σε διαφορετικά μόρια DNA. Σε γενικές γραμμές ισχύει ότι η αναλογία φορέα προς ένθεμα πρέπει να είναι 1 προς 5, ώστε να αποφύγουμε φαινόμενα επανασυγκόλλησης του φορέα χωρίς το ένθεμα. Μία αντίδραση λιγάσης όγκου 15 μl πρέπει να περιέχει τα εξής υλικά:

1. Ποσότητα DNA φορέα και ενθέματος σε κατάλληλη αναλογία.
2. 1.5 μl 10x ligase buffer
3. 1 μl T4 λιγάση
4. ATP 20 mM (μπορεί να περιέχεται στο buffer)
5. Νερό

Η αντίδραση επωάζεται ολονύκτια στους 4⁰C. Στο τέλος πραγματοποιούνται δοκιμαστικές πέψεις για έλεγχο της ένθεσης στο φορέα.

A7. ΥΓΡΟ ΚΑΙ ΣΤΕΡΕΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ LB

Υλικά

Bacto-tryptone

Bacto-yeast

NaCl

άγαρ 15 gr/l

Διαδικασία

Για την παρασκευή ενός λίτρου υγρού LB βάζουμε σε αποσταγμένο νερό ενός λίτρου 10 gr bacto-tryptone, 5 gr bacto-yeast extract και 8 gr NaCl και διαλύουμε το μείγμα σε μαγνητικό αναδευτήρα. Το LB αποστειρώνεται για περίπου 1 ώρα. Αν θέλουμε να προσθέσουμε αντιβιοτικό στο LB το κάνουμε μετά την αποστείρωσή του διότι αλλιώς χαλάει κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας.

Για την κατασκευή στερεού LB απλά προσθέτουμε πριν την αποστείρωση άγαρ 15 gr/lit το οποίο διαλύεται κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης. Αν θέλουμε μετά προσθέτουμε αντιβιοτικό (αφού κρυώσει λίγο το LB αλλά πριν στερεοποιηθεί) και γεμίζουμε τρυβλία-Petri αφήνοντας το LB να στερεοποιηθεί. Τα τρυβλία φυλάσσονται μετά στο ψυγείο.

A8. ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΜΕ ΘΕΡΜΙΚΟ ΣΟΚ

Με το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων εισάγουμε ένα πλασμίδιο σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα (*E.coli* DH10β στη παρούσα εργασία). Αυτά τα κύτταρα μπορούμε μετά να τα πολλαπλασιάσουμε για περαιτέρω χρήση.

Υλικά

Επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* DH10β

Πλασμίδιο

Υγρό LB χωρίς αντιβιοτικό

Τρυβλία-Petri στερεού LB (προσθήκη άγαρ) με αντιβιοτικό (ανάλογα την ανθεκτικότητα του πλασμιδίου)

Διαδικασία

1. Βγάζουμε τα επιδεκτικά κύτταρα από τους -80°C και τα βάζουμε σε πάγο μέχρι να υγροποιηθούν. Προσθέτουμε σε αυτά το πλασμίδιο. Αν είναι προϊόν της αντίδρασης λιγάσης (ligation) προσθέτουμε όλη την αντίδραση, αν είναι προϊόν *mediprep* βάζουμε 1 μl.
2. Ανακινούμε με το χέρι και αφήνουμε 30 min στον πάγο.
3. Πραγματοποιούμε θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec ακριβώς.
4. Τοποθετούμε στον πάγο για 1-2 min.

5. Προσθέτουμε 900 μl LB στο erpedorf και αφήνουμε την καλλιέργεια να αναπτυχθεί στους 37°C για 45-60 min.
6. Τοποθετούμε τα τρυβλία στους 37°C για να φύγει η υγρασία.
7. Φυγοκεντρούμε την καλλιέργεια στις 2000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (για ligation κάνω απευθείας plating με 100 μl καλλιέργειας).
8. Αφαιρούμε ~500-600 μl του υπερκείμενου LB και επαναδιαλύουμε την πελέτα στο υπόλοιπο LB.
9. Απλώνουμε το διάλυμα στο τρυβλίο και αφήνουμε να επωαστεί στους 37°C ολονύκτια (κατά το άπλωμα δουλεύουμε κοντά σε φλόγα για να αποφύγουμε μολύνσεις).

A9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΜΙΚΡΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MINIPREPS)

Υλικά

Υγρό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό

Lysis buffer (8% sucrose, 5% Triton X-100, 500 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 7.5)

Λυσοζύμη (10 mg/ml)

Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη 75%

RNAse

T.E. (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) ή νερό

Λιαδικασία

1. Λήψη μοναδιαίων αποικιών με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα από τρυβλίο με στερεό θρεπτικό μέσο LB και καλλιέργειά τους ολονύκτια με ανακίνηση στους 37°C σε 2 ml υγρό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό.
2. Μεταφορά σε erpedorf (1,5 ml).

3. Φυγοκέντριση για 1 min στις 13000 rpm σε RT και απομάκρυνση υπερκλειμένου.
4. Προσθήκη 600 µl lysis buffer και 20 µl λυσοζύμη.
5. Επαναδιάλυση της πελέτας με vortex και επώαση 10 min σε RT.
6. Βράσιμο για 90 sec.
7. Επώαση στο πάγο για 15 min.
8. Φυγοκέντριση 15 min στις 13000 rpm σε RT.
9. Απομάκρυνση του ιζήματος με οδοντογλυφίδα.
10. Προσθήκη 600 µl παγωμένης ισοπροπανόλης (ανακατεύουμε καλά).
11. Τοποθέτηση στους -20°C για 20-30 min.
12. Φυγοκέντριση για 15 min στις 13000 rpm σε RT και απομάκρυνση υπερκλειμένου.
13. Προσθήκη 500 µl αιθανόλης 75%.
14. Φυγοκέντριση για 5 min στις 13000 rpm σε RT και απομάκρυνση υπερκλειμένου.
15. Στέγνωμα πελέτας σε HOOD
16. Επαναδιάλυση σε T.E. ή νερό με 10 mg/ml RNase.
17. Αποθήκευση στους -20°C .

Α10. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΜΕΣΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MEDIPREPS)

Υλικά

Υγρό LB με κατάλληλο αντιβιοτικό

Διαλύματα P1 (resuspension buffer), P2 (lysis buffer), P3 (neutralization buffer), QBT (equilibration buffer), QC (wash buffer), QF (elution buffer) της Qiagen

RNase (την προσθέτουμε στο P1)

Κολώνες Qiagen

Φίλτρο ενυδρείου

Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη 75%

T.E. (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8) ή νερό

Διαδικασία

Αρχικά μολύνονται 3 ml θρεπτικό LB με αντιβιοτικό με μοναδιαία αποικία και γίνεται ολονύκτια επώαση στους 37°C. Στη συνέχεια μέρος αυτής της καλλιέργειας χρησιμοποιείται για μόλυνση 200 ml LB με αντιβιοτικό και γίνεται πάλι ολονύκτια επώαση στους 37°C. Εναλλακτικά μπορούμε απευθείας να μολύνουμε 200 ml LB με αντιβιοτικό με μοναδιαία καλλιέργεια από το τρυβλίο-Petri και να γίνει ολονύκτια επώαση στους 37°C.

1. Μεταφορά καλλιέργειας σε τέσσερα falcon των 50 ml.
2. Φυγοκέντριση για 20 min στις 3500 rpm στους 4°C και απομάκρυνση υπερκείμενου.

-Ανά 100ml καλλιέργειας:

3. Προσθήκη 4 ml P1 με RNAse και διάλυση πελέτας με vortex.
4. Προσθήκη 4 ml P2, ήπια ανακίνηση και τοποθέτηση για 5 min σε RT.
5. Προσθήκη 4 ml P3, ήπια ανακίνηση και τοποθέτηση σε πάγο για 15 min.
6. Φυγοκέντριση για 30 min στις 3500 rpm στους 4°C.
7. Προσθήκη 4 ml QBT σε κολώνα Qiagen.
8. Τοποθέτηση φίλτρου ενυδρείου στην κολώνα και προσθήκη υπερκείμενου της φυγοκέντρισης.
9. Προσθήκη 10 ml QC από δύο φορές στην κολώνα.
10. Αφού περάσει το QC τοποθετούμε κάτω από την κολώνα falcon των 15 ml.
11. Προσθήκη 5 ml QF, το οποίο συγκεντρώνεται στο falcon με το DNA.
12. Προσθήκη 3.5 ml ισοπροπανόλης (70% του όγκου), ήπια ανακίνηση και μοίρασμα σε 6 eppendorf.
13. Φυγοκέντριση για 30 min στις 13000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση υπερκείμενου.
14. Επανάληψη των βημάτων 7-13 για τα υπόλοιπα 100 ml της καλλιέργειας.
15. Προσθήκη 75% αιθανόλης (300 μl/eppendorf).
16. Φυγοκέντριση για 30 min στις 13000 rpm σε RT και απομάκρυνση υπερκείμενου.
17. Στέγνωμα πελέτας σε HOOD.

18. Επαναδιάλυση σε ~200 µl T.E. ή νερού (~30 µl/eppeдорf) ολονύκτια στους 4°C.
19. Αποθήκευση στους -20°C.

Για την ποσοτικοποίηση του DNA προσθέτουμε 5 µl από το mediprep σε 995 µl νερού και το φωτομετρούμε στα 260 nm (για τυφλό χρησιμοποιούμε σκέτο νερό). Ο αριθμός που προκύπτει πολλαπλασιαζόμενος με το 10 µας δίνει την ποσότητα του DNA που έχουμε στο mediprep σε µg/µl.

A11. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ (HaCaT) ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ cDNA (RT-PCR)

Υλικά

Καλλιέργεια HaCaT κυττάρων (χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία)

Διπλά αποστειρωμένα blue tips, yellow tips, eppendorf των 1.5 ml και 2 ml, και eppendorf για PCR

1x PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)

Trizol

Χλωροφόρμιο

Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη 75%

Νερό (WFI)

Για αντίδραση RT-PCR: dNTPs (φρέσκα), random primers, 5x first strand buffer, DTT, transcriptase, RNase out

Διαδικασία

-Κυτταρική καλλιέργεια:

Αρχικά αραιώνουμε τα κύτταρα, τα τοποθετούμε σε p60 (~500.000 cells/plate) και τα αφήνουμε για 24 ώρες να μεγαλώσουν. Στη συνέχεια αν θέλουμε να προσθέσουμε TGF-β πρέπει να τα περάσουμε σε θρεπτικό DMEM High 0.02% FBS για 24 ώρες, διαφορετικά μπορούμε να τα λύσουμε άμεσα. Στη συνέχεια προσθέτουμε TGF-β στα χρονικά όρια που μας ενδιαφέρουν (π.χ. 24, 8, 4, 2, 1 ώρες).

-Λύση κυττάρων και απομόνωση του RNA:

1. Έκπλυση κυττάρων με 1 ml 1x PBS.
2. Προσθήκη 1 ml Trizol για ομογενοποίηση και τοποθέτηση σε eppendorf των 2 ml (εδώ μπορώ να αποθηκεύσω τα κύτταρα στους -80°C).
3. Επώαση για 5 min σε RT.
4. Προσθήκη 200 μl χλωροφόρμιου, vortex για 10 min για ομογενοποίηση και επώαση για 2-3 min σε RT.
5. Φυγοκέντριση για 15 min στις 12000 rpm στους 4°C .
6. Λήψη πάνω φάσης και τοποθέτησή της σε eppendorf του 1.5ml.
7. Προσθήκη 0.5 ml φρέσκιας ισοπροπανόλης, ανακίνηση και επώαση για 10 min σε RT.
8. Φυγοκέντριση για 15 min στις 12000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση υπερκείμενου.
9. Προσθήκη 1 ml 75% φρέσκιας απόλυτης αιθανόλης και vortex.
10. Φυγοκέντριση για 15 min στις 12000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση υπερκείμενου.
11. Στέγνωμα πελέτας σε HOOD.
12. Προσθήκη 30-35 μl WFI και επαναδιάλυση σε πάγο για 30 min.
13. Αποθήκευση στους -80°C .

-Παρασκευή cDNA:

1. Προσθέτω 5 μl RNA σε 995 μl νερό και φωτομετρώ στα 260 nm.

2. Το αποτέλεσμα της φωτομέτρησης πολλαπλασιαζόμενο επί 8 μας δίνει τη ποσότητα σε $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
3. Φτιάχνω μία αραιώση 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (σε τελικό όγκο 20 ή 50 μl) και τη χρησιμοποιώ στην παρακάτω αντίδραση cDNA:
 - 5 μl RNA (αραιώση 200 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
 - 20.5 μl WFI
 - 5 μl dNTPs (φρέσκα)
 - 3 μl random primers για RT-PCR (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$)
4. Τοποθετώ τις αντιδράσεις στο πρόγραμμα cDNA (δες παρακάτω).
5. Αφήνω να ολοκληρωθεί το πρώτο βήμα στους 65°C για 5 min και κάνω παύση.
6. Τοποθετώ τα δείγματα στο πάγο και προσθέτω 10 μl 5x first strand buffer και 5 μl DTT.
7. Επανατοποθετώ τα δείγματα στο μηχάνημα της PCR για τη συνέχιση της αντίδρασης και μετά από δύο λεπτά κάνω παύση και τοποθετώ τα δείγματα στο πάγο.
8. Προσθέτω 1 μl transcriptase και 0.5 μl RNase out.
9. Επανατοποθετώ τα δείγματα στο μηχάνημα της PCR για την ολοκλήρωση της αντίδρασης.
10. Τα δείγματα τα φυλάω στους -20°C .
11. Για να διερευνήσω την επιτυχία στην παρασκευή του cDNA χρησιμοποιώ 2 μl σε αντίδραση PCR με γονίδιο ελέγχου το GAPDH.

-Προγράμματα PCR και εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν σε RT-PCR πειράματα στη παρούσα εργασία:

Οι συνθήκες PCR για τη παρασκευή cDNA είναι:

65°C	5 min
25°C	12 min
32°C	50 min
70°C	15 min

Για το GAPDH οι εκκινητές και οι συνθήκες PCR είναι:

Forward primer: 5'-gtggtctgtgtcaccgtatc-3'

Reverse primer: 5'-gtagttgaatccgagctgcc-3'

94 ⁰ C	4 min	
94 ⁰ C	30 sec	} 20 κύκλοι
57 ⁰ C	30 sec	
72 ⁰ C	45 sec	
72 ⁰ C	4 min	

Για το PAI οι εκκινητές και οι συνθήκες PCR είναι:

Forward primer: 5'-accacagtccatgccatca-3'

Reverse primer: 5'-tccaccacctgttgctgta-3'

95 ⁰ C	7 min	
94 ⁰ C	30 sec	} 29 κύκλοι
59 ⁰ C	30 sec	
72 ⁰ C	30 sec	
72 ⁰ C	5 min	

Για τα SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A οι συνθήκες της PCR και οι εκκινητές φαίνονται στην ενότητα A1 με διαφορά ότι στις αντιδράσεις για τα SCP1 και SCP2 ανεβάσαμε τη θερμοκρασία υβριδοποίησης στους 64⁰C.

B) ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

B1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ (SDS-PAGE)

Υλικά

Εκμαγείο για παρασκευή του πήκτωματος πολυακρυλαμίδης

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

30% Acrylamide (29 gr acrylamide, 1g bis-acrylamide, volume 100 ml)

Running buffer (Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8)

Stacking buffer (Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8)

10% APS (1 gr APS σε 10 ml νερό)

TEMED

1x TGS (1 L 10x TGS: 30.3 gr Tris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3)

4x loading buffer (2.5 ml Tris-HCl, 1.6 ml β-mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue)

Πρωτεϊνικός δείκτης μοριακών μεγεθών

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών διαφορετικού μέγεθος και αποτελείται από δύο μέρη, το stacking gel (πήκτωμα κατακάθισης) και το running gel (πήκτωμα διαχωρισμού). Η σύστασή τους φαίνεται στην εικόνα 14. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνικών διαλυμάτων προσθέτουμε 4x loading buffer και το βράζουμε για 5 min στους 100⁰C για να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες. Το πήκτωμα ηλεκτροφορείται μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TGS για 1 ώρα στα 150 V/90 A.

GEL ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ						
Running gel					stacking gel	
	7%	8.5%	10.5%	12.5%		
ddH ₂ O	5 ml	4.6 ml	3.9 ml	3.2 ml	ddH ₂ O	3.6 ml
30% acrylamide	2.4 ml	2.8 ml	3.5 ml	4.2 ml	30% acrylamide	0.9 ml
Running buffer	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	Stacking buffer	1.5 ml
10% APS	160 μl	160 μl	160 μl	160 μl	10% APS	60 μl
TEMED	8 μl	8 μl	8 μl	8 μl	TEMED	6 μl

Εικόνα 14. Τα συστατικά του running και του stacking gel του πήκτωματος πολυακρυλαμίδης. Το πήκτωμα είναι αποδιατακτικό αφού περιέχει SDS (στα buffer).

B2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ (TRANSFER) ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΣΕ MEMBRANΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ

Υλικά

Transfer buffer (700 ml H₂O, 100 ml 10x TGS, 200 ml methanol)

Σφουγγαράκια

Χαρτί wattmann

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Protran/Whatman)

Συσκευή transfer (μαζί με ειδικό δοχείο που περιέχει νερό σε μορφή πάγου)

Διαδικασία

1. Ηλεκτροφόρηση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
2. Τοποθέτηση στη συσκευή transfer κατά σειρά: ένα σφουγγαράκι εμποτισμένο με transfer buffer, δύο χαρτιά wattmann εμποτισμένα με transfer buffer, το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, ξανά δύο χαρτιά wattmann εμποτισμένα με transfer buffer και ξανά ένα σφουγγαράκι εμποτισμένο με transfer buffer. Το χαρτί wattmann κόβεται σε διαστάσεις 7x9 cm και η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης κόβεται σε διαστάσεις ίδιες με αυτές του

running gel του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης. Όταν τοποθετήσουμε το πήκτωμα (έχουμε κόψει το stacking gel) φροντίζουμε να το κρατάμε υγρό με transfer buffer και προσέχουμε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες κατά τη τοποθέτηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης.

3. Κλείνουμε τη συσκευή transfer και την εφαρμόζουμε σε ειδικό δοχείο. Η πλευρά στην οποία το πήκτωμα εφάπτεται με τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φροντίζουμε να κοιτά το θετικό πόλο για σωστή μεταφορά της πρωτεΐνης. Το δοχείο αυτό γεμίζεται με transfer buffer. Για να μην αναπτυχθούν πολύ υψηλές θερμοκρασίες κατά την ηλεκτροφόρηση τοποθετούμε ένα επιπρόσθετο μικρό δοχείο με νερό σε μορφή πάγου.
4. Γίνεται ηλεκτροφόρηση στα 400 A/150 V για μιάμιση ώρα.

B3. WESTERN BLOT

Υλικά

TBS-T 0.05% (1x TBS, 0.05% Tween-20 και 1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2 M pH 7.3)

Blocking solution (5% dry milk σε TBS-T 0.05%)

1^ο αντίσωμα (ειδικό για τη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει)

2^ο αντίσωμα (anti-HRP)

ECL (Oxidizing και enhanced luminal reagent) (Thermo Scientific)

Μεμβράνη saran

Κασέτα εμφάνισης

Φιλμ εμφάνισης (Fujifilm)

Διαδικασία

1. Έπειτα από transfer λαμβάνεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και τοποθετείται σε δοχείο με τη πλευρά που βρίσκονται οι πρωτεΐνες προς τα πάνω (είναι η πλευρά που εφάπταναν του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης).
2. Έκπλυση με TBS-T 0.05% για 10 min.

3. Επώαση με blocking solution για 1 ώρες σε RT για το μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης του αντισώματος.
4. Γρήγορο ξέπλυμα με TBS-T 0.05%.
5. Επώαση με 1^ο αντίσωμα στην επιθυμητή αραίωση στους 4°C ολονύκτια (δες εικόνα 15 για τα αντισώματα της παρούσας εργασίας).
6. Τρεις δεκάλεπτες εκπλύσεις με TBS-T 0.05%.
7. Επώαση με 2^ο αντίσωμα anti-HRP στην επιθυμητή αραίωση σε blocking solution σε RT για 1 ώρα.
8. Τρεις δεκάλεπτες εκπλύσεις με TBS-T 0.05%.
9. Έκπλυση με 1x TBS για 5 min.
10. Τοποθέτηση ECL πάνω στη μεμβράνη (400 μl oxidizing reagent και 400 μl enhanced luminal reagent) για την ενίσχυση του σήματος του αντισώματος. Το αφήνουμε για 5min πάνω στη μεμβράνη υπό σκοτάδι.
11. Κάλυψη της μεμβράνης με saran, τοποθέτησή της σε ειδική κασέτα και έκθεση του φιλμ σε διάφορες χρονικές περιόδους (εξαρτάται πόσο δυνατό είναι το σήμα του αντισώματος).

1 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρία
a-P-Smad 2 L (Ser 245/250/255) (rabbit)	1:1000 5% BSA/TBST 0.1% (WB)	Cell Signaling
a-P-Smad 2 C (Ser 465/467) (rabbit)	1:1000 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Cell Signaling
a-Smad 2 (goat)	1:200 3% milk/TBST 0.05% (WB)	Santa Cruz
a-P-Smad 3 C (Ser 433/435) (rabbit)	1:1000 5% BSA/TBST 0.1% (WB)	Cell Signaling
a-Smad 3 (rabbit)	1:400 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Zymed Labor.
a-myc (mouse)	1:500 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Sigma
	1:200 PBS+/-/1.5% FBS (IF)	
a-flag (mouse)	1:1000 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Sigma
a-actin (mouse)	1:5000 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Chemicon
a-HNF4 (rabbit)	1:250 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Santa Cruz
	1:200 PBS+/-/1.5% FBS (IF)	
2 ^ο Αντίσωμα	Αραίωση	Εταιρία
a-rabbit HRP	1:5000 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Chemicon
a-rabbit FITC	1:50 PBS+/-/1.5% FBS (IF)	Chemicon
a-mouse HRP	1:10000 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Sigma
a-mouse FITC	1:50 PBS+/-/1.5% FBS (IF)	Chemicon
a-goat HRP	1:10000 5% milk/TBST 0.05% (WB)	Sigma
Streptavidin HRP	1:20000 TBST 0.1% (WB)	Sigma

Εικόνα 15. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Στη πρώτη στήλη φαίνεται σε παρένθεση το είδος του αντισώματος και στη δεύτερη είναι σε παρένθεση η εφαρμογή που χρησιμοποιήθηκε (WB-Western Blot και IF-Immunofluoresence).

B4. STRIPPING ΚΑΙ BLOCKING ΤΩΝ HRP ΜΕ NaN_3

Οι μεμβράνες του western blot μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για ανίχνευση διαφορετικού επιτόπου αφού «σβήσουμε» το σήμα της προηγούμενης ανίχνευσης. Στην περίπτωση που το 2^ο αντίσωμα (το anti-HRP) της καινούργιας ανίχνευσης είναι διαφορετικό από αυτό της πρώτης, τότε αρκεί να κάνουμε μπλοκάρισμα των HRP με NaN_3 ώστε να σβήσουμε πιθανό σήμα από τη πρώτη ανίχνευση. Σε περίπτωση που το 2^ο αντίσωμα (το anti-HRP) της καινούργιας ανίχνευσης είναι ίδιο με αυτό της πρώτης, τότε αυτό θα προσδεθεί εκ νέου στο 1^ο αντίσωμα της πρώτης ανίχνευσης και θα μας δώσει σήμα το οποίο θα θέλαμε να αποφύγουμε. Για να λύσουμε αυτό το πρόβλημα υποβάλουμε τη μεμβράνη σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος. Αυτή η διαδικασία έχει σαν αποτέλεσμα την αποδέσμευση και απομάκρυνση του 1^{ου} αντισώματος της πρώτης ανίχνευσης από την πρωτεΐνη-στόχο οπότε και το «σβήσιμο» του σήματος.

Υλικά

Stripping buffer (100 mM β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8)

TBS-T 0.05%

NaN_3 1% σε TBS-T 0.05% (1ml NaN_3 1% και 49ml TBS-T 0.05%)

Διαδικασία

-Stripping:

1. Επώαση της μεμβράνης στο stripping buffer για 30 min σε 50°C και 5 min σε rotating platform σε RT.
2. Έκπλυση με TBS-T 0.05% για 10 min.
3. Συνέχεια τη διαδικασίας του western blot από το σημείο επώασης της μεμβράνης με blocking solution.

-Blocking με HRP:

1. Επώαση της μεμβράνης με NaN_3 1% σε TBS-T 0.05% για 1 ώρα σε RT.
2. Τρεις δεκάλεπτες εκπλύσεις με TBS-T 0.05%.
3. Συνέχεια τη διαδικασίας του western blot από το σημείο επώασης της μεμβράνης με 1^ο αντίσωμα ολονύκτια.

B5. ΛΥΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ CO-IP LYSIS BUFFER

Υλικά

Co-IP lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% γλυκερόλη, 1% Triton X-100)

PMSF 0.1M και benzamidine 0.5M (αναστολείς σερινοπρωτεασών που προσθέτουμε στο Co-IP lysis buffer σε αραίωση 100:1 και 1000:1 αντίστοιχα)

1x PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)

Scraper

Διαδικασία

1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό υλικό από τα κύτταρα και προσθέτουμε 1 ml 1x PBS.
2. Για την αποκόλληση των κυττάρων από τα πιάτα τα ζύνουμε με ειδικό scraper και το τοποθετούμε σε eppendorf του 1.5 ml μέσα σε πάγο.
3. Φυγοκέντριση για 5 min στις 5000 rpm στους 4⁰C και απομάκρυνση υπερκειμένου.
4. Επαναδιάλυση της πελέτας σε 100 μl Co-IP lysis buffer με τους αναστολείς πρωτεασών PMSF και benzamidine.
5. Αφήνουμε το δείγματα στον rotator για 30 min στους 4⁰C.
6. Φυγοκέντριση για 5 min στις 13000 rpm στους 4⁰C.
7. Αποθήκευση του υπερκειμένου με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στους -80⁰C μέχρι τη χρήση του.

B6. ΚΑΝΟΝΟΚΟΠΟΙΗΣΗ LOWRY-BRADFORD

Με αυτή τη μέθοδο μπορούμε να μετρήσουμε σε μg την ολική ποσότητα των πρωτεϊνών σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα και να διερευνήσουμε σε ποσοτικό επίπεδο διαφορές των πρωτεϊνών που βρίσκονται στα διάφορα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

Υλικά

10μl από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα

Νερό

Διαλύματα A, B και S (Bio-rad)

Διάλυμα A' (1000 μl A και 20 μl S)

Διαδικασία

1. Αναμιγνύω 10 μl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος με 190 μl νερό, 100 μl A' και 800 μl B.
2. Αφήνω για 15 min σε RT.
3. Φωτομετρώ στα 750 nm.
4. Για τον υπολογισμό της ποσότητας της πρωτεΐνης που περιέχεται στα 10 μl χρησιμοποιούμε τον τύπο:

$x=(y-a)/b$ όπου x: η ποσότητα της πρωτεΐνης σε μg

y: η οπτική πυκνότητα (OD)

a: 0.02348

b: 0.00745

5. Ανάγουμε το αποτέλεσμα στον όγκο του συνολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος για να βρούμε την ολική ποσότητα της πρωτεΐνης που περιέχει.

B7. Η ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΝΟΝΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΤΙΜΩΝ ΤΗΣ (LUCIFERASE & β-GAL ASSAY)

Η αντίδραση λουσιφεράσης είναι μία μέθοδος μέτρησης της μεταγραφικής ενεργοποίησης που προκαλείται από ρυθμιστικά στοιχεία κάποιου γονιδίου. Δηλαδή, όταν τα ρυθμιστικά στοιχεία αναγνώρισης κάποιου μεταγραφικού παράγοντα που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε βρίσκονται upstream του γονιδίου της λουσιφεράσης σε ένα πλασμίδιο, τότε μετρώντας την ενεργότητα της λουσιφεράσης μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για την ικανότητα μεταγραφής του μεταγραφικού παράγοντα κάτω από συγκριμένες συνθήκες (π.χ. παρουσία κάποιας μετάλλαξης ή κάποιου αναστολέα του μεταγραφικού παράγοντα). Για παράδειγμα στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση των Smad2/3 πρωτεϊνών παρουσία των SCPs. Τα πλασμίδια-reporter που χρησιμοποιήθηκαν είναι το p(CAGA)₁₂-E1B-luc το οποίο περιέχει 12 φορές την αλληλουχία πρόσδεσης των Smad CAGA και έτσι ενεργοποιείται η μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης και το pG5-E1B-luc το οποίο περιέχει θέσεις πρόσδεσης για το DBD του GAL4.

Η κανονικοποίηση με β-gal γίνεται για να εξισορροπηθούν οι τιμές του luc assay από διαφορές που μπορεί να οφείλονται στην απόδοση της διαμόλυνσης ή στον αριθμό των κυττάρων που υπάρχει στα πιάτα καλλιέργειας αλλά όχι στις υπό μελέτη συνθήκες. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται το πλασμίδιο CMV-LacZ το οποίο περιέχει β-γαλακτοσιδάση κάτω από τον ισχυρό υποκινητή του κυτταρομεγαλοϊού. Η β-γαλακτοσιδάση καταλύει την υδρόλυση των β-γαλακτοσιδίων όπως ONPG και τα ανιόντα του ONP μας δίνουν το χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί στα 410 nm.

Υλικά

1x PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)

1x Cell lysis reagent (Promega)

Υπόστρωμα λουσιφερίνης

Sodium phosphate buffer 0.1 M (7.098 gr Na₂HPO₄ και ρύθμιση του pH στο 7.3 με NaH₂PO₄ 0.1 M, αποθήκευση σε RT)

ONPG (Για 8 mg/ml γίνεται προσθήκη 0.4 gr O-nitrophenol-galactoside σε 50 ml sodium phosphate buffer 0.1 M, αποθήκευση στους -20°C)

Mg^{2+} buffer (Για 1 ml χρησιμοποιούμε 333 μl KCl 3 M, 100 μl MgCl_2 1 M, 352 μl β -mercaptoethanol και 215 μl H_2O , αποθήκευση στους -20°C).

Διαδικασία

-luc assay:

1. Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού από κυτταρική καλλιέργεια.
2. Έκπλυση με 1x PBS.
3. Προσθήκη 1x cell lysis reagent (500 μl για HEK293T και 200 μl για HepG2).
4. Αφήνουμε τα δείγματα για 5 min σε ανακινούμενη πλατφόρμα ώστε να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από τα πιάτα (τα HepG2 τα ζύνουμε και με scraper).
5. Μεταφορά των κυττάρων σε eppendorf και vortex.
6. Τοποθέτηση για 10 min στους -80°C .
7. Τοποθέτηση για 2 min στους 37°C και γρήγορο vortex.
8. Φυγοκέντριση για 1 min στις 13000 rpm σε RT και λήψη υπερκείμενου.
9. Τοποθέτηση 60 μl από το υπερκείμενο σε νέο eppendorf και προσθήκη 60 μl υποστρώματος λουσιφερίνης.
10. Τοποθέτηση του eppendorf χωρίς καθυστέρηση στο λουμινόμετρο (luminometer) που θα μας δώσει την τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης.

$-\beta$ -gal assay:

1. Σε μικρή ποσότητα εκχυλίσματος (2 μl για HEK293T και 15 μl για HepG2) που έχει απομονωθεί από τη προηγούμενη διαδικασία προσθέτουμε 456 μl sodium phosphate buffer, 132 μl ONPG και 6 μl Mg^{2+} buffer (φτιάχνουμε ένα mix για όλα τα δείγματα).
2. Γρήγορη ανάδευση με vortex και τοποθέτηση χωρίς καθυστέρηση στους 37°C μέχρι την ανάπτυξη κίτρινης απόχρωσης.

3. Διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 200 μ l Na_2CO_3 1 M και ανάδευση με vortex.
4. Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 410 nm (για τυφλό χρησιμοποιούμε δείγμα που περιέχει 1x cell lysis reagent αντί για κυτταρικό εκχύλισμα).
5. Διαιρώντας τη μέγιστη τιμή της οπτικής πυκνότητα με τις μικρότερες προκύπτει ένας συντελεστής ο οποίος πολλαπλασιαζόμενος με τις τιμές του luc assay μας δίνει την κανονικοποιημένη τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης για κάθε δείγμα.

B8. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ

Υλικά

1x PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)

Buffer A (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1 mM DTT, 10 μ M leupeptin, 10 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM Na_4VO_3)

Buffer C (20 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 0.42M NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 10 μ M leupeptin, 10 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM Na_4VO_3)

Buffer D (20 mM Hepes pH 7.9, 0.05 M KCl, 0.2 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 10 μ M leupeptin, 10 mM PMSF, 10 μ g/ml aprotinin, 1 mM Na_4VO_3)

Διαδικασία

1. Έκπλυση των κυττάρων με 1x PBS.
2. Προσθήκη 1 ml 1x PBS, ξύσιμο των κυττάρων με scraper και μεταφορά τους σε eppendorf.
3. Φυγοκέντριση για 5 min στις 6000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση του PBS.

4. Επαναδιάλυση σε 400 µl Buffer A και αφήνουμε το δείγματα στον rotator για 15 min στους 4°C.
5. Φυγοκέντριση για 6 min στις 6000 rpm στους 4°C.
6. Το υπερκείμενο αποτελεί το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα και αφαιρείται προσεκτικά.
7. Επαναδιάλυση των πυρήνων της πελέτας σε 80 µl Buffer C και επώαση για 30 min στο πάγο
8. Προσθήκη 60 µl Buffer D και φυγοκέντριση για 6 min στις 13000 rpm στους 4°C.
9. Το υπερκείμενο αποτελεί το πυρηνικό εκχύλισμα το οποίο αφαιρείται και φυλάσσεται στους -80°C.

B9. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ DNA ΜΕ ΠΡΩΤΕΪΝΗ: ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΣΕ ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΜΕΝΟ ΟΛΙΓΟ-ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟ (DNAP-DNA AFFINITY PRECIPITATION)

Υλικά

Βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο

Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen)

Μαγνητικό rack

2x B&W (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM NaCl)

BBRC (10% glycerol, 10 mM Tris pH 7.5, 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA)

Protease inhibitors (1 mM DTT, 10 µM leupeptin, 10 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin)

Διαδικασία

1. Για την προετοιμασία των Dynabeads γίνεται αρχικά προσθήκη 5 µl Dynabeads M-280 Streptavidin σε eppendorf και έκπλυση τους μία φορά με 500 µl 1x B&W στο μαγνητικό rack.

2. Στη συνέχεια προσθέτουμε 7 μl 2x B&W και 7 μl από το βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο και αφήνουμε για 15 min (για δείγμα ελέγχου χωρίς το ολιγονουκλεοτίδιο βάζουμε μόνο 14 μl 1x B&W).
3. Έκπλυση δύο φορές με 1x B&W στο μαγνητικό rack.
4. Έκπλυση μία φορά με BBRC στο μαγνητικό rack.
5. Προσθήκη στα beads 500 μl BBRC με inhibitors και περίπου 300 μg από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα (το οποίο έχει απομονωθεί από ευκαρυωτικά κύτταρα με Co-IP lysis buffer-ενότητα B5-).
6. Επώαση στον rotator ολονύκτια στους 4⁰C.
7. Έκπλυση τρεις φορές με 500 μl BBRC με inhibitors στο μαγνητικό rack.
8. Προσθήκη 4x loading buffer στα beads, βράσιμο για 10 min και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
9. Western blot με κατάλληλο αντίσωμα.

B10. ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ ΒΙΟΤΙΝΥΛΙΩΣΗ

Η βιοτινυλίωση του επιτόπου bio από τη βακτηριακή λιγάση BirA και η δυνατότητα απομόνωσής του μέσω σφαιριδίων streptavidin-agarose μας δίνει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Συγκεκριμένα η λογική είναι ότι συνεκφράζουμε μια πρωτεΐνη που φέρει τον επίτοπο bio με BirA και την απομονώνουμε με σφαιρίδια streptavidin-agarose. Με κατάλληλο αντίσωμα και western blot μπορούμε να διαπιστώσουμε αν υπάρχει πάνω της προσδεμένη κάποια άλλη πρωτεΐνη.

Υλικά

Τα πλασμίδια που περιέχουν BirA και τη bio-tagged πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Streptavidin-agarose beads εξισορροπημένα (Sigma) (για την εξισορρόπησή τους προσθέτουμε σε αυτά 10 όγκους 1x PBS, φυγοκεντρούμε για 5 min στις 2000 rpm στους 4⁰C και αφαιρούμε το υπερκείμενο. Αυτό γίνεται τρεις φορές και στο τέλος προσθέτουμε ίσο όγκο 1x PBS ώστε τελικά να έχουμε 50% beads στο τελικό διάλυμα).

1x PBS (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)

Co-IP lysis buffer με 10 mM PMSF και 1 mM benzamide

Διαδικασία

1. Αρχικά τα κύτταρα λύνονται με Co-IP lysis με αναστολείς σε τελικό όγκο 550 μl (δες ενότητα B5).
2. Μεταφορά των 50 μl σε νέο eppendorf που θα χρησιμοποιηθούν ως input και προσθήκη 30 μl εξισορροπημένων σφαιριδίων στα υπόλοιπα 500 μl.
3. Επάωση των σφαιριδίων με το πρωτεϊνικό εκχύλισμα ολονύκτια στον rotator στους 4⁰C.
4. Φυγοκέντριση για 5 min στις 2000 rpm στους 4⁰C.
5. Προσθήκη 500 μl Co-IP lysis με αναστολείς.
6. Φυγοκέντριση για 5 min στις 2000 rpm στους 4⁰C και αφαίρεση υπερκείμενου Co-IP buffer.
7. Επανάληψη των βημάτων 6 και 7 άλλες δύο φορές.
8. Προσθήκη στα beads 10 μl 4x loading buffer, βράσιμο για 10 min και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.
9. Western blot με κατάλληλο αντίσωμα.

B11. ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

Ο έμμεσος ανοσοφθορισμός πραγματοποιείται για την παρατήρηση κάποιου αντιγόνου-πρωτεΐνης *in situ* με τη βοήθεια αντισωμάτων.

Υλικά

Αιθανόλη

0.5 ml ζελατίνης 0.1%

DMEM

Καλυπτρίδες και αντικειμενοφόροι

PBS +/+ (PBS με 0.9 mM CaCl₂ και 0.5 mM MgCl₂)

PBS +/+ / 1.5 % FBS

3% παραφορμαλδεΰδη (PFA)

Triton X-100

Buffer 1 (Για 10x: 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.5 mM γλυκόζη, 4 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 20 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6-6.5)

1^ο αντίσωμα

2^ο φθορίζων αντίσωμα

DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride)

Mounting solution

Βερνίκι νυχιών

Λιαδικασία

1. Για την τοποθέτηση των καλυπτρίδων στα 6-well αρχικά αποστειρώνονται σε 90% αιθανόλη και φλόγα.
2. Τοποθετούνται στα 6-well και επικαλύπτονται με 0.5 ml ζελατίνης 0.1% για 5 min.
3. Απομακρύνεται η ζελατίνη και γίνεται έκπλυση με 1 ml DMEM (χωρίς ορό και αντιβιοτικό).
4. Μετά από split απλώνονται τα κύτταρα πάνω στις καλυπτρίδες (~ 2x10⁵ ανά καλυπτρίδα).
5. Μετά από ~20 ώρες πραγματοποιείται διαμόλυνση των κυττάρων (αν χρειάζεται αλλιώς περνάμε απευθείας στο βήμα 7).
6. Μετά από 7-17 ώρες γίνεται αλλαγή θρεπτικού μέσου.
7. Μετά από 16 ώρες γίνεται παρατήρηση των κυττάρων και πρέπει να δείχνουν ομοιόμορφα καταναμημένα και όχι πολύ πυκνά ή πολύ αραιά.
8. Απομάκρυνση του θρεπτικού και 2 εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/+ για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.
9. Μονιμοποίηση κυττάρων με 1 ml 3% παραφορμαλδεΰδης (PFA) για 30 min σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.

10. Δύο εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.
11. Τα κύτταρα γίνονται διαπερατά με 1 ml 0.5% Triton X-100 σε buffer 1 για 5 min χωρίς ανακίνηση.
12. Δύο εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.
13. Δύο εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- /1.5 % FBS για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.
14. Επώαση με 50 μl από το 1^ο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση PBS +/- /1.5 % FBS (π.χ. a-myc 1:200 σε PBS +/- /1,5% FBS) για 30 min στους 4⁰C χωρίς ανακίνηση.
15. Τρεις εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- /1.5 % FBS για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα.
16. Επώαση με 50 μl από το 2^ο αντίσωμα σε κατάλληλη αραιώση PBS +/- /1.5 % FBS (π.χ. a-mouse FITC 1:50 σε PBS +/- /1,5% FBS) για 30 min στο σκοτάδι στους 4⁰C χωρίς ανακίνηση.
17. Δύο εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- /1.5 % FBS για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα στο σκοτάδι.
18. Δύο εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα στο σκοτάδι.
19. Τοποθέτηση 50 μl DAPI (σε αραιώση 4 μl από το stock μέσα σε 1 ml PBS +/-) για 5 min σε RT σε στο σκοτάδι.
20. Δύο εκπλύσεις με 1.5 ml PBS +/- για 3 min σε RT πάνω σε αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα στο σκοτάδι.
21. Τοποθέτηση στις αντικειμενοφόρους 15 μl mounting solution και εφαρμογή των καλυπτρίδων πάνω αυτό.
22. Σφράγιση της καλυπτρίδας περιμετρικά πάνω στην αντικειμενοφόρο με βερνίκι νυχιών.
23. Αποθήκευση των αντικειμενοφόρων με τα δείγματα στους 4⁰C υπό σκοτάδι ή παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο φθορισμού.

Γ) ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Γ1. ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΣΕΙΡΑΣ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK293T (human embryonic kidney cells), HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cells), HaCaT (human keratinocyte cells) και Cos7 (African Green monkey SV40 kidney fibroblast cells). Οι κυτταρικές αυτές σειρές μεγάλωναν σε θρεπτικό DMEM High (Dulbeccos Modified Eagles Medium με 4.5 g/L Glucose, L-Glutamine και Pyruvate) με 10% FBS (Fetal Bovine Serum) και 2% αντιβιοτικό (πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη) εκτός από τα Cos7 που μεγάλωναν σε DMEM Low (1 g/L D-Glucose και Pyruvate) αντί για High (τα θρεπτικά είναι GIBCO της Invitrogen). Οι συνθήκες επώασης ήταν 37⁰C και 5% CO₂. Η διατήρηση έγινε σε φλάσκες των 75 cm² ενώ για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν και πιάτα 6-well (διαμέτρου 6 mm), p60 (διαμέτρου 60 mm) και p100 (διαμέτρου 100 mm).

Τα κύτταρα μεγαλώνουν σε μονοστιβάδα μέσα στη φλάσκα και ανά δύο μέρες (48 ώρες) χρειάζονται αλλαγή στο θρεπτικό μέσο (10 ml για φλάσκα, 5 ml για p100, 3 ml για p60 και 1 ml για 6-well). Όταν πυκνώσουν αρκετά πρέπει να αραιωθούν (split). Κατά τη διαδικασία αυτή:

1. Απομακρύνουμε το θρεπτικό από τη φλάσκα και ξεπλένουμε μία φορά με τρυψίνη-EDTA.
2. Προσθέτουμε 2 ml τρυψίνη-EDTA και αφήνουμε για 5 min σε incubator (37⁰C/5% CO₂) για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα.
3. Απενεργοποιούμε την τρυψίνη με 2 ml θρεπτικό μέσο και μεταφέρουμε τα κύτταρα σε falcon των 15 ml.
4. Διασπάμε τα συσσωματώματα με πιπέτα των 10 ml και blue tip και προσθέτουμε 6 ml θρεπτικό.
5. Αν θέλουμε μετράμε τα κύτταρα σε αιμοκυτταρόμετρο (για κάποια πείραμα που χρειαζόμαστε συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων)
6. Προσθέτουμε το 1/10 του όγκου των κυττάρων σε φλάσκα με νέο θρεπτικό.

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα στους -80°C σε DMSO (dimethyl sulfoxide). Συγκεκριμένα μετά τη διάσπαση των συσσωματωμάτων κατά τη διάρκεια του split μπορούν να φυγοκεντριστούν για 5 min στις 1800 rpm σε RT και η πελέτα να επαναδιαλυθεί σε 2 ml θρεπτικό μέσο. Από αυτά τοποθετούμε σε cryovials 900 μl κύτταρα και 100 μl DMSO και χωρίς καθυστέρηση τα φυλάσσουμε στους -80°C .

Γ2. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαμόλυνση ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών επιτρέπει την εισαγωγή ξένου (πλασμιδιακού) DNA σε αυτά. Ο αριθμός των κυττάρων που είναι απαραίτητο να απλωθούν πριν τη διαμόλυνση εξαρτάται από τη κυτταρική σειρά και τα πιάτα της καλλιέργειας. Για 6-well απλώνονται 2.5×10^5 κύτταρα ανά well (με εξαίρεση τα HepG2 που απλώθηκαν 5×10^5 κύτταρα/well), για p60 5×10^5 κύτταρα/πιάτο και για p100 10^6 κύτταρα/πιάτο. Οι συγκεντρώσεις των DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν στο 0.5 μg/μl και για κάθε συγκεκριμένο φορέα έκφρασης έμπαινε συγκεκριμένη ποσότητα DNA και γινόταν συμπλήρωση με Salmon Sperm DNA όπου χρειαζόταν. Συγκεκριμένα στα 6-well γινόταν διαμόλυνση συνολικά 6 μg DNA με 1 μg από κάθε φορέα έκφρασης και το υπόλοιπο salmon sperm. Επειδή όμως τα 6-well χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα σε πειράματα luc assay που είχαμε duplicates για κάθε δείγμα, οι ποσότητες ήταν διπλάσιες (12 μg DNA σύνολο και 2 μg για κάθε φορέα) και το μείγμα χωρίζονταν ισομερώς σε δύο πηγάδια. Στα p60 η συνολική ποσότητα διαμόλυνσης ήταν 15 μg DNA με 5 μg από κάθε φορέα έκφρασης (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) και το υπόλοιπο salmon sperm. Τέλος, στα p100 η συνολική ποσότητα διαμόλυνσης ήταν 30 μg DNA με 5-10 μg από κάθε φορέα έκφρασης και το υπόλοιπο salmon sperm. Στην παρούσα εργασία η διαμόλυνση έγινε με δύο μεθόδους, με CaCl_2 και με λιποφεκταμίνη.

-Διαμόλυνση με CaCl₂:

Η αρχή της μεθόδου αυτής βασίζεται στη συνδυασμένη δυνατότητα του θετικά φορτισμένου Ca του CaCl₂ και των φωσφορικών ανιόντων του HBS να συγκατακρημνίζουν το DNA προς διαμόλυνση και με τη σειρά αυτό να μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα μέσω του συμπλόκου DNA-Ca₃(PO₄)₂.

Υλικά

DNA προς διαμόλυνση

Πιάτα με καλλιέργειες

CaCl₂ 2 M

2x HBS (Hepes Buffered Saline: 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄.H₂O, 12 mM dextrose, 42 mM Hepes pH 7.1)

WFI (water for injection)

Διαδικασία

1. Σε eppendorf του 1.5 ml φτιάχνουμε το mix με το DNA (250 μl τελικός όγκος) προσθέτοντας 31 μl CaCl₂ 2 M και WFI (δες παραδείγματα σε εικόνες 16, 17).
2. Σε eppendorf των 2 ml τοποθετούμε ίσο όγκο 2x HBS.
3. Ενώ κάνουμε vortex στο HBS προσθέτω σε αυτό σταγόνα-σταγόνα το mix με το DNA.
4. Το τελικό μείγμα το αφήνουμε για 15 min στη HOOD των κυτταροκαλλιιεργειών και το ρίχνουμε σε όλη την έκταση της καλλιέργειας.
5. Μετά από 7-17 ώρες αλλάζουμε θρεπτικό και μετά από 24 ώρες από την αλλαγή θρεπτικού μαζεύουμε τα κύτταρα για πείραμα.

-Διαμόλυνση με λιποφεκταμίνη:

Η μέθοδος της λιποφεκταμίνης βασίζεται στην εισαγωγή του DNA στα κύτταρα μέσω λιπιδίων. Είναι πιο αποτελεσματική μέθοδος διαμόλυνσης σε σχέση με τη

διαμόλυνση με CaCl_2 και είναι σημαντικό να μην χρησιμοποιείται αντιβιοτικό στο θρεπτικό μέσο σε αυτή τη διαδικασία.

Υλικά

DNA προς διαμόλυνση (2 μg για 6-well)

Πιάτα με καλλιέργειες

DMEM χωρίς αντιβιοτικό με 10% FBS ή 20% FBS

Opti-MEM (Invitrogen)

Λιποφεκταμίνη (Invitrogen)

Διαδικασία

1. Για διαμόλυνση με λιποφεκταμίνη κάνουμε split στα κύτταρα σε θρεπτικό χωρίς αντιβιοτικό ή τα περνάμε σε θρεπτικό χωρίς αντιβιοτικό τουλάχιστον 8 ώρες πριν τη διαμόλυνση.
2. Σε ένα eppendorf βάζουμε 100 μl Opti-MEM με 2 μg DNA και σε ένα άλλο eppendorf βάζουμε 100 μl Opti-MEM με 7.5 μl λιποφεκταμίνη.
3. Ενώνουμε το περιεχόμενο των δύο eppendorf, πιπετάρουμε απαλά και αφήνουμε το μείγμα για 30 min σε RT.
4. Λίγο πριν τελειώσουν τα 30 min αφαιρούμε το θρεπτικό από τα κύτταρα και ξεπλένουμε μία φορά με 2 ml Opti-MEM. Ακόμα προσθέτουμε 800 μl Opti-MEM στο μείγμα και πιπετάρουμε απαλά.
5. Ρίχνουμε το μείγμα στα κύτταρα και τα αφήνουμε στον incubator ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$) για 6 ώρες.
6. Προσθέτουμε 1 ml DMEM με 20% FBS χωρίς αντιβιοτικό (χωρίς να αφαιρέσουμε το Opti-MEM) και αφήνουμε ολονύκτια στον incubator.
7. Την επόμενη μέρα απομακρύνουμε το θρεπτικό και ρίχνουμε 1-2 ml DMEM χωρίς αντιβιοτικό με 10% FBS. Αφήνουμε για 24 ώρες στον incubator και την επόμενη μέρα τα κύτταρα μαζεύονται για τη συνέχεια του πειράματος.

No	Expr. Vector #1	Expr. Vector #2	Salmon Sperm	CaCl ₂	H ₂ O
A	10 µl Flag-Smad2	-	20 µl	31 µl	190 µl
B	10 µl Flag-Smad2	10 µl SCP1	10 µl	31 µl	190 µl
C	10 µl Flag-Smad2	10 µl PPM1A	10 µl	31 µl	190 µl

Εικόνα 16. Παράδειγμα διαμόλυνσης με CaCl₂ σε p60. Οι συγκεντρώσεις των DNA stocks είναι 0.5 µg/µl. Ο συνολικός όγκος του DNA mix είναι 250 µl, η μέγιστη ποσότητα DNA είναι 15 µg και 5 µg για κάθε φορέα έκφρασης. Η συμπλήρωση του DNA έγινε με salmon sperm. Στο κάθε δείγμα θα προσθέσουμε ίσο όγκο 2x HBS και το μείγμα θα απλωθεί ομοιόμορφα στο πιάτο καλλιέργειας.

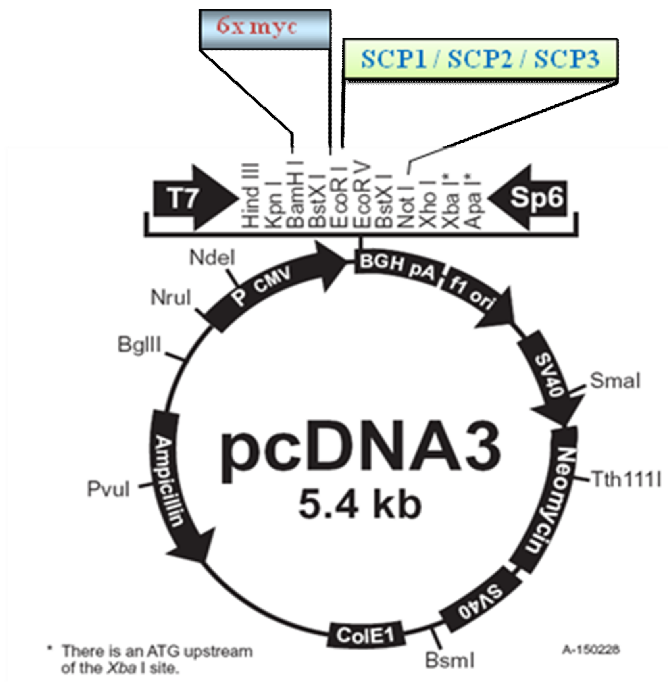
No	Reporter	Expr. Vect. #1	Expr. Vect. #2	Salmon sperm	β-gal	CaCl ₂	H ₂ O
A	4 µl p(CAGA) ₁₂ -luc	-	-	16 µl	4 µl	31 µl	195 µl
B	4 µl p(CAGA) ₁₂ -luc	4 µl Smad2ΔE3	4 µl SCP1	8 µl	4 µl	31 µl	195 µl
C	4 µl p(CAGA) ₁₂ -luc	4 µl Smad2ΔE3	4 µl SCP2	8 µl	4 µl	31 µl	195 µl
D	4 µl p(CAGA) ₁₂ -luc	4 µl Smad2ΔE3	4 µl SCP3	8 µl	4 µl	31 µl	195 µl

Εικόνα 17. Παράδειγμα διαμόλυνσης με CaCl₂ σε 6-well για luc assay. Τα DNA stocks είναι 0.5 µg/µl. Ο συνολικός όγκος του DNA mix είναι 250 µl, η μέγιστη ποσότητα DNA είναι 12 µg και 2 µg για κάθε φορέα έκφρασης. Η συμπλήρωση του DNA έγινε με salmon sperm. Στο κάθε δείγμα θα προσθέσουμε ίσο όγκο 2x HBS και το μείγμα χωρίζεται και απλώνεται ισομερώς σε δύο πηγάδια.

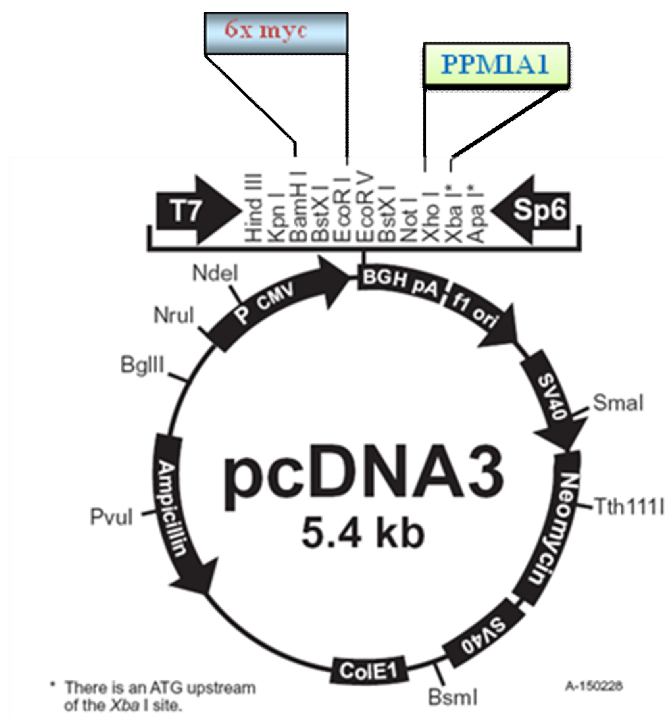
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A ΣΤΟ ΦΟΡΕΑ pcDNA3-6myc

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα ως εργαλεία οι φωσφατάσες SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A (NCBI accession numbers: NM_182642, NM_005730, NM_001008392 και NM_021003). Αρχικά λοιπόν αφού απομονώθηκαν με PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (δες Υλικά και Μέθοδοι, ενότητα A1) από HaCaT cDNA, έγινε η εισαγωγή τους στο φορέα pcDNA3-6myc. Ο φορέας αυτός προέρχεται από τον φορέα pcDNA3 (Invitrogen), που περιέχει τον υποκινητή CMV για υψηλά επίπεδα έκφρασης και γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και τη νεομυκίνη. Επιπρόσθετα, όμως, περιέχει και τον επίτοπο 6x myc (στις θέσεις BamHI και EcoRI) ο οποίος βρίσκεται σε σύντηξη με τα πιθανά ενθέματα που θα εισαχθούν στο φορέα. Αυτό επιτρέπει την εύκολη ανίχνευση της συντηγμένης πρωτεΐνης που προκύπτει με α-myc αντίσωμα. Τα cDNA των SCP1, SCP2 και SCP3 εισήχθησαν στις θέσεις EcoRI και NotI ενώ το cDNA της PPM1A εισήχθη στις θέσεις XhoI και XbaI. Έτσι τελικά προκύπτουν οι φορείς pcDNA3-6myc/SCP1, pcDNA3-6myc/SCP2, pcDNA3-6myc/SCP3 και pcDNA3-6myc/PPM1A (Εικόνες 18 και 19) που εκφράζουν τα πεπτίδια 6myc-SCP1, 6myc-SCP2, 6myc-SCP3 και 6myc-PPM1A. Τα μεγέθη των cDNA και των πεπτιδίων των SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A (χωρίς το 6myc) είναι αντίστοιχα 783bp/260aa, 816bp/269aa, 831bp/276aa και 1149bp/384aa.



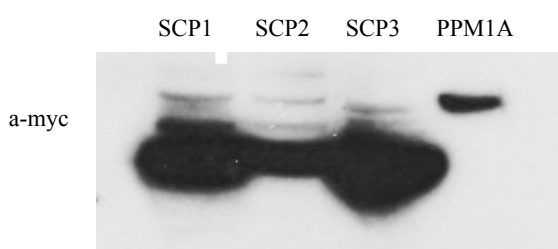
Εικόνα 18. Οι φορείς pcDNA3-6myc/SCP1, pcDNA3-6myc/SCP2 και pcDNA3-6myc/SCP3. Στις θέσεις EcoRI και NotI έχει εισαχθεί μία εκ των φωσφατασών SCP1, SCP2 και SCP3.



Εικόνα 19. Ο φορέας pcDNA3-6myc/PPM1A.

B. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΦΩΣΦΑΤΑΣΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A ΣΕ HEK293T

Για τον έλεγχο της έκφρασης των SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A έγινε διαμόλυνση των φορέων pcDNA3-6myc/SCP1, pcDNA3-6myc/SCP2, pcDNA3-6myc/SCP3 και pcDNA3-6myc/PPM1A σε ευκαρυωτικά κύτταρα HEK293T με τη μέθοδο του CaCl₂. Μετά από 48 ώρες απομονώθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα από τα κύτταρα, ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και με western blot, χρησιμοποιώντας a-myc αντίσωμα έγινε η ανίχνευση των πρωτεϊνών (Εικόνα 20). Η PPM1A εκφράζεται ικανοποιητικά, ωστόσο δε φτάνει τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των SCPs.

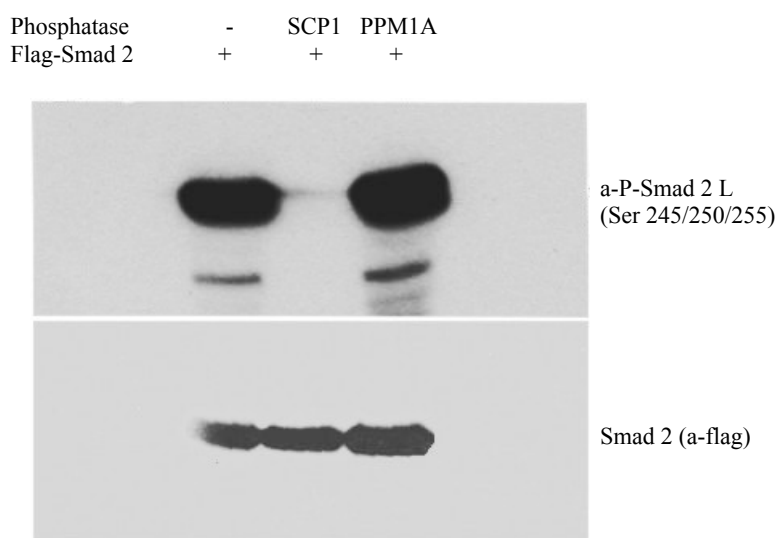


Εικόνα 20. Η Έκφραση των SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A σε HEK293T. Για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα a-myc.

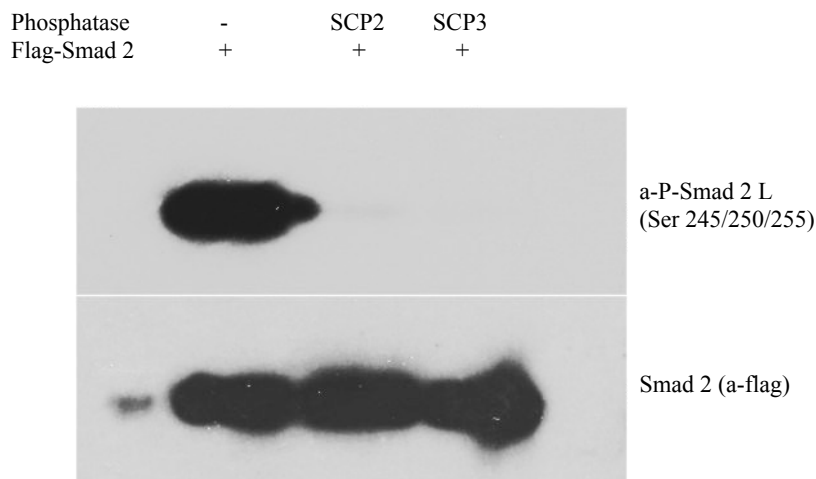
Γ. ΟΙ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A ΩΣ ΦΩΣΦΑΤΑΣΕΣ ΤΟΥ LINKER Ή ΤΟΥ C-TERMINUS ΤΩΝ R-SMADS

Για τη διερεύνηση της λειτουργία των SCPs και της PPM1A ως φωσφατασών που αποφωσφορυλιώνουν τη περιοχή του linker των R-Smads έγινε διαμόλυνση της flag-Smad2 σε HEK293T απουσία κάποιας φωσφατάσης ή παρουσία μίας εκ των φωσφατασών SCP1 και PPM1A. Αρχικά απομονώθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και με western blot, με τη χρήση αντισώματος που ανιχνεύει τις φωσφορυλιωμένες σερίνες 245, 250 και 255 της περιοχής του linker της Smad2 (a-P-Smad2 L) επιβεβαιώθηκε ότι οι SCPs

αποφωσφορυλιώνουν τον linker της Smad2. Από την άλλη η PPM1A δεν έχει καμία επίδραση στην αποφωσφορυλίωση των συγκεκριμένων σερινών. Συγκεκριμένα στην εικόνα 21 φαίνεται ότι απουσία κάποιας φωσφατάσης, ο linker της Smad2 είναι συστατικά φωσφορυλιωμένος στις σερίνες 245, 250 και 255. Παρουσία της SCP1 δεν ανιχνεύονται οι φωσφορυλιωμένες σερίνες. Αντίθετα η PPM1A δεν αποφωσφορυλιώνει τις συγκεκριμένες σερίνες. Ακριβώς το ίδιο πείραμα ελέγχου αποφωσφορυλίωσης της περιοχής του linker της Smad2 έγινε με τις SCP2 και SCP3 και το αποτέλεσμα έδειξε ότι, όπως η SCP1, μπορούν και αυτές να αποφωσφορυλιώνουν τον linker στις σερίνες 245, 250 και 255 (Εικόνα 22).



Εικόνα 21. Η SCP1, αλλά όχι η PPM1A, αποφωσφορυλιώνει την περιοχή του linker της flag-Smad2. Η flag-Smad2 είναι συστατικά φωσφορυλιωμένη στις σερίνες 245/250/255 του linker απουσία κάποιας φωσφατάσης. Παρουσία της SCP1 οι σερίνες αποφωσφορυλιώνονται. Η PPM1A από την άλλη δεν παρουσιάζει τέτοια δράση. Η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης και της ολικής flag-Smad2 έγινε αντίστοιχα με τα αντισώματα a-P-Smad2 L και a-flag.



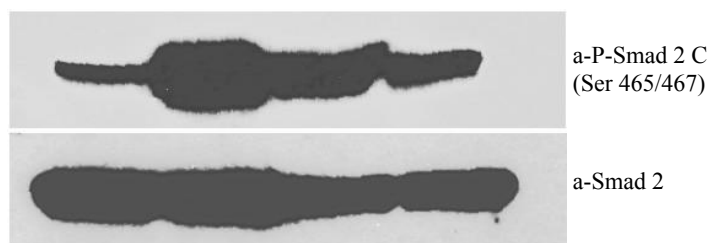
Εικόνα 22. Οι SCP2 και SCP3 αποφωσφορυλιώνουν τη περιοχή του linker της flag-Smad2. Η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης και της ολικής flag-Smad2 έγινε αντίστοιχα με τα αντισώματα a-P-Smad2 L και a-flag.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η ικανότητα της SCP1 και της PPM1A να αποφωσφορυλιώνουν το μοτίβο SXS του καρβοξυτελικού άκρου των Smad2 και Smad3. Συγκεκριμένα σε HEK293T διαμολύνθηκαν Bio-Smad2 ή Bio-Smad3 απουσία ή παρουσία CA-ALK5 και μία εκ των SCP1 ή PPM1A φωσφατασών. Ο CA-ALK5 (constitutively active ALK5) είναι ένας συστατικά ενεργός υποδοχέας TGF-β τύπου I και μπορεί να ενεργοποιεί τις Smad2/3 φωσφορυλιώνοντας το μοτίβο SXS χωρίς να απαιτείται η παρουσία TGF-β. Στη συνέχεια έγινε απομόνωση των κυτταρικών εκχυλισμάτων και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Για το western blot χρησιμοποιήθηκαν τα ειδικά αντισώματα a-P-Smad2 C (Ser 465/467) και a-P-Smad3 C (Ser 433/435) που εντοπίζουν το φωσφορυλιωμένο SXS μοτίβο του καρβοξυτελικού άκρου και μας επιτρέπουν να παρακολουθούμε τη πορεία της φωσφορυλίωσης στις συγκεκριμένες σερίνες. Απουσία ενεργού υποδοχέα η φωσφορυλίωση του SXS μοτίβου είναι περιορισμένη στη περίπτωση της Smad2 και μηδαμινή στην περίπτωση της Smad3 (εικόνα 23-α,β). Η προσθήκη του CA-ALK5 έχει ως αποτέλεσμα την φωσφορυλίωση των σερινών σε πολύ μεγάλο βαθμό. Η παρουσία της PPM1A έχει ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση του SXS και ιδιαίτερα αποτελεσματικά στην περίπτωση της Smad3. Το σημαντικό είναι ότι και η SCP1 έχει εξίσου την ίδια ικανότητα να αποφωσφορυλιώνει το SXS μοτίβο και μάλιστα στην περίπτωση της Smad2 πιο αποτελεσματικά από την PPM1A (εικόνα

23-β). Αυτό είναι κάτι το εντελώς καινούργιο καθώς μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί η ικανότητα της SCP1 να αποφωσφορυλιώνει το μοτίβο SXS των Smad2/3. Επομένως διαφαίνεται ένας διττός ρόλος της SCP1 στη σηματοδότηση των Smad πρωτεϊνών ρυθμίζοντας τη φωσφορυλίωση τόσο του linker όσο και του καρβοξυτελικού άκρου.

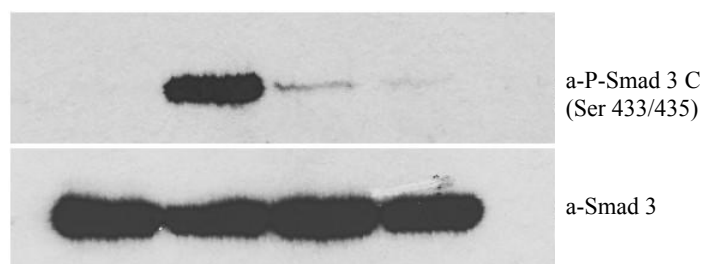
α)

Phosphatase	-	-	PPM1A	SCP1
CA-ALK 5	-	+	+	+
Bio-Smad 2	+	+	+	+



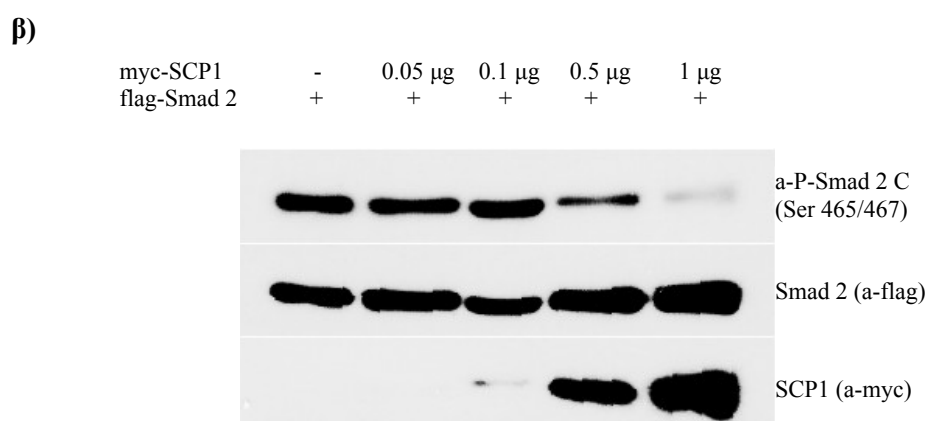
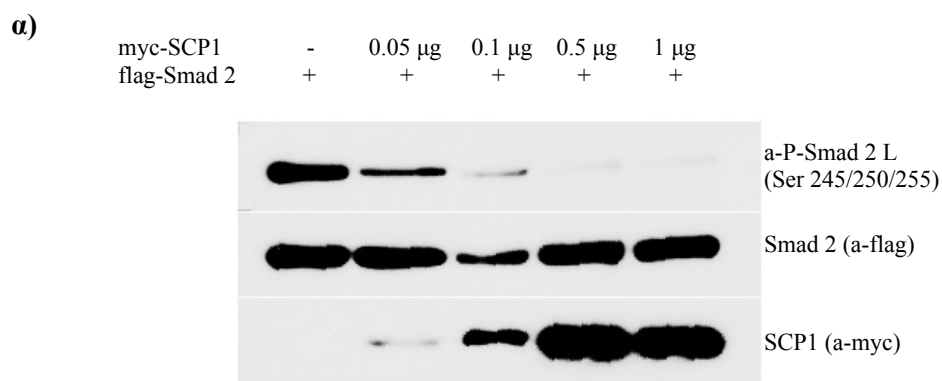
β)

Phosphatase	-	-	PPM1A	SCP1
CA-ALK 5	-	+	+	+
Bio-Smad 3	+	+	+	+



Εικόνα 23. Η αποφωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού μοτίβου SXS της Smad2 (α) και της Smad3 (β) από την PPM1A και την SCP1. Το SXS μοτίβο των Smad2/3 φωσφορυλιώνεται από τον CA-ALK5 ενώ παρουσία μίας εκ των φωσφατασών SCP1 ή PPM1A η φωσφορυλίωση υποβαθμίζεται. Η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου SXS έγινε με αντισώματα a-P-Smad2 C (Ser 465/467) και a-P-Smad3 C (Ser 433/435) και των ολικών επιπέδων των Smad2/3 με a-Smad2 και a-Smad3.

Το επόμενο βήμα ήταν να δημιουργηθεί μία ποσοτική συσχέτιση της SCP1 που διαμολύνονταν σε HEK293T σε σχέση με την ικανότητα αποφωσφορυλίωσης του linker και του SXS. Έτσι θα μπορούσαμε να διαπιστώσουμε την ελάχιστη ποσότητα που είναι απαραίτητη για αποφωσφορυλίωση και ποιες ποσότητες είναι αυτές που προκαλούν ολοκληρωτική αποφωσφορυλίωση. Στα προηγούμενα πειράματα τα 5 μg SCP1 αποφωσφορυλίωσαν ολοκληρωτικά τον linker και σε σημαντικό βαθμό το μοτίβο SXS. Έτσι σε HEK293T έγινε διαμόλυνση της flag-Smad2 απουσία SCP1 ή παρουσία διαβαθμισμένης ποσότητας SCP1 (0.05, 0.1, 0.5 και 1 μg). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στο western blot έγινε ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου linker ή SXS της Smad2 (Εικόνα 24-α,β). Στις πολύ μικρές ποσότητες των 0.05 και 0.1 μg η SCP1 προκαλεί σημαντική αποφωσφορυλίωση στο linker και στη ποσότητα των 0.5 και 1 μg ο linker της Smad2 αποφωσφορυλιώνεται ολοκληρωτικά. Για τον έλεγχο της αποφωσφορυλίωσης στο SXS δεν χρησιμοποιήθηκε CA-ALK5 συγκριτικά με το προηγούμενο πείραμα καθώς το μοτίβο παρουσίαζε κάποια συστατική φωσφορυλίωση (πιθανώς εξαιτίας του ορού της κυτταρική καλλιέργειας που περιέχει μικρές ποσότητες TGF-β). Εδώ στις ποσότητες των 0.05 και 0.1 μg της SCP1 η φωσφορυλίωση του SXS δεν επηρεάζεται. Στη ποσότητα του 0.5 μg φαίνεται ότι το SXS αρχίζει και αποφωσφορυλιώνεται ενώ στο 1 μg της SCP1 μειώνεται σημαντικά η φωσφορυλίωση στο SXS. Αυτό είναι ένδειξη ότι η SCP1 έχει μεγαλύτερη ικανότητα να ρυθμίζει το linker σε σχέση με το SXS. Επομένως πρωταρχικός της ρόλος είναι η ρύθμιση των φωσφορικών του linker στη σηματοδότηση των Smad2/3 και ίσως να ενεργεί συμπληρωματικά με την PPM1A στην ρύθμιση του SXS.

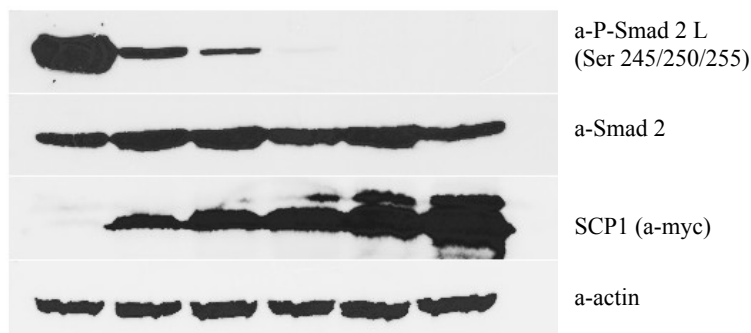


Εικόνες 24. Η αποφωσφορυλίωση του linker (α) και του καρβοξυτελικού μοτίβου SXS (β) της flag-Smad2 σε αυξανόμενη ποσότητα της SCP1. Η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου SXS και linker της flag-Smad2 έγινε με τα αντισώματα a-P-Smad2 C (Ser 465/467) και a-P-Smad2 L (Ser 245/250/255) αντίστοιχα, των ολικών επιπέδων της flag-Smad2 με a-flag και της SCP1 με a-myc.

Το πείραμα με τη διαβάθμιση στην ποσότητα των φωσφατασών επαναλήφθηκε με όλες τις SCPs (SCP1, SCP2 και SCP3 σε ποσότητες 0.1, 0.3, 1, 2 και 5 μg) και Bio-Smad2 και έγινε έλεγχος στην αποφωσφορυλίωση του linker (Εικόνα 25-α,β,γ). Το αποτέλεσμα ήταν η σημαντική αποφωσφορυλίωση του linker στις μικρές ποσότητες (0.1 και 0.3 μg) και ολική αποφωσφορυλίωση στις μεγάλες (2 και 5 μg) για όλες τις SCPs. Το αξιοσημείωτο είναι ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις των SCPs παρατηρείται μια πτώση της ολικής Smad2. Ο έλεγχος με αντίσωμα έναντι της ακτίνης δε δείχνει διαφορές στις ποσότητες του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος που φορτώθηκαν (εικόνα 25-α). Επομένως αυτή η πτώση σχετίζεται με την δράση των SCPs σε υψηλές συγκεντρώσεις στο κύτταρο και με την αποφωσφορυλίωση στο linker της Smad2, η οποία πολύ πιθανόν να οδηγεί στην αποικοδόμηση της Smad2.

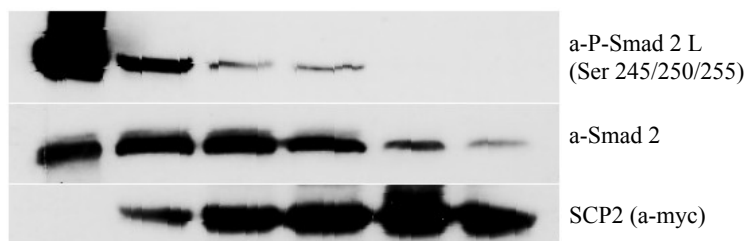
α)

myc-SCP1	-	0.1 μg	0.3 μg	1 μg	2 μg	5 μg
Bio-Smad 2	+	+	+	+	+	+



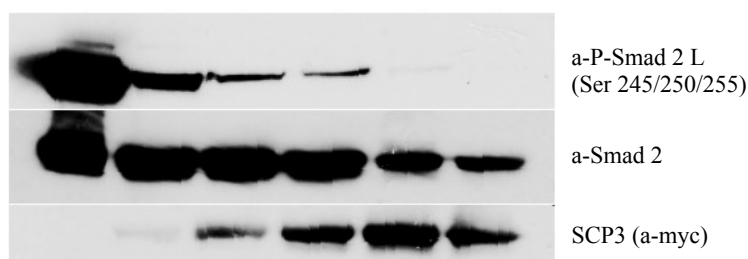
β)

myc-SCP2	-	0.1 μg	0.3 μg	1 μg	2 μg	5 μg
Bio-Smad 2	+	+	+	+	+	+



γ)

myc-SCP3	-	0.1 μg	0.3 μg	1 μg	2 μg	5 μg
Bio-Smad 2	+	+	+	+	+	+

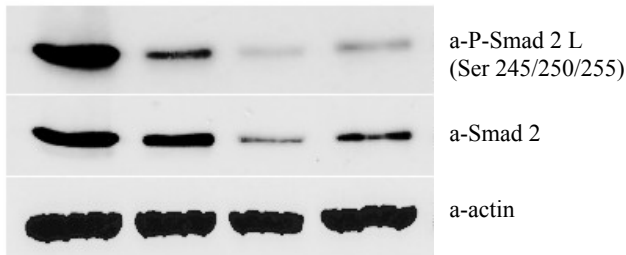


Εικόνες 25. Η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2 σε αυξανόμενη ποσότητα των SCP1 (α), SCP2 (β) και SCP3 (γ). Η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου linker της Smad2 έγινε με το αντίσωμα a-P-Smad2 L (Ser 245/250/255), των ολικών επιπέδων της Smad2 με a-Smad2, της SCP1 με a-myc και της ακτίνης με a-actin.

Δ. Η ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ LINKER ΤΗΣ SMAD2 ΑΠΟ ΤΙΣ CDK2/4, ERK ΚΑΙ JNK ΚΙΝΑΣΕΣ

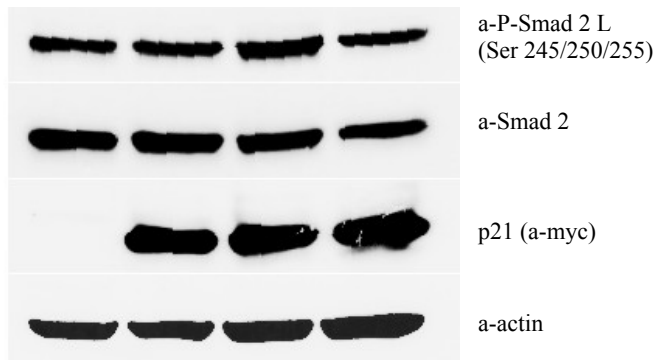
Στη βιβλιογραφία έχουν ήδη αναφερθεί κινάσες που φωσφορυλιώνουν τον linker των Smad πρωτεϊνών. Η JNK (c-Jun N-terminal Kinase) τον φωσφορυλιώνει στις Ser250/255 (Mori *et al.*, 2004), η ERK (Extracellular signal regulated kinase) στις Ser245/250/255 και Thr220 (Kretzschmar *et al.*, 1999) και οι CDK2/4 (Cyclin-dependant kinase 2/4) μόνο *in vitro* σε κατάλοιπα που δεν έχουν επιβεβαιωθεί ακόμη (Matsuura *et al.*, 2004). Για να επιβεβαιώσουμε αυτές τις αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιήσαμε αναστολείς αυτών των κινασών για να εμποδίσουμε τη φωσφορυλίωση του linker της Smad2. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ο JNK inhibitor II SP600125 (Calbiochem), ο MEK inhibitor U0126 (Calbiochem) και ο p21 που είναι φυσικός αναστολέας των CDK2/4 (Sherr & Roberts, 1999). Σε HEK293T έγινε διαμόλυνση με bio-Smad2 και προστέθηκαν οι αναστολείς SP600125 και U0126 μαζί ή χωριστά για 24 ώρες σε συγκέντρωση 10 μM. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και έγινε western blot για την ανίχνευση της φωσφορυλίωσης του linker της Smad2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 26, η βασική φωσφορυλίωση στο linker της Smad2 παρουσία του U0126 υποχωρεί σε σημαντικό βαθμό και σχεδόν εξαφανίζεται παρουσία του SP600125. Όταν γίνει προσθήκη και των δύο αναστολέων η φωσφορυλίωση επίσης ελαχιστοποιείται. Επομένως αυτό επιβεβαιώνει ότι οι ERK και JNK κινάσες είναι υπεύθυνες για τη φωσφορυλίωση του linker. Από την άλλη μεριά η συνέκφραση της bio-Smad2 με την p21 σε HEK293T δεν επηρέασε καθόλου τη φωσφορυλίωση στο linker (Εικόνα 27). Αυτό σημαίνει ότι οι CDK2/4 δεν παίζουν το κύριο ρόλο στη βασική φωσφορυλίωση του linker της Smad2 ή τουλάχιστον στις Ser245/250/255. Ενδεχομένως να έχουν βασικό ρόλο στη φωσφορυλίωση μόνο της Thr220 του linker ή να δουλεύουν μόνο συμπληρωματικά με τις JNK και ERK συμβάλλοντας σε πολύ μικρότερο ποσοστό στη φωσφορυλίωση.

SP600125	-	-	+	+
U0126	-	+	-	+
Bio-Smad 2	+	+	+	+



Εικόνα 26. Η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2 παρουσία των αναστολέων U0126 και SP600125 οι οποίοι εμποδίζουν τη δράση των ERK και JNK αντίστοιχα. Οι αναστολείς χρησιμοποιήθηκαν στην συγκέντρωση των 10 μ M και οι πρωτεΐνες ανιχνεύτηκαν με western blot χρησιμοποιώντας τα αντισώματα a-P-Smad2 L (Ser 245/250/255) για τη φωσφορυλίωση του linker της Smad2, a-Smad2 για τα ολικά επίπεδα της Smad2 και a-actin για την ακτίνη.

myc-p21	-	1 μ g	2 μ g	5 μ g
Bio-Smad 2	+	+	+	+

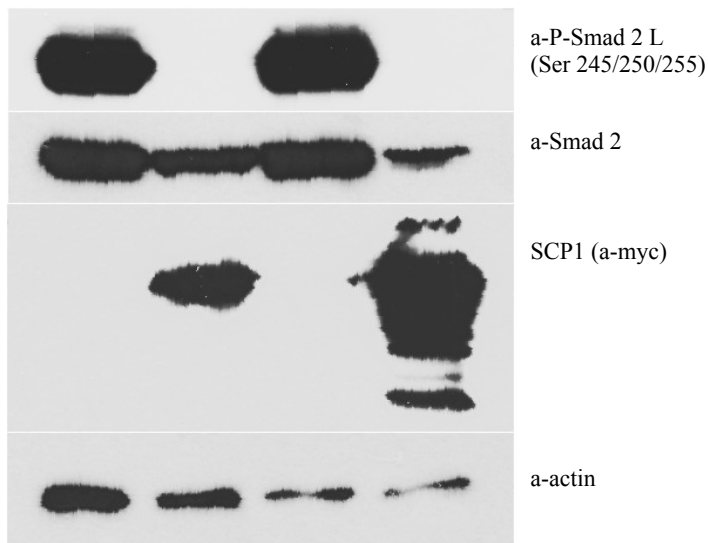


Εικόνα 27. Ο ρόλος της p21 στην αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2. Ο αναστολέας p21 των κινασών CDK2/4 δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των Ser245/250/255, ενδεικτικό ότι οι CDK2/4 δεν φωσφορυλιώνουν το linker σε αυτά τα κατάλοιπα ή έχουν δευτερεύοντα ρόλο στη φωσφορυλίωσή τους. Η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου linker έγινε με a-P-Smad2 L (Ser 245/250/255), της ολικής Smad2 με a-Smad2, της p21 με a-myc και της ακτίνης με a-actin.

Ε. Η ΑΠΟΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ LINKER ΤΗΣ SMAD2 ΚΑΙ Η ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗ ΤΗΣ

Ένα πολύ ενδιαφέρον φαινόμενο που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα είναι ότι η ολική αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2 οδηγεί σε μερική πτώση της ολικής Smad2 (Εικόνες 25 & 26). Γεννάται, λοιπόν, το ερώτημα αν η απώλεια της φωσφορυλίωσης του linker της Smad2 οδηγεί στην αποικοδόμησή της μέσω του 26S πρωτεασώματος. Για να ελέγξουμε αυτή τη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας του 26S πρωτεασώματος MG-132 (Calbiochem). Η λογική του πειράματος είναι ότι η SCP1 σε μεγάλη ποσότητα θα αποφωσφορυλιώνει ολοκληρωτικά το linker, αλλά παρουσία του αναστολέα MG-132 τα επίπεδα της συνολικής Smad2 θα παραμένουν αναλλοίωτα. Έτσι σε HEK293T έγινε διαμόλυνση της bio-Smad2 παρουσία ή απουσία του *myc-SCP1* (5 μ g) και προστέθηκε ο MG-132 (20 μ M). Τα δείγματα λύθηκαν για την απομόνωση του κυτταρικού εκχυλίσματος και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Στο western blot έγινε ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης Smad2 στο linker και της ολικής Smad2. Αντίθετα όμως από το αναμενόμενο η παρουσία του MG-132 μαζί με την SCP1 φαίνεται ότι μείωσε ακόμη περισσότερο τα επίπεδα της Smad2 (Εικόνα 28). Αυτό υποδηλώνει ένα μηχανισμό αποικοδόμησης της αποφωσφορυλιωμένης στο linker Smad2 διαφορετικό από αυτόν του 26S πρωτεασώματος.

MG-132	-	-	+	+
myc-SCP1	-	+	-	+
Bio-Smad 2	+	+	+	+

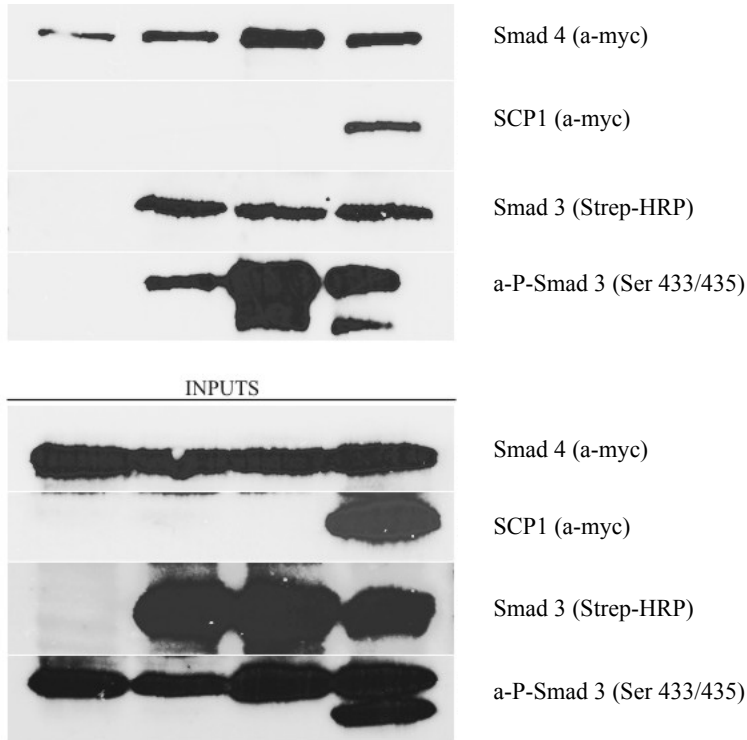


Εικόνα 28. Η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2 σε σχέση με τα ολικά επίπεδα της Smad2 παρουσία της SCP1 και του αναστολέα του 26S πρωτεασώματος MG-132. Η υψηλή ποσότητα της SCP1 (5 µg) αποφωσφορυλιώνει τον linker της Smad2 αλλά ρίχνει και τα επίπεδα της ολικής Smad2. Η παρουσία του αναστολέα του 26S πρωτεασώματος MG-132 (20 µM) δε σώζει τη Smad2 από τη μερική αποικοδόμηση που ίσως καταστρέφεται μέσω κάποιου άλλου μηχανισμού. Η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου linker έγινε με a-P-Smad2 L (Ser 245/250/255), της ολικής Smad2 με a-Smad2, της SCP1 με a-myc και της ακτίνης με a-actin..

ΣΤ. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ SCP1 ΣΤΟ ΔΙΜΕΡΙΣΜΟ ΤΗΣ SMAD3 ΜΕ ΤΗ SMAD4

Για να μελετήσουμε την επίδραση που έχει η SCP1 στην σηματοδότηση του TGF-β και συγκεκριμένα στον ολιγομερισμό μεταξύ των Smad3/Smad4 χρησιμοποιήσαμε το σύστημα της βιοτινυλίωσης με BirA. Σε HEK293T διαμολύνθηκαν bio-Smad3 και myc-Smad4 παρουσία ή απουσία των BirA, CA-ALK5 και myc-SCP1. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν σε 550 μl Co-IP lysis buffer από τα οποία τα 50 μl κρατήθηκαν ως input και τα υπόλοιπα 500 μl επώαστηκαν με εξισορροπημένα Streptavidin-agarose beads. Η BirA είναι αυτή που θα βιοτινυλιώσει τη Smad3 για την αλληλεπίδραση με τα beads και η CA-ALK5 φωσφορυλιώνει το SXS της Smad3 και επομένως ενισχύεται ο διμερισμός με τη Smad4. Στη συνέχεια τα beads απομονώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μαζί με τα inputs. Στο western blot έγινε ανίχνευση της Smad4 για τον έλεγχο της αλληλεπίδρασής της με τη Smad3. Τα αποτελέσματα στην εικόνα 29 δείχνουν ότι η SCP1 μπορεί να επηρεάσει το διμερισμό της Smad3 με τη Smad4. Η συνέκφραση των Smad3/4 παρουσία της BirA δείχνει ότι υπάρχει μια μικρή αλληλεπίδραση που οφείλεται στον μικρό βαθμό φωσφορυλίωσης της Smad3 στο SXS. Η προσθήκη CA-ALK5 αυξάνει τη φωσφορυλίωση του SXS της Smad3 και επομένως και το διμερισμό με τη Smad4. Όταν προστεθεί και η SCP1 η αλληλεπίδραση μειώνεται στα βασικά επίπεδα όπως αυτά απουσίας της CA-ALK5. Η ανίχνευση τη SCP1 στα σφαιρίδια σημαίνει ότι την απομονώνουμε σε φάση που αλληλεπιδρά με την Smad3.

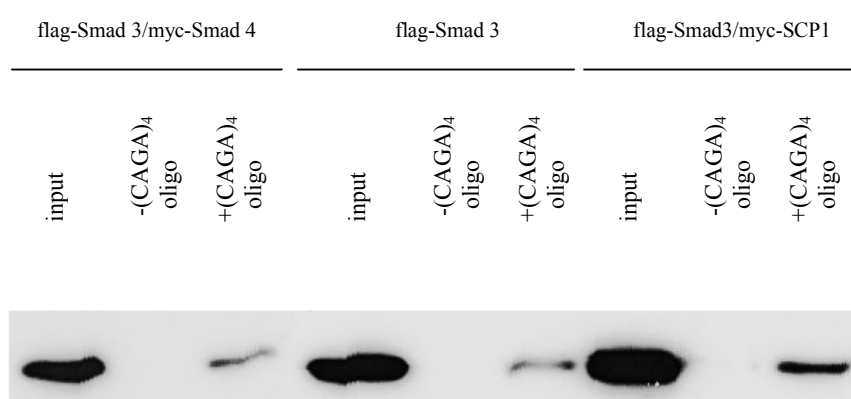
Bio-Smad 3	+	+	+	+
myc-Smad4	+	+	+	+
myc-SCP1	-	-	-	+
CA-ALK5	-	-	+	+
BirA	-	+	+	+



Εικόνα 29. Η επίδραση της SCP1 στο διμερισμό της Smad3 με τη Smad4. Πάνω είναι το πείραμα με streptavidin beads και κάτω τα inputs (κυτταρικό εκχύλισμα χωρίς beads). Η SCP1 μειώνει την αλληλεπίδραση της Smad3 με τη Smad4. Η μικρή ζώνη της Smad4 απουσία της BirA οφείλεται στη μη ειδική πρόσδεσή της στα beads. Η ανίχνευση των Smad4 και SCP1 έγινε με a-myc, της Smad3 με Streptavidin HRP και των φωσφορικών του SXS έγινε με a-P-Smad3 C (Ser 433/435).

Z. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ SCP1 ΣΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΗΣ SMAD3 ΣΤΟ DNA

Ένα ερώτημα που εγείρεται είναι εάν η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad3 από την SCP1 επηρεάζει τη πρόσδεσή της στο DNA. Για να το απαντήσουμε χρησιμοποιήσαμε ένα συνθετικό βιοτινυλιωμένο ολιγονουκλεοτίδιο με τέσσερις θέσεις πρόσδεσης των Smads (CAGA)₄. Με τη μέθοδο του DNAP (DNA Affinity Precipitation) ελέγξαμε εάν η SCP1 επηρεάζει τη πρόσδεση της Smad3 στο συγκεκριμένο ολιγονουκλεοτίδιο. Για το λόγο αυτό διαμολύνθηκαν HEK293T με Smad3 ή Smad3/Smad4 ή Smad3/SCP1 και τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν με Dynabeads M-280 Streptavidin παρουσία ή απουσία του bio-(CAGA)₄ ολιγονουκλεοτιδίου (20 μl κρατήθηκαν για input και 300 μg πρωτεΐνης επώαστηκε με τα σφαιρίδια). Τα σφαιρίδια απομονώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και με western blot έγινε η ανίχνευση της Smad3. Καταρχήν είδαμε ότι η Smad3 προσδένεται στο ολιγονουκλεοτίδιο εξίσου αποτελεσματικά παρουσία ή απουσία της Smad4 (εικόνα 30) ενώ δεν υπάρχει μη ειδική πρόσδεση στα beads (απουσία του ολιγονουκλεοτιδίου). Η προσθήκη της SCP1 δεν φαίνεται να επηρεάζει την πρόσδεση της Smad3 στο bio-(CAGA)₄. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad3 δεν επηρεάζει την πρόσδεσή της στο DNA οπότε δεν συμβάλει σε αλλαγές στη σηματοδότηση του TGF-β με αυτό τον τρόπο.



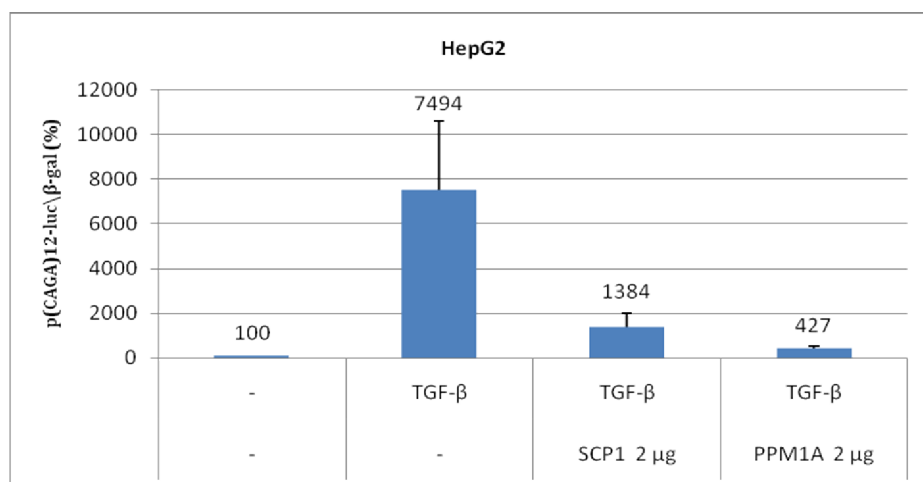
Εικόνα 30. Η επίδραση της SCP1 στη πρόσδεση της Smad3 στο DNA. Η Smad3 δεν προσδένεται μη-ειδικά στα beads (δεύτερη ζώνη) ενώ η πρόσδεσή της στο bio-(CAGA)₄ είναι παρόμοια είτε είναι μόνη της, είτε με Smad4 είτε με SCP1. Η ανίχνευση της Smad3 έγινε με a-flag.

Η. ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ

Σε αυτή την ενότητα πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων μεταγραφικής ενεργοποίησης γονιδίων αναφοράς από τις Smads παρουσία των SCPs (όλα τα αποτελέσματα είναι μέσος όρος δύο πειραμάτων). Με αυτά επιχειρείται να δοθεί απάντηση στο πώς επιδρά η αποφωσφορυλίωση του linker στην επαγωγή της μεταγραφής από τις Smads. Όλα τα πειράματα της μεταγραφικής ενεργοποίησης έγιναν σε HepG2 με τη μέθοδο διαμόλυνσης του CaCl₂ (εκτός όπου αναφέρεται διαφορετικά) και όλα τα πλασμίδια διαμολύνθηκαν στη ποσότητα των 2 μg το κάθε ένα εκτός από τις φωσφατάσες όπου πραγματοποιήθηκε μια διαβάθμιση στις ποσότητες που εισήχθηκαν (αναγράφεται στα γραφήματα). Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα pG₅-E1B-luc και p(CAGA)₁₂-E1B-luc. Το p(CAGA)₁₂-E1B-luc περιέχει τις θέσεις CAGA για άμεση πρόσδεση των Smads και το pG₅-E1B-luc θέσεις πρόσδεσης για το GAL4 για τις συντηγμένες πρωτεΐνες GAL4-Smads. Έτσι, για την ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc υπερεκφράστηκε η Smad2ΔE3 ή η flag-Smad3 ή χρησιμοποιήθηκε TGF-β για ενεργοποίηση από τα ενδογενή Smads και για την ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc υπερεκφράστηκε η GAL4-Smad2 ή GAL4-Smad3. Στη περίπτωση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc οι καλλιέργειες στερούνταν το ορό κατά την αλλαγή του θρεπτικού 12 ώρες μετά τη διαμόλυνση ώστε να αποφύγουμε την ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς από τον TGF-β που υπάρχει στον ορό μέσω των ενδογενών Smads. Επίσης έγινε κανονικοποίηση με β-gal για την εξισορρόπηση των τιμών της λουσιφεράσης χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο CMV-LacZ.

Το πρώτο πείραμα αφορά την μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από τα ενδογενή Smads παρουσία των SCPs ή της PPM1A. Σε πρώτη φάση έγινε διαμόλυνση με 2 μg SCP1 ή 2 μg PPM1A και 24 ώρες πριν τη λύση των κυττάρων έγινε αλλαγή του θρεπτικού χωρίς ορό και προσθήκη TGF-β (5 ng/ml). Όπως φαίνεται στην εικόνα 31 τα R-Smads δεν φωσφορυλιώνονται χωρίς TGF-β οπότε η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς παραμένει σε χαμηλά βασικά επίπεδα. Όταν γίνεται προσθήκη του TGF-β, τα R-Smads φωσφορυλιώνονται και επάγεται η ενεργοποίηση της λουσιφεράσης περίπου 75 φορές. Η υπερεκφρασμένη PPM1A αποφωσφορυλιώνει το SXS των ενδογενών Smad2/3 οπότε και τις απενεργοποιεί με αποτέλεσμα η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς να πέφτει σε

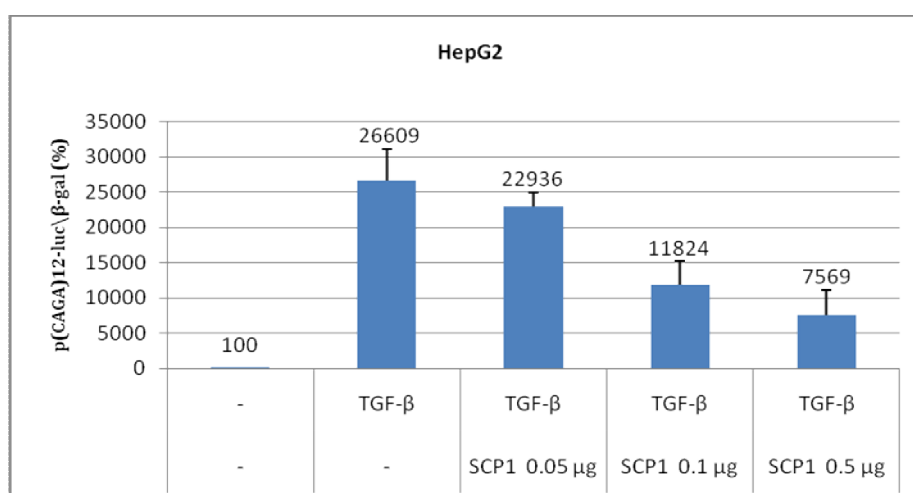
επίπεδα μόλις 4 φορές πάνω από τα βασικά επίπεδα χωρίς TGF-β. Ουσιαστικά λοιπόν αναιρεί την δράση του TGF-β. Η SCP1 ομοίως ρίχνει την ενεργοποίηση σημαντικά αν και όχι στο βαθμό της PPM1A.



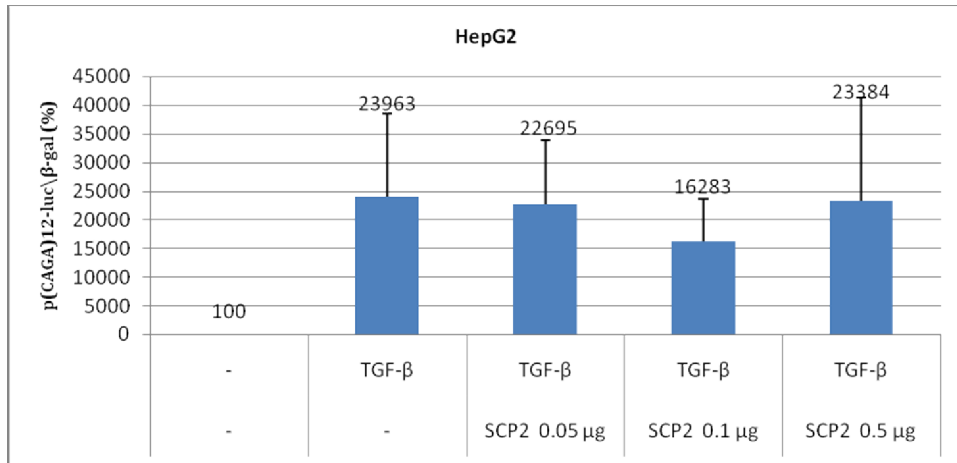
Εικόνα 31. Η επίδραση της SCP1 και της PPM1A στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από τον TGF-β. Τόσο η δράση της PPM1A όσο και της SCP1 μειώνουν την μεταγραφική ικανότητα των ενδογενών Smads.

Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκαν όλες οι SCPs (SCP1, SCP2 και SCP3) σε διαβάθμιση ποσοτήτων των 0.05 μg, 0.1 μg και 0.5 μg. Καταρχήν η διαβάθμιση στην ποσότητα έγινε για να δούμε αν υπάρχει μία ποσοτική συσχέτιση των SCPs με την επίδραση που έχουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση. Δεύτερον, οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν είναι πολύ μικρότερες από αυτές της εικόνας 31 και αυτό έγινε για να αποφύγουμε την περίπτωση της αποφωσφορυλίωσης του SXS από τα SCPs στις μεγάλες τους συγκεντρώσεις (όπως είδαμε στην ενότητα Γ). Από τη άλλη η ικανότητα των SCPs να αποφωσφορυλιώνουν τον linker είναι αρκετά ισχυρή και σε πολύ μικρές ποσότητες (ενότητα Γ). Επομένως για να μπορούμε να δούμε διαφορές στη μεταγραφική ενεργοποίηση που να οφείλονται σε διαφορές στην αποφωσφορυλίωση του linker

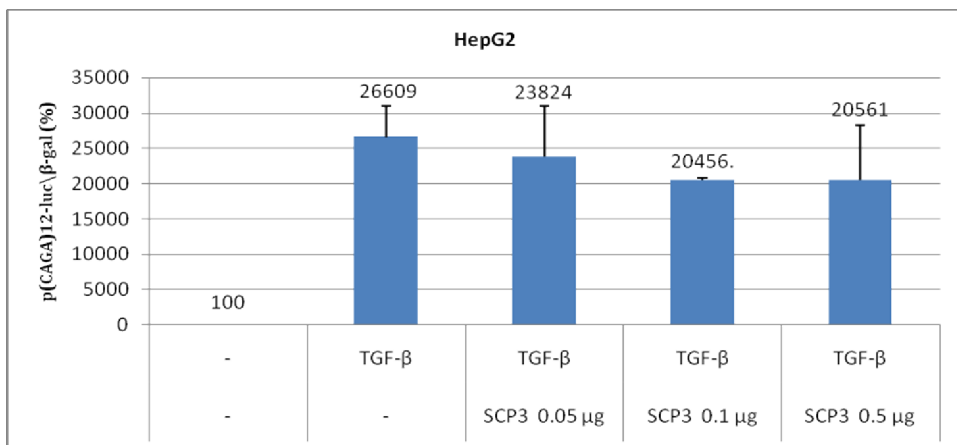
χωρίς να φτάνουμε στο πλατό όπου ο linker είναι ολικά αποφωσφορυλιωμένος χρησιμοποιήθηκαν ποσότητες βάσει του western blot της εικόνας 25. Στην εικόνα 32 φαίνεται ότι όσο περισσότερη είναι η ποσότητα της SCP1 τόσο μικρότερη είναι η μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από τα ενδογενή Smads. Τα SCP2 και SCP3 από την άλλη μείωσαν την ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc σε πολύ μικρό βαθμό (Εικόνες 33, 34) που είναι ενδεικτικό ότι η δράση τους στη μεταγραφική ενεργοποίηση από τα ενδογενή Smads δεν φτάνει στα επίπεδα της SCP1.



Εικόνα 32. Η επίδραση της SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από τον TGF-β. Η αυξανόμενη ποσότητα της SCP1 έχει και μεγαλύτερη επίδραση στη μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τα ενδογενή Smads.

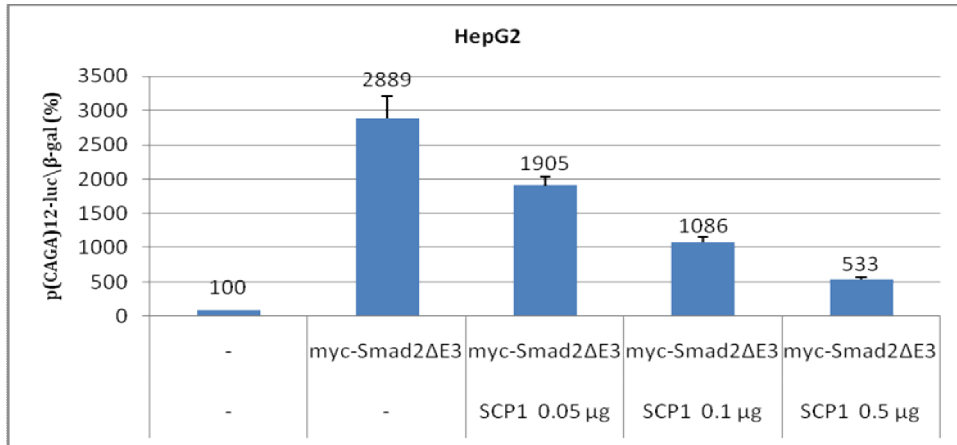


Εικόνα 33. Η επίδραση της SCP2 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από τον TGF-β. Η μείωση στη μεταγραφική ενεργοποίηση είναι ελάχιστη συγκριτικά με αυτή που προκαλεί η SCP1.

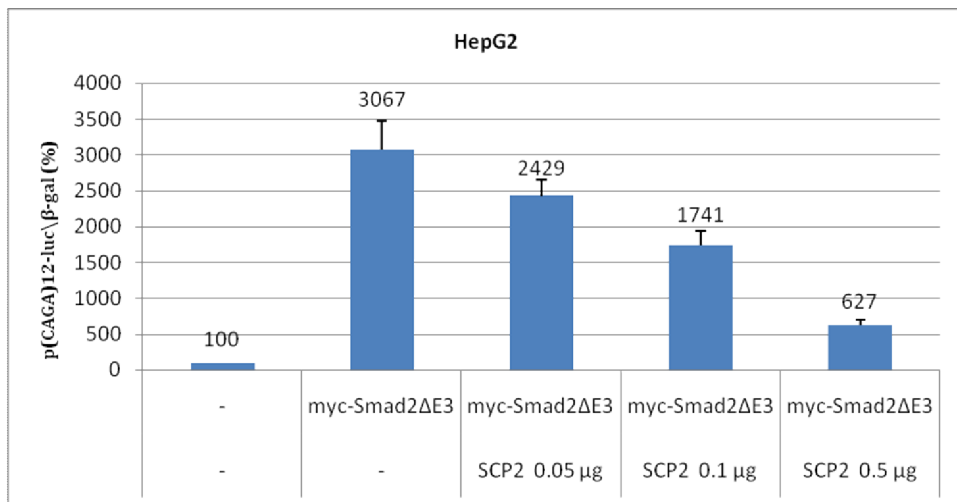


Εικόνα 34. Η επίδραση της SCP3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από τον TGF-β. Η μείωση στη μεταγραφική ενεργοποίηση είναι επίσης πολύ μικρή και παραπλήσια της SCP2 παρά της SCP1.

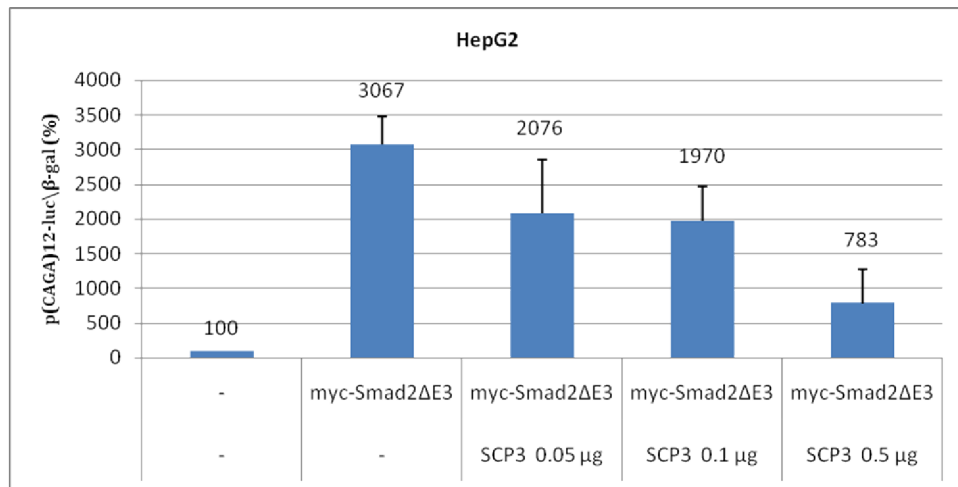
Ο επόμενος στόχος για την επιβεβαίωση των παραπάνω είναι να δούμε αν ισχύουν στην περίπτωση των υπερεκφρασμένων myc-Smad2ΔΕ3 και flag-Smad3. Η Smad2ΔΕ3 είναι μια ισομορφή της Smad2 από την οποία απουσιάζει το εξόνιο 3 με συνέπεια να μπορεί να προσδεθεί άμεσα στο DNA. Αντί λοιπόν για TGF-β υπερεκφράστηκαν τα myc-Smad2ΔΕ3 και flag-Smad3 και μετρήθηκε η μεταγραφική ενεργοποίηση που προκαλούν στον p(CAGA)₁₂-E1B-luc παρουσία των SCPs σε διαβαθμισμένες ποσότητες. Σε αυτά τα πειράματα τα κύτταρα επίσης στερήθηκαν τον ορό 24 ώρες πριν τη λύση τους. Στην εικόνα 35 φαίνεται ότι η SCP1 μειώνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση αποφωσφορυλιώνοντας το linker της Smad2ΔΕ3 πάλι με μία αντίστροφη ποσοτική συσχέτιση. Η προσθήκη της Smad2ΔΕ3 αυξάνει περίπου 29 φορές τα βασικά επίπεδα της ενεργότητας του γονιδίου αναφοράς, τα οποία σταδιακά πέφτουν με τη προσθήκη SCP1 και είναι μόνο 5 φορές αυξημένα παρουσία 0.5 μg SCP1. Επομένως όσο περισσότερη είναι η αποφωσφορυλίωση τόσο μικρότερη είναι η μεταγραφική ενεργοποίηση. Για τα SCP2 και SCP3 ισχύει ακριβώς το ίδιο με την SCP1, δηλαδή όσο αυξάνεται η ποσότητά τους τόσο μειώνουν την μεταγραφική ενεργοποίηση που προκαλεί η Smad2ΔΕ3 (Εικόνες 36, 37). Αυτή η αντίθεση σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα του TGF-β ενδεχομένως να οφείλεται στην μειωμένη ικανότητα των SCP2 και SCP3 να δράσουν στα ενδογενή Smads. Εδώ όμως που έχουμε περίπτωση υπερέκφρασης έχουν πολύ περισσότερο υπόστρωμα για να δράσουν, με αποτέλεσμα να αποφωσφορυλιώνουν πιο αποτελεσματικά το linker και να μειώνεται η μεταγραφική ενεργοποίηση. Είναι δύσκολο να συγκριθεί εδώ ποια από τις SCPs είναι πιο αποτελεσματική όμως είναι βέβαιο ότι δρουν παρόμοια και στην υψηλή τους ποσότητα η ενεργοποίηση του γονιδίου αναφοράς πέφτει κατακόρυφα.



Εικόνα 35. Η επίδραση της SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από την Smad2ΔE3. Η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2ΔE3 μειώνει σημαντικά την ικανότητά της να προκαλεί μεταγραφή.

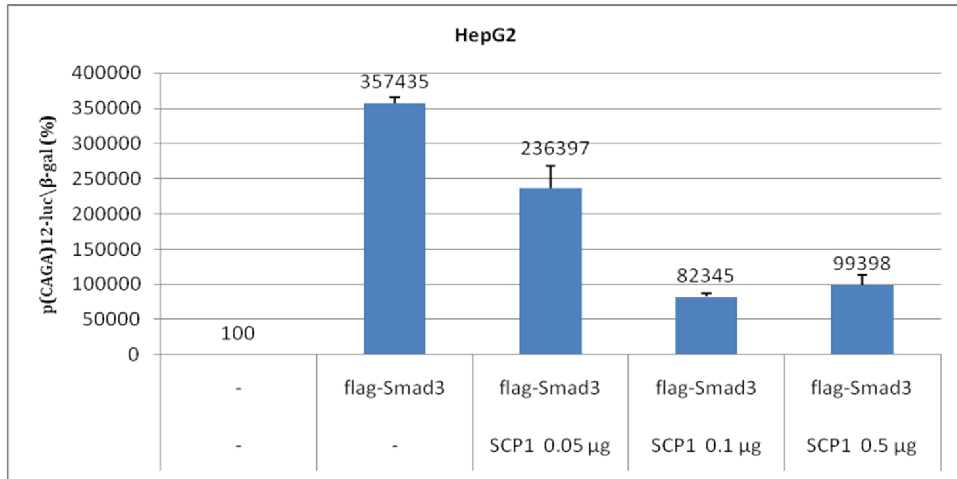


Εικόνα 36. Η επίδραση της SCP2 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από την Smad2ΔE3. Σε αυτή την περίπτωση η δράση της SCP2 είναι πανομοιότυπη με της SCP1 προκαλώντας πτώση της ενεργοποίησης σε αντίστοιχα επίπεδα.

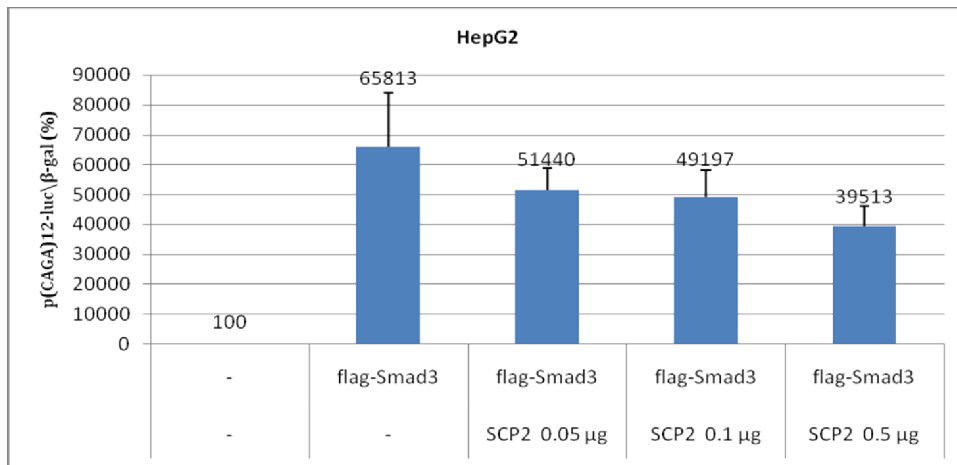


Εικόνα 37. Η επίδραση της SCP3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από την Smad2ΔE3. Η SCP3 ακολουθεί το ίδιο πρότυπο δράσης με τις SCP1 και SCP2.

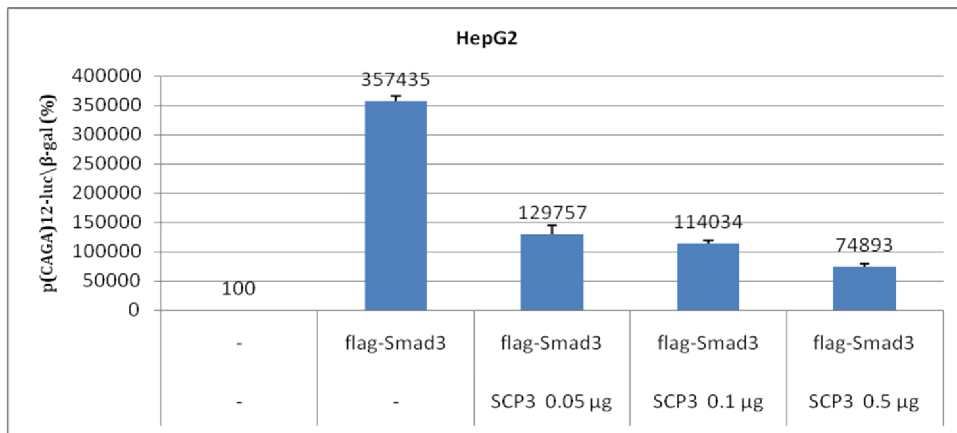
Τα αντίστοιχα πειράματα στην περίπτωση της flag-Smad3 είχαν παρόμοια αποτελέσματα όπως με τη Smad2ΔE3. Τα SCPs μειώνουν την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τη Smad3 με το σταδιακό πρότυπο που προαναφέρθηκε. Το αξιοσημείωτο εδώ είναι ότι η SCP2 αν και μειώνει την ενεργοποίηση, δεν το καταφέρνει τόσο αποτελεσματικά όσο η SCP1 και η SCP3. Η μείωση στην ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς που παρατηρείται στις δύο πρώτες διαβαθμίσεις της ποσότητας της SCP2 κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα ενώ στη μεγάλη ποσότητα των 0.5 μg είναι λίγο μεγαλύτερη. Συνολικά όμως δεν επιδρά στην ενεργοποίηση στο βαθμό που το κάνουν οι SCP1 και SCP3. Επίσης η SCP3 ρίχνει την ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς σε μεγάλο βαθμό ακόμη και όταν βρίσκεται σε χαμηλή ποσότητα (Εικόνες 38, 39, 40). Υπάρχει λοιπόν το ενδεχόμενο η SCP3 να έχει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τη δράση της απέναντι στη Smad3 σε αντίθεση με τη SCP2 που ίσως δρα καλύτερα πάνω στη Smad2.



Εικόνα 38. Η επίδραση της SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από την Smad3. Ομοίως με την Smad2 η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad3 προκαλεί μείωση στη μεταγραφική ενεργοποίηση που προκαλεί.



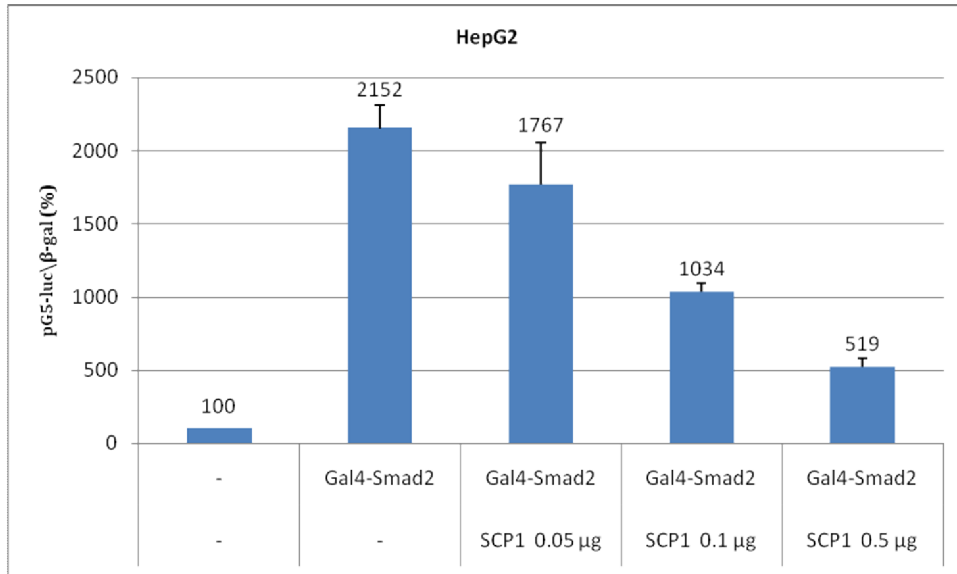
Εικόνα 39. Η επίδραση της SCP2 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από την Smad3. Η SCP2 ρίχνει και εδώ τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τη Smad3 όχι όμως στα επίπεδα των SCP1 και SCP3.



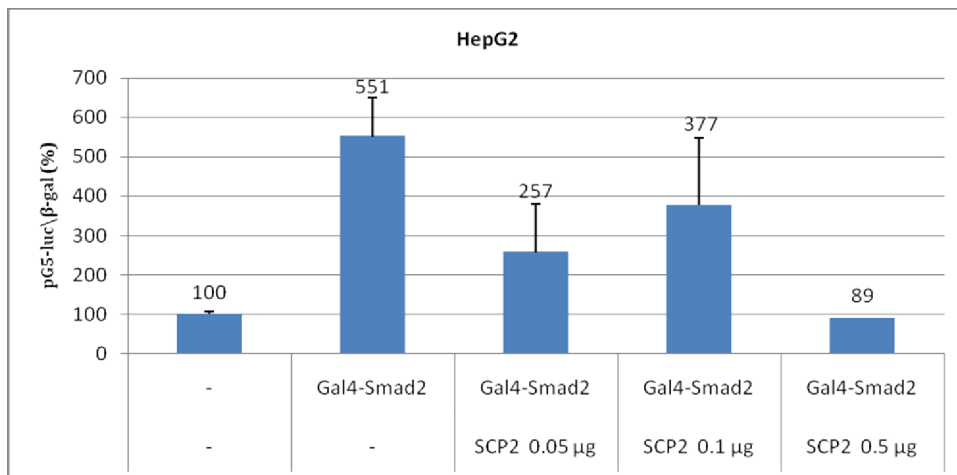
Εικόνα 40. Η επίδραση της SCP3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από την Smad3. Η SCP3 είναι η αποτελεσματικότερη όλων στην μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τη Smad3. Αυτό μπορεί να είναι ενδεικτικό ότι η SCP3 παρουσιάζει ιδιαίτερη προτίμηση να δρα πάνω στη Smad3.

Ένα πολύ σημαντικό ζήτημα για τη πτώση στη μεταγραφική ενεργότητα που παρατηρήσαμε είναι να διαπιστώσουμε ποιο στάδιο δράσης των R-Smads επηρεάζουν τα SCPs και κατ' επέκταση η αποφωσφορυλίωση του linker. Για παράδειγμα η αποφωσφορυλίωση του linker μπορεί να ευνοεί τη διατήρηση των R-Smads στο κυτταρόπλασμα και να εμποδίζει την εισαγωγή τους στον πυρήνα. Επίσης δεν αποκλείεται να εμποδίζεται και ο ολιγομερισμός των Smad2/3 με τη Smad4 (ενδείξεις στην ενότητα ΣΤ). Ακόμα η δράση των SCPs ίσως επηρεάζει την πρόσδεση των R-Smads στο DNA ή ρυθμίζει τη συστράτευση μεταγραφικών παραγόντων με τρόπο που να εμποδίζεται η μεταγραφή. Για να απαντήσουμε αυτό το ερώτημα χρησιμοποιήσαμε το γονίδιο αναφοράς pG₅-E1B-luc και τις συντηγμένες πρωτεΐνες GAL4-Smad2 και GAL4-Smad3. Η GAL4 μπορεί να προσδέεται στο DNA σε στοιχεία του pG₅-E1B-luc και περιέχει NLS για τη μεταφορά της στον πυρήνα. Επομένως εξαναγκάζουμε τις R-Smads τόσο να βρεθούν στον πυρήνα όσο και να προσδεθούν στο DNA. Αν η αποφωσφορυλίωση του linker εμποδίζει την εισαγωγή των Smads στον πυρήνα τότε εδώ δεν υπάρχει περίπτωση να δούμε πτώση στη μεταγραφική ενεργότητα διότι υπάρχει το ισχυρό σινιάλο που ούτως ή άλλως τις οδηγεί στον πυρήνα. Εάν τώρα η πτώση στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου

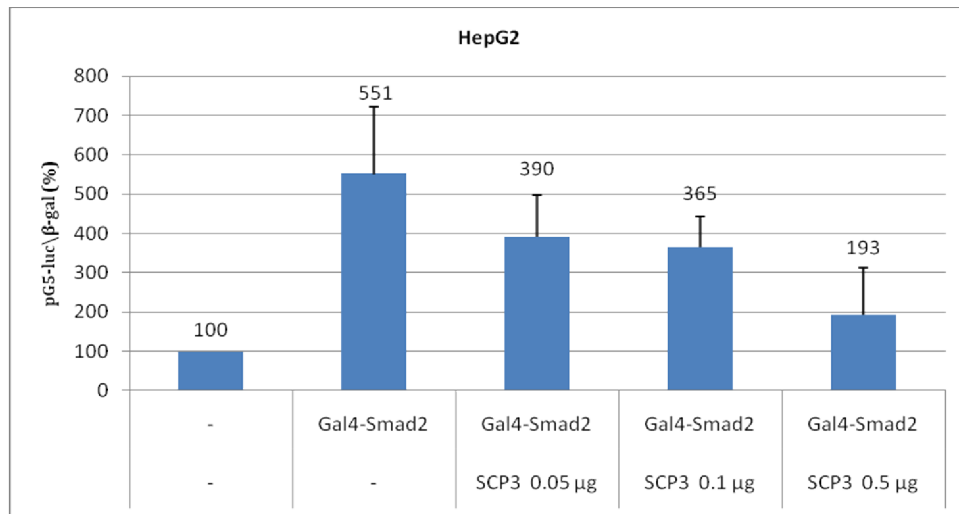
αναφοράς ακολουθήσει τα προηγούμενα πρότυπα τότε αυτή οφείλεται σε γεγονότα που συμβαίνουν στον πυρήνα όπως στην συστράτευση μεταγραφικών παραγόντων στο μεταγραφικό σύμπλοκο των R-Smads/Smad4. Τα SCPs χρησιμοποιήθηκαν και πάλι στις γνωστές συγκεντρώσεις των 0.05 μg, 0.1 μg και 0.5 μg. Στις εικόνες 41, 42, 43 φαίνεται ότι τα SCPs μειώνουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση του GAL4-Smad2 στα πρότυπα των προηγούμενων πειραμάτων (με εξαίρεση τη διαφοροποίηση στις δύο πρώτες συγκεντρώσεις της SCP2 που όμως και πάλι υπάρχει μειωμένη ενεργοποίηση). Επομένως το συμπέρασμα είναι ότι η αποφωσφορυλίωση του linker μπορεί να εμποδίσει τη δράση της Smad2 μέσα στον πυρήνα. Στην περίπτωση του GAL4-Smad3 (Εικόνες 44, 45, 46) ισχύουν τα ίδια αν και η πτώση της ενεργοποίησης είναι σαφώς μικρότερη από αυτή που προκαλείται στο GAL4-Smad2. Επίσης στην περίπτωση των SCP2 και SCP3 η μικρή ποσότητα τους (0.05 μg) φαίνεται ότι μπορεί να αυξήσει ελάχιστα τη μεταγραφική ενεργότητα του GAL4-Smad3. Εδώ τίθεται το ερώτημα εάν πάρα πολύ μικρές ποσότητες των SCPs (<0.05μ) θα μπορούσαν να αποφωσφορυλιώνουν τον linker σε πρότυπα που να βοηθούν τη μεταγραφή. Το πιθανότερο όμως είναι ότι η Smad3 επιδεικνύει μεγαλύτερη μεταγραφική ικανότητα από τη Smad2 στο συγκεκριμένο πείραμα και είναι δυσκολότερο για τις SCPs να δράσουν τόσο αποτελεσματικά. Γενικά τα αποτελέσματα στην περίπτωση της GAL4-Smad3 υποδηλώνουν είτε ότι δεν αποφωσφορυλιώνεται σε μεγάλο βαθμό ο linker είτε ότι η GAL4-Smad3 μπορεί και διατηρεί την ικανότητα της μεταγραφικής ενεργοποίησης σε υψηλά επίπεδα.



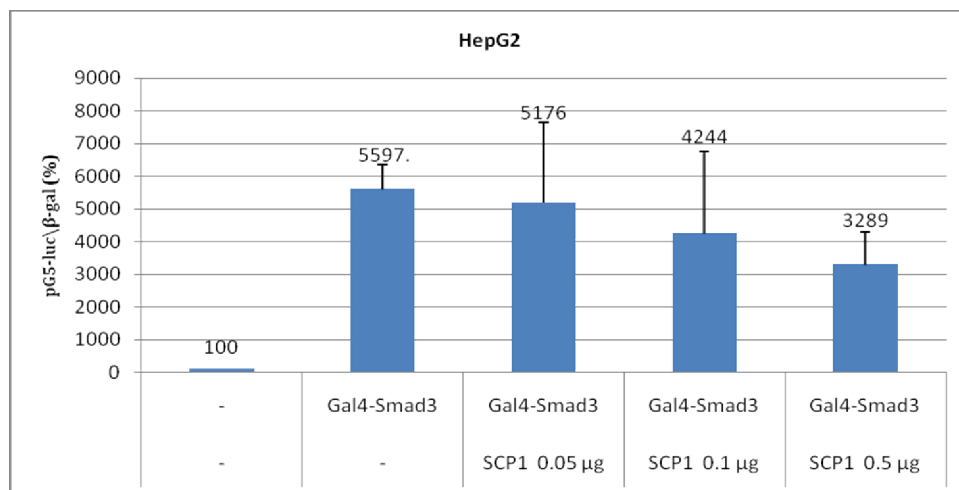
Εικόνα 41. Η επίδραση της SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc από την GAL4-Smad2. Η SCP1 μειώνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση με το ίδιο πρότυπο που ακολουθεί και στη Smad2ΔE3. Επομένως το αποτέλεσμα της αποφωσφορυλίωσης του linker της Smad2 στην μεταγραφική ενεργοποίηση οφείλεται σε γεγονότα που συμβαίνουν στον πυρήνα.



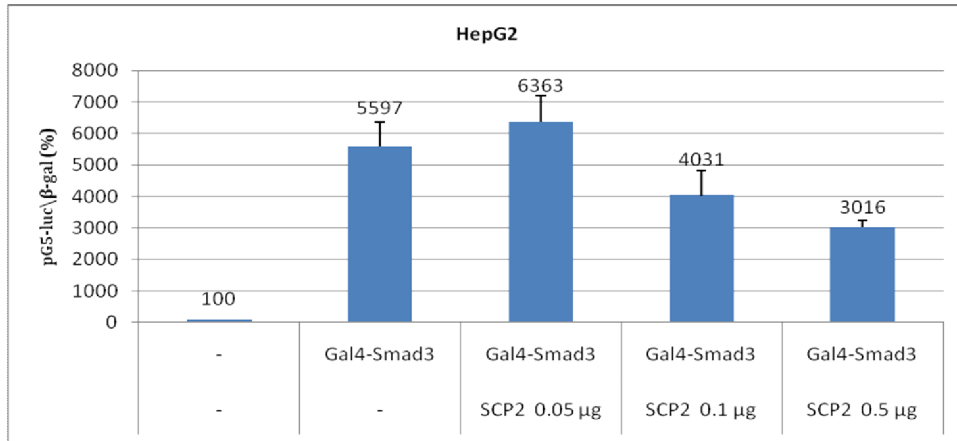
Εικόνα 42. Η επίδραση της SCP2 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc από την GAL4-Smad2. Η αποφωσφορυλίωση από την SCP2 επίσης ρίχνει την μεταγραφική ενεργοποίηση από τη GAL4-Smad2. Παρόλη τη διαφοροποίηση στις δύο μικρές ποσότητες της SCP2 το αποτέλεσμα είναι πάλι η πτώση στην ενεργοποίηση. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι η μεγάλη ποσότητα της SCP2 ρίχνει την ενεργοποίηση κάτω από τα βασικά επίπεδα που δεν υπάρχει η GAL4-Smad2.



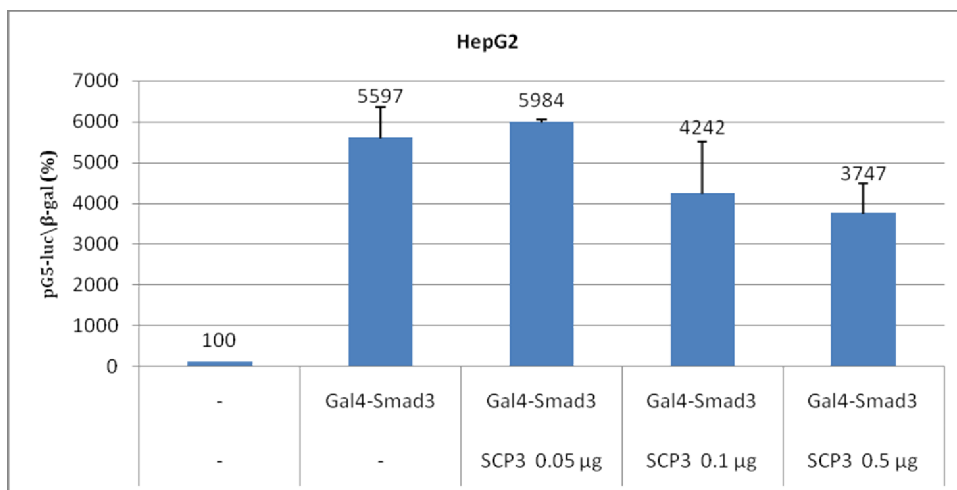
Εικόνα 43. Η επίδραση της SCP3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc από την GAL4-Smad2. Η SCP3 ακολουθεί το ίδιο πρότυπο μείωσης της μεταγραφικής ενεργοποίησης με την SCP1.



Εικόνα 44. Η επίδραση της SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc από την GAL4-Smad3. Η SCP1 μειώνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση σε μικρότερα όμως επίπεδα από ότι συνήθως. Αυτό μπορεί να σημαίνει είτε ότι δεν αποφωσφορυλιώνει σε ικανοποιητικά επίπεδα τον linker της GAL4-Smad3 είτε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση από το GAL4-Smad3 είναι ισχυρή ακόμη και μετά την αποφωσφορυλίωση του linker.

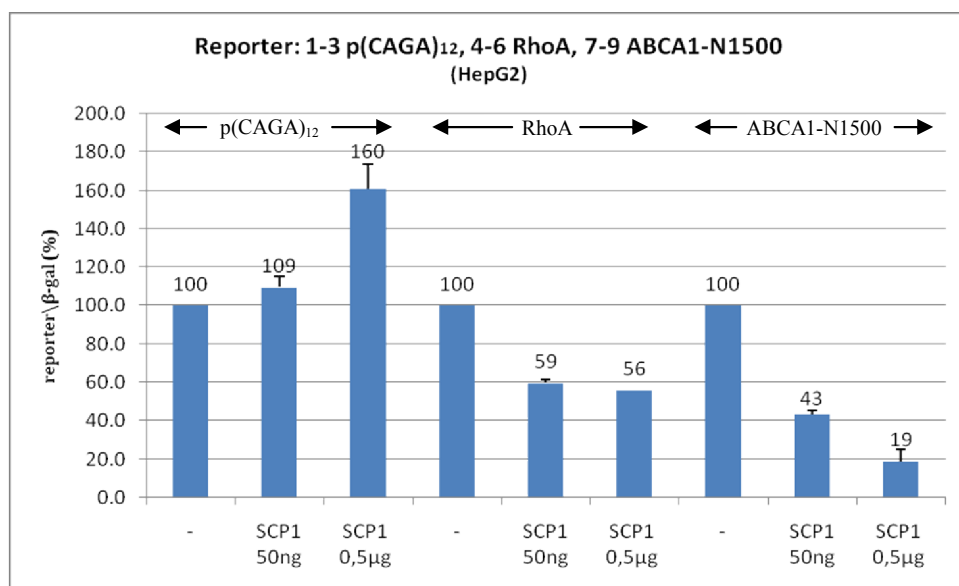


Εικόνα 45. Η επίδραση της SCP2 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc από την GAL4-Smad3. Η SCP2 μειώνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση σε μικρά επίπεδα όπως η SCP1 στην αντίστοιχη περίπτωση. Η μικρή αύξηση της ενεργοποίησης στη μικρή ποσότητα της SCP2 σημαίνει ότι η SCP2 δεν είναι ικανή να ελαττώσει την μεταγραφική ενεργοποίηση ή ότι σε πολύ μικρές ποσότητες θα μπορούσε να παίζει και ενισχυτικό ρόλο.



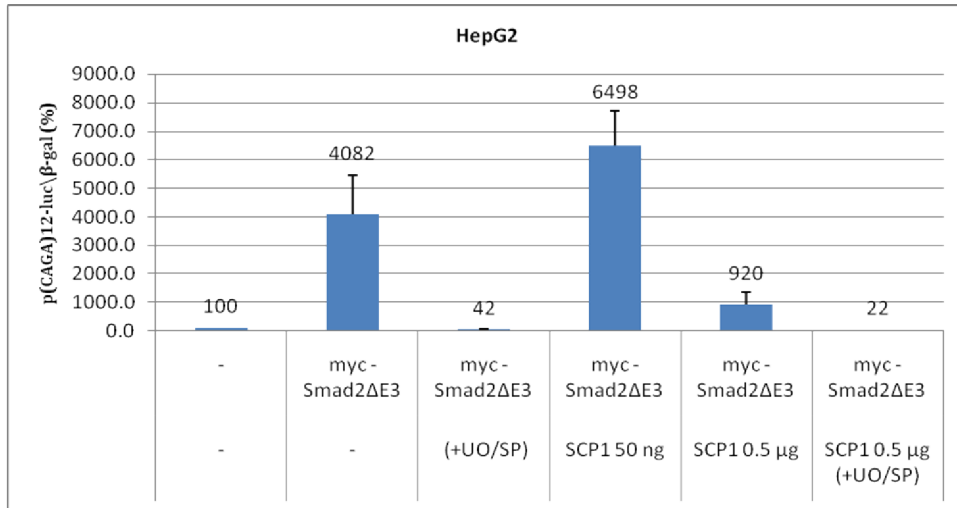
Εικόνα 46. Η επίδραση της SCP3 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του pG₅-E1B-luc από την GAL4-Smad3. Η SCP3 ακολουθεί ακριβώς το ίδιο πρότυπο με την SCP2 στη μείωση της μεταγραφική ενεργοποίησης της GAL4-Smad3.

Όπως έχει αναφερθεί στη εισαγωγή της παρούσας εργασίας, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η υπερέκφραση της SCP1 οδηγεί στην μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης μίας ποικιλίας γονιδίων με πιθανή εξήγηση την αποφωσφορυλίωση του CTD (Carboxy terminal domain της RNAPII (RNA polymerase II) (Yeo *et al.*, 2003, 2005; Thompson *et al.*, 2006). Για να δούμε αν ισχύει αυτό στη δική μας περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν τα γονίδια αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-luc, RhoA-luc και ABCA1-N1500-luc παρουσία της SCP1 σε συγκεντρώσεις των 50 ng και 0.5 μg (Εικόνα 47). Στην περίπτωση των RhoA και ABCA1 είχαμε πράγματι σημαντική πτώση της βασικής ενεργοποίησης. Από την άλλη μεριά στην περίπτωση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc είχαμε ελαφριά άνοδο. Γεγονός είναι ότι η SCP1 μπορεί και επηρεάζει γενικότερα τη βασική μεταγραφική μηχανή. Στην περίπτωση όμως του p(CAGA)₁₂-E1B-luc δεν μειώνει τα βασικά μεταγραφικά επίπεδα οπότε και το αποτέλεσμα των προηγούμενων πειραμάτων μεταγραφής είναι ειδικό για την επίδραση των SCPs πάνω στις Smads και όχι στη μεταγραφική μηχανή.



Εικόνα 47. Η επίδραση της SCP1 στη βασική μεταγραφική ενεργοποίηση των p(CAGA)₁₂-E1B-luc (στήλες 1-3), RhoA-luc (στήλες 4-6) και ABCA1-N1500-luc (στήλες 7-9). Στην πρώτη περίπτωση η SCP1 έχει θετικό ρόλο στην ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc. Αντίθετα μειώνει την βασική ενεργοποίηση του RhoA στο μισό ενώ στην περίπτωση του ABCA1-1500 τα αποτελέσματα είναι ακόμη πιο δραματικά αφού στην υψηλή ποσότητα του 0.5 μg σχεδόν την εκμηδενίζει.

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε εάν οι αναστολείς U0126 και SP600125 που εμποδίζουν την φωσφορυλίωση του linker από τις ERK και JNK αντίστοιχα έχουν παρόμοιο αποτέλεσμα με τις SCPs στη μεταγραφική ενεργοποίηση από τις Smads. Έγινε λοιπόν ένα πείραμα μεταγραφικής ενεργοποίησης του p(CAGA)₁₂-E1B-luc με myc-Smad2ΔE3 παρουσία της SCP1. Στην αλλαγή του θρεπτικού 24 ώρες πριν τη λύση των κυττάρων αφαιρέθηκε ο ορός και προστέθηκαν οι αναστολείς U0126 και SP600125 (10 μM). Στην εικόνα 48 φαίνεται ότι οι αναστολείς ρίχνουν την μεταγραφική ενεργοποίηση σε επίπεδα χαμηλότερα της βασικής ενεργοποίησης και όταν μάλιστα συνυπάρχουν με την SCP1 το αποτέλεσμα είναι ακόμη πιο δραματικό. Φαίνεται λοιπόν ότι οι αναστολείς δρουν πολύ πιο αποτελεσματικά από την SCP1 στη μείωση της μεταγραφικής ικανότητας των Smads. Με βάση αυτή τη παρατήρηση έγινε western blot σε HepG2 σε παρόμοιες συνθήκες με αυτές του παραπάνω πειράματος μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η ποσότητα διαμόλυνση της bio-Smad2 ήταν 10 μg και της myc-SCP1 0.05 ή 0.5 μg. Οι αναστολείς προστέθηκαν για 24h σε συγκέντρωση 10 μM. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα απομονώθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στο western blot έγινε η ανίχνευση της φωσφορυλίωσης του linker της Smad2. Το αποτέλεσμα (Εικόνα 49) έδειξε ότι όντως στα HepG2 οι αναστολείς εκμηδενίζουν τη φωσφορυλίωση στο linker και δουλεύουν πολύ καλύτερα από την SCP1 σε αυτό. Επομένως έτσι εξηγείται γιατί ρίχνουν τόσο πολύ την ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς. Από την άλλη έγινε το ίδιο πείραμα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε HEK293T (Εικόνα 50) και εδώ φάνηκε ότι οι αναστολείς από μόνοι τους δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τη Smad2ΔE3. Σε συνεργασία όμως με την SCP1 προκαλούν δραματική πτώση στη μεταγραφική ενεργοποίηση σε επίπεδα κάτω από τα βασικά. Βλέπουμε λοιπόν ότι η δράση των αναστολέων είναι πολύ ισχυρότερη στα HepG2 από ότι στα HEK293 ή ίσως το αποτέλεσμα να υποδηλώνει εναλλακτικούς τρόπους φωσφορυλίωσης του linker των R-Smads στα HEK293.

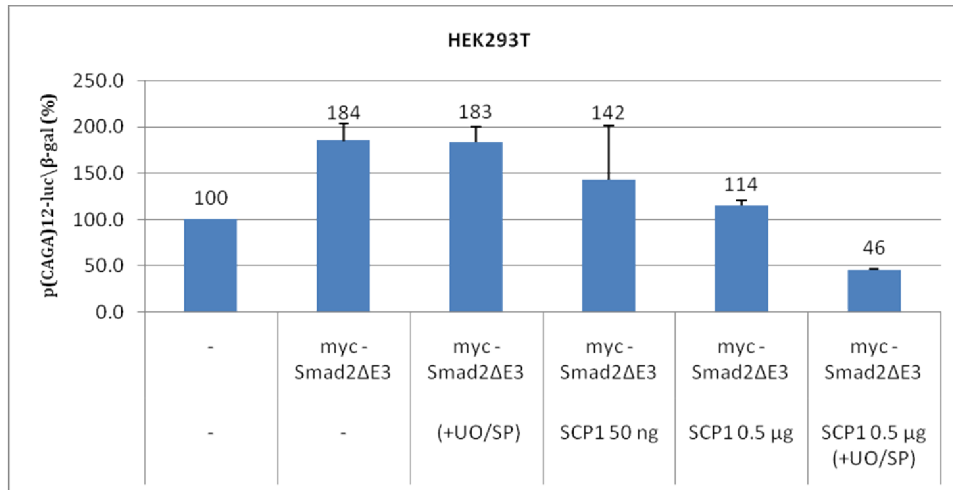


Εικόνα 48. Η επίδραση των αναστολέων U0126 και SP600125 συγκριτικά με την SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του $p(CAGA)_{12}$ -E1B-luc από τη myc-Smad2ΔE3 σε HepG2. Οι αναστολείς είναι πιο αποτελεσματική στο να ρίχνουν την μεταγραφική ενεργοποίηση από τα Smads σε σχέση με την SCP1 στα HepG2 ενώ όταν συνυπάρχουν το αποτέλεσμα είναι ακόμη πιο ισχυρό.

SP600125	-	+	-	-	+
U0126	-	+	-	-	+
myc-SCP1	-	-	0.1 μg	1 μg	1 μg
Bio-Smad 2	+	+	+	+	+



Εικόνα 49. Η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad2 παρουσία των αναστολέων U0126 και SP600125 στα HepG2. Η ανίχνευση της φωσφορυλίωσης του linker έγινε με a-P-Smad2 L (Ser 245/250/255), της ολικής Smad2 με a-Smad2, της SCP1 με a-myc (η ποσότητα του 0.1 μg δεν ήταν δυνατό να ανιχνευθεί) και της ακτίνης με a-actin.

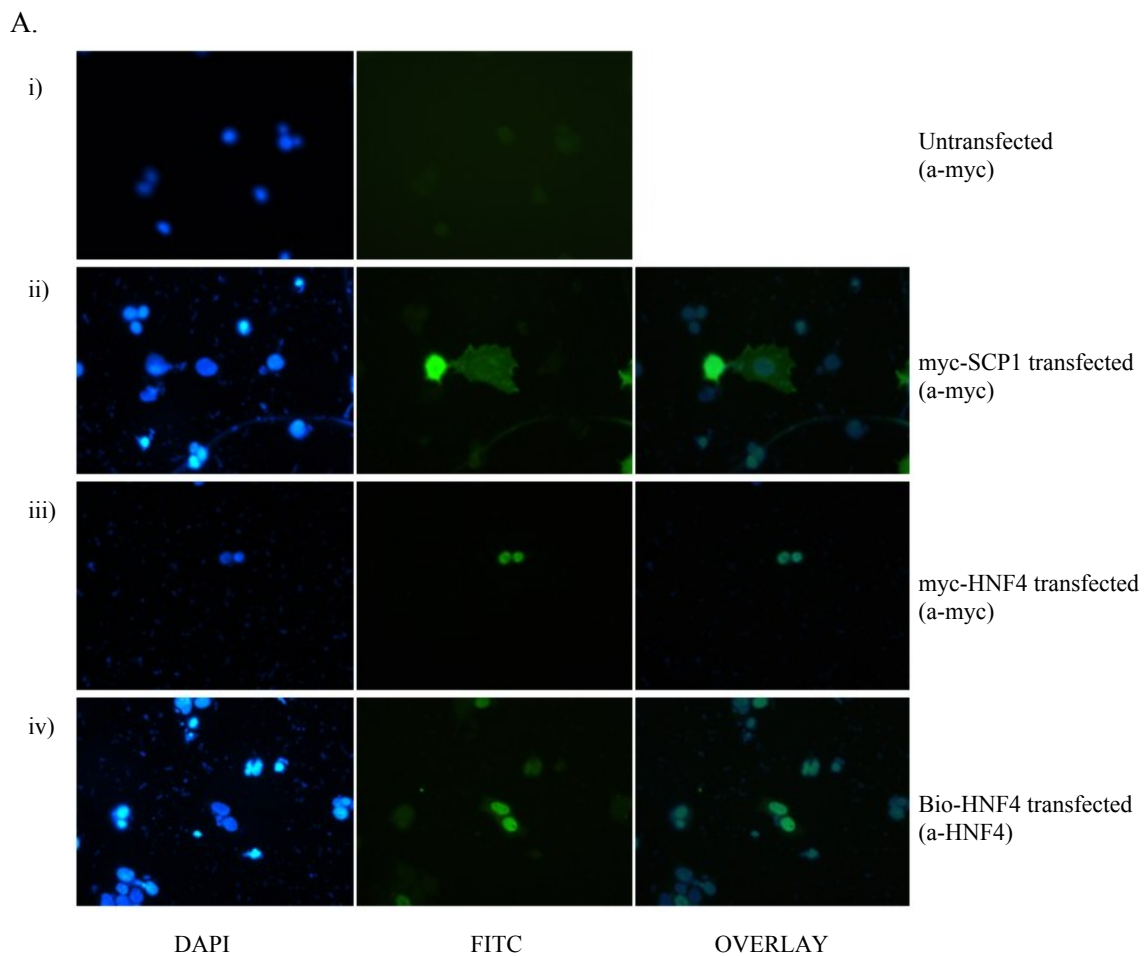


Εικόνα 50. Η επίδραση των αναστολέων U0126 και SP600125 συγκριτικά με την SCP1 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από τη myc-Smad2ΔE3 σε HEK293T. Η SCP1 δρα καλύτερα από τους αναστολείς στην πτώση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τα Smads. Η συνύπαρξή τους βέβαια πάλι εκμηδενίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση.

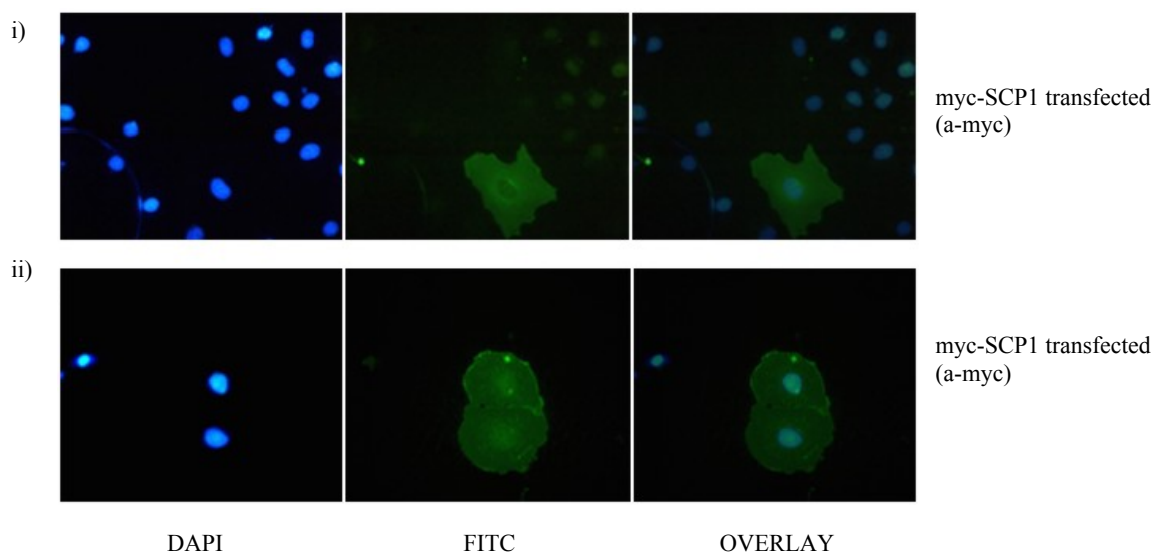
Θ. ΤΟΠΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΚΕΦΡΑΣΜΕΝΗΣ SCP1

Γνωρίζουμε ότι η ενδογενής SCP1 εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων (Yeo *et al.*, 2003). Σε όλα όμως τα προηγούμενα πειράματα η SCP1 υπερεκφράστηκε γι' αυτό και είναι σημαντικό να την εντοπίσουμε μέσα στο κύτταρο ώστε να δούμε τις περιοχές που μπορεί να δράσει. Για τον εντοπισμό της χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του έμμεσου ανοσοφθορισμού σε HEK293T και σε COS-7. Για δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν μη διαμολυσμένα κύτταρα ώστε να δούμε αν το myc αντίσωμα πιάνει κάτι μη ειδικά, επίσης κύτταρα διαμολυσμένα με myc-HNF₄ (4 μg) για έλεγχο της λειτουργίας του myc αντισώματος στον ανοσοφθορισμό και τέλος διαμολυσμένα κύτταρα με bio-HNF₄ (4 μg) όπου η αντίγνωση έγινε με διαφορετικό αντίσωμα από το myc ώστε να επιβεβαιωθεί ότι το πρωτόκολλο του ανοσοφθορισμού

δουλεύει καλά. Η ανίχνευση των myc πρωτεϊνών έγινε με a-myc 1:200 σε PBS+//1.5% FBS και δεύτερο αντίσωμα a-mouse FITC 1:50 σε PBS+//1.5% FBS. Η ανίχνευση της bio-HNF₄ έγινε με a-HNF4 1:200 σε PBS+//1.5% FBS και δεύτερο αντίσωμα a-rabbit FITC 1:50 σε PBS+//1.5% FBS. Το αποτέλεσμα του ανοσοφθορισμού (Εικόνα 51-A) έδειξε ότι η υπερεκφρασμένη myc-SCP1 εντοπίζεται σε όλη την έκταση του κυττάρου και όχι μόνο στον πυρήνα. Τα δείγματα ελέγχου έδειξαν τόσο ότι το myc αντίσωμα δε πιάνει μη-ειδικά κάποιο



B.

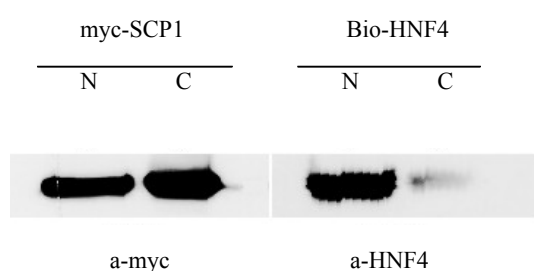


Εικόνα 51. Η τοπολογία της υπερεκφρασμένης SCP1 στο κύτταρο είναι πυρηνική και κυτταροπλασματική. (A) Ο ανοσοφθορισμός σε HEK293 μη διαμολυσμένων κυττάρων και ανίχνευση με a-myc (i), διαμολυσμένων κυττάρων με myc-SCP1 και ανίχνευση με a-myc (ii), διαμολυσμένων κυττάρων με myc-HNF₄ και ανίχνευση με a-myc (iii) και διαμολυσμένων κυττάρων με bio-HNF₄ και ανίχνευση με a-HNF₄. (B) Ο ανοσοφθορισμός σε COS-7 κύτταρα, διαμολυσμένων με myc-SCP1 και ανίχνευση με a-myc (i, ii από διαφορετικά σημεία του ίδιου πιάτου). Ο χρωματισμός των πυρήνων έγινε με DAPI.

επίτοπο στα HEK293T όσο και ότι η διαδικασία του ανοσοφθορισμού ήταν εντάξει αφού η πυρηνική πρωτεΐνη HNF₄ εντοπίστηκε και στις δύο περιπτώσεις με a-myc και a-HNF₄. Επίσης έγινε και ανοσοφθορισμός σε COS-7 σε 6-well στα οποία διαμολύνθηκε η myc-SCP1 (6 µg) με τη μέθοδο του CaCl₂. Ομοίως και εδώ η υπερεκφρασμένη SCP1 εντοπίστηκε σε όλη τη έκταση του κυττάρου (Εικόνα 51-B).

Ένα δεύτερο πείραμα που επιβεβαιώνει ότι η υπερεκφρασμένη SCP1 βρίσκεται σε όλη την έκταση του κυττάρου είναι ο διαχωρισμός του πυρηνικού από το κυτταροπλασματικό διαμέρισμα του κυττάρου και ο έλεγχος με western blot για την ύπαρξη της myc-SCP1. Για το πείραμα αυτό διαμολύνθηκαν HEK293T σε p100 με 15 µg myc-SCP1 ή bio-HNF₄. Μετά το διαχωρισμό του πυρηνικού από το

κυτταροπλασματικό εκχύλισμα ακολούθησε η ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και έγινε ανίχνευση της SCP1 ή της HNF₄ στο western blot. Γνωρίζουμε ότι η HNF₄ ακόμη και υπερεκφρασμένη παραμένει πυρηνική οπότε θα βοηθήσει ως δείγμα ελέγχου για την πιστοποίηση της καλής διαχωριστικής ικανότητας μεταξύ πυρηνικού και κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος. Στην εικόνα 52 φαίνεται λοιπόν ότι ο διαχωρισμός γίνεται σε αρκετά ικανοποιητικό επίπεδο αφού η HNF₄ εντοπίζεται στο πυρηνικό διαμέρισμα και μόνο ίχνη της στο κυτταροπλασματικό. Συγκεκριμένα με τη βοήθεια του προγράμματος Tinascan 2.0 μετρήθηκαν οι ζώνες που εμφανίζονται στη περίπτωση του HNF₄ και εξισορροπήθηκαν βάσει των ποσοτήτων που φορτώθηκαν (72 μg για το πυρηνικό εκχύλισμα και 43 μg για το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα της HNF₄). Φάνηκε λοιπόν ότι υπήρχε μια διαρροή περίπου 20% από τον πυρήνα προς το κυτταρόπλασμα. Βάσει αυτής της εξισορρόπησης και των ποσοτήτων από τα εκχυλίσματα που φορτώθηκαν για την SCP1 (56 μg για το πυρηνικό εκχύλισμα και 42 μg για το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα της SCP1) βρέθηκε ότι το 52% της SCP1 εντοπίζεται στον πυρήνα και το 48% στο κυτταρόπλασμα. Έτσι λοιπόν η myc-SCP1 εντοπίζεται εξίσου στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα συμφωνώντας με τα αποτελέσματα του ανοσοφθορισμού.



Εικόνα 52. Ο πυρηνικός/κυτταροπλασματικός διαχωρισμός των κυττάρων και ο εντοπισμός της υπερεκφρασμένης SCP1 και στα δύο διαμερίσματα. Αριστερά η myc-SCP1 εντοπίζεται τόσο στον πυρήνα (N) όσο και στο κυτταρόπλασμα (C). Δεξιά η HNF₄ εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα (N) όπως αναμενόταν και μόνο ίχνη της στο κυτταρόπλασμα (C).

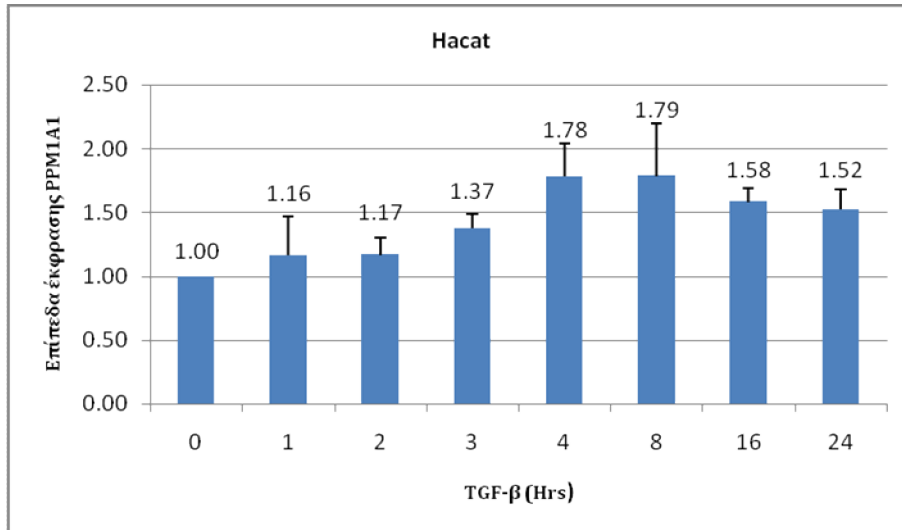
Τα παραπάνω δείχνουν ότι η SCP1 όταν υπερεκφράζεται επιδρά πάνω στις Smads τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Παρόλο που η αποφωσφορυλίωση του linker των Smads μπορεί να συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα επηρεάζοντας τη σηματοδότηση από τα Smads, εμείς είδαμε ότι η πτώση που προκαλεί στην μεταγραφική ενεργοποίηση πολύ πιθανόν να οφείλεται σε γεγονότα που συμβαίνουν στον πυρήνα. Από την άλλη ο φυσιολογικός τρόπος της δράσης της SCP1 είναι ο πυρήνας αφού εκεί έχει εντοπιστεί ενδογενώς. Επομένως είναι πιθανότερο ότι εκεί αποφωσφορυλιώνει το linker των Smads και καταστέλλει τη μεταγραφική τους ικανότητα.

I. Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TGF- β ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΩΝ SCP1, SCP2, SCP3 ΚΑΙ PPM1A

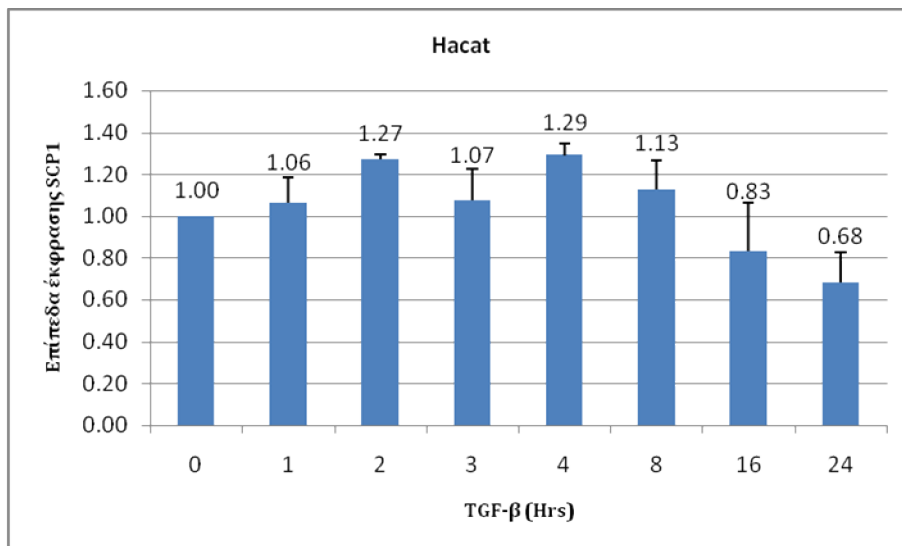
Το τελευταίο ερώτημα που επιχειρήθηκε να απαντηθεί στην παρούσα εργασία είναι εάν ο TGF- β επηρεάζει τη μεταγραφή των γονιδίων της SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A. Για το πείραμα αυτό αναπτύχθηκαν καλλιέργειες με HaCaT σε 8 πιάτα ρ60. Σε κάθε πιάτο έγινε μία φορά προσθήκη TGF- β (5 ng/ml) σε διαφορετικό χρονικό διάστημα (1, 2, 3, 4, 8, 16, 24 ώρες πριν τη λύση των κυττάρων) ενώ υπήρχε και πιάτο στο οποίο δεν έγινε προσθήκη TGF- β (0 ώρες). Στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν, απομονώθηκε το RNA και από αυτό παρασκευάστηκε cDNA όπως αναφέρεται στην ενότητα A11 στα Υλικά και Μέθοδοι. Με τη χρήση εκκινήτων για τα SCP1, SCP2, SCP3 και PPM1A και με μητρικό DNA το cDNA που προήλθε από τα παραπάνω κύτταρα μπορέσαμε να συγκρίνουμε με PCR τα επίπεδα του mRNA για κάθε γονίδιο σε σχέση με το χρόνο επώασης με TGF- β (τα αποτελέσματα είναι μέσος όρος τουλάχιστον δύο επαναλήψεων της PCR). Οι διαφορές στα επίπεδα του cDNA ανάμεσα στα δείγματα που δεν οφείλονται στον TGF- β κανονικοποιήθηκαν βάσει της

PCR του GAPDH. Με το πρόγραμμα Tinascan 2.0 μετρήθηκαν οι διαφορές στις ζώνες της PCR για τα διάφορα δείγματα ώστε να φτιαχτούν τα διαγράμματα. Έτσι μπορούμε να συγκρίνουμε κατά πόσο αλλάζει η μεταγραφή των γονιδίων αυτών παρουσία ή απουσία του TGF- β αλλά και να συσχετίσουμε την διάρκεια αυτής της αλλαγής με τη διάρκεια του σήματος από τον TGF- β . Τα επίπεδα της μεταγραφής του PPM1A γονιδίου παρουσιάζουν μία πολύ μικρή αύξηση όταν το σήμα του TGF- β διαρκεί 1-3 ώρες, παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αύξηση στις 4 και 8 ώρες (~1.8 φορές) και στις 16 και 24 ώρες είναι αυξημένα κατά ~1.55 φορές (Εικόνα 53). Γενικότερα η αύξηση στη μεταγραφή του PPM1A μπορεί να υποδηλώνει ένα αναδραστικό μηχανισμό αναστολής από τη σηματοδότηση του TGF- β . Το γονίδιο της SCP1 παρουσιάζει μία ελάχιστη αύξηση στα χρονικά διαστήματα 1-8 ώρες του TGF- β ενώ μειώνεται κάτω από τα βασικά επίπεδα στα χρονικά διαστήματα των 18 και 24 ωρών (Εικόνα 54). Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η SCP1 δρα σε πολύ μικρές ποσότητες στη ρύθμιση της σηματοδότησης από τον TGF- β . Για το γονίδιο της SCP2 ισχύει ότι γενικότερα παρουσιάζει αύξηση στη μεταγραφή του παρουσία του TGF- β όμως και αυτή είναι πολύ μικρή (Εικόνα 55) με τη μέγιστη να είναι 1.42 φορές πάνω από το δείγμα ελέγχου. Τέλος και το γονίδιο της SCP3 παρουσιάζει αύξηση (Εικόνα 56) με τις μεγαλύτερες διαφορές να παρατηρούνται στις 2 και 4 ώρες επώασης με TGF- β .

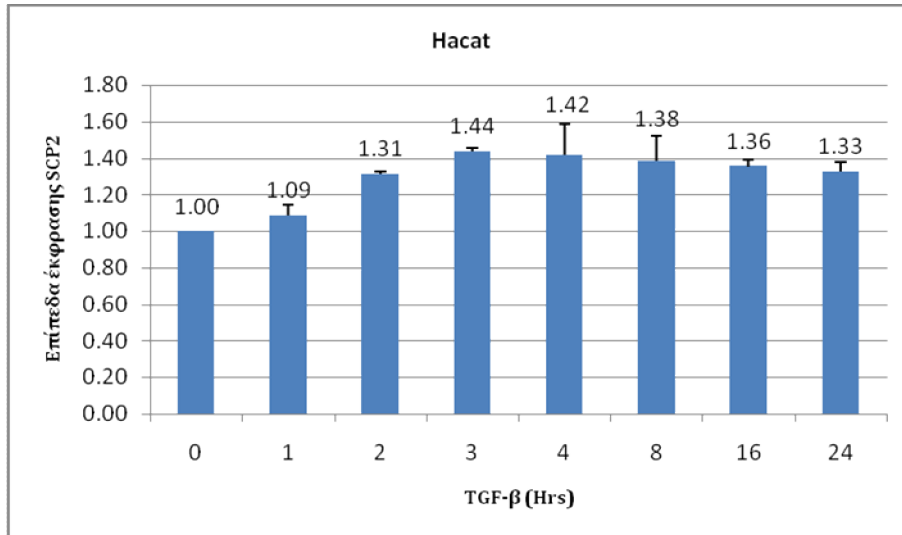
Το συμπέρασμα είναι ότι η σηματοδότηση του TGF- β αλλάζει τη μεταγραφή των γονιδίων της SCP1, SCP2, SCP2 και PPM1A, με τάσεις για μικρή αύξηση. Επειδή η αύξηση είναι πολύ μικρή είναι αμφίβολο ότι τα γονίδια ρυθμίζονται από τον TGF- β . Από την άλλη ίσως αρκεί πολύ μικρή ποσότητα για να δράσουν αποτελεσματικά στη σηματοδότηση του TGF- β .



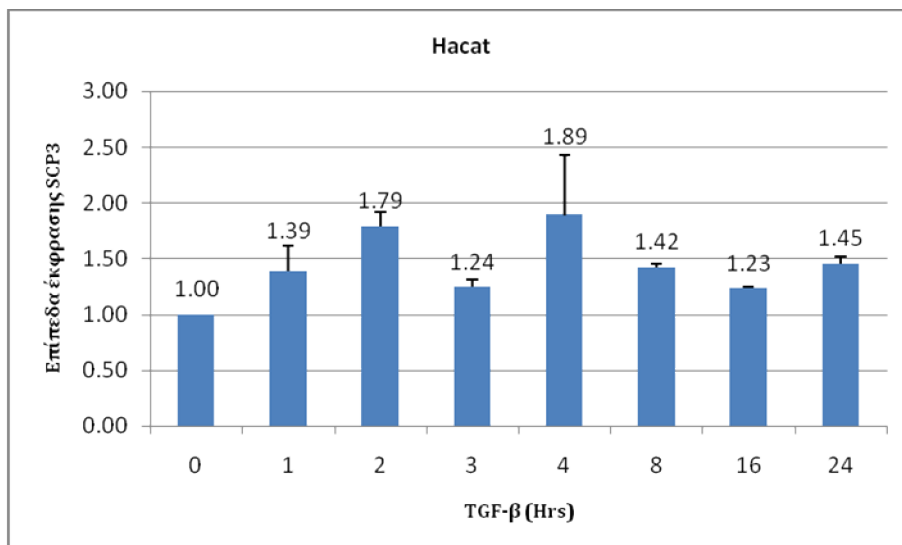
Εικόνα 53. Τα επίπεδα του cDNA της PPM1A σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β.



Εικόνα 54. Τα επίπεδα του cDNA της SCP1 σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β.

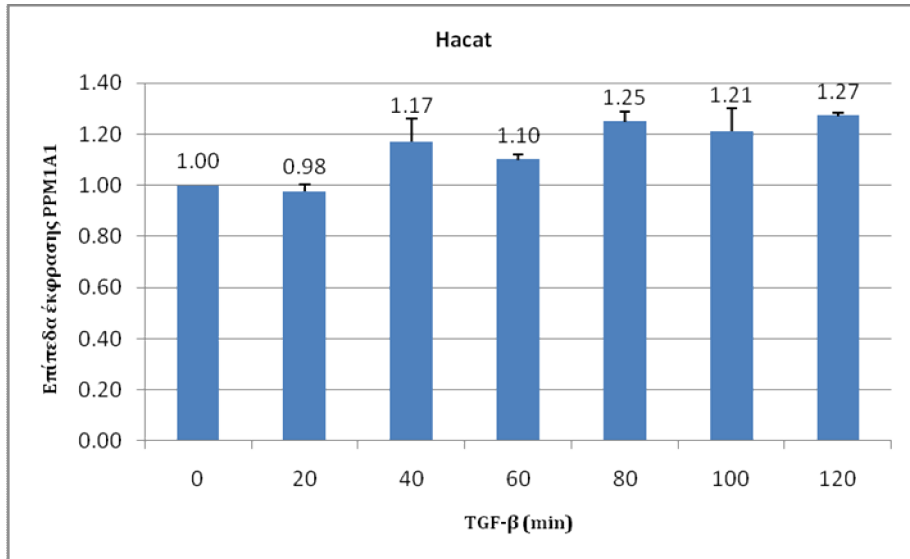


Εικόνα 55. Τα επίπεδα του cDNA της SCP2 σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β.

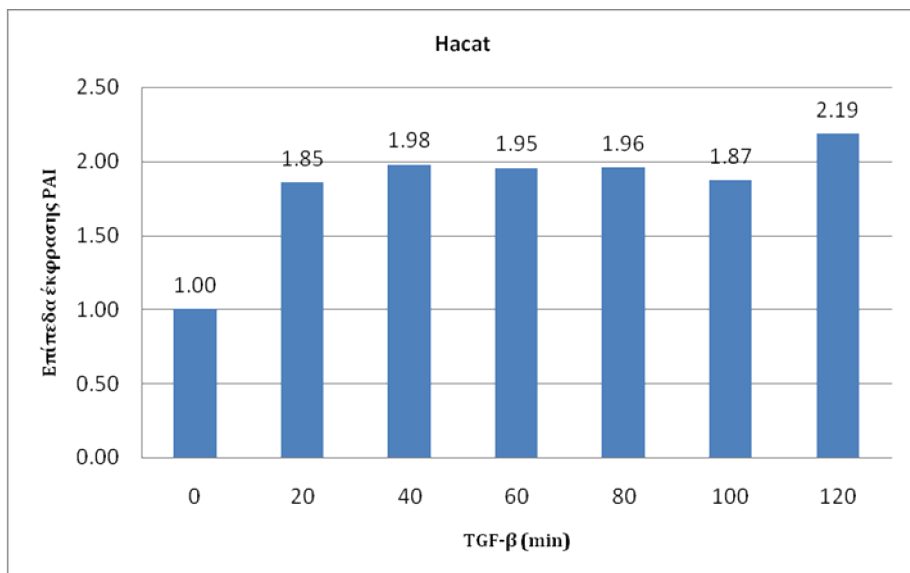


Εικόνα 56. Τα επίπεδα του cDNA της SCP3 σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β.

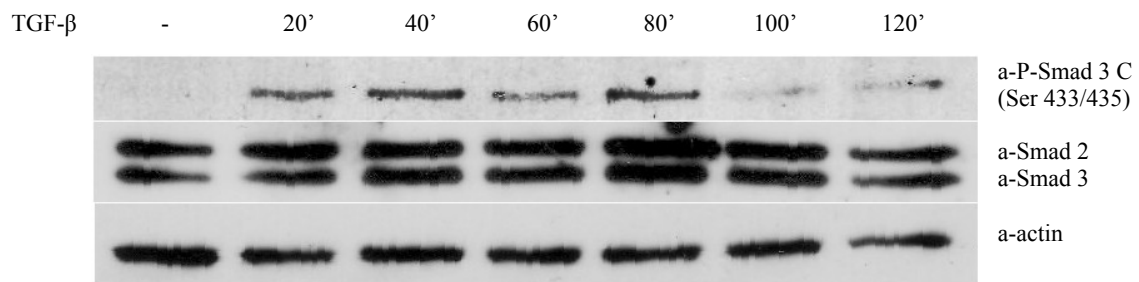
Στη συνέχεια μας ενδιαφέρει να δούμε τη χρονική στιγμή που δρα η PPM1A όταν τα κύτταρα υποβάλλονται σε ερέθισμα με TGF-β και παράλληλα να τη συσχετίσουμε με τα επίπεδα έκφρασης της. Γι' αυτό το πείραμα απομονώθηκε RNA από HaCaT σε χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β των 20', 40', 60', 80', 100' και 120' (0 για το δείγμα χωρίς TGF-β), παρασκευάστηκε cDNA και με τους εκκινήτες της PPM1A μετρήσαμε τα μεταγραφικά της επίπεδα. Στην εικόνα 57 φαίνεται μία ελαφριά αύξηση στη μεταγραφή της PPM1A στα μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β. Παράλληλα στα ίδια δείγματα μετρήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα του PAI που είναι γνωστό ότι αυξάνονται από τον TGF-β (Εικόνα 58). Αυτό αποτελεί και δείγμα ελέγχου για την ομαλή λειτουργία του σηματοδοτικού μονοπατιού. Τέλος, απομονώθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα από HaCaT στις ίδιες συνθήκες επώασης με TGF-β για τα χρονικά διαστήματα 0-120'. Από αυτά πραγματοποιήθηκε western blot για την ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης Smad3 στο SXS ώστε να συγκριθεί με τα επίπεδα της PPM1A. Όπως φαίνεται στην εικόνα 59 όταν απουσιάζει ο TGF-β δεν υπάρχει φωσφορυλιωμένη Smad3 στο SXS. Από τα 20' έως και τα 80' επώασης με TGF-β η Smad3 είναι φωσφορυλιωμένη. Στα 100' και 120' η φωσφορυλίωση πέφτει. Συγκριτικά με τα μεταγραφικά επίπεδα της PPM1A της εικόνας 57 αυτά είναι αυξημένα μετά τα 80'. Αυτό σημαίνει ότι από εκεί και πέρα αρχίζει και δρα η PPM1A σε ικανοποιητικό βαθμό για την αποφωσφορυλίωση του SXS και την καταστολή της σηματοδότησης από τα Smads.



Εικόνα 57. Τα επίπεδα του cDNA της PPM1A σε χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β από 20΄ έως 120΄.



Εικόνα 58. Τα επίπεδα του cDNA της PAI σε χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β από 20΄ έως 120΄.



Εικόνα 59. Τα ενδογενή επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Smad3 στο SXS σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα επώασης με TGF-β. Απουσία του TGF-β δεν υφίσταται φωσφορυλίωση στο SXS. Η Smad3 ενεργοποιείται με τη προσθήκη TGF-β και η φωσφορυλίωσή της πέφτει μετά τα 80' πιθανόν λόγω της δράσης της PPM1A. Η ανίχνευση του φωσφορυλιωμένου SXS έγινε με αντισώματα a-P-Smad3 C (Ser 433/435), της ολικής Smad3 με a-Smad3 (πιάνει και τη Smad2) και της ακτίνης με a-actin.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β ρυθμίζει βασικές λειτουργίες στα κύτταρα των μεταζώων όπως το διπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση και τη μετανάστευση τους. Γι' αυτό το λόγο συμμετέχει σε σημαντικές βιολογικές διαδικασίες όπως η οργανογένεση των εμβρύων και η ομοιόσταση των ενήλικων οργανισμών. Η απορύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β μπορεί να προκαλέσει σοβαρά αναπτυξιακά προβλήματα στα έμβρυα, ακόμη και θάνατο. Επίσης στους ενήλικους ιστούς έχει συσχετιστεί με πάρα πολλά είδη καρκίνου όπως του παγκρέατος, του παχέως εντέρου και του πνεύμονα. Επομένως η μελέτη και η κατανόηση της λειτουργίας του TGF-β στον άνθρωπο είναι υψίστης σημασίας. Πρώτον διότι θα βοηθήσει στην κατανόηση πολλών μηχανισμών και διαδικασιών που διέπουν την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Δεύτερον διότι θα κατανοήσουμε την ευρύτερη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού και την ικανότητά του να αυτορυθμίζεται ως ενιαίο σύνολο πολλών δομών και διαδικασιών. Τρίτον διότι το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β αποτελεί ένα σημαντικό φαρμακευτικό στόχο για την καταπολέμηση μίας από τις δυσκολότερες ασθένειες της εποχής μας, τον καρκίνο. Συμπερασματικά, η κατανόηση του ρόλου του TGF-β βοηθά να γνωρίσουμε καλύτερα τον εαυτό μας και να αντιμετωπίσουμε τις ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται.

Αν και ο TGF-β δίνει το παρόν σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, το σηματοδοτικό μονοπάτι του είναι σχετικά απλό. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης από τον TGF-β οι οποίοι φωσφορυλιώνουν τους ενδοκυττάριους διαμεσολαβητές R-Smads στο μοτίβο SXS. Οι R-Smads με τη Smad4 σχηματίζουν ολιγομερή και μεταβαίνουν στον πυρήνα για να ρυθμίσουν την μεταγραφή γονιδίων. Η ποικιλία των κυτταρικών αποκρίσεων του μονοπατιού κρύβεται στην πολυπλοκότητα της ρύθμισης και της λειτουργίας των Smads καθώς και στην ευελιξία που παρουσιάζουν στην ρύθμιση των γονιδίων. Όλα αυτά εξαρτώνται από την κατάσταση του κυττάρου, τη συγκέντρωση του TGF-β και το χρονικό διάστημα που διαρκεί το ερέθισμά του.

Πέρα από τη φωσφορυλίωση στο μοτίβο SXS από τους υποδοχείς, υπάρχουν και άλλες μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις φωσφορυλίωσης των R-Smads που περιλαμβάνουν μία σειρά καταλοίπων στη περιοχή του linker και του MH1. Αν και η φωσφορυλίωση του SXS αναμφίβολα έχει το βασικότερο ρόλο στην λειτουργία των R-Smads, τα τελευταία χρόνια ο linker αναδεικνύεται σε σημαντικό ρυθμιστή της σηματοδότησης του TGF-β. Η φωσφορυλίωση του linker από MAPKs και CDKs

αποτελεί σημείο αναφοράς για την σύγκλιση της σηματοδότησης του TGF- β με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως των EGF/FGF/Ras. Το αποτέλεσμα αυτής της σύγκλισης καθώς και η γενικότερη επίδραση που έχει η φωσφορυλίωση του linker στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF- β παραμένει αμφιλεγόμενο. Υπάρχουν έρευνες που συνδέουν την φωσφορυλίωση του linker με τον αποκλεισμό των R-Smads από τον πυρήνα του κυττάρου και την ακόλουθη διακοπή της σηματοδότησης του TGF- β (Calonge and Massague, 1999; Kretschmar *et al.*, 1997,1999; Wicks *et al.*, 2000; Grimm and Gurdon, 2002; Matsuura *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Fuentealba *et al.*, 2007). Το μοντέλο των Sapkota *et al* (2007) εξηγεί σε μεγάλο βαθμό αυτά τα αποτελέσματα. Αντίθετα, σε άλλες έρευνες η φωσφορυλίωση του linker προάγει τον ολιγομερισμό των R-Smads/Smad4, την πυρηνική τους μετατόπιση και την αλληλεπίδρασή τους με συνενεργοποιητές όπως ο CBP, έχοντας συνολικά ενισχυτικό ρόλο στη σηματοδότηση του TGF- β (Brown *et al.*, 1999; de Caestecker *et al.*, 1998; Funaba *et al.*, 2002; Hayashida *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2004; Kamaraju and Roberts, 2005). Οι διαφορές αυτές δεν έχουν εξηγηθεί ακόμη και μπορεί να οφείλονται σε πολλούς παράγοντες. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι οι διαφορετικές πειραματικές προσεγγίσεις που όμως κρύβουν βαθύτερο βιολογικό νόημα. Αυτό είναι ότι το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης του linker εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, την κατάσταση του κυττάρου ή το γονίδιο-στόχο. Έτσι για παράδειγμα υπάρχουν περιπτώσεις που ο TGF- β δρα ανταγωνιστικά με τους EGF/FGF αλλά και περιπτώσεις που δρα συνεργατικά.

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της αποφωσφορυλίωσης του linker των Smad2/3 στη σηματοδότηση του TGF- β . Γι' αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν οι φωσφατάσες SCP1, SCP2 και SCP3 που έχει δειχθεί ότι έχουν την ικανότητα να αποφωσφορυλιώνουν την περιοχή του linker των R-Smads (Sapkota *et al.*, 2006; Wrighton *et al.*, 2006). Επίσης, ελέγχτηκε αν η PPM1A φωσφατάση του μοτίβου SXS των R-Smads παρουσιάζει τέτοια δράση. Αρχικά λοιπόν οι παραπάνω φωσφατάσες εισήχθηκαν σε φορείς έκφρασης και ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων για να διαπιστωθεί η ικανότητά τους να αποφωσφορυλιώνουν τον linker στα κατάλοιπα Ser245/250/255 και το μοτίβο SXS των Smad2/3. Στη συνέχεια είδαμε την επίδρασή της SCP1 σε διαδικασίες του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β όπως το διμερισμό της Smad3 με τη Smad4 και την πρόσδεση της Smad3 στο DNA. Η πιο εκτεταμένη έρευνα έγινε στην επίδραση της αποφωσφορυλίωσης του linker από τις SCPs στην μεταγραφική ενεργοποίηση των Smad2/3. Συγκεκριμένα

χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί p(CAGA)₁₂-E1B-luc με TGF-β ή Smad2ΔE3 ή Smad3 και pG₅-E1B-luc με GAL4-Smad2 ή GAL4Smad3. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε η φωσφορυλίωση του linker από τις JNK και Erk με western blot και πειράματα συνενεργοποίησης. Τέλος μελετήθηκε η επίδραση του TGF-β στην μεταγραφή των SCPs και της PPM1A.

Η μελέτη των SCPs ως φωσφατάσες των Smad2/3 είχε κάποια πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Πρώτα από όλα επιβεβαιώθηκε ότι οι SCPs είναι φωσφατάσες του linker των Smad2/3 στα κατάλοιπα Ser245/250/255. Αντίθετα η PPM1A δεν παρουσίασε τέτοια δράση. Στη συνέχεια διερευνήθηκε η ικανότητα της SCP1 να αποφωσφορυλιώνει το μοτίβο SXS της Smad2 των Smad2/3. Το αποτέλεσμα παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον καθώς η SCP1 αποφωσφορυλιώνει το SXS σε επίπεδα ισάξια αν όχι καλύτερα της PPM1A. Από άλλη μελέτη έχειδειχθεί ότι η SCP1 αποφωσφορυλιώνει το SXS της Smad1 (Knockaert *et al.*, 2006) όμως είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται το ίδιο για τις Smad2/3. Μάλιστα στις μελέτες των Sarkota *et al* (2006) και Wrighton *et al* (2006) δεν παρατηρήθηκε αυτό το φαινόμενο. Αυτό λοιπόν αποτελεί ένδειξη ότι οι SCPs έχουν πιο διευρυμένο ρόλο στην λειτουργία των R-Smads ρυθμίζοντας την αποφωσφορυλίωση τόσο του linker όσο και του μοτίβου SXS. Επίσης δείξαμε μια ποσοτική συσχέτιση των SCPs στην ικανότητά τους να αποφωσφορυλιώνουν τον linker της Smad2. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι σε όσο μεγαλύτερη ποσότητα υπάρχουν στο κύτταρο, τόσο πιο αποτελεσματικά αποφωσφορυλιώνουν τον linker της Smad2. Τα συμπεράσματα από αυτό το πείραμα είναι πρώτον ότι οι SCPs δρουν σε πολύ μικρές ποσότητες για την αποφωσφορυλίωση του linker και δεύτερον ότι το κύτταρο ίσως έχει τη δυνατότητα να ρυθμίζει την αποφωσφορυλίωση του linker περιορίζοντας ή αυξάνοντας την ποσότητα των SCPs. Θα είχε ιδιαίτερη σημασία για το κύτταρο αν οι SCPs παρουσίαζαν διαφορές στην προτίμησή τους να αποφωσφορυλιώνουν συγκεκριμένα κατάλοιπα στον linker. Για παράδειγμα θα μπορούσε η SCP1 να προτιμά τις Ser245/250 και η SCP2 τις Ser250/255, αν και σε μεγάλες ποσότητες δεν θα έκαναν αυτή τη διάκριση και θα αποφωσφορυλιώναν όλα τα κατάλοιπα. Αυτό θα δημιουργούσε προϋποθέσεις για την δημιουργία ενός ευέλικτου φωσφορυλιωμένου προτύπου του linker που θα πρόσφερε ποικιλία στις αλληλεπιδράσεις των R-Smads με άλλες πρωτεΐνες και γενικότερα στην δράση τους μέσα στο κύτταρο. Παράλληλα, ο βαθμός της αποφωσφορυλίωσης του SXS από την SCP1 επίσης εξαρτάται από την ποσότητά της μέσα στο κύτταρο και μάλιστα όσο περισσότερη είναι τόσο πιο πολύ

αποφωσφορυλιώνεται το SXS. Η διαφορά όμως είναι ότι χρειάζονται πολύ μεγαλύτερες ποσότητες της SCP1 για να αποφωσφορυλιώσει το SXS σε σχέση με τον linker. Αυτό δείχνει ότι το πρωταρχικό της υπόστρωμα είναι ο linker της Smad2 και σε δεύτερη φάση το μοτίβο SXS. Ίσως μάλιστα ο αποφωσφορυλιωμένος linker να αποτελεί προϋπόθεση για την αποφωσφορυλίωση του SXS από την SCP1. Παραμένει το ερώτημα εάν η αποφωσφορυλίωση του SXS των Smad2/3 γίνεται άμεσα από την SCP1 ή έμμεσα. Η SCP1 μπορεί να προσδένεται άμεσα στην Smad1 και να αποφωσφορυλιώνει το SXS (Knockaert *et al.*, 2006) και επίσης αλληλεπιδρά με τις Smad2/3 ερχόμενη σε φυσική επαφή μαζί τους (Wrighton *et al.*, 2006). Αυτό δείχνει ότι το SXS θα μπορούσε να αποτελεί άμεσο υπόστρωμα για την SCP1. Δεν αποκλείεται όμως η αποφωσφορυλίωση του linker να δημιουργεί τις κατάλληλες προϋποθέσεις για την δράση της PPM1A. Επίσης ίσως η αποφωσφορυλίωση του linker να εμποδίζει την αλληλεπίδραση των R-Smads με τους υποδοχείς του TGF-β. Τέλος ένας άλλος τρόπος έμμεσης αποφωσφορυλίωσης του SXS θα μπορούσε να περιλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση του TβRI από την SCP1 και κατ' επέκταση την αδυναμία του να φωσφορυλιώσει το μοτίβο SXS. Πάντως ένα σύστημα ταυτόχρονης δράσης των SCPs και της PPM1A στις R-Smads θα αποτελούσε ένα πολύ καλό τρόπο ελέγχου της έντασης και της δράσης του σήματος του TGF-β.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι ο linker των R-Smads φωσφορυλιώνεται από MAPKs και CDKs χρησιμοποιήθηκαν οι συνθετικοί αναστολείς της MEK και της JNK, U0126 και SP600125 αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκε και ο p21 που είναι φυσικός αναστολέας των CDK2/4. Στόχος του πειράματος είναι να αποτρέψουμε τη φωσφορυλίωση του linker της Smad2 παρουσία των αναστολέων. Πράγματι ο U0126 μείωσε σημαντικά τη φωσφορυλίωση του linker και ο SP600125 ακόμη περισσότερο. Ο συνδυασμός τους επίσης σχεδόν εξαφάνισε τη φωσφορυλίωση στο linker. Αυτό σημαίνει ότι όντως το μονοπάτι των MAPKs ευθύνεται για την φωσφορυλίωση του linker των R-Smads. Από την άλλη ο p21 δεν επηρέασε καθόλου τη φωσφορυλίωση του linker της Smad2. Ενώ έχει αποδειχθεί ότι οι CDK2/4 φωσφορυλιώνουν τον linker της Smad3, δεν υπάρχουν *in vivo* δεδομένα που να δείχνουν το ίδιο για τον linker της Smad2 (Matsuura *et al.*, 2004). Στην δική μας διάταξη δεν καταφέραμε να αποδείξουμε ότι η φωσφορυλίωση του linker μπορεί να προέρχεται από CDKs, δεν αποκλείεται όμως η συνεισφορά τους να είναι πολύ μικρή ή να συμβαίνει σε ειδικές καταστάσεις μέσα στο κύτταρο ή να φωσφορυλιώνουν άλλα κατάλοιπα του linker όπως τη Thr220.

Ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε στα παραπάνω πειράματα ήταν η μερική πτώση των επιπέδων της συνολικής Smad2 στις περιπτώσεις που ο linker ήταν ολοκληρωτικά αποφωσφορυλιωμένος. Αυτό υποδηλώνει ότι η αποφωσφορυλίωση του linker θα μπορούσε να οδηγεί τις R-Smads προς αποικοδόμηση. Χρησιμοποιώντας ένα συνθετικό αναστολέα του 26S πρωτεασώματος (MG-132) δεν καταφέραμε να αποτρέψουμε την αποικοδόμηση της Smad2. Αυτό σημαίνει είτε ότι η πειραματική μας προσέγγιση δεν ήταν ικανή να διακόψει τη δράση του πρωτεασώματος, είτε ότι υπάρχει εναλλακτικός τρόπος καταστροφής της SCP1 είτε ότι επηρεάζονται τα μεταγραφικά επίπεδα της Smad2. Πάντως σε περίπτωση που η αποφωσφορυλίωση του linker συνοδεύεται από την αποφωσφορυλίωση του SXS τότε θα ήταν λογικό η Smad2 πέρα από την ανακύκλωσή της, να αποικοδομείται σε κάποιο βαθμό.

Για τη περαιτέρω μελέτη της επίδρασης που έχει η SCP1 στη σηματοδότηση του TGF- β πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με το σύστημα της βιοτινυλίωσης με BirA. Συγκεκριμένα διερευνήθηκε κατά πόσο αλληλεπιδρά η Smad3 με τη Smad4 παρουσία της SCP1. Αρχικά παρατηρήθηκε μία βασική ικανότητα αλληλεπίδρασής τους η οποία αυξήθηκε κατακόρυφα από την φωσφορυλίωση του SXS από τον CA-ALK5. Η SCP1 υποβάθμισε το διμερισμό των Smad3/4 και τον επανέφερε στα επίπεδα που υπήρχαν χωρίς την παρουσία του CA-ALK5. Επομένως η SCP1 εμποδίζει την αλληλεπίδραση των Smad3/4. Παρόλο που θα μπορούσε να ευθύνεται αποκλειστικά η αποφωσφορυλίωση του linker της Smad3 από την SCP1, ίσως να υπάρχει και αποφωσφορυλίωση στο SXS. Δεν φαίνεται όμως να τίθεται τέτοιο θέμα αφού τα δείγματα στα inputs δείχνουν ότι η SCP1 δεν είναι σε ικανή ποσότητα για να αποφωσφορυλιώσει το SXS της Smad3. Επομένως είναι πολύ πιθανό να ευθύνεται μόνο ο αποφωσφορυλιωμένος linker για αυτή την υποβάθμιση του διμερισμού των Smad3/4.

Μία άλλη διαδικασία στη οποία θα μπορούσε να εμπλέκεται η SCP1 είναι στην πρόσδεση των R-Smads στο DNA. Γι' αυτό διερευνήθηκε με DNAP η ικανότητα της Smad3 να προσδέεται στο τεχνητό ολιγονουκλεοτίδιο (CAGA)₄. Καταρχήν, η Smad3 έδειξε την ίδια ικανότητα πρόσδεσης είτε ήταν μόνη της είτε με τη Smad4. Η SCP1 δεν είχε καμία επίδραση στην ικανότητα της πρόσδεσης της Smad3 στο DNA. Επομένως η αποφωσφορυλίωση του linker δεν φαίνεται ούτε να εμποδίζει αλλά ούτε και να βοηθά την πρόσδεση των R-Smads στο DNA.

Η μεγαλύτερη ενότητα των πειραμάτων της παρούσας εργασία αφορά την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς από τις Smad2/3 παρουσία των SCPs. Για τα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε μια διαβάθμιση στην ποσότητα των SCPs που όμως δεν ξεπερνούσε τα επίπεδα στα οποία αποφωσφορυλιώνεται το μοτίβο SXS. Αυτό έγινε ώστε τα αποτελέσματα των πειραμάτων να οφείλονται όσο το δυνατόν περισσότερο στην αποφωσφορυλίωση του linker των R-Smads. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του p(CAGA)₁₂-E1B-luc από τον TGF-β όσο και από τις υπερεκφρασμένες Smad2ΔE3 και Smad3 υποβαθμίστηκε σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία των SCPs και όπως ήταν αναμενόμενο και από την PPM1A. Όσο μεγαλύτερη ήταν η ποσότητα των SCPs τόσο πιο μειωμένη εμφανίζονταν η μεταγραφική ενεργότητα του γονιδίου αναφοράς. Επομένως η αποφωσφορυλίωση του linker έχει αρνητική επίδραση στην ικανότητα των R-Smads να επάγουν τη μεταγραφή.

Στην περίπτωση της ενεργοποίησης από τον TGF-β η SCP1 είναι πιο δραστική από τις SCP2 και SCP3, ρίχνοντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από τις άλλες δύο. Αυτό υποδηλώνει ότι η SCP1 θα μπορούσε γενικά ή υπό συνθήκες να παίζει το βασικό ρόλο στη παρεμπόδιση των Smads να μεταγράφουν γονίδια ενώ οι SCP2/3 να παρουσιάζουν συμπληρωματικό ή εφεδρικό ρόλο. Από την άλλη όμως στην περίπτωση της υπερεκφρασμένης Smad2ΔE3 όλες οι SCP μειώνουν το ίδιο αποτελεσματικά την μεταγραφική ενεργοποίηση. Αυτό ίσως να οφείλεται στην παρουσία περίσσειας υποστρώματος στο οποίο μπορούν να δράσουν. Στην περίπτωση της υπερεκφρασμένης Smad3 η SCP3 μειώνει την μεταγραφική ενεργοποίηση στα ίδια επίπεδα με την SCP1 ενώ η SCP2 το καταφέρνει σε πολύ μικρότερο βαθμό. Εδώ διαφαίνεται ότι η SCP2 σε αντίθεση με τις SCP1/3 αποφωσφορυλιώνει τον linker της Smad3 σε πρότυπο που επηρεάζει λιγότερο την μεταγραφική ενεργοποίηση.

Η μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης των Smads από τις SCPs μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες. Καταρχήν, αυτή η μείωση θα ταίριαζε σε μια φωσφατάση του SXS. Τέτοιου είδους δράση παρατηρήσαμε για την SCP1 στις υψηλές συγκεντρώσεις της στο κύτταρο. Στην περίπτωση αυτή η άμεση ή έμμεση αποφωσφορυλίωση του SXS από τις SCPs αποτρέπει την εισαγωγή των R-Smads στο πυρήνα, εμποδίζει τον ολιγομερισμό με την Smad4 και αποκλείει τη δημιουργία μεταγραφικών συμπλόκων. Από την άλλη μεριά όμως οι ποσότητες των SCPs που διαμολύνθηκαν ήταν πολύ μικρές για να υφίσταται αποφωσφορυλίωση στο SXS.

Μόνο ίσως στη μεγαλύτερη ποσότητα διαμόλυνσης των SCPs (0.5 μ g) δεν θα έπρεπε να αποκλείσουμε την περίπτωση της μερικής αποφωσφορυλίωσης του SXS (σύμφωνα με τα western των πειραμάτων αποφωσφορυλίωσης). Ακόμη και στην περίπτωση λοιπόν που η μείωση στη μεταγραφική ενεργοποίηση οφείλεται αποκλειστικά στην αποφωσφορυλίωση του linker, πάλι οι R-Smads μπορεί να αδυνατούν να μπουν στον πυρήνα ή να ολιγομερίζονται με τη Smad4. Επίσης η αποφωσφορυλίωση του linker ίσως εμποδίζει τη συστράτευση μεταγραφικών παραγόντων στο μεταγραφικό σύμπλοκο των R-Smads ή ευνοεί τη δημιουργία συμπλόκων καταστολής της μεταγραφής. Τα παραπάνω αποτελέσματα διαφωνούν με τις έρευνες που δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση του linker έχει ανασταλτικό ρόλο στην σηματοδότηση του TGF- β (Calonge and Massague, 1999; Kretzschmar *et al.*, 1997,1999; Wicks *et al.*, 2000; Grimm and Gurdon, 2002; Matsuura *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Fuentealba *et al.*, 2007; Sapkota *et al.*, 2007) αλλά συμφωνούν με τις έρευνες που δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση του linker είναι απαραίτητη για την επαγωγή της μεταγραφής από τις Smads (Brown *et al.*, 1999; de Caestecker *et al.*, 1998; Funaba *et al.*, 2002; Hayashida *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2004; Kamaraju and Roberts, 2005).

Η χρήση του συστήματος pG₅-E1B-luc και GAL4-Smads μας επιτρέπει να περιορίσουμε τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η μείωση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τις SCPs. Αυτό διότι η GAL4 περιέχει ισχυρό NLS για τη μεταφορά της στον πυρήνα των κυττάρων και στοιχείο πρόσδεσης στο pG₅-E1B-luc χωρίς να εξαρτάται από τις Smads. Επομένως το μόνο πράγμα που μπορεί να επηρεάσει η αποφωσφορυλίωση του linker των Smad2/3 είναι η δημιουργία ενεργών μεταγραφικών συμπλόκων. Πράγματι και εδώ οι SCPs μείωσαν τη μεταγραφική ενεργοποίηση από τις GAL4-Smad2/3 με το ίδιο πρότυπο των προηγούμενων πειραμάτων μεταγραφικής συνενεργοποίησης. Οπότε αυτό οφείλεται καθαρά ε αδυναμία σχηματισμού ενός ενεργού μεταγραφικού συμπλόκου των Smads με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές όπως οι p300/CBP ή P/CAF. Αυτό βέβαια δε σημαίνει ότι αποκλείεται το ενδεχόμενο οι αποφωσφορυλιωμένες στον linker Smad2/3 να μην εισάγονται στον πυρήνα ή να μην σχηματίζουν ολιγομερή με τη Smad4, αλλά είναι φανερό ότι ο φωσφορυλιωμένος linker μπορεί να παίζει καθοριστικό ρόλο στην δημιουργία των μεταγραφικών συμπλόκων των R-Smads.

Η προσθήκη των αναστολέων U0126 και SP600125 που εμποδίζουν την φωσφορυλίωση του linker είχαν ακριβώς το ίδιο αποτέλεσμα με τις SCPs στην ενεργοποίηση της μεταγραφής από τις Smads. Το γεγονός μάλιστα ότι μειώνουν τη μεταγραφική ενεργοποίηση στα HepG2 πολύ περισσότερο από ότι στα HEK293T συνδυάζεται με το ότι η αποφωσφορυλίωση του linker είναι πολύ μεγαλύτερη στα HepG2.

Στα παραπάνω πειράματα συνενεργοποίησης πρέπει να λάβουμε υπόψη τις έρευνες που δείχνουν ότι οι SCP1 και SCP2 αποφωσφορυλιώνουν το CTD της RNAPII και καταστέλλουν τη μεταγραφή (Yeo *et al.*, 2003, 2005; Thompson *et al.*, 2006). Ήταν λοιπόν σημαντικό να διευκρινιστεί αν η μείωση τη μεταγραφικής ενεργοποίησης που βλέπουμε είναι ειδική για τα Smads ή οφείλεται στην γενική επίδραση των SCPs στη μεταγραφική μηχανή. Για τη διερεύνηση αυτού του θέματος χρησιμοποιήθηκαν οι reporter p(CAGA)₁₂-luc, RhoA-luc και ABCA1-N1500-luc παρουσία μόνο της υπερέκφρασμένης SCP1. Ενώ στην περίπτωση των RhoA-luc και ABCA1-N1500-luc η SCP1 έριξε τη μεταγραφική ενεργοποίηση κάτω από τα βασικά επίπεδα, στην περίπτωση του p(CAGA)₁₂-luc είχαμε ελαφριά άνοδο. Αυτό σημαίνει ότι η μείωση στη μεταγραφική ενεργοποίηση που παρατηρήσαμε στις περιπτώσεις των Smads από τις SCPs είναι ειδικές για το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β. Επιπρόσθετα οι διαφορές ήταν αρκετά μεγάλες ώστε να οφείλονται μόνο στις δράση των SCPs πάνω στην RNAPII.

Τα πειράματα που πραγματοποιήσαμε έγιναν σε συνθήκες υπερέκφρασης της SCP1. Είναι λοιπόν σημαντικό να προσδιορίσουμε που εντοπίζεται η υπερέκφρασμένη SCP1 ώστε να διαπιστώσουμε που μπορεί να δράσει για την αποφωσφορυλίωση του linker των R-Smads. Ο ανοσοφθορισμός που πραγματοποιήθηκε σε HEK293T και COS-7 έδειξε ότι η υπερέκφρασμένη SCP1 εντοπίζεται σε όλη την έκταση του κυττάρου. Επίσης ο διαχωρισμός του πυρηνικού και του κυτταροπλασματικού διαμερίσματος σε HEK293T που υπερέκφρασαν την SCP1 έδειξε ότι αυτή εντοπίζεται τόσο στο πυρήνα όσο και το κυτταρόπλασμα. Αυτό σημαίνει ότι στα προηγούμενα πειράματα ο linker των R-Smads είναι αποφωσφορυλιωμένος όπου κι αν βρίσκεται μέσα στο κύτταρο. Αυτό είναι σημαντικό διότι εμποδίζει την διερεύνηση διαφορών στην λειτουργία του linker των R-Smads ανάλογα αν αυτές βρίσκονται στον πυρήνα ή το κυτταρόπλασμα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω οι SCPs λειτουργούν όπως η PPM1A υπέρ της καταστολής της σηματοδότησης του TGF-β. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν

RT-PCR για να διερευνήσουμε αν η μεταγραφή των γονιδίων των SCPs και της PPM1A ρυθμίζεται από τον TGF-β. Αυτό θα μπορούσε να δώσει απάντηση αν ο TGF-β επάγει την μεταγραφή τους για την διακοπή της σηματοδότησής του. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι σε γενικές γραμμές ο TGF-β αλλάζει τη μεταγραφή των γονιδίων της SCP1, SCP2, SCP2 και PPM1A και μάλιστα με τάσεις για μικρή αύξηση. Επειδή η αύξηση είναι μικρή μπορεί να γίνει ο ισχυρισμός ότι είναι αμελητέα και ότι στην ουσία δεν υπάρχει απόδειξη ότι ο TGF-β ρυθμίζει την έκφρασή τους. Είναι ενδεικτικό ότι ενώ μετά τα 80' επώασης με TGF-β χάνεται η φωσφορυλίωση της Smad3 στο SXS, τα αντίστοιχα επίπεδα του mRNA της PPM1A είναι μόνο ελάχιστα αυξημένα. Από την άλλη μεριά οι φωσφατάσες αυτές είναι απαραίτητες στη ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β και στην περίπτωση που δρουν σε πολύ μικρές ποσότητες είναι λογικό να παρατηρείται μικρή αλλαγή στα μεταγραφικά τους επίπεδα. Επιπρόσθετα, από τη στιγμή που φαίνεται ότι έχουν αρνητική επίδραση στη μεταγραφική ενεργοποίηση από τον TGF-β η αύξησή τους ίσως αποτελεί ένα αναδραστικό μηχανισμό διακοπής της σηματοδότησης.

Το συμπέρασμα από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι η αποφωσφορυλίωση του linker των R-Smads έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της σηματοδότησης του TGF-β. Οι SCPs είναι οι φωσφατάσες του linker που επιστρατεύονται από τα κύτταρα για να συνεισφέρουν σε αυτό. Οι έρευνες που έχουν γίνει για τις SCPs μέχρι σήμερα δείχνουν ότι δρουν ανασταλτικά στο μονοπάτι των BMPs με το να αποφωσφορυλιώνουν εκτός από τον linker και το SXS της Smad1 (Knockaert *et al.*, 2006). Αντίθετα, στις Smad2/3 αποφωσφορυλιώνουν μόνο τον linker με αποτέλεσμα να ευνοούν τον πυρηνικό εντοπισμό τους και να ενισχύουν της σηματοδότηση του TGF-β (Sapkota *et al.*, 2006; Wrighton *et al.*, 2006). Οι παραπάνω έρευνες παίρνουν ως δεδομένο ότι η φωσφορυλίωση του linker από τις MAPKs έχει αρνητική επίδραση στην λειτουργία των R-Smads αποκλείοντας τις από τον πυρήνα. Τα δικά μας αποτελέσματα συνηγορούν περισσότερο στη θεωρία που υποστηρίζει ότι η φωσφορυλίωση του linker δρα ενισχυτικά στην λειτουργία των R-Smads και ότι οι SCPs επιστρατεύονται για να υποβαθμίσουν αυτή τη λειτουργία. Το βασικό λοιπόν ερώτημα είναι πως δρουν οι SCPs στην αποφωσφορυλίωση του linker και γιατί αυτό εμποδίζει τις Smads να επάγουν την μεταγραφή. Δύο μοντέλα δράσης των SCPs παρουσιάζονται σε αυτή την εργασία, το κυτταροπλασματικό και το πυρηνικό. Αυτά τα μοντέλα έχουν καθοριστεί από το εάν οι SCPs έχουν τη δυνατότητα να αποφωσφορυλιώνουν τον linker των R-Smads στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα

και επίσης σε τι βαθμό μπορούν να προκαλέσουν την αποφωσφορυλίωση του μοτίβου SXS. Το τελευταίο αποτελεί ποσοτικό θέμα για τις SCPs αφού φαίνεται ότι μόνο σε μεγάλες συγκεντρώσεις επιτυγχάνουν την αποφωσφορυλίωση του SXS.

Στο κυτταροπλασματικό μοντέλο η αποφωσφορυλίωση του linker από τις SCPs θα μπορούσε να εμποδίζει τις R-Smads σε πολλά επίπεδα. Πρώτον, σε μικρές ποσότητες των SCPs, η αποφωσφορυλίωση του linker μπορεί να αποτρέπει τον ολιγομερισμό με τις Smad4 ή την αλληλεπίδραση με τις νουκλεοπορίνες για την εισαγωγή στο πυρήνα. Σε μεγαλύτερες ποσότητες οι SCPs μπορούν να επιδρούν άμεσα στη φωσφορυλίωση του SXS. Αυτό σημαίνει είτε ότι το αποφωσφορυλιώνουν άμεσα είτε έμμεσα εμποδίζοντας την φωσφορυλίωση του από τους υποδοχείς. Αυτό το μοντέλο θα μπορούσε κάλλιστα να ισχύει στην δική μας πειραματική διάταξη που οι SCPs υπερεκφράστηκαν και εντοπιζόνταν σε όλη την έκταση του κυττάρου.

Όμως, οι SCP1 και SCP2 σε φυσιολογικές συνθήκες εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων (Yeo *et al.*, 2003; Knockaert *et al.*, 2006) επομένως δεν είναι λογικό να δρουν στο κυτταρόπλασμα. Αυτόν τον ρόλο μπορεί να τον παίζει η SCP3 που έχει εντοπιστεί ενδογενώς σε όλη την έκταση του κυττάρου (Kashuba *et al.*, 2004). Επίσης θα ήταν αξιόλογη μία μελέτη για την διερεύνηση της τοπολογίας των SCP1/2 σε κύτταρα που δέχονται ερέθισμα με TGF- β καθώς αυτό θα μπορούσε να τις μετατοπίζει σε κάποιο βαθμό και στο κυτταρόπλασμα. Το πιθανότερο βέβαια είναι ότι οι SCPs δρουν πάνω στις Smads στον πυρήνα του κυττάρου όπως και η PPM1A φωσφατάση του SXS. Το πυρηνικό μοντέλο δράσης των SCPs θα μπορούσε επίσης να συμβαίνει σε πολλά επίπεδα και περιλαμβάνει εκτός από την υποβάθμιση του ολιγομερισμού των R-Smads/Smad4 και την περίπτωση να μην σχηματίζονται μεταγραφικά σύμπλοκα. Έχει δειχτεί ότι η περιοχή 200-230 του linker της Smad3, η οποία περιλαμβάνει τις σερίνες που φωσφορυλιώνονται από MAPKs και CDKs, είναι σημαντική για την επαγωγή της μεταγραφής επειδή είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον συμπαράγοντα P/CAF (Prokova *et al.*, 2005). Η αποφωσφορυλίωση του linker θα μπορούσε να εμποδίζει την αλληλεπίδραση των R-Smads με συνενεργοποιητές όπως οι P/CAF, p300 και CBP.

Δεν αποκλείεται βέβαια η δράση των SCPs, η αποφωσφορυλίωση του linker των R-Smads και η στρατολόγηση μεταγραφικών συμπαραγόντων να είναι ακόμη πιο πολύπλοκη. Για παράδειγμα η ταυτόχρονη δράση όλων των SCPs ή η αποκλειστική δράση μόνο μίας σε ποικίλες ποσότητες και σε συνδυασμό με τις ενεργοποιημένες MAPKs θα μπορούσαν να δημιουργούν πολλαπλά πρότυπα φωσφορυλίωσης στον

linker των R-Smads με εντελώς διαφορετικά αποτελέσματα. Αυτά τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν είτε την επιλεκτική μεταγραφή γονιδίων είτε τον περιορισμό της έντασης που έχει η σηματοδότηση του TGF-β στην μεταγραφή γονιδίων. Επίσης πάνω σε αυτό δεν πρέπει να ξεχνάμε και την κατάσταση των καταλοίπων του linker που δεν φωσφορυλιώνονται από MAPKs ή που δεν επιδρούν σε αυτά οι SCPs. Η φωσφορυλίωση αυτών των καταλοίπων μαζί με ορισμένα του MH1 (Thr8) ίσως έχουν επιπρόσθετο ρυθμιστικό ρόλο. Γενικότερα η φωσφορυλίωση του linker μπορεί να προσφέρει μία απίστευτη ευελιξία στην μεταγραφή από τα Smads και οι SCPs να αποτελούν τον κύριο ρυθμιστή της. Βέβαια όπως φαίνεται από τα αποτελέσματά μας, όταν η αποφωσφορυλίωση στον linker είναι σημαντική τότε το πιθανότερο είναι πως δυσχεραίνεται σε μεγάλο βαθμό η πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων στις Smads. Εκτός από αυτό, η μεγάλη ποσότητα των SCPs φαίνεται ότι οδηγεί στην αποφωσφορυλίωση του SXS των R-Smads μέσα στο πυρήνα των κυττάρων. Αυτό είτε γίνεται άμεσα από τις SCPs είτε έμμεσα αποφωσφορυλιώνοντας τον linker και δημιουργώντας τις κατάλληλες προϋποθέσεις για να δράσει η PPM1A. Το αποτέλεσμα είναι η ολοκληρωτική καταστολή της σηματοδότησης του TGF-β.

Συνοψίζοντας το πυρηνικό μοντέλο της δράσης των SCPs στην σηματοδότηση του TGF-β περιλαμβάνει τρία ουσιαστικά σημεία. Το πρώτο είναι η ρυθμιστική δράση που μπορεί να έχουν στη μεταγραφή σε σχέση με τη ποσότητά τους και τον βαθμό ενεργοποίησης των MAPKs, το δεύτερο είναι ότι σε μεγαλύτερες ποσότητες τους η αποφωσφορυλίωση του linker λειτουργεί για να μετριάσει το σήμα του TGF-β και το τρίτο είναι ότι σε πολύ μεγάλες ποσότητες οδηγεί στη αποφωσφορυλίωση του SXS και την ισχυρή καταστολή της σηματοδότησης του TGF-β. Σε όλα αυτά βέβαια θα πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι δε γνωρίζουμε πόσο σημαντική είναι η φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser276 του linker της Smad4 και εάν οι SCPs δρουν πάνω της. Αυτό κάνει ακόμη πιο πολύπλοκο το ρόλο που μπορεί να διαδραματίσει ο linker των Smads.

Όλα τα παραπάνω υποστηρίζουν τη θεωρία ότι η φωσφορυλίωση του linker έχει ενισχυτικό ρόλο στη σηματοδότηση του TGF-β ενώ η αποφωσφορυλίωση του έχει αρνητική επίδραση. Αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη θεωρία του πυρηνικού αποκλεισμού των Smads όταν ο linker είναι φωσφορυλιωμένος. Θα μπορούσε βέβαια η αποφωσφορυλίωση του linker να εξαναγκάζει την πυρηνική διατήρηση των R-Smads με συνέπεια τον αποκλεισμό της ενεργοποίησης τους από τους υποδοχείς και την καταστολή της σηματοδότησης του TGF-β. Παρόλα αυτά δεν είναι απαραίτητο

ότι ο linker των R-Smads έχει τον ίδιο ρόλο σε όλους τους κυτταρικούς τύπους ενώ θα μπορούσε να διαδραματίσει και διαφορετικό ρόλο στο ίδιο κύτταρο ανάλογα με την κατάστασή του. Το σίγουρο είναι ότι για να διαλευκανθεί οριστικά ο ρόλος του linker θα πρέπει να βρεθούν και να μελετηθούν οι παράγοντες που τον επηρεάζουν άμεσα ή έμμεσα καθώς και το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης.

Τέλος, η μελέτη της φωσφορυλίωσης του linker και της αποφωσφορυλίωσής του από τις SCPs είναι σημαντικές για το ρόλο του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF- β στον καρκίνο. Σε πολλά είδη καρκίνων υπερλειτουργούν οι CDKs, Ras και EGF και παρατηρείται αυξημένη φωσφορυλίωση του linker των R-Smads αλλά δεν έχει γίνει ξεκάθαρη η σημασία που έχει στην βιολογία του καρκίνου. Επίσης θα ήταν αξιόλογο να μελετηθεί η έκφραση και η λειτουργία των SCPs και PPM1A σε καρκινικούς ιστούς. Αυτά θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην εύρεση τρόπων να ενεργοποιηθεί το κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGF- β σε καρκινικά κύτταρα ή να παρεμποδιστεί η δράση του σε προχωρημένα στάδια του καρκίνου όπου ευνοεί τη μετάσταση. Δεν θα ήταν υπερβολή να λέγαμε ότι ο linker των R-Smads και οι φωσφατάσες τους ίσως αποτελέσουν φαρμακευτικό στόχο στο μέλλον για την θεραπεία πολλών μορφών καρκίνου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Annes, J.P., Munger, J.S., Rifkin, D.B.** (2003) Making sense of latent TGF- β activation. *J. Cell Sci.* 116:217–224.
- Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B. & DeRobertis, E.M.** (2002) Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signaling by BMP and TGF- β . *Nat. Cell Biol.* 4: 599–604.
- Bai, R.Y., Koester, C., Ouyang, T., Hahn, S.A., Hammerschmidt, M., Peschel, C. & Duyster, J.** (2002) SMIF, a Smad4-interacting protein that functions as a co-activator in TGF- β signaling. *Nat. Cell Biol.* 4: 181–190.
- Brown, J.D., DiChiara, M.R., Anderson, K.R., Gimbrone, M.A. & Topper, J.N.** (1999) MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2 mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 274: 8797–8805.
- Calonge, M.J. & Massague, J.** (1999) Smad4/DPC4 silencing and hyperactive Ras jointly disrupt transforming growth factor- β antiproliferative responses in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 274: 33637–33643.
- Chacko, B.M., Qin, B., Correia, J.J., Lam, S.S., De Caestecker, M.P., et al.** (2001) The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat. Struct. Biol.* 8:248–253
- Chacko, B.M., Qin, B.Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L.J., De Caestecker, M. & Lin, K.** (2004) Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF- β signaling. *Mol. Cell* 15: 813–823.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G. & Whitman, M.** (1997) Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389: 85–89.
- Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., et al.** (1998a) Determinants of specificity in TGF- β signal transduction. *Genes Dev.* 12: 2144–2152.
- Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L. & Reiss, M.** (1998b) Transforming growth factor beta type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 58: 4805–4810.

Chen, C.R., Kang, Y., Siegel, P.M. & Massagué, J. (2002) E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGF- β receptor to c-myc repression. *Cell* 110: 19–32.

Chen, H.B., Rud, J.G., Lin, K. & Xu, L. (2005) Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *J. Biol. Chem.* 280: 21329–21336.

Chen, H.B., Shen, J., Ip, Y.T. & Xu, L. (2006) Identification of phosphatases for Smad in the BMP/DPP pathway *Genes Dev.* 20: 648–653.

Cheng, S.K., Olale, F., Bennett, J.T., Brivanlou, A.H. & Schier, A.F. (2003) EGF, CFC proteins are essential core receptors for the TGF- β signals Vg1 and GDF1. *Genes Dev.* 17: 31–36.

Chong, P.A., Lin, H., Wrana, J.L. & Forman-Kay, J.D. (2006) An expanded WW domain recognition motif revealed by the interaction between Smad7 and the E3 ubiquitin ligase Smurf2. *J. Bio Chem.* 281: 17069–17075.

Chu, G.C., Dunn, N.R., Anderson, D.C., Oxburgh, L. & Robertson, E.J. (2004) Differential requirements for Smad4 in TGF β -dependent patterning of the early mouse embryo. *Development* 131: 3501–3512.

Daopin, S., Piez, K., Ogawa, Y., Davies, D. (1992) Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily. *Science* 257: 369–373.

De Caestecker, M., Parks, W., Frank, C., Castagnino, P., Bottaro, D., et al. (1998) Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev.* 12: 1587–1592.

De Caestecker, M.P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W.T., Huang, S., Hill, C.S., Shioda, T., Roberts, A.B. & Lechleider, R.J. (2000) The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J. Biol. Chem.* 275: 2115–2122.

Derynck, R., Akhurst, R.J. & Balmain, A. (2001) TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genet.* 29: 117–129.

Derynck, R. & Zhang, Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 425: 577-84.

Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. & Wrana, J.L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF- β receptor signaling and turnover. *Nat. Cell Biol.* 5: 410–421.

- Duan, X., Liang, Y.Y., Feng, X.H. & Lin, X.** (2006) Protein serine/ threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *J. Biol Chem*, 281: 36526–36532.
- Dunn, N.R., Koonce, C.H., Anderson, D.C., Islam, A., Bikoff, E.K. & Robertson, E.J.** (2005) Mice exclusively expressing the short isoform of Smad2 develop normally and are viable and fertile. *Genes & Dev*. 19: 152–163.
- Eppert, K. et al.** (1996) *MADR2* maps to 18q21 and encodes a TGF β -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86: 543–552.
- Feng, X.Y. & Derynck, R.** (2005) Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 659–93.
- Fuentealba, L.C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., Kuroda, H., Pera, E.M., De Robertis, E.M.** (2007) Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad signal. *Cell* 131: 980-993.
- Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K. & Miyazono, K.** (2001) Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol. Biol. Cell* 12: 1431–1443.
- Funaba, M., Zimmerman, C.M. & Mathews, L.S.** (2002) Modulation of Smad2-mediated signalling by extracellular signal-regulated kinase. *J. Biol. Chem.* 277: 41361-41368.
- Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C.J., Hruban, R.H. & Kern, S.E.** (1998) Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 58: 5329–5332.
- Gomis, R.R., Alarcon, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., et al.** (2006a) A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. *Proc. Natl.Acad. Sci.* 103: 12747–12752.
- Gomis, R.R., Alarcon, C., Nadal, C., Van Poznak, C. & Massague, J.** (2006b) C/EBP at the core of the TGF- β cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer Cell* 10: 203–214.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Lebrin, F., Larsson, J., et al.** (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF- β /ALK5 signaling. *Mol. Cell* 12: 817-828.

Grady, W.M., et al. (1999) Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 59: 320–324.

Grimm, O.H. & Gurdon, J.B. (2002) Nuclear exclusion of Smad2 is a mechanism leading to loss of competence. *Nat. Cell. Biol.* 4: 519-522.

Hart, P.J., Deep, S., Taylor, A.B., Shu, Z., Hinck, C.S. & Hinck, A.P. (2002) Crystal structure of the human T β R2 ectodomain-TGF- β 3 complex. *Nat. Struct. Biol.* 9: 203–208.

Hasegawa, Y. et al. (2001) Transforming growth factor- β 1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with non small cell lung carcinoma. *Cancer* 91: 964–971.

Hata, A., Lagna, G., Massagué, J. & Hemmati-Brivanlou, A. (1998) Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes & Dev.* 12: 186–197.

Hata, A., Seoane, J., Lagna, G., Montalvo, E., Hemmati-Brivanlou, A. & Massagué, J. (2000) OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP–Smad and Olf signaling pathways. *Cell* 100: 229–240.

Hayashida, T., Decaestecker, M. & Scnapper, H.W. (2003) Cross-talk between ERK MAP kinase and Smad signaling pathways enhances TGF β -dependant responses in human mesangial cells. *FASEB J.* 17: 1576-1578.

Ho, J., Cocolakis, E., Dumas, V.M., Posner, B.I., Laporte, S.A. & Lebrun, J.J. (2005) The G protein coupled receptor kinase-2 is a TGF β inducible antagonist of TGF β signal transduction. *EMBO J.* 24: 3247-3258.

Hocevar, B.A., Smine, A., Xu, X.X. & Howe, P.H. (2001) The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor- β receptors to the Smad pathway. *EMBO J.* 20: 2789–2801.

Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J. & Massague, J. (2001) The TGF- β receptor activation process: an inhibitor-to substrate-binding switch. *Mol. Cell* 8: 671–682.

Inman, G.J., Nicolas, F.J. & Hill, C.S. (2002) Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF- β receptor activity. *Mol. Cell* 10: 283–294.

Inman, G.J. & Hill, C.S., (2002) Stoichiometry of active Smad-transcription factor complexes on DNA. *J. Biol. Chem.* 277: 51008–51016.

Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M. & Miyazono, K. (2000) Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J. Biol. Chem.* 275: 6075–6079.

Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.H., Heldin, N.E. & ten Dijke, P. (1998) Transforming growth factor β 1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J. Biol. Chem.* 273: 29195–29201.

Itoh, S., Ericsson, J., Nishikawa, J., Heldin, C.H. & ten Dijke, P. (2000) The transcriptional co-activator P/CAF potentiates TGF- β /Smad signaling. *Nucleic Acids Res.* 28: 4291–4298.

Izutsu, K., Kurokawa, M., Imai, Y., Maki, K., Mitani, K., & Hirai, H. (2001) The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor β signaling. *Blood* 97: 2815–2822

Izzi, L. & Attisano, L. (2004) Regulation of the TGF- β signaling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* 23: 2071–2078.

Kamaraju, A.K. & Roberts, A.B. (2005) Role of Rho/Rock and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor- β -mediated Smad-dependant growth inhibition of human breast carcinoma cells *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 280:1024-1036

Kang, Y., Chen, C.R. & Massagué, J. (2003a) A self-enabling TGF- β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell* 11: 915–926.

Kang, Y. et al. (2003b) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537–549.

Kashuba, V.I. et al (2004) RBSP3 (HYA22) is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 4906-4911.

Kato, Y., Habas, R., Katsuyama, Y., Naar, A.M. & He, X. (2002) A component of the ARC/Mediator complex required for TGF- β /Nodal signalling. *Nature* 418: 641–646.

Khokha, M.K., Yeh, J., Grammer, T.C. & Harland, R.M. (2005) Depletion of three BMP antagonists from Spemann's organizer leads to a catastrophic loss of dorsal structures. *Developmental Cell* 8: 401–411.

- Kirsch, T., Sebald, W. & Dreyer, M.K.** (2000) Crystal structure of The BMP-2-BRIA ectodomain complex. *Nat. Struct. Biol.* 7: 492–496.
- Knockaert, M., Sapkota, G., Alarcon, C., Massague, J. & Brivanlou A.H.** (2006) Unique players in the BMP pathway: Small C-terminal domain phosphatases dephosphorylate Smad1 to attenuate BMP signaling *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 11940–11945.
- Kretzschmar, M., Doody, J. & Massagué, J.** (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathway converge on the TGF β family mediator Smad1. *Nature* 389: 618–622.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J.** (1999) A mechanism of repression of TGF- β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & Dev.* 13: 804–816.
- Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H. & Moustakas, A.** (2001) Transforming growth factor- β induces nuclear import of Smad3 in an importin- β 1 and Ran-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 12: 1079–1091.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. & TenDijke, P.** (2005) TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research* 65: 599–608.
- Lin, H.Y., Moustakas, A., Knaus, P., Wells, R.G., Henis, Y.I. & Lodish, H.F.** (1995) The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF) beta receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF-beta ligands. *Journal of Biological Chemistry* 270: 2747–2754.
- Lin, X., Liang, Y.Y., Sun, B., Liang, M., Shi, Y., Brunnicardi, F.C. & Feng, X.H.** (2003) Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription. *Mol. Cell. Biol.* 23: 9081–9093.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y. Y., Su, Y., Wrighton, K. H., Long, J., et al.** (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGF- β signaling. *Cell* 125: 915–928.
- Lo, R., Chen Y.G., Shi, Y., Pavletich, N.P., Massague, J.** (1998) The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF- β receptors. *EMBO J.* 17:996–1005.
- Lo, R.S. & Massagué, J.** (1999) Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nat. Cell Biol.* 1: 472–478.

- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. & Zhou, Q.** (1999) The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF- β signaling. *Genes & Dev.* 13: 2196–2206.
- Markowitz, S. et al.** (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336–1338.
- Massague, J.** (1998) TGF- β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753–791.
- Massagué, J. & Wotton, D.** (2000) Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* 19: 1745–1754.
- Massagué, J.** (2003) Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes & Dev.* 17: 2993–2997.
- Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D.** (2005) Smad transcription factors. *Genes & Dev.* 19: 2783–2810.
- Massague, J., Gomis, R.R.** (2006) The logic of TGF- β signaling. *FEBS Letters* 580: 2811–2820.
- Matsuura, I., Denissova, N.G., Wang, G., He, D., Long, J. & Liu, F.** (2004) Cyclin-dependent kinases regulate the antiproliferative function of Smads. *Nature.* 430: 226–231.
- Moren, A., Imamura, T., Miyazono, K., Heldin, C.H. & Moustakas, A.** (2005) Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* 280: 22115–22123.
- Mori, S., et al.** (2004) TGF- β and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23: 7416–7429.
- Moustakas, A. Souchelnytskyi, S. & Heldin, C.H.** (2001) Smad regulation in TGF- β signal transduction. *Journal of Cell Science* 114: 4359–4369.
- Moustakas, A. & Heldin, C.H.** (2005) Non-Smad TGF- β signals. *Journal of Cell Science* 118: 3573–3584.
- Muller, B., Hartmann, B., Pyrowolakis, G., Affolter, M. & Basler, K.** (2003) Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. *Cell* 113: 221–233.

Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2003) Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell* 14: 2809–2817.

Nakao, A., Afrakhte, M., Morén, A., Nakayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., et al. (1997) Identification of Smad7, a TGF- β -inducible antagonist of TGF- β signaling. *Nature* 389: 631–635.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Taga, T. (1999) Synergistic signaling in fetal brain by STAT3–Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284: 479–482.

Natsume, T., Tomita, S., Iemura, S., Kinto, N., Yamaguchi, A. & Ueno, N. (1997) Interaction between soluble type I receptor for bonemorphogenetic protein and bonemorphogenetic protein-4. *Journal of Biological Chemistry* 272: 11535–11540.

Nohe, A., Keating, E., Knaus, P. & Peterson, N.O. (2004) Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular Signalling* 16: 291-299.

Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. & Niehrs, C. (1999) Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401: 480–485.

Palancade, B. & Bensaude, O. (2003) Investigating RNA polymerase II carboxyl terminal domain (CTD) phosphorylation *Eur. J. Biochem.* 270, 3859–3870.

Pera, E.M., Ikeda, A., Eivers, E. & De Robertis, E.M. (2003) Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes & Dev.* 17: 3023-3028.

Pierreux, C.E., Nicolas, F.J. & Hill, C.S. (2000) Transforming growth factor- β -independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9041–9054.

Prokova P., Mavridou, S., Papakosta, P. & Kardassis, D. (2005) Characterization of a novel transcriptionally active domain in the transforming growth factor β -regulated Smad3 protein. *Nucleic Acids Res.* 33: 3708-3721.

Randall, R.A., Germain, S., Inman, G.J., Bates, P.A. & Hill, C.S. (2002) Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *EMBO J.* 21: 145–156.

Roelen, B.A.J., Cohen, O.S., Raychowdhury, M.K., Chadee, D.N., Zhang, Y., Kyriakis, J.M., Alessandrini, A.A. & Lin, H.Y. (2003) Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor- β -induced nuclear accumulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285: C823-830.

Ross, S. & Hill, C. (2008) How the Smads regulate transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40: 383–408.

Samad, T.A., Rebbapragada, A., Bell, E., Zhang, Y., Sidis, Y., Jeong, S.J., Campagna, J.A., Perusini, S., Fabrizio, D.A., Schneyer, A.L. et al. (2005) DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *Journal of Biological Chemistry* 280: 14122–14129.

Sapkota, G., Knockaert, M., Alarcón, C., Montalvo, E., Brivanlou A.H. & Massague, J. (2006) Dephosphorylation of the Linker Regions of Smad1 and Smad2/3 by Small C-terminal Domain Phosphatases Has Distinct Outcomes for Bone Morphogenetic Protein and Transforming Growth Factor- β Pathways. *J. Biol. Chem.* 281: 40412–40419.

Sapkota, G., Alarcon, C., Spagnoli, F.M., Brivanlou, A.H. & Massague, J. (2007) Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol. Cell* 25: 441–454.

Schmierer, B. & Hill, C.S. (2005) Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor- β -dependent nuclear accumulation of Smads. *Mol. Cell Biol.* 25: 9845–9858.

Seo, S.R., Lallemand, F., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Camonis, J. & Atfi, A. (2004) The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *EMBO J.* 23: 3780–3792.

Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A. & Massagué, J. (2004) Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117: 211–223.

Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1 phase progression. *Genes Dev.* 13: 1501–1512.

Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massagué, J. & Pavletich, N.P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: Insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell* 94: 585–594.

Shi, Y. & Massague, J. (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.

Shimizu, K., Bourillot, P.Y., Nielsen, S.J., Zorn, A.M. & Gurdon, J.B. (2001) Swift is a novel BRCT domain coactivator of Smad2 in transforming growth factor- β signaling. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3901–3912.

Siegel, P.M. & Massagué, J. (2003) Cytostatic and apoptotic functions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews* 3: 807-820.

Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002) Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 277: 39919–39925.

Thiery, J.P. (2002) Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Rev. Cancer* 2: 442–454.

Thompson, J., Lepikhova, T., Teixido-Travesa1, N., Whitehead, M.A., Palvimo, J.J. & Janne, O.A. (2006) Small carboxyl-terminal domain phosphatase 2 attenuates androgen-dependent transcription. *The EMBO Journal* 25: 2757–2767.

Torre-Amione, G. et al. (1990) A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type β 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 1486–1490.

Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. & Wrana, J.L. (1998) SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- β receptor. *Cell* 95: 779–791.

Uchida, K. et al. (1996) Somatic *in vivo* alterations of the *JV18-1* gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* 56: 5583–5585.

Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. & Nishida, E. (2000) Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep.* 1: 176–182.

Wang, D., Kanuma, T., Mizunuma, H., Takama, F., Ibuki, Y., Wake, N., Mogi, A., Shitara, Y. & Takenoshita, S. (2000) Analysis of specific gene mutations in the transforming growth factor-beta signal transduction pathway in human ovarian cancer. *Cancer Res.* 60: 4507–4512.

Wang, G., Long, J., Matsuura, I., He, D. & Liu, F. (2005) The Smad3 linker region contains a transcriptional activation domain. *Biochem. J.* 386: 29–34.

- Wicks, S.J., Lui, S., Abdel-Wahab, N., Mason, R.M. & Chantry, A.** (2000) Inactivation of smad-transforming growth factor- β signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol. Cell Biol.* 20: 8103–8111.
- Wotton, D., Lo, R.S., Lee, S. & Massagué, J.** (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97: 29–39.
- Wrighton, K.H., Willis, D., Long, J., Liu, F., Lin, X. & Feng Xin-Hua** (2006) Small C-terminal Domain Phosphatases dephosphorylate the regulatory linker regions of Smad2 and Smad3 to enhance Transforming Growth Factor- β signaling *J. Biol. Chem.* 281: 38365–38375.
- Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massagué, J. & Shi, Y.** (2000) Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287: 92–97.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., et al.** (2001) Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF- β signaling. *Mol. Cell* 8: 1277–1289.
- Wu, J.W., Krawitz, A.R., Chai, J., Li, W., Zhang, F., Luo, K. & Shi, Y.** (2002) Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: Insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *Cell* 111: 357–367.
- Xu, L., Kang, Y., Col, S. & Massagué, J.** (2002) Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF- β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell* 10: 271–282.
- Xu, L., Alarcon, C., Col, S. & Massagué, J.** (2003) Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J. Biol. Chem.* 278: 42569–42577.
- Yakymovych, I. & Souchelnytskyi, S.** (2006) Regulation of Smad function by phosphorylation. *P.ten Dijke and C.-H. Heldin (eds.), Smad Signal Transduction*, 235-252. © Springer.
- Yamagata, H. et al.** (2005) Acceleration of Smad2 and Smad3 phosphorylation via c-Jun NH2-terminal kinase during human colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 65: 157-165.
- Yamakawa, N., Tsuchida, K. & Sugino, H.** (2002) The ras GAP binding protein, Dok-1, mediates activin signaling via serine/ threonine kinase receptors. *EMBO J.* 21: 1684–1694.

Yeo, M., Lin, P.S., Dahmus, M.E. & Gill, G.N. (2003) A novel RNA polymerase II C-terminal domain phosphatase that preferentially dephosphorylates serine 5. *J. Biol. Chem.* 278: 26078-26085.

Yeo, M., Lee, S.K., Lee, B., Ruiz, E.C., Pfaff, S.L. & Gill, G.N. (2005) Small CTD phosphatases function in silencing neuronal gene expression. *Science.* 307: 596-600.

Zhang, Y. and Derynck, R. (2000) Transcriptional regulation of the transforming growth factor- β -inducible mouse germ line *Iga* constant region gene by functional cooperation of Smad, CREB, and AML family members. *J. Biol. Chem.* 275: 16979– 16985.

Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., et al. (2007) Smad7 antagonizes TGF- β signaling in the nucleus by interfering with functional Smad–DNA complex formation. *Mol. Cell Biol.* 27: 4488–4499.

Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. & Thomsen, G.H. (1999) A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400: 687–693.