

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
“ Κυτταρική και γενετική αιτιολογία,  
διαγνωστική και θεραπευτική των ασθενειών του ανθρώπου”**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

***“Μελέτη σημειακών μεταλλάξεων της Smad3  
πρωτεΐνης του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ  
που πιθανόν να εμπλέκονται στον καρκίνο”***

**ΜΑΥΡΙΔΟΥ Κ. ΣΟΦΙΑ**

**Επιβλέπων καθηγητής: Αν. Καθ. Δ. Καρδάσης**

**Ηράκλειο 2005**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Δ. Καρδάση για την άψογη συνεργασία μας, τις πολύτιμες συμβουλές του και για την καθοδήγηση του καθ'όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές Β. Ζαννή και Χ. Τσατσάνη για τις πολύτιμες συμβουλές τους καθώς επίσης και τον Διευθυντή σπουδών του μεταπτυχιακού προγράμματος Καθηγητή Δ. Μπούμπα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την γραμματέα του προγράμματος, Μ. Αδαμάκη για την βοήθεια της και το ενδιαφέρον της κατά την διάρκεια του μεταπτυχιακού.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Β. Προκόβα για τις συμβουλές τις και την συνεργασία μας η οποία κατέληξε σε μια πολύ καλή φιλία. Ευχαριστώ επίσης την τεχνικό του εργαστηρίου Π. Παπακώστα για την βοήθεια της, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Β. Νικολαΐδου, Ε. Βασιλάκη και Έ. Θυμιάκου.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τις πολύ καλές μου φίλες και συμφοιτήτριες Μάγδα και Ευμορφία για την συμπαράσταση, τη φιλία τους και την αγάπη τους καθ'όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού αυτού.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Σταύρο για την συμπαράσταση και την αγάπη του.

Βέβαια το πιο μεγάλο ευχαριστώ το αποδίδω στους γονείς μου οι οποίοι με στήριξαν ηθικά και πρακτικά όλα τα χρόνια των σπουδών μου και χωρίς τους οποίους δεν θα πραγματοποιούσα τους στόχους μου.

*Στους γονείς μου, Κοριάκο και Μαρία*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</u></b>	<b>1</b>
<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b>3</b>
<b><u>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</u></b>	<b>5</b>
Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας TGFβ	5
Το σηματοδοτικό μονοπάτι του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα TGFβ	9
Οι Smad πρωτεΐνες - μεταγωγείς της σηματοδότησης του TGFβ	11
Δομή, ολιγομερισμός και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Smad	14
Πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση των Smads	19
Πυρηνική σηματοδότηση	21
Απώλεια της TGFβ επαγόμενης κυτταροστατικής δράσης στον καρκίνο	26
Προ-διεισδυτικές και μεταστατικές λειτουργίες του TGFβ	31
<b><u>ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ</u></b>	<b>34</b>
<b><u>ΥΛΙΚΑ</u></b>	<b>36</b>
<b><u>ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>	<b>37</b>
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)	37
Απομόνωση τμημάτων DNA	37
Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)	38
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B της <i>E.coli</i> (transformation)	38
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening)	39
Κατασκευή μεταλλάξεων	40

Κατασκευή των pGFP-C1 Smad3Y237A και pGFP-C1 Smad3R287A πρωτεϊνών	43
Κυτταροκαλλιέργειες	45
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)	45
Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal	46
Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)	47
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)	47
Το σύστημα της <i>in vivo</i> βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών ( <i>in vivo</i> biotinylation)	48
Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)	50
Άμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών συζευγμένων με την GFP πρωτεΐνη (Direct Immunofluorescence)	51
<b><u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u></b>	<b>53</b>
Περιοχές της Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστικότητα	53
Μια εσωτερική απαλοιφή στην κεντρική περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης επηρεάζει δραστικά την μεταγραφική της δραστικότητα	56
Η εσωτερική απαλοιφή Δ200-230 μειώνει δραστικά την μεταγραφική δραστικότητα της Smad3 πρωτεΐνης και την λειτουργική αλληλεπίδραση της με την Smad4 πρωτεΐνη	59
Η εσωτερική απαλοιφή Δ200-230 δεν επηρεάζει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα	63
Απαλοιφή της περιοχής Δ200-230 επηρεάζει την φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της Smad3 και του συνενεργοποιητή p/CAF	65

Μια σημειακή μετάλλαξη στην αμινοξική θέση 239 της Smad3 πρωτεΐνης αναστέλλει την μεταγραφική της ενεργότητα	70
Επίδραση σημειακών μεταλλάξεων της Smad3 πρωτεΐνης στην λειτουργία της	74
Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης των Smad3 Y237A και Smad3 R287A με την Smad4 πρωτεΐνη	77
Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης της Smad3 R287A με την Smad4 πρωτεΐνη	81
Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων Y237A και R287A της Smad3 πρωτεΐνης στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους.	84
Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων στον ομο- και ετεροπολυμερισμό της Smad3 πρωτεΐνης	86
<b><u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</u></b>	<b>90</b>
Η εσωτερική απαλοιφή στην κεντρική περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης επηρεάζει την λειτουργία της	90
Η σημειακή μετάλλαξη E239A επιδρά δραστικά στην λειτουργία της Smad3 πρωτεΐνης	92
Οι σημειακές μεταλλάξεις Y237A και R287A έχουν διαφορετική επίδραση στην λειτουργία της Smad3 πρωτεΐνης	93
<b><u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u></b>	<b>96</b>

## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

bHLH : basic Helix-Loop-Helix  
BMP : Bone morphogenic protein  
Co-Smads : common Smads  
CTGF : Connective-tissue growth factor  
CTL : Cytotoxic T lymphocytes  
DPC4 : deleted in pancreatic carcinoma locus 4  
ECM : Extracellular matrix  
EGF : Epidermal Growth Factor  
EMT : Epithelial-mesenchymal transition  
FHA : ForkHead Associated  
GFP : Green fluorescent protein  
HNF4 : Hepatocyte nuclear factor  
I-Smads : Inhibitory Smads  
JNK : c-Jun N-terminal kinase  
JPS : Juvenile polyposis syndrome  
MAPK : Mitogen activated protein kinase  
MH1, MH2 : Mad homology 1,2  
NES : Nuclear export signal  
NLS : Nuclear localisation signal  
PCR : Polymerase chain reaction  
PIP3 : phosphatidyl inositol-3-phosphate  
R-Smads : Receptor-activated Smads  
SAD : Smad-activation domain  
SARA : Smad Anchor for Receptor Activation  
SBE : Smad binding element  
SNIP1 : Smad nuclear interacting protein  
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription  
TGFβ: Transforming Growth Factor beta  
TGIF : TGFβ inducer factor  
TNFα : Tumour Necrosis Factor α  
VEGF : Vascular endothelial Growth Factor

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β (TGFβ) είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη η οποία ρυθμίζει πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η αιματοποίηση, η επούλωση πληγών και η απόπτωση. Ο TGFβ είναι μέλος μιας υπεροικογένειας κυτοκινών οι οποίες κωδικοποιούνται από 29 διαφορετικά γονίδια στον άνθρωπο. Η σηματοδότηση από αυτούς τους παράγοντες αρχίζει με πρόσδεση του TGFβ σε συγκεκριμένους διαμεμβρανικούς υποδοχείς με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης, τύπου I και τύπου II. Ο ρόλος του TGFβ είναι να φέρει σε επαφή αυτές τις δύο κινάσες, σχηματίζοντας ένα ετερομερές σύμπλοκο υποδοχέων και να επιτρέψει την φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα από τον τύπου II υποδοχέα. Στη συνέχεια, ο τύπου I υποδοχέας φωσφορυλιώνει τις Smad πρωτεΐνες, οι οποίες με τη σειρά τους σχηματίζουν ολιγομερή και μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων στόχων του TGFβ σε συνεργασία με πυρηνικούς παράγοντες και συνενεργοποιητές. Το κεντρικό Smad σηματοδοτικό μονοπάτι είναι ενσωματωμένο σε ένα σύμπλοκο θετικών και αρνητικών ρυθμιστών οι οποίοι επηρεάζουν σημαντικά την κυτταρική απόκριση στον TGFβ.

Ο σκοπός του πρώτου μέρους της παρούσας διατριβής ήταν η εκπόνηση λειτουργικής χαρτογράφησης της περιοχής του συνδέτη της Smad3 πρωτεΐνης ο οποίος περικλείει μία μεταγραφικά ενεργή περιοχή, η οποία ταυτοποιήθηκε πρόσφατα στο εργαστήριο μας. Αποτελέσματα από το εργαστήριο μας έδειξαν πρόσφατα ότι εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 200-230 του συνδέτη καταστέλλει την μεταγραφική ικανότητα της Smad3 πρωτεΐνης. Σε πειράματα που περιγράφονται στην παρούσα διατριβή, επωάζοντας κύτταρα με κυκλοεξιμίδη, η οποία αναστέλλει την πρωτεινοσύνθεση, παρατηρήθηκε ότι η παραπάνω εσωτερική απαλοιφή δεν επηρεάζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης. Πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι η ίδια απαλοιφή δεν επηρεάζει την πυρηνική μετατόπιση της πρωτεΐνης. Τέλος, με πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης δείχθηκε ότι αυτή η απαλοιφή κατέστειλε πλήρως την αλληλεπίδραση της Smad3 πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή p/CAF.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, δημιουργήθηκε και εκπονήθηκε μια ενδεδειγμένη λειτουργική χαρτογράφηση δύο σημειακών μεταλλάξεων της Smad3



πρωτεΐνης, Y237A και R287A, αμινοξέα τα οποία έρχονται σε άμεση επαφή με το αμινοξύ E239. Έχει καταγραφεί ότι μεταλλάξεις στο αμινοξύ E239 συναντιούνται συχνά σε καρκινοπαθείς. Επιπλέον, πειράματα στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι η μεταγραφική δραστηριότητα της μεταλλαγμένης Smad3 E239A καταστέλλεται πλήρως.

Τα πειράματα αυτής της διατριβής έδειξαν ότι η σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την μετάλλαξη E239A, ενώ επηρεάζεται λιγότερο από τις μεταλλάξεις Y237A και R287A. Η σημειακή μετάλλαξη Y237A δεν επηρέασε την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης, τον ομο- και ετεροπολυμερισμό της με την Smad4 πρωτεΐνη και την είσοδο της στον πυρήνα. Αντίθετα, η σημειακή μετάλλαξη R287A μείωσε δραματικά την μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 πρωτεΐνης, κατέστειλε πλήρως την ικανότητα της να σχηματίζει ομοπολυμερή και ετεροπολυμερή με την Smad4 πρωτεΐνη και εμποδίζει την είσοδο της στον πυρήνα.

Η ακεραιότητα του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ είναι απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ιστών και η διαταραχή του από μεταλλάξεις αποτελεί την βάση για πολλά κληρονομήσιμα νοσήματα και για τον καρκίνο. Η χαρτογράφηση των περιοχών της Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστηριότητα καθώς και συγκεκριμένα αμινοξέα τα οποία είναι σημαντικά για την λειτουργία της και την αλληλεπίδραση της με άλλες πρωτεΐνες, θα αποτελέσει χρήσιμη γνώση για την κατασκευή μορίων που θα επάγουν την TGFβ σηματοδότηση σε περιπτώσεις μεταλλάξεων των Smad πρωτεϊνών όπως ο καρκίνος του γαστρεντερολογικού συστήματος και του πνεύμονα, ή θα την καταστέλλουν σε περιπτώσεις υπερλειτουργίας του, όπως η ίνωση και οι μεταστάσεις.

## ABSTRACT

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) is a pleiotropic cytokine that regulates many biological processes including cellular proliferation, differentiation, haematopoiesis, wound repair and apoptosis. TGF $\beta$  is a member of a superfamily of cytokines encoded by 29 different genes in humans. Signal transduction by these factors is initiated by binding of TGF $\beta$  to specific transmembrane serine/threonine kinases called the type I and type II receptors. The role of TGF $\beta$  is to bring together these two kinases, forming a heteromeric receptor complex and allowing the phosphorylation of the type I receptor by the type II receptor. Then type I receptor phosphorylates Smad proteins, which in turn form oligomers and translocate to the nucleus where they activate the transcription of TGF $\beta$  target genes in cooperation with nuclear factors and coactivators. The core Smad signal-transduction pathway is embedded within a complex of positive and negative regulators that greatly influence the cellular response to TGF $\beta$ .

The purpose of the first part of this Thesis was to perform a functional analysis of the linker domain of Smad3 that contains a novel transcriptionally active region identified recently in our lab. We had shown previously that an internal deletion of the 200-230 region of the linker severely inhibits the transactivation capacity of Smad3. By using the protein synthesis inhibitor cycloheximide, it was shown that the above internal deletion does not affect the stability of the protein. By performing indirect immunofluorescence, it was shown that the same deletion does not affect Smad3 nuclear translocation. Finally, using transactivation assays it was shown that this deletion abolished the functional interaction of Smad3 with the coactivator p/CAF.

In the second part of the Thesis, it was constructed and performed a detailed functional analysis of two novel point mutants in Smad3 protein, Y237A and R287A, which are in direct contact with amino acid E239. It has been reported that mutations at amino acid E239 are found frequently in cancer patients. Furthermore, we have recently shown that the transcriptional activity of the Smad3 E239A mutant is severely abolished.

The experiments of this Thesis showed that the stability of Smad3 protein is severely affected by the mutation E239A but affected to a lesser extent by mutations Y237A and R287A. The point mutation Y237A did not affect the transcriptional

activity of Smad3, the homo- and hetero-oligomerisation with Smad4 and its nuclear import. On the contrary, the point mutation R287A drastically reduced transcriptional activity of Smad3, abolished its ability to form homo- and heteromers with Smad4 and prevented its nuclear import.

The integrity of TGF $\beta$  signalling network is essential for normal development and tissue homeostasis, and its disruption by mutation underlies several inherited disorders and cancer. Elucidation of the transcriptionally active regions of Smad3 protein and the specific amino acids which are crucial for its activity and its interaction with other proteins could be important for constructing molecules that could either enhance TGF $\beta$  signalling (when Smad proteins are mutated in cancers of the lung or gastrointestinal cancers), or suppress TGF $\beta$  signalling (when its function is unregulated in fibrosis and metastasis).

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας TGFβ

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας, TGFβ είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη η οποία ελέγχει πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες. Ο TGFβ είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας η οποία απαρτίζεται από 35 δομικά συσχετιζόμενες πλειοτροπικές κυτταροκίνες. οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τρεις ισομορφές του TGFβ, τις ακτιβίνες και τις πρωτεΐνες μορφογένεσης οστών (Bone morphogenetic proteins, BMPs) (Massague et al., 1998). Τα μέλη της οικογένειας του TGFβ, τα οποία κωδικοποιούνται από 29 γονίδια, ελέγχουν την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την απόπτωση, καθώς και την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ρυθμίζοντας έτσι την έκφραση γονιδίων που καθορίζουν το φαινότυπο του κυττάρου (**Εικόνα 1**).

Αυτές οι πρωτεΐνες σηματοδοτούν ενεργοποιώντας τον σχηματισμό συγκεκριμένων συμπλόκων ετερομερών τύπου I και τύπου II διαμεμβρανικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης και από τις μέχρι σήμερα πληροφορίες υποστηρίζεται ότι οι υποδοχείς τύπου I είναι υπεύθυνοι για την ειδικότητα της σηματοδότησης. Οι υποδοχείς τύπου I κωδικοποιούνται από επτά γονίδια θηλαστικών, ενώ οι τύπου II κωδικοποιούνται από πέντε γονίδια. Οι βοηθητικές πρωτεΐνες β-γλυκάνη και ενδογλίνη αυξάνουν την ειδικότητα παρουσίασης του TGFβ στο σηματοδοτικό σύμπλοκο των υποδοχέων. Η έκφραση της β-γλυκάνης στην κυτταρική επιφάνεια ενδεχομένως ρυθμίζει την απόκριση των κυττάρων στον TGFβ (Blobe et al., 2001) και οι αγγειακές ανωμαλίες που προκαλούνται από δυσλειτουργία της ενδογλίνης πιθανότατα εξηγούνται από την ελλιπή σηματοδότηση του TGFβ στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Barbara N, et al., 1999). Οι ενδοκυτταρικοί επαγωγείς σηματοδότησης των υποδοχέων, οι Smad πρωτεΐνες, καθώς και οι συνδέτες και οι ίδιοι οι υποδοχείς είναι συντηρημένοι σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από τον *Caenorhabditis elegans* και την *Drosophila* μέχρι τα θηλαστικά (Moustakas et al., 2001).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει μικρότερος αριθμός υποδοχέων και Smad πρωτεϊνών από ότι συνδετών παρατηρείται πολύ μεγάλη ποικιλότητα στο αποτέλεσμα της σηματοδότησης. Η ποικιλότητα αυτή οδηγεί σε μεταγραφική ρύθμιση

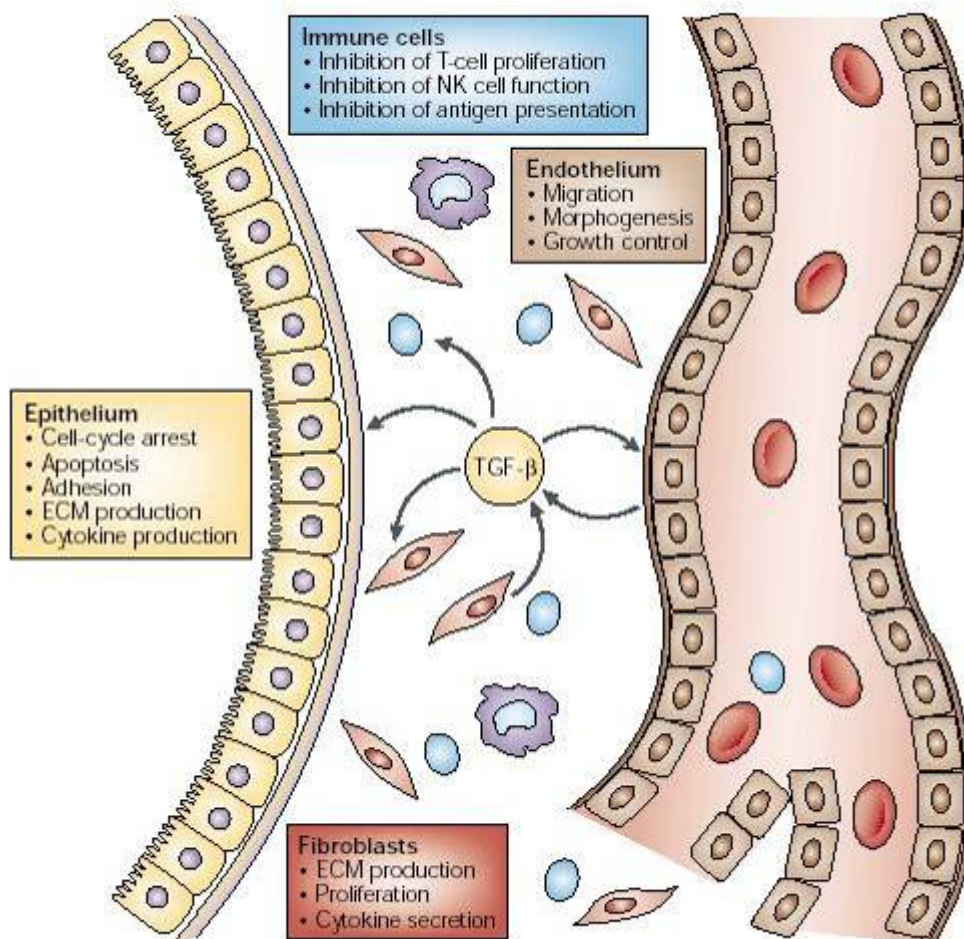
εξαρτημένη από την κυτταρική σύσταση και αποδίδεται σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας είναι οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων τύπου I και τύπου II στα ολιγομερή σύμπλοκα που σχηματίζουν, ενώ ο δεύτερος παράγοντας, αφορά στην ποικιλία των μεταγραφικών παραγόντων με τους οποίους αλληλεπιδρούν οι Smads. Επίσης είναι πλέον γνωστό ότι το TGFβ μονοπάτι αλληλεπιδρά με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε Smad-επαγόμενες και Smad-ανεξάρτητες αποκρίσεις (Derynck and Zhang., 2003).

Ο TGFβ έχει κυτταροστατικές και αποπτωτικές λειτουργίες οι οποίες βοηθούν την καταστολή της αύξησης των ιστών των θηλαστικών. Απώλεια αυτών των λειτουργιών οδηγεί σε υπερπολλαπλασιαστικές ανωμαλίες και είναι κοινό φαινόμενο σε περιπτώσεις καρκίνου. Καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν υφίστανται στην TGFβ επαγόμενη καταστολή της κυτταρικής αύξησης, υπερπαραγούν αυτήν την κυτοκίνη δημιουργώντας ένα τοπικό ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που προάγει την καρκινογένεση και την μεταστατική συμπεριφορά των ίδιων των καρκινικών κυττάρων. Η TGFβ σηματοδότηση είναι σημαντική για την επαγωγή της μορφογένεσης και της αγγειογένεσης κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Γενετικές αναλύσεις της TGFβ σηματοδότησης δεν υποδεικνύουν κατασταλτικό ρόλο του TGFβ στην ανάπτυξη κατά την εμβρυογένεση. Αργότερα, κατά την ωρίμανση των ιστών, πολλοί τύποι κυττάρων αποκτούν την ικανότητα να αποκρίνονται στον TGFβ με καταστολή της αύξησης ή με κυτταρικό θάνατο. Η φύση και η φάση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο καθορίζουν την τελική ανταπόκριση σε αυτή την κυτοκίνη (Siegel and Massague, 2003). Έχει παρατηρηθεί TGFβ επαγόμενος έλεγχος της κυτταρικής αύξησης στα επιθηλιακά κύτταρα του θηλαστικού αδένα, του δέρματος, του ορθού, του παγκρέατος, του ήπατος και του προστάτη (Siegel and Massague, 2003). Το σύστημα του δέρματος αντιπροσωπεύει ακόμη ένα οργανικό σύστημα το οποίο είναι ευαίσθητο στην δράση του TGFβ, καθώς διαγονιδιακές μελέτες αποκαλύπτουν αντικρουόμενα αποτελέσματα της δράσης του TGFβ στον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των κερατινοκυττάρων, γεγονός που ενδεχομένως αντανάκλα τον βαθμό της κυτταρικής διαφοροποίησης, τα επίπεδα έκφρασης του TGFβ και την διάρκεια της σηματοδότησης. Έτσι, η έκφραση του TGFβ στα διαφοροποιημένα υπερβασικά στρώματα οδηγεί σε αύξηση του μιτωτικού ρυθμού (Cui et al., 1995), ενώ έκφραση της κυτταροκίνης στο πολλαπλασιαζόμενο βασικό στρώμα οδηγεί σε καταστολή της αύξησης (Wang et al., 1999, Liu et al., 2001). Επίσης, ο TGFβ επιδρά αρνητικά στην επούλωση πληγών περιορίζοντας τον

πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στην περιοχή του τραύματος, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει θετικά την διαδικασία επούλωσης ενισχύοντας την μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και την εναπόθεση εξωκυττάρου υλικού (extracellular matrix, ECM) (Wang et al., 2001).

Η TGFβ σηματοδότηση ελέγχει την ανάπτυξη των κυττάρων του ανοσοποιητικού και του νευρικού συστήματος (Siegel and Massague, 2003). Παρά το γεγονός ότι ο TGFβ επάγει την καταστολή της κυτταρικής αύξησης και την απόπτωση των καλλιεργούμενων ενδοθηλιακών κυττάρων, η TGFβ σηματοδότηση απαιτείται για την αγγειογένεση κατά την ανάπτυξη και ενέσιμη παροχή του TGFβ οδηγεί σε αγγειογενετική απόκριση *in vivo* (Dickson et al., 1995, Larsson et al., 2001, Roberts et al., 1986, Oh et al., 2000). Οι παραπάνω αντίθετες αποκρίσεις εξηγούνται από το γεγονός ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν δύο υποδοχείς τύπου I του TGFβ, τον ALK1 και τον ALK5. Ο πρώτος ενεργοποιεί την Smad1 και αυξάνει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ ο δεύτερος μέσω των Smad2/3 καταστέλλει αυτές τις λειτουργίες. Το είδος του υποδοχέα που σηματοδοτεί και τελικά καθορίζει το αποτέλεσμα εξαρτάται από την συγκέντρωση του TGFβ (Goumans et al., 2002).

Ο TGFβ επάγει την μεταγραφή κυτταροστατικών γονιδίων σε οποιαδήποτε από τις φάσεις G1, S ή G2 του κυτταρικού κύκλου, αλλά οι αποκρίσεις στον παράγοντα αυτό στοχεύουν κυρίως τα γεγονότα της φάσης G1 (Laiho et al., 1990). Προσθήκη του TGFβ σε κύτταρα τα οποία έχουν ήδη δεσμευτεί να εισέλθουν στην φάση S του κυτταρικού κύκλου δεν αναστέλλει την ολοκλήρωση αυτού του κύκλου. Οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την κυτταροστατική δράση του TGFβ προέρχονται από μελέτες σε επιθηλιακά κύτταρα δέρματος, πνεύμονα και θηλαστικού αδένα, και αφορούν στην ενεργοποίηση των αναστολέων κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες (cyclin-dependent kinase inhibitors) p15 και p21 ή WAF1, και στην καταστολή των μεταγραφικών παραγόντων c-MYC, ID1, ID2 και ID3 που επάγουν την αύξηση (Siegel and Massague, 2003).



**Εικόνα 1.** Στόχοι του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα TGFβ και οι λειτουργίες του σε ώριμους ιστούς. Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας TGFβ βοηθά στην διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό διάφορων κυτταρικών τύπων – επιθηλιακά, ενδοθηλιακά, ινοβλάστες και ανοσοποιητικά κύτταρα – καθώς επίσης επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση αυτών των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον του ιστού (Siegel and Massague et al., 2003).

## Το σηματοδοτικό μονοπάτι του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα TGFβ

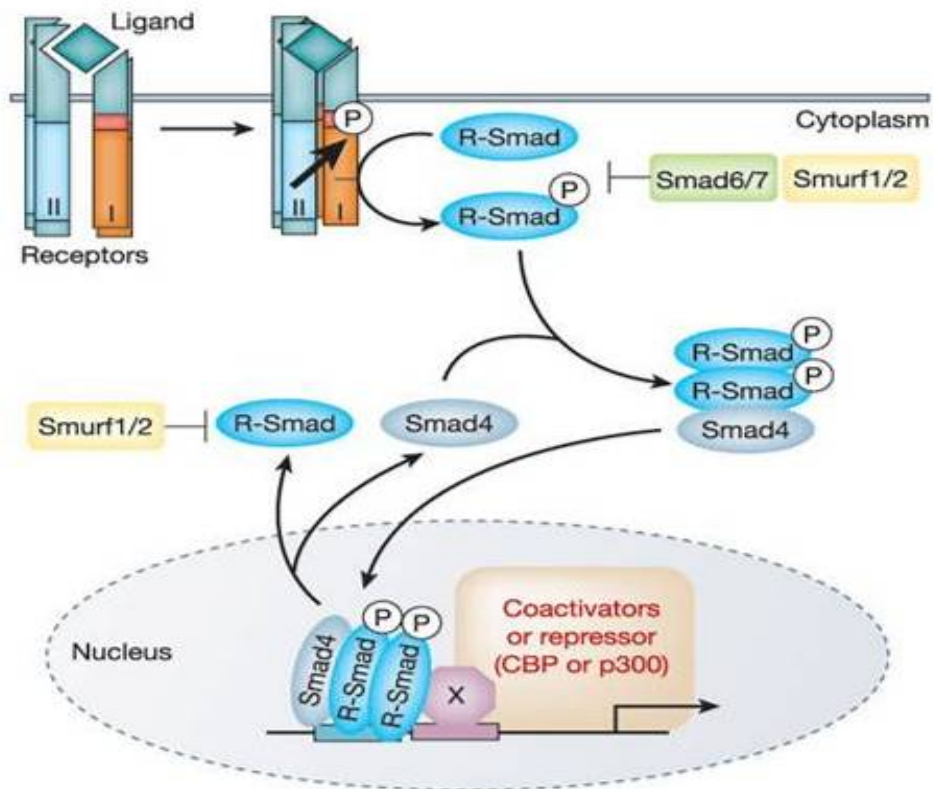
Τα μοριακά γεγονότα που οδηγούν από την ενεργοποίηση των υποδοχέων του TGFβ στην δημιουργία των Smad μεταγραφικών συμπλόκων, καθώς και στη ρύθμιση όλης αυτής της διαδικασίας έχει αποσαφηνιστεί κατά ένα μεγάλο μέρος. Όπως προαναφέρθηκε ο TGF-β σηματοδοτεί μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Ο υποδοχέας του TGFβ είναι ένα ετερομερές που αποτελείται από ένα διμερές τύπου I και από ένα διμερές τύπου II. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης πραγματοποιείται μετά από φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I στην συντηρημένη περιοχή 30 αμινοξέων, GS από τον υποδοχέα τύπου II, η οποία προκαλεί αλλαγή στην διαμόρφωση του υποδοχέα τύπου I (Derynck et al., 1997). Στη συνέχεια, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας τύπου I αναγνωρίζει και φωσφορυλιώνει τους ενδοκυττάριους επαγωγείς σηματοδότησης, τις R-Smads (Receptor-activated Smads), στο καρβοξυτερματικό μοτίβο SXS (Shi and Massague., 2003).

Οι R-Smads έρχονται σε άμεση επαφή με τον φωσφορυλιωμένο υποδοχέα τύπου I (ALK5) του TGF-β, ενώ έχει δειχθεί ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ ALK5 και R-Smads υποβοηθείται από την πρωτεΐνη των πρώιμων ενδοσωμάτων SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) (Tsukazaki et al, 1998). Η SARA είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά ειδικά με την μη-ενεργοποιημένη Smad2 και το σύμπλοκο των υποδοχέων, σχηματίζοντας έτσι μια γέφυρα ανάμεσα στους υποδοχείς και την Smad2, υποβοηθώντας με αυτόν τον τρόπο την φωσφορυλίωση της Smad2 από τον υποδοχέα τύπου I (Tsukazaki et al., 1998). Επίσης, η σταθερή αλληλεπίδραση της SARA με την Smad2 αναστέλλει την πυρηνική είσοδο της τελευταίας (Xu et al., 2000). Η SARA περιέχει την αμινοξική περιοχή FYVE, ένα μοτίβο που είναι γνωστό ότι προσδένει την 3-φωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη (PIP3), γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αγκυροβόληση της Smad2 στο εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή στα ενδοσώματα. Επομένως, η SARA αποτελεί το πρώτο παράδειγμα οργάνωσης κέντρων σηματοδότησης του TGFβ στην πλασματική μεμβράνη, παρόλο που δεν έχουν ακόμα αναφερθεί πρωτεΐνες υποδοχείς ανάλογες με την SARA σε BMP σηματοδοτικά μονοπάτια.

Μετά την απελευθέρωση των R-Smads από την SARA οι Smad2, Smad3 σχηματίζουν ετεροδιμερή με την πρωτεΐνη Smad4 (**Εικόνα 2**) τα οποία μεταβαίνουν



στον πυρήνα μέσω των importins, προσδένονται στο DNA και σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες και συνεργοποιητές επάγουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Τα διμερή των Smads προσδένονται στην αλληλουχία 5'CAGAC3' του υποκινητή και προκαλούν την έναρξη της μεταγραφής. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ περιγράφεται στην **Εικόνα 2**.



**Εικόνα 2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα TGF-β.** Μετά την πρόσδεση του συνδέτη TGFβ στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I και τύπου II παρατηρείται αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα II ο οποίος στην συνέχεια φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει τις R-Smads στην C-τελική περιοχή τους. Οι ενεργοποιημένες R-Smads σχηματίζουν σύμπλοκο με την Co-Smad4 το οποίο μεταβαίνει στον πυρήνα και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων στόχων μέσω φυσικών και λειτουργικών αλληλεπιδράσεων με DNA-προσδεδόμενους μεταγραφικούς παράγοντες και τους συνεργοποιητές CBP/p300. Η ενεργοποίηση των R-Smads από τους υποδοχείς τύπου I αναστέλλεται από την Smad6 ή την Smad7. Οι R-Smads και η Smad4 εισέρχονται και εξέρχονται συνεχώς από τον πυρήνα. Οι E3 λιγάσες ουμπικουτίνης Smurf1 και Smurf2 αποικοδομούν τις R-Smads, καθώς και τους υποδοχείς τύπου I μέσω αλληλεπίδρασης με τις Smad6/7 (Derynck and Zhang., 2003).

## Οι Smad πρωτεΐνες - μεταγωγείς της σηματοδότησης του TGFβ

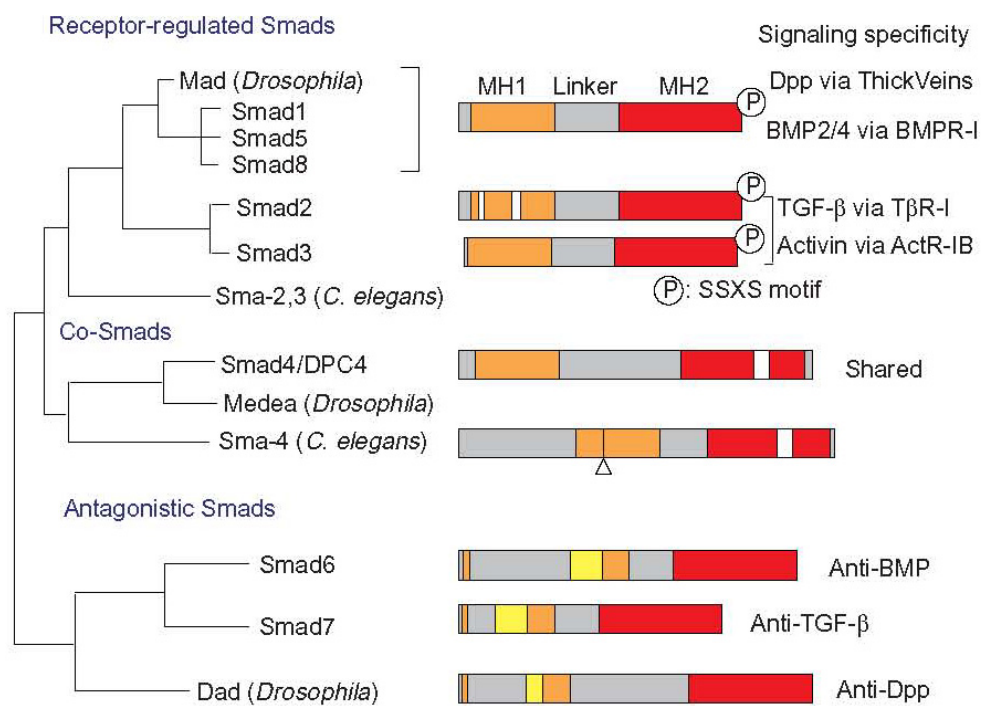
Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούν τα μοναδικά γνωστά υποστρώματα των υποδοχέων τύπου I με λειτουργία σηματοδότησης. Αρχικά αναγνωρίστηκαν ως τα προϊόντα των γονιδίων Mad της *Drosophila* και Sma του *C.Elegans*. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί οκτώ μέλη της οικογένειας των Smad (Mad-homologues (MADH)). Πρέπει να σημειωθεί ότι οι MADH2, MADH4 και MADH7 χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 18q21-22, που αποτελεί γνωστή ογκοκατασταλτική περιοχή. Οι Smad πρωτεΐνες εκφράζονται ευρέως καθ'όλη την διάρκεια της ανάπτυξης και σε όλους τους ενήλικους ιστούς και πολλές από αυτές (Smad2, Smad4, Smad5, Smad6 και Smad8) παράγονται από εναλλακτικό ομματισμό (splicing) των mRNAs (Moustakas et al., 2001).

Οι Smads, οι οποίες αποτελούνται από 400-500 αμινοξέα, εμπίπτουν σε τρεις υπο-οικογένειες ανάλογα με τις λειτουργίες τους: α) τις R-Smads (Receptor-activated Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 Smad8) που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς και συγκεκριμένα φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I, β) τις κοινές μεταγωγείς Co-Smads (Common mediator Smads: Smad4) που σχηματίζουν ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-Smads, και γ) τις ανασταλτικές I-Smads (Inhibitory Smads: Smad6 και Smad7) που επάγονται από μέλη της οικογένειας του TGFβ. Οι τελευταίες συμμετέχουν σε έναν αυτοανασταλτικό μηχανισμό, αφ' ενός ανταγωνιζόμενες τις R-Smads στην αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς και αφετέρου προκαλώντας την αποικοδόμηση των υποδοχέων, μέσω ουμπικιτινίωσης (Derynck et al., 1997). Στην **Εικόνα 3** παριστάνονται οι τρεις κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών στους διάφορους οργανισμούς.

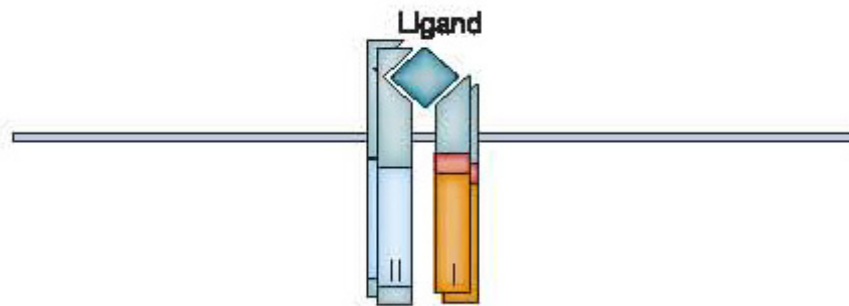
Οι υποδοχείς του TGFβ και της ακτιβίνης φωσφορυλιώνουν τις Smad2 και Smad3, ενώ οι υποδοχείς του BMP φωσφορυλιώνουν τις Smad1, Smad5 και Smad8 (Chen et al., 1998). Η ενεργοποίηση των διαφόρων R-Smads από τους υποδοχείς των προαναφερθέντων συνδετών καταδεικνύεται στην **Εικόνα 4**. Ωστόσο υπάρχουν και άλλες κινάσες όπως η Erk MAPK (mitogen activated protein kinase), η Ras, η MEKK1, η JNK (c-Jun N-terminal kinase), η PKC, η CamKII που ρυθμίζουν περαιτέρω την Smad σηματοδότηση (Engel et al, 1999, Mori et al, 2004, Matsuura et al, 2004, Wicks et al, 2000, Kretzschmar et al, 1999).

Απουσία συνδέτη, οι υποδοχείς τύπου I και II σχηματίζουν ομοδιμερή πάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Οι ισομορφές του TGFβ, TGFβ1, TGFβ3 και οι ακτιβίνες

προσδένονται στους υποδοχείς τύπου II χωρίς να απαιτείται η παρουσία των υποδοχέων τύπου I, ενώ οι BMP2, BMP4 και BMP7 προσδένονται αρχικά στους υποδοχείς τύπου I παρόλο που η παρουσία ετερομερών BMP συμπλόκων υποδοχέων προσφέρουν μεγαλύτερη συγγένεια στην πρόσδεση κάθε συνδέτη. Άλλοι TGFβ συνδέτες όπως ο TGFβ2 αλληλεπιδρά μόνο με συνδυασμό υποδοχέων τύπου I και τύπου II. Ωστόσο, ενώ η πρόσδεση του συνδέτη στα ομοδιμερή των υποδοχέων επάγει κυτταροπλασματική αυτοφωσφορυλίωση στους υποδοχείς τύπου II, δεν επαρκεί για να ενεργοποιήσει την σηματοδότηση απουσία των υποδοχέων τύπου I (Derynck et al., 1997).



**Εικόνα 3. Οι τρεις υπό-οικογένειες των Smad πρωτεϊνών.** Οι R-Smads (Receptor-regulated Smads) υποδιαιρούνται σε δύο διαφορετικές ομάδες κάθε μία εκ των οποίων ενεργοποιείται από διαφορετικό συνδέτη (BMP ή TGFβ/activin). Η SSXS αλληλουχία φωσφορυλίωσης από τους υποδοχείς (P) εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο τους. Οι co-Smads περιλαμβάνουν την Medea της *Drosophila*, την Sma-4 του *Caenorhabditis elegans* και την Smad4 του ανθρώπου. Η Sma-4, όπως και η Smad2, περιέχει διάφορες μικρές ενθέσεις στην MH1 περιοχή και χαρακτηρίζεται από προέκταση του N-τελικού της άκρου. Οι ανασταλτικές (ή ανταγωνιστικές) I-Smads στερούνται του μεγαλύτερου μέρους της MH1 περιοχής και διαφέρουν ως προς την MH2 περιοχή από τα άλλα μέλη της Smad οικογένειας (Hata et al., 1998).



Type II	Type I	R-Smad
BMPRII	ALK-2 (ActR) ALK-3 (BMP-RI/A) ALK-6 (BMP-RI/B)	Smad1, Smad5, Smad8
ActRII, ActRIIB ActRIIB	ALK-4 (ActRI/B) ALK-7	Smad2 Smad2
TβRII	ALK-5 (TβRI) ALK-1 ALK-2	Smad2, Smad3 Smad1, Smad5
AMHR	ALK-3 ALK-2 ALK-6	Smad1, Smad5

Εικόνα 4. Οι διάφορες R-Smads ενεργοποιούνται από διαφορετικούς υποδοχείς της οικογένειας του TGFβ. Οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων τύπου I και τύπου II καθορίζουν τις αποκρίσεις στην σηματοδότηση των κυτταροκινών (Derynck and Zhang, 2003).

## Δομή, ολιγομερισμός και ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Smad

Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούνται από μία συντηρημένη αμινοτερματική (N-terminal) και μία συντηρημένη καρβοξυτερματική (C-terminal) περιοχή, MH1 και MH2 (Mad Homology 1 and 2) αντίστοιχα οι οποίες διαχωρίζονται από μία συνδετική περιοχή (linker domain). Η MH1 περιοχή είναι εξαιρετικά συντηρημένη ανάμεσα στις R-Smads και τις Co-Smads, ενώ η MH2 περιοχή είναι συντηρημένη μεταξύ όλων των Smads. Η MH1 περιοχή ρυθμίζει την είσοδο στον πυρήνα, την μεταγραφή μέσω πρόσδεσης στο DNA και την αλληλεπίδραση με πυρηνικές πρωτεΐνες (**Εικόνα 5**). Η MH1 περιοχή των R-Smad προσδένεται στο DNA που περιέχει την 5-CAGAC-3 αλληλουχία η οποία ονομάζεται SBE (Smad binding elements). Από μελέτες που έχουν γίνει είναι γνωστό ότι η MH2 περιοχή περιέχει πέντε α-έλικες και τρεις θηλιές (loops) που περικλείουν έναν β-sandwich πυρήνα ο οποίος αποτελείται από επτά αντιπαράλληλες β πτυχωτές επιφάνειες. Η MH2 περιοχή θυμίζει μια FHA (ForkHead Associated) περιοχή, μια περιοχή πρόσδεσης σε φωσφοπεπτιδίο, κοινή σε μεταγραφικούς και σηματοδοτικούς παράγοντες (Li et al., 2000). Η περιοχή αυτή ρυθμίζει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις: α) του υποδοχέα με τις R-Smads και τις I-Smads, β) Smad-Smad γ) Smad με DNA-προσδεδόμενους συνπαράγοντες και δ) Smad-SARA (Derynck and Zhang, 2003, Moustakas. et al., 2001). Η φωσφορυλίωση των R-Smads στο καρβοξυτερματικό τους άκρο και συγκεκριμένα στις δυο πρώτες σερίνες του μοτίβου SSXS από τους τύπου I υποδοχείς είναι το 'κλειδί' για την ενεργοποίηση των Smads (Abdolalah et al., 1997). Στην MH2 περιοχή των R-Smads υπάρχει η L3 θηλιά η οποία μαζί με την θηλιά L45 εννέα αμινοξέων του υποδοχέα τύπου I καθορίζει την ειδικότητα της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με τις R-Smads (**Εικόνα 5**) (Massague et al., 2000, Huse et al., 2001).

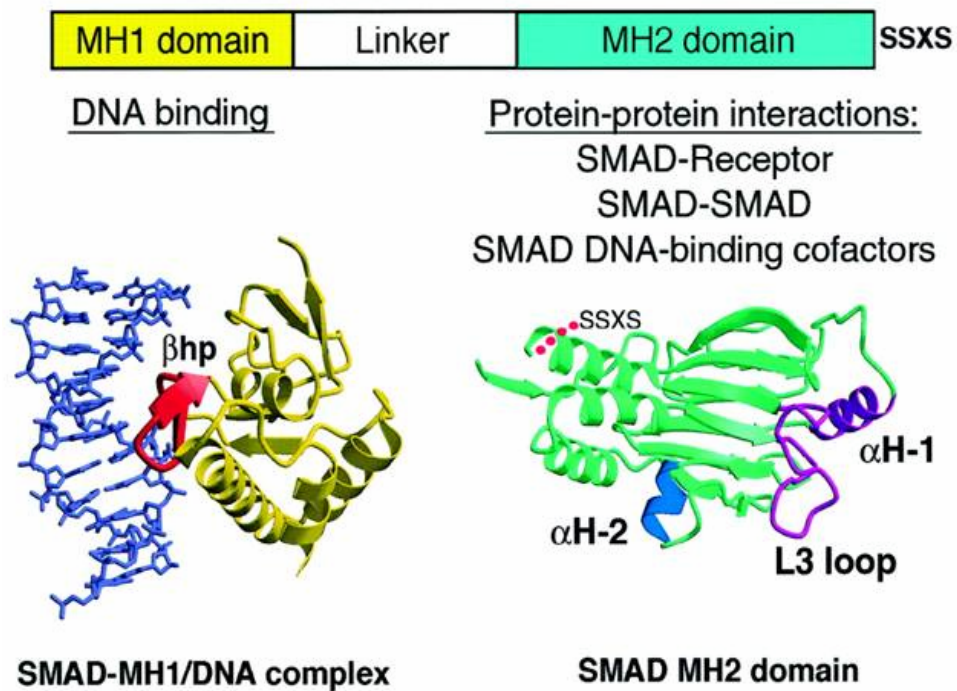
Από βιοχημικές και δομικές αναλύσεις προκύπτει ότι το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης των R-Smads στην καρβοξυτερματική τους περιοχή είναι η ειδική αλληλεπίδραση με την θηλιά L3 μιας άλλης Smad πρωτεΐνης (R-Smad ή Smad4), γεγονός που αρκεί για να προκαλέσει τον ολιγομερισμό τους (**Εικόνα 6**) (Correia et al., 2001). Ο ολιγομερισμός υποβοηθάται από εκτεταμένες επαφές μεταξύ της θηλιάς-έλικας (loop-helix) περιοχής της μιας υπομονάδας και την ομάδα τριών ελίκων (three-helix bundle) της άλλης υπομονάδας – περιοχές των Smads εξελικτικά συντηρημένες (Shi, 2001). Οι κυτταροπλασματικές, μη ενεργές Smads, αυτο-καταστέλλονται ενδογενώς μέσω μιας ενδομοριακής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις περιοχές MH1 και

MH2 (Hata et al., 1997). Επίσης, η Smad4 περιέχει μια μοναδική θηλιά στην MH2 περιοχή της, η οποία αναστέλλει τον αυθόρμητο ολιγομερισμό απουσία σηματοδότησης (Tada et al., 1999). Η φωσφορυλίωση μέσω του υποδοχέα φαίνεται ότι επάγει αλλαγές στην διαμόρφωση των μορίων που αναστέλλουν την αυτοκαταστολή και πιθανότατα εκθέτουν στην επιφάνεια περιοχές των ενεργοποιημένων Smad οι οποίες ήταν θαμμένες και εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες σημαντικές για την πυρηνική είσοδο, την μεταγραφική ρύθμιση ή την αποικοδόμηση.

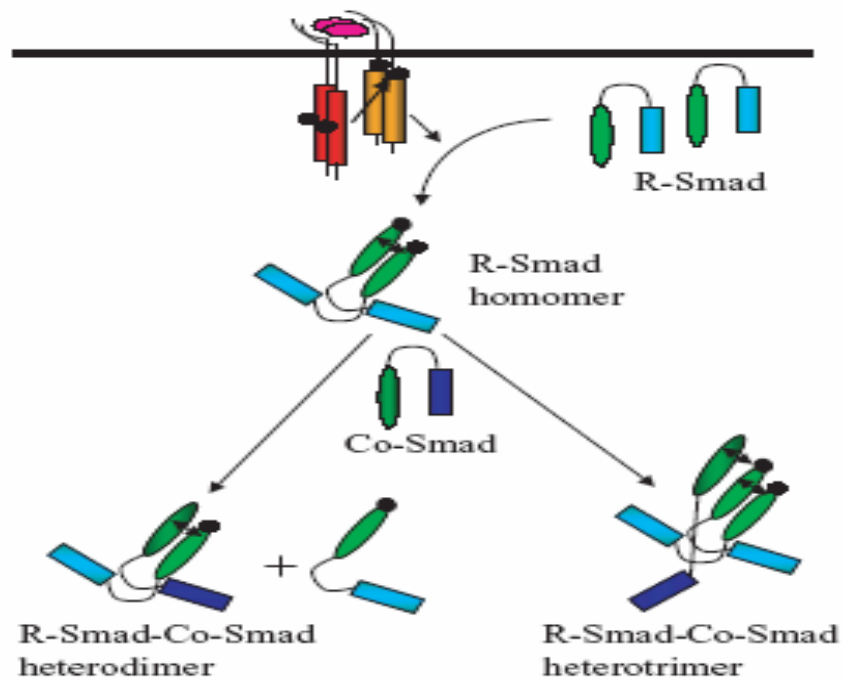
Αρχικά είχε δειχθεί ότι τα ολιγομερή των Smad είναι ουσιαστικά ετεροτριμερή που αποτελούνται από δύο R-Smads και μία Smad4 (Kawabata et al., 1998, Shi, 2001), γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί για την περίπτωση της Smad3 και με κρυσταλλογραφικές αναλύσεις (Correia et al., 2001). Πρόσφατες αναλύσεις αναφέρουν διμερή διαμόρφωση για το σύμπλοκο των Smad2/Smad4 (Wu et al., 2001), και για το σύμπλοκο Smad3/Smad4 στον υποκινητή του c-Jun (Inman et al., 2002). Επίσης, μερικές αποκρίσεις στον TGFβ, όπως η επαγωγή της έκφρασης του p15 (Ink4B) απαιτεί ταυτόχρονη ενεργοποίηση των Smad2 και Smad3 και ταυτόχρονη αλληλεπίδρασή τους με την Smad4 (Feng et al., 2000). Το ετεροτριμερές μοντέλο (**Εικόνα 6**) επιτρέπει την αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών μορίων R-Smad με την Smad4. Συνεπώς, είναι πιθανά διαφορετικά R-Smad-Co-Smad ολιγομερή με ποικίλες στοιχειομετρίες. (Jayaraman & Massague, 2000).

Παρά τον διαφορετικό έλεγχο που υφίστανται κατά την ανάπτυξη, οι R-Smads και η Smad4 εκφράζονται στα περισσότερα, αν όχι σε όλα, τα κύτταρα. Αντιθέτως, η έκφραση των I-Smads υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο εξωκυττάρων σημάτων. Η επαγωγή της έκφρασης των Smad6 και Smad7 από τους συνδέτες BMP και TGFβ αντίστοιχα, αποτελεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έναν αυτοκατασταλτικό μηχανισμό της σηματοδότησης (Moustakas et al., 2001). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και άλλων υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, η ενεργοποίηση της σηματοδότησης της ιντερφερόνης – γ μέσω των πρωτεϊνών STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) καθώς και η ενεργοποίηση του NF-kB από τον TNFα (Tumour Necrosis Factor α) επάγουν την έκφραση της Smad7 και συνεπώς καταστέλλουν την TGFβ σηματοδότηση (Massague et al., 2000, Itoh et al., 2000, Moustakas et al., 2001). Η ενεργοποίηση των ανασταλτικών Smad6/7 πρωτεϊνών από

διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια καθώς επίσης και τα σηματοδοτικά πολυπρωτεϊνικά κέντρα του TGFβ που προαναφέρθηκαν δείχνονται στην **Εικόνα 7**.

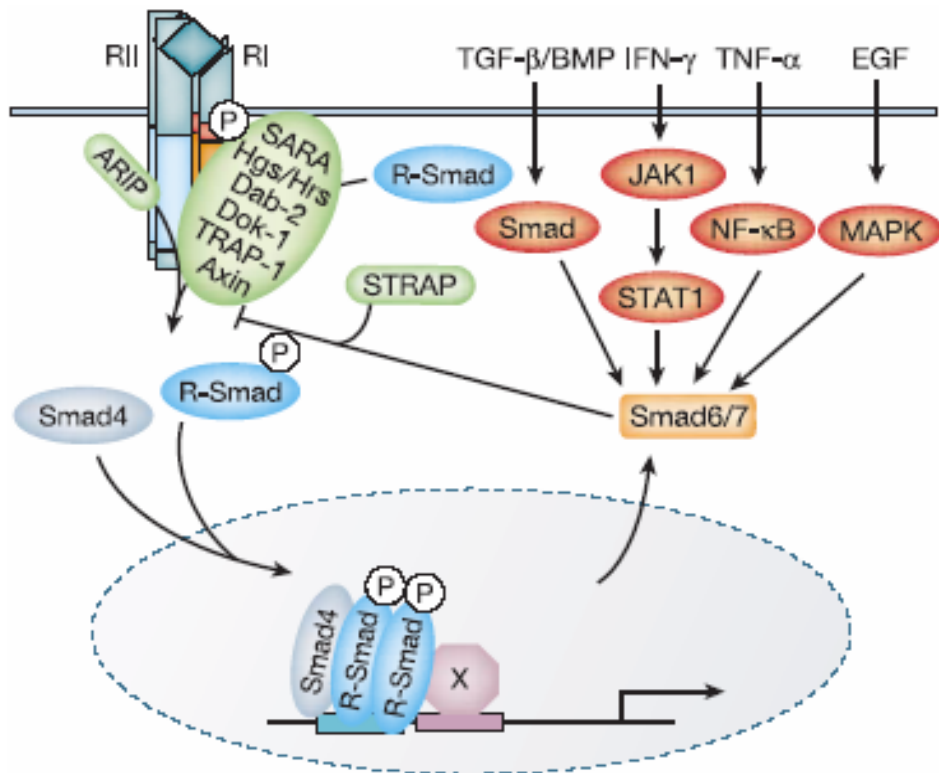


**Εικόνα 5. Δομή και λειτουργίες των Smad πρωτεϊνών.** Η MH1 περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA των Smad πρωτεϊνών, για τον πυρηνικό εντοπισμό τους και για την αλληλεπίδραση με παράγοντες όπως ο HNF4, ο Sp1 και οι HDACs, ενώ η MH2 για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς, άλλες Smads και DNA προσδεδεμένοι συναρμόνιοι. Στο κάτω μέρος απεικονίζονται οι κρυσταλλογραφικές δομές των MH1 και MH2 περιοχών (Massague, Wotton.,2000).



**Εικόνα 6. Ολιγομερισμός των Smad πρωτεϊνών.** Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς φωσφορυλιώνουν τις R-Smads, οι οποίες συμβολίζονται με ανοικτό μπλε χρώμα, στο C-τελικό τους άκρο με αποτέλεσμα τον ομο-ολιγομερισμό τους. Ο ετερο-ολιγομερισμός τους με την Co-Smad, που συμβολίζεται με σκούρο μπλε χρώμα, οδηγεί στον σχηματισμό διμερών και τριμερών συμπλόκων. Οι μικροί μαύροι κύκλοι συμβολίζουν την φωσφορυλίωση της SSXS αλληλουχίας και τα διπλής κατεύθυνσης βέλη συμβολίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του C-τελικού φωσφορυλιωμένου άκρου και της MH2 περιοχής (Moustakas et al., 2001).





**Εικόνα 7.** Η ενεργοποίηση των R-Smads ρυθμίζεται από πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς και από τις ανασταλτικές Smad6/7. Οι πρωτεΐνες με το πράσινο χρώμα συμμετέχουν στην συγκρότηση κέντρων σηματοδότησης του TGFβ. Η έκφραση των Smad6/7 επάγεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων αυτών των TGFβ/BMP και καταστέλλουν την ενεργοποίηση των R-Smads. Η STRAP πρωτεΐνη αλληλεπιδρά τόσο με τους υποδοχείς τύπου I και τύπου II, όσο και με την Smad7, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση της τελευταίας με το σύμπλοκο των υποδοχέων (Derynck and Zhang, 2003).

## Πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση των Smads

Μετά την πρόσδεση του συνδέτη του TGFβ οι υποδοχείς παραμένουν ενεργοί για 3-4 ώρες τουλάχιστον και αυτή η συνεχής ενεργοποίηση των υποδοχέων διατηρεί τα σύμπλοκα των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων (Inman et al., 2002). Απουσία ενεργοποίησης, όλες οι R-Smads εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα, ενώ η Smad4 και οι I-Smads εντοπίζονται στον πυρήνα του κυττάρου (Inman et al., 2002, Watanabe et al., 2000, Xiao et al., 2001, Itoh et al., 2001, Hanyu et al., 2001). Με πειράματα συν-κατακρήμνισης έχει δειχθεί ότι οι φωσφορυλιωμένες από τον υποδοχέα R-Smads σχηματίζουν σύμπλοκα με την Smad4, πιθανότατα πριν τη μετάβαση των συμπλόκων στον πυρήνα (Lagna et al., 1996), πιθανότητα που ενισχύεται από μελέτες με μεταλλαγμένες μορφές της Smad4 που στερούνται της ικανότητας μετάβασης στον πυρήνα, αλλά παρόλα αυτά μπορούν να σχηματίζουν ολιγομερή με τις R-Smads (Moren et al., 2000). Αρχικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η μετακίνηση των R-Smads στον πυρήνα είναι ανεξάρτητη της Smad4, ενώ η μετακίνηση της Smad4 μετά την TGFβ σηματοδότηση φαίνεται να απαιτεί την παρουσία μιας ενεργοποιημένης R-Smad (Hoodless et al., 1999, Liu et al., 1997).

Η MH1 περιοχή όλων των Smads περιέχει ένα μοτίβο πλούσιο σε λυσίνες, το οποίο στην περίπτωση των Smad1, Smad3 έχει δειχθεί ότι λειτουργεί ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού, NLS (nuclear localization signal) (Xiao et al., 2000, Xiao et al., 2001). Στην περίπτωση της Smad3, η C-τερματική φωσφορυλίωση οδηγεί σε αλλαγές στην διαμόρφωση του μορίου με αποτέλεσμα την έκθεση του NLS με τέτοιο τρόπο που επιτρέπει την πρόσδεση της ιμφορτίνης β1 και την επαγωγή της Ran-εξαρτημένης πυρηνικής εισόδου (Kurisaki et al., 2001, Xiao et al., 2000). Αντιθέτως, η Smad2, η οποία περιέχει επίσης την πλούσια σε λυσίνες αλληλουχία στην MH1 περιοχή της, απελευθερώνεται από την SARA μετά την C-τερματική της φωσφορυλίωση και μεταβαίνει στον πυρήνα με την αρωγή ενός κυτταροπλασματικού παράγοντα, ανεξάρτητου της ιμφορτίνης, ο οποίος απαιτεί την ακεραιότητα της MH2 περιοχής (Xu et al., 2000). Η διαφορά ανάμεσα στις δύο R-Smads, Smad3 και Smad2 που υπάγονται στο TGFβ μονοπάτι και στο μονοπάτι της ακτιβίνης, έγκειται στην παρουσία του μοναδικού εξονίου 3 στην MH1 περιοχή της Smad2 (Kurisaki et al., 2001). Έτσι, ανεξάρτητα από την παρουσία της κοινής, πλούσιας σε λυσίνες,

αλληλουχίας στην MH1 περιοχή, υπάρχουν μοναδικοί δομικοί καθοριστές της πυρηνικής εισόδου οι οποίοι είναι διαφορετικοί για τις διαφορετικές Smads.

Έχουν αναγνωριστεί εναλλακτικές μορφές ομματισμού της Smad4 του *Xenopus* οι οποίες οδηγούν στην συνεχή είσοδο της Smad4 στον πυρήνα. Ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της Smad4 σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα οφείλεται αφενός στην παρουσία ενός συστατικά ενεργοποιημένου NLS στην περιοχή MH1 (Inman et al., 2002, Xiao et al., 2003 ) και αφετέρου σε ενεργή έξοδο από τον πυρήνα (Pierreux et al., 2000, Watanabe et al., 2000). Αυτή η έξοδος επάγεται από ένα πλούσιο σε λυσίνες σήμα πυρηνικής εξόδου NES (nuclear export signal) το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή του linker της Smad4 όσο και στην MH1 περιοχή και καταλύεται από την εξαπορτίνη Crm1. Συνεπώς, η Smad4 μεταφέρεται συνεχώς από και προς τον πυρήνα. Τα σύμπλοκα της Co-Smad με τις R-Smads μπορεί να σχηματίζονται στον πυρήνα ή στην πορεία προς τον πυρήνα, και ο σχηματισμός αυτός ενδεχομένως να καλύπτει το NES με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των συμπλόκων στον πυρήνα. Το σήμα πυρηνικής εξόδου, NES είναι συντηρημένο μεταξύ των Smads αλλά είναι ενεργό μόνο σε συγκεκριμένες Smads. Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι Smad2 και Smad3 εξέρχονται από τον πυρήνα μετά από παρατεταμένη παρουσία του συνδέτη TGFβ (Pierreux et al., 2000). Στην συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι αυτές οι Smads αποφωσφορυλιώνονται συνεχώς, με αποτέλεσμα τον αποσχηματισμό των συμπλόκων και την έξοδο των ανενεργών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα (Inman et al., 2002). Δεν έχει αναγνωριστεί συγκεκριμένο ενεργό NES σήμα στις Smad2 και Smad3, ωστόσο είναι γνωστό ότι η Smad2 εξέρχεται από τον πυρήνα με την αρωγή της νουκλεοπορίνης Nup153 (Xu et al., 2002).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ έχει αναπτύξει πολλούς μηχανισμούς παρακολούθησης της ενεργότητας των υποδοχέων γεγονός που υποδεικνύεται από την συνεχή μετακίνηση των Smads από και προς τον πυρήνα, ακόμα και σε κύτταρα στα οποία οι υποδοχείς είναι ενεργοί. Παρουσία μεγάλης ποσότητας συνδέτη, οι ίδιες Smads μπορούν να επαναφωσφορυλιωθούν προκειμένου να διατηρήσουν την παρατεταμένη σηματοδότηση, δεδομένου του περιορισμένου αριθμού Smad μορίων ανά κύτταρο. Με το πέρας της σηματοδότησης οι Smads μπορούν ταχύτατα να επιστρέψουν στο κυτταρόπλασμα, σταματώντας άμεσα την μεταγραφή γονιδίων στόχων από την στιγμή που οι υποδοχείς σταματήσουν να ενεργοποιούνται (Reguly and Wrana, 2003).

## Πυρηνική σηματοδότηση

Όλες οι Smads παρουσιάζουν μεταγραφική δραστηριότητα (Itoh et al., 2000, Massague and Wotton, 2000). Τα ετερομερή R-Smad-Co-Smad αποτελούν ενδογενείς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι I-Smads έχει δειχθεί ότι εμφανίζουν μεταγραφική δραστηριότητα, η σημασία της οποίας δεν έχει ακόμη διαλευκανθεί (Bai et al., 2000, Hill-Karturczak et al., 2000, Pulaski et al., 2001).

Οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες προσδένονται απευθείας αλλά με χαμηλή συνάφεια σε Smad-προσδενόμενα στοιχεία DNA, SBEs (Smad-binding elements), με το ελάχιστο μοτίβο αλληλουχίας 5' CAGAC 3'. Η πρόσδεση αυτή επιτυγχάνεται μέσω μιας συντηρημένης θηλιάς με δομή β-φουρκέτας (β-hairpin) της MH1 περιοχής. Ειδικά για την Smad3 υπάρχουν πρόσθετες αλληλουχίες της MH1 περιοχής που συνεισφέρουν στην πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA, όπως η α-έλικα 2 (α-helix 2) (Kusanagi et al., 2001). Αντιθέτως, η Smad2 δεν προσδένεται σε SBE λόγω της ύπαρξης μιας επιπρόσθετης αλληλουχίας 20 αμινοξέων στην MH1 περιοχή της, η οποία κωδικοποιείται από το εξόνιο 3 και η οποία παρεμποδίζει τον σχηματισμό της δομής β-φουρκέτας (Yagi et al., 1999). Επίσης, οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες προσδένονται σε GC-πλούσια μοτίβα υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων, γεγονός που υποδεικνύει μια χαμηλή ειδικότητα πρόσδεσης της MH1 περιοχής στο DNA (Labbe et al., 1998).

Τα παραπάνω παραδείγματα αφορούν την Smad-επαγόμενη ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε το πρώτο παράδειγμα της Smad-επαγόμενης καταστολής της γονιδιακής έκφρασης όπου οι εμπλεκόμενες αλληλουχίες DNA είναι διαφορετικές από τα SBEs και τα GC-πλούσια μοτίβα (Alliston et al., 2001, Chen et al., 2001). Θα πρέπει ωστόσο να διερευνηθεί περαιτέρω αν οι Smads προσδένονται άμεσα ή έμμεσα σε αυτές τις διαφορετικές αλληλουχίες.

Η μεταγραφική ενεργότητα των Smads χαρτογραφείται στην MH2 περιοχή της πρωτεΐνης και είναι γνωστό ότι επάγεται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης της MH2 περιοχής με συνενεργοποιητές όπως ο p300 και ο pCAF (p300 and CBP-associating factor) (**Εικόνα 8A**) (Itoh et al., 2000a, Itoh et al., 2000b). Ειδικά η Smad4 εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad συμπλόκων στον πυρήνα, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση των R-Smads με το DNA και τους συνενεργοποιητές CBP/p300. Ο σημαντικός αυτός ρόλος της Smad4 οφείλεται στην παρουσία μιας μεταγραφικά ενεργής περιοχής που

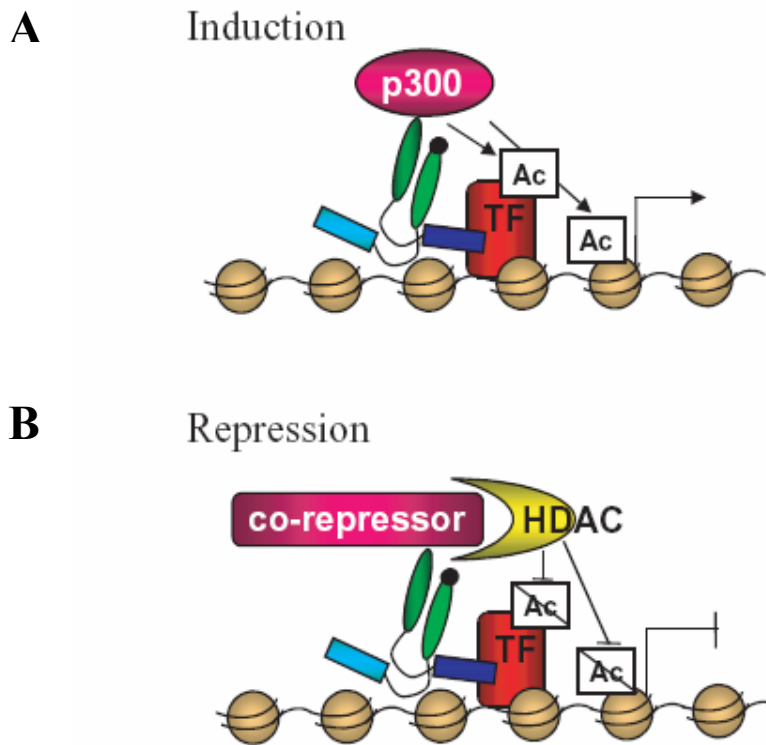
ονομάζεται SAD (Smad-activation domain). Η περιοχή SAD επιτρέπει ισχυρότερη πρόσδεση της Smad4 με τους CBP/ p300 μέσω μιας μοναδικής διαμόρφωσης της MH2 περιοχής της Smad4 (Chacko et al., 2001, de Caestecker et al., 2000b).

Έχει καταγραφεί ότι η MH1 περιοχή της Smad3, σχετίζεται με ενεργότητα απακετυλάσης ιστονών (HDAC), αλλά δεν είναι γνωστό αν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση των Smads με τις HDACs (Liberati et al., 2001). Εναλλακτικά, οι Smads αλληλεπιδρούν με συν-καταστολείς οι οποίοι με τη σειρά τους προσελκύουν HDACs (**Εικόνα 8B**). Τέτοιοι συν-καταστολείς είναι η homeodomain DNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη TGIF (Wotton et al., 1999) καθώς και τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων Ski και SnoN (Liu., Sun et al., 2001). Αυτοί οι συν-καταστολείς αλλάζουν την πυρηνική ενεργότητα των Smads, και μάλιστα τα επίπεδα έκφρασης των συν-καταστολέων καθορίζουν το βαθμό της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smads.

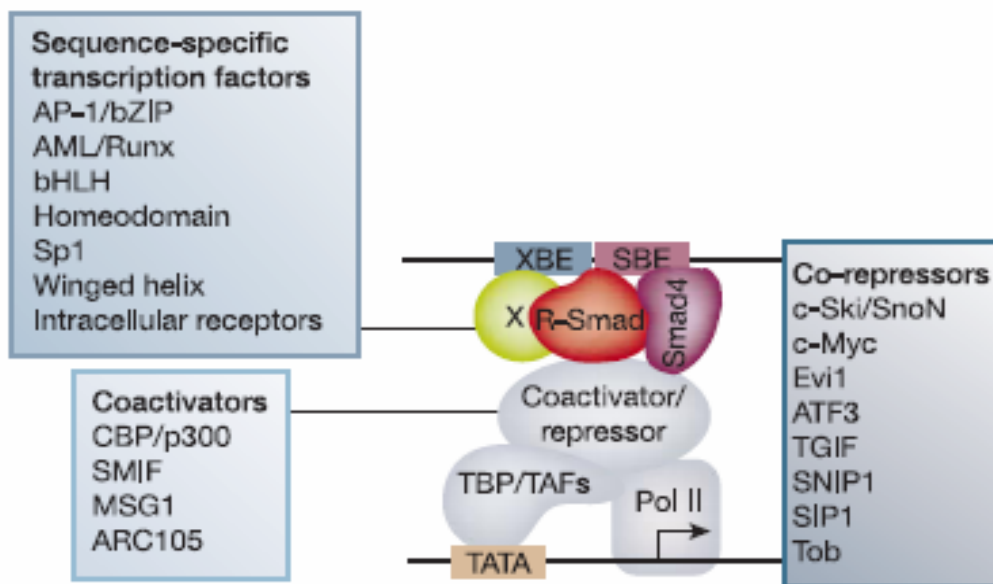
Ο TGFβ αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας την μεταγραφή των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως η c-Myc και μέλη της οικογένειας Id που καταστέλλονται μεταγραφικά από τον TGFβ (Chen et al., 2002, Kang et al., 2003). Συγκεκριμένα, η Smad3 καταστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου c-Myc σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F4 και E2F5 και τον συν-καταστολέα p107. Το σύμπλοκο αυτό προσχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα και παρουσία της TGFβ ενεργοποίησης μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με την Smad4 προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου c-Myc και καταστέλλει την έκφρασή της (Chen et al., 2002). Επίσης, η TGFβ ενεργοποιημένη Smad3 επάγει άμεσα την έκφραση της ATF3, με την οποία σχηματίζει σύμπλοκο που καταστέλλει τον Id1 υποκινητή (Kang et al., 2003). Ομοίως, η TGFβ επαγόμενη SIP1 καταστέλλει την έκφραση της E-cadherin (Comijn et al., 2001). Επιπρόσθετα, ο TGFβ αναστέλλει την διαφοροποίηση μυοβλαστών, οστεοβλαστών και αδικοκυττάρων μέσω λειτουργικής καταστολής μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν αυτά τα μονοπάτια διαφοροποίησης. Έτσι, η Smad3 καταστέλλει την μεταγραφική δράση του Runx2/CBFA1 (core-binding factor, runt domain, α-υπομονάδα) κατά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Alliston et al., 2001). Ακόμη, η Smad3 καταστέλλει την δράση της MyoD και άλλων μυογενετικών basic helix-loop-helix (bHLH) μεταγραφικών παραγόντων στους μυοβλάστες, αλληλεπιδρώντας με την HLH περιοχή τους και εμποδίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον διμερισμό αυτών των παραγόντων και την αποτελεσματική πρόσδεσή τους στο DNA (Liu et al., 2001).

Τέλος, η Smad3 καταστέλλει την δράση των CCAAT/enhancer-binding πρωτεϊνών (C/EBPs) κατά την διαφοροποίηση των αδιποκυττάρων (Choy et al., 2003).

Συνεπώς, η απαιτούμενη μεταγραφική δραστηριότητα του Smad μονοπατιού επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών SBE μοτίβων σε υποκινητές γονιδίων στόχων των Smad πρωτεϊνών, και μέσω πρόσθετων μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τις Smads. Στην **Εικόνα 9** περιγράφονται κάποιες από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα των R-Smads/Smad4. Η πληθώρα αυτών των μεταγραφικών παραγόντων και γενικότερα των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις Smads παρέχει επίσης μια μηχανιστική ερμηνεία της καταγεγραμμένης συνεργασίας του Smad μονοπατιού με πολλά άλλα σηματοδοτικά δίκτυα, τα οποία ποικίλουν από το Ras/MAPK μονοπάτι μέχρι το δίκτυο σηματοδότησης των πυρηνικών υποδοχέων (Itoh et al., 2000b, Massague 2000).



**Εικόνα 8. Ρύθμιση της μεταγραφής από τις Smad πρωτεΐνες.** **A.** Ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Οι Smads που απεικονίζονται ως ετεροδιμερή, αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες (TF) που προσδένονται στο DNA, και προσελκύουν συνενεργοποιητές όπως ο εικονιζόμενος p300 ο οποίος ακετυλιώνει τον TF ή/και τις ιστόνες της χρωματίνης. Το βέλος που ξεκινά από την χρωματίνη, που εικονίζεται σε διαμόρφωση νουκλεοσωμάτων, συμβολίζει επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. **B.** Γονιδιακή καταστολή. Τα ετερομερή των Smad πρωτεϊνών προσελκύουν συνκαταστολείς, όπως ο c-Ski, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με απακετυλάσες ιστονών (HDACs). Οι τελευταίες απακετυλιώνουν τον TF ή/και τις ιστόνες. Η κάθετη γραμμή που ξεκινά από την χρωματίνη υποδηλώνει καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή και συνεπώς, της γονιδιακής έκφρασης (Moustakas et al., 2001).



**Εικόνα 9. Αλληλεπίδραση των R-Smad/Smad4 συμπλόκων με μεταγραφικούς παράγοντες, συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς.** Το R-Smad/Smad4 σύμπλοκο συνεργάζεται με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (X) που προσδένονται με μεγάλη ειδικότητα σε αλληλουχίες DNA (X Binding Element, XBE), αλλά και το ίδιο προσδένεται με μικρή συνάφεια σε αλληλουχίες DNA (Smad Binding Element, SBE), προκειμένου να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Οι R-Smads αλληλεπιδρούν άμεσα με τους συνενεργοποιητές CBP/p300, αλλά και η Smad4 λειτουργεί ως συνενεργοποιητής των R-Smads, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση τους με τους CBP/p300. Οι συνενεργοποιητές SMIF, MSG1 και ARC105 ρυθμίζουν τον βαθμό της Smad επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους συνκαταστολείς καταστέλλει την μεταγραφική τους ενεργότητα. Οι συνκαταστολείς c-Ski, SnoN, c-Myc και Evi1 εκφράζονται από πρωτοογκογονίδια. Οι συνκαταστολείς TGIF (TGFβ induced factor) και SNIP1 (Smad nuclear interacting protein) καταστέλλουν και TGFβ-ανεξάρτητες μεταγραφικές αποκρίσεις. Η αλληλεπίδραση του συνκαταστολέα Tob με την Smad2 καταστέλλει την έκφραση της ιντερλευκίνης 2 σε T κύτταρα (Derynck and Zhang, 2003).



## Απώλεια της TGFβ επαγόμενης κυτταροστατικής δράσης στον καρκίνο

Δεδομένων των αντιπολλαπλασιαστικών και αποπτωτικών λειτουργιών του TGFβ, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι αυτό το μονοπάτι καταστέλλεται από σωματικές μεταλλάξεις σε περιπτώσεις καρκίνου. Εκτός, από τις σωματικές μεταλλάξεις, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις και σε γενετικά κύτταρα, καθώς και άλλες κληρονομήσιμες ανωμαλίες συστατικών του TGFβ μονοπατιού που προδιαθέτουν για καρκινογένεση (Derynck et al., 2001, Massague et al., 2000, Wakefield et al., 2000).

**Μεταλλάξεις στους TGFβ υποδοχείς.** Έχουν αναφερθεί τόσο σποραδικές όσο και κληρονομήσιμες περιπτώσεις καρκίνων του ορθού. Οι περιπτώσεις αυτές σχετίζονται με μεταλλάξεις – ενθέσεις ή απαλοιφές – της περιοχής που κωδικοποιεί για την εξωκυτταρική περιοχή του TβRII, με αποτέλεσμα ελλειμματικές ή ανενεργές μορφές του υποδοχέα. Αυτού του τύπου οι καρκίνοι εμφανίζουν φαινότυπο MSI (microsatellite instability) και περιγράφουν διπλοειδείς όγκους με ελλατωματικά γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (Markowitz et al., 1995, Lu et al., 1996). Τέτοιες μεταλλάξεις απαντώνται και σε MSI γαστρικούς όγκους (Myeroff et al., 1995) και γλοιώματα (Izumoto et al., 1997), αλλά είναι σχετικά σπάνιες σε περιπτώσεις MSI καρκίνων του ενδομητρίου, του ήπατος και του μαστού (Myeroff et al., 1995, Tomita et al., 1999, Furuta et al., 1999). Μεταλλάξεις που στοχεύουν τους TβRI έχουν παρατηρηθεί σε καρκίνους των ωοθηκών (Wang et al., 2000), του μαστού (Chen et al., 1998) και του παγκρέατος (Goggins et al., 1998), καθώς και σε T-κυτταρικά λεμφώματα (Schiemann et al., 1999). Τα παραπάνω στοιχεία υποδεικνύουν ότι απώλεια της ευαισθησίας σε TGFβ μπορεί να συνεισφέρει στον σχηματισμό συγκεκριμένων τύπων όγκων. Συνεχής ενεργοποίηση της TGFβ σηματοδότησης σε οργανισμούς μοντέλα υποδεικνύει την ογκοκατασταλτική φύση αυτού του μονοπατιού. Έτσι, εκτοπική έκφραση ενεργού TGFβ σε κερατινοκύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία διαγονιδικών ποντικών που είναι ανθεκτικοί σε χημικά επαγόμενη επιδερμική υπερπλασία (Wang et al., 1999) και δερματική ογκογένεση (Cui et al., 1996).

**Μεταλλάξεις των Smads.** Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Smad4 αρχικά χαρακτηρίστηκε ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο του χρωμοσώματος 18q21, για αυτό και το αρχικό του όνομα ήταν DPC4 (deleted in pancreatic carcinoma locus 4) (Hahn et al., 1996). Η Smad4 πρωτεΐνη είναι μεταλλαγμένη σε σημαντικό ποσοστό των εντερικών όγκων (Takagi et al., 1996, MacGrogan et al., 1997), ενώ απαντάται πιο

σπάνια σε περιπτώσεις καρκίνων του μαστού, των ωοθηκών (Schutte et al., 1996), κεφαλής και λαιμού (Kim et al., 1996), του προστάτη (MacGrogan et al., 1997), του οισοφάγου και του στομάχου (Lei et al., 1996). Γενετικές μεταλλάξεις της Smad4 σχετίζονται με το σύνδρομο πολυπόδων στους εφήβους (Juvenile polyposis syndrome, JPS). Το JPS εμφανίζεται τόσο κατά την εφηβεία όσο και κατά την δεκαετία των 50 και χαρακτηρίζεται από γαστρεντερολογικούς αιμορραγικούς πολύποδες. Οι ασθενείς που εμφανίζουν αυτό το σύνδρομο έχουν 10-50% πιθανότητες να εμφανίσουν καρκίνο κατά την διάρκεια της ζωής τους, με κυριότερο εκείνον του εντέρου (Waite and Eng, 2003). Οι περισσότερες μεταλλάξεις της Smad4 που σχετίζονται με το JPS χαρτογραφούνται στο C-τερματικό μισό του γονιδίου και συνεπώς θεωρείται ότι επηρεάζουν την ικανότητα της πρωτεΐνης να σχηματίζει ομο-ολιγομερή και να επάγει την TGFβ σηματοδότηση (Shi et al., 1997).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την Smad2 εντοπίζεται επίσης στο χρωμόσωμα 18q21, και αποτελεί επίσης στόχο μεταλλάξεων σε περιπτώσεις καρκίνων του εντέρου (Eppert et al., 1996) και των πνευμόνων (Ushida et al., 1996). Εκτός από μεγάλες απαλοιφές σε ολόκληρη την περιοχή που κωδικοποιεί την Smad4, οι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν τις Smad2 και Smad4 σε καρκίνους περιλαμβάνουν μικρές απαλοιφές, και μεταλλάξεις χωρίς νόημα, με λάθος νόημα ή μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου. Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις επηρεάζουν κυρίως την MH2 περιοχή, περιγράφονται στην **Εικόνα 10** και εμπίπτουν σε τέσσερις διακριτές ομάδες ανάλογα με το πώς επηρεάζουν την διαμόρφωση της MH2 περιοχής και την λειτουργία της πρωτεΐνης (**Εικόνα 11**).

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μεταλλάξεις που προέρχονται από όγκους και επηρεάζουν περιοχές που εμπλέκονται στην διατήρηση της δομής του πυρήνα του β-sandwich (**Εικόνα 11**). Τέτοιες μεταλλάξεις είναι οι αντικαταστάσεις Leu440Arg και Pro445His στην Smad2 και η Arg441Pro στην Smad4 πρωτεΐνη. Οι μεταλλάξεις αυτές προβλέπεται, από κρυσταλλογραφικές αναλύσεις, να επηρεάζουν την διαμόρφωση της MH2 περιοχής, και όπως αναμενόταν, μειώνουν την σταθερότητα αυτών των πρωτεϊνών (Shi et al., 1997, Eppert et al., 1996).

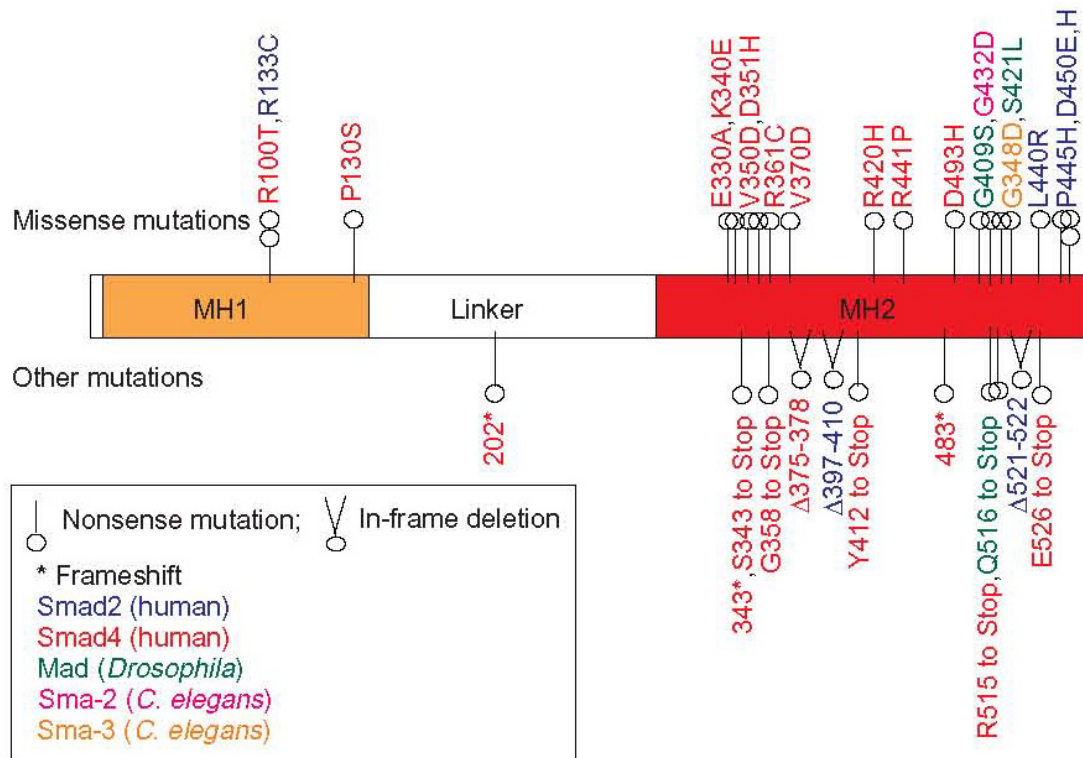
Η δεύτερη ομάδα αφορά μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης των μονομερών που σχηματίζουν το MH2 ομοτρίμερες (**Εικόνα 11**). Σχεδόν οι μισές από τις ογκογονικές μεταλλάξεις του γονιδίου Smad4 εμπίπτουν σε αυτήν την κατηγορία. Οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την loop/helix περιοχή (Val350Asp, Asp351His, Arg361Cys και Val370Asp στην Smad4) ή την three-helix

bundle περιοχή (Asp450Glu Asp450His της Smad2, και Asp493His της Smad4). Οι περισσότερες επηρεάζουν περιοχές που σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική δομή συμμετέχουν σε σημαντικούς δεσμούς υδρογόνου ή σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις επιφανειών του τριμερούς. Το αποτέλεσμα είναι η αποσταθεροποίηση του ομοτριμερούς και η αναστολή σχηματισμού Smad2-Smad4 συμπλόκων (Shi et al., 1997).

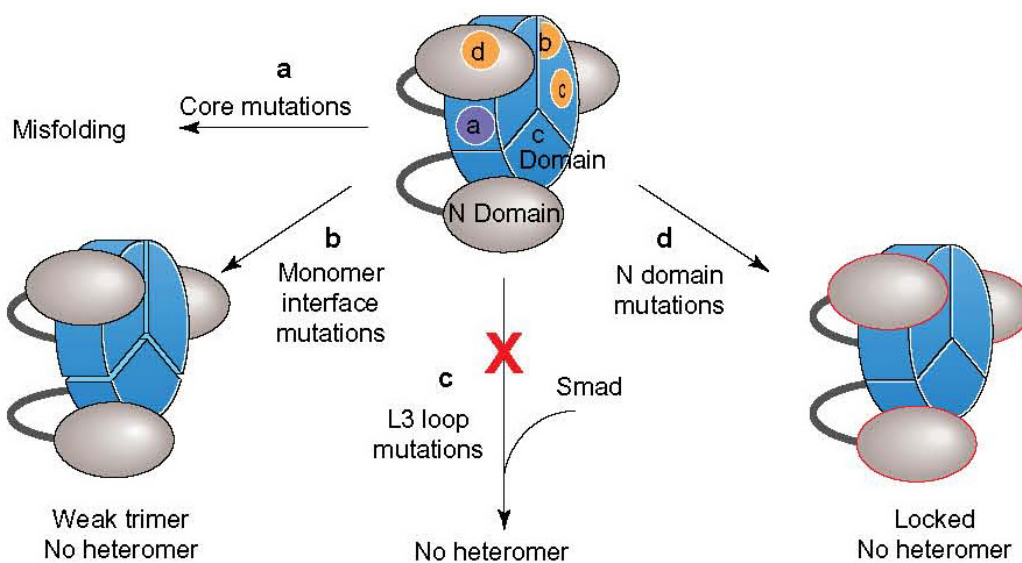
Η τρίτη ομάδα μεταλλάξεων αντικατάστασης χαρτογραφούνται στην περιοχή που καλείται θηλιά L3 (**Εικόνα 11**). Η δομή αυτή προεξέχει από κάθε μονομερές στην C-τερματική πλευρά του τριμερούς δίσκου (Shi et al., 1997). Η L3 θηλιά δεν συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονομερών αλλά, καθώς είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια, μπορεί να συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις των Smads με άλλες πρωτεΐνες. Πράγματι, μεταλλάξεις στην L3 θηλιά της Smad2 (Gly421Ser) ή της Smad4 (Gly508Ser) δεν επηρεάζουν τον ομο-ολιγομερισμό τους. Ωστόσο, μεταλλάξεις στην L3 θηλιά της Smad2 αποτρέπουν την αλληλεπίδραση της τελευταίας με τον TGFβ υποδοχέα (Macias-Silva et al., 1996, Lo et al., 1998). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η L3 θηλιά όχι μόνο είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους υποδοχείς αλλά και ότι δρα καθοριστικά για την ειδικότητα αυτής της αλληλεπίδρασης (Lo et al., 1998). Είναι αξιοσημείωτο ότι στην Smad4, η οποία δεν αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς, η θηλιά L3 απαιτείται για την αλληλεπίδρασή της με τις R-Smads (Shi et al., 1997).

Μόνο λίγες ογκογονικές μεταλλάξεις αντικατάστασης έχουν εντοπιστεί στην MH1 περιοχή. Δύο από αυτές τις μεταλλάξεις επηρεάζουν την ίδια συντηρημένη περιοχή της Smad2 (Arg133Cys) σε καρκινώματα του εντέρου (Eppert et al., 1996) και της Smad4 (Arg100Thr) σε καρκινώματα του παγκρέατος (Schutte et al., 1996). Αυτές οι μεταλλάξεις αυξάνουν την συγγένεια της MH1 περιοχής για την MH2 περιοχή, κλειδώνοντας τις Smads σε ανενεργή διαμόρφωση. Οι Smad2 και Smad4 που περιέχουν αυτές τις μεταλλάξεις σχηματίζουν ομο-ολιγομερή αλλά δεν σχηματίζουν Smad2-Smad4 σύμπλοκα, παρουσία του TGFβ, και συνεπώς δεν ενεργοποιούν την μεταγραφή γονιδίων στόχων (Hata et al., 1997). Καθώς η MH1 περιοχή της Smad4 συνεισφέρει στην πρόσδεση στο DNA του συμπλόκου Fast-1-Smad2-Smad4, είναι πιθανόν η μεταλλαγμένη Smad4 (Arg100Thr) να καταστέλλει την μεταγραφή αναστέλλοντας την πρόσδεση του συμπλόκου στο DNA. Ετερομερή σύμπλοκα μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου μορφών των Smads στα κύτταρα μπορεί

να καταστέλλουν την δραστικότητα ολόκληρου του συμπλόκου δρώντας ως αρνητικός επικρατούντα μόρια (Hata et al, 1998).



**Εικόνα 10. Μεταλλάξεις των Smad-κωδικοποιημένων γονιδίων στον καρκίνο.** Η Smad4 πρωτεΐνη είναι σημειακά μεταλλαγμένη ή ελλειμματική σε μεγάλο αριθμό καρκίνων του παγκρέατος. Οι Smad2 και Smad4 πρωτεΐνες είναι μεταλλαγμένες σε μικρό αριθμό καρκινωμάτων άλλης προέλευσης. Οι περισσότερες σημειακές μεταλλάξεις χαρτογραφούνται στις συντηρημένες MH1 και MH2 περιοχές (Hata et al., 1998).



**Εικόνα 11. Οι τέσσερις ομάδες μεταλλάξεων των Smad πρωτεϊνών που σχετίζονται με καρκινογένεση.** Οι ογκογόνες μεταλλάξεις των Smad πρωτεϊνών κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις διακριτές ομάδες (a-d), ανάλογα με την θέση τους και τις επιπτώσεις τους στη λειτουργία των Smad. **(a)** Αυτή η ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζει περιοχές της δομής β-sandwich και μειώνουν την σταθερότητα των πρωτεϊνών. **(b)** Η δεύτερη ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζει τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης μονομερών και συνεπώς παρεμποδίζουν τον σχηματισμό ομοπολυμερών και αναστέλλουν τον σχηματισμό ετεροπολυμερών. **(c)** Η Τρίτη ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζουν την περιοχή της θηλιάς L3 και αναστέλλουν τον σχηματισμό ετεροπολυμερών μεταξύ των R-Smads και της Smad4. **(d)** Συγκεκριμένες μεταλλάξεις στην MH1 περιοχή αυξάνουν την συνάφεια μεταξύ των MH1 και MH2 περιοχών, με αποτέλεσμα την ανενεργή διαμόρφωση του Smad μορίου. (Hata et al., 1998).

## Προ-διεισδυτικές και μεταστατικές λειτουργίες του TGFβ

Είναι λίγες οι περιπτώσεις στις οποίες τα καρκινικά κύτταρα καθίστανται ανθεκτικά στην κυτταροστατική και αποπτωτική δράση του TGFβ, λόγω απώλειας του υποδοχέα ή των Smad λειτουργιών. Συνήθως, η έλλειψη ανταπόκρισης στην δράση της κυτοκίνης που εμφανίζουν τα καρκινικά κύτταρα οφείλεται στο ότι τα τελευταία χρησιμοποιούν τον TGFβ ως παράγοντα που προάγει την καρκινογένεση. Έτσι, διαγονιδιακά ποντίκια που υπερεκφράζουν τον TGFβ στο ήπαρ είναι περισσότερο επιρρεπή στην χημικά επαγόμενη ηπατοκαρκινογένεση (Factor et al., 1997). Επίσης, διαλυτές μορφές του TGFβ υποδοχέα που δεσμεύουν τον συνδέτη TGFβ μειώνουν τη μετάσταση όγκων του θηλαστικού αδένα στον πνεύμονα σε διαγονιδιακά και μη ποντίκια (Bandyopadhyay et al., 1999, Muraoka et al., 2002, Yang et al., 2002).

Αυξημένη παραγωγή του TGFβ παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνου και σχετίζεται με τον βαθμό της καρκινογένεσης (Derynck et al., 2001). Ο TGFβ που προέρχεται από όγκους επηρεάζει διάφορους τύπους κυττάρων που βρίσκονται κοντά στην περιοχή όπου αναπτύσσεται ο όγκος, όπως ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Ωστόσο, ο TGFβ επιδεικνύει ογκογενετική δράση και στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό έχει δειχθεί με υπερέκφραση είτε ενεργών είτε αρνητικώς επικρατούντων μορφών του TGFβ υποδοχέα σε διάφορους τύπους καρκίνων, όπως μεταστατικά καρκινικά κύτταρα του εντέρου (Ott et al., 1998), ή καρκινικά κύτταρα του μαστού που κάνουν μετάσταση στα οστά (Yin et al., 1999).

**Ανοσοκαταστολή.** Η ικανότητα του TGFβ να καταστέλλει την αύξηση των αιμοποιητικών κυττάρων χρησιμοποιείται προς όφελος των όγκων που υπερεκφράζουν αυτήν την κυτοκίνη. Οι εμφανιζόμενοι όγκοι καταστέλλουν την λειτουργία τόσο των CTLs όσο και των βοηθητικών T λεμφοκυττάρων. Επιπλέον, ο TGFβ καταστέλλει την ενεργοποίηση των T-κυττάρων μέσω αρνητικής δράσης στους ενεργοποιητές τους, τα αντιγονοπαρουσιαστικά δενδριτικά κύτταρα (antigen-presenting cells, APCs). Αυξημένος αριθμός ανώριμων μη ενεργών δενδριτικών κυττάρων συνεισφέρει στην T-κυτταρική ανεργία και αύξηση του όγκου λόγω ανεπαρκούς παρουσίασης ογκοειδικών αντιγόνων (Geissmann et al., 1999). Τέλος, ο TGFβ καταστέλλει την έκφραση μορίων του μέγιστου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξεως II μέσω ενός Smad3 εξαρτημένου μηχανισμού (Dong et al., 2001). Τα

παραπάνω υποδεικνύουν ότι ο TGFβ επάγει την πρόοδο της καρκινογένεσης, μέσω ανοσοκαταστολής.

**Αγγειογένεση.** Η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να επάγουν τον σχηματισμό νέων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία είναι σημαντική για την πρόοδο της ογκογένεσης και την μετάσταση ενός νεοπλάσματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι καρκινικά κύτταρα του προστάτη που εκφράζουν TGFβ επάγουν έντονη αγγειογενετική απόκριση (Steams et al., 1999), ενώ η εξουδετέρωση του TGFβ μπορεί να καταστείλει αυτή την αγγειογένεση (Tuxhom et al., 2002). Επίσης, ο TGFβ επάγει την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και ο CTGF (Connective-Tissue Growth Factor) σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες (Petrovaara et al., 1994, Shimo et al., 2001). Ταυτόχρονα, ο TGFβ καταστέλλει την έκφραση της αγγειοποιητίνης ANG1 η οποία διατηρεί την ακεραιότητα των αγγείων, σε κύτταρα ινοβλαστών (Enhholm et al., 1997) και επάγει την έκφραση, έκκριση ή ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνών του υποστρώματος σε ενδοθηλιακά κύτταρα επιτρέποντας την απελευθέρωση των τελευταίων στην κυκλοφορία του αίματος (Derynck et al., 2001).

**Επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT).** Η μεταναστευτική ικανότητα των επιθηλιακών κυττάρων βασίζεται στην απώλεια των επαφών μεταξύ των κυττάρων και στην απόκτηση ινοβλαστικών χαρακτηριστικών, διαδικασία που συχνά αναφέρεται ως επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Η διαδικασία αυτή, η οποία συμβαίνει συχνά κατά την ανάπτυξη αλλά και κατά την πρόοδο της καρκινογένεσης, επηρεάζεται από μέλη της TGFβ οικογένειας (Moustakas et al., 2002). Ένας από τους κύριους στόχους απενεργοποίησης κατά την EMT είναι ο ασβεστο-εξαρτώμενος υποδοχέας κυτταρικών επαφών E-cadherin που συχνά καταστέλλεται σε περιπτώσεις καρκίνων από τον TGFβ (Oft et al., 1996, Miettinen et al., 1994, Thiery et al., 2002).

**Επαγωγή ιστοειδικής μετάστασης.** Οι προ-μεταστατικές λειτουργίες του TGFβ επηρεάζουν βασικές διαδικασίες που καθιστούν εφικτή την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η δράση του TGFβ μπορεί να κατευθύνει την μετάσταση σε συγκεκριμένους ιστούς. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η TGFβ-επαγόμενη μετάσταση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων από τον μαστό στα οστά, μέσω καταστολής της c-Myc (Yin et al., 1999, Chen et al., 2001). Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα μαστού ποντικού υποδεικνύουν την υπερέκφραση μιας ομάδας γονιδίων που υποβοηθούν τη διείσδυση, την αγγειογένεση και την οστεόλυση. Η

έκφραση του γονιδίου του αγγειογενετικού παράγοντα CTGF και του παράγοντα διαφοροποίησης οστεοκλαστών ιντερλευκίνη 11 (IL11), αυξάνεται περαιτέρω από τον TGFβ, μέσω πρόσδεσης του Smad συμπλόκου στους υποκινητές αυτών των γονιδίων (Kang et al., 2002). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν τα οστά ως επιρρεπή ιστό για μεταστάσεις, ως αποτέλεσμα της ογκογονικής δράσης του TGFβ.



## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Η MH2 περιοχή χαρακτηρίζεται από ενδογενή μεταγραφική δραστικότητα. Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι η Smad3 πρωτεΐνη έχει μία δεύτερη αυτόνομη περιοχή μεταγραφικής δραστικότητας που εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην αμινοξική περιοχή 143-248 η οποία περιλαμβάνει την περιοχή του συνδέτη και τα πρώτα 18 αμινοξέα της περιοχής MH2 (Προκόβα Βασιλική, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Κρήτης, 2004 ). Δημιουργήθηκε πρόσφατα μια εσωτερική απαλοιφή στην περιοχή του συνδέτη της Smad3 και συγκεκριμένα της περιοχής 200-230 (Smad3 Δ200-230). Η περιοχή αυτή αποτελεί μια μη συντηρημένη αλληλουχία 30 αμινοξέων που εντοπίζεται στο C-τερματικό άκρο του συνδέτη και είναι ομόλογη με την περιοχή των Smad2, Smad4 ως προς την παρουσία προλινών. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου δείχθηκε ότι η εσωτερική αυτή απαλοιφή μειώνει την μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 χωρίς να επηρεάζει τον ομο- ή τον ετεροπολυμερισμό της.

Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης, διερευνήθηκαν περαιτέρω ορισμένα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης Smad3 Δ200-230. Συγκεκριμένα εξετάστηκε:

- ✓ Η επίδραση της εσωτερικής αυτής απαλοιφής στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης
- ✓ Η ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης των φυσικών υποκινητών mSmad7(-4200/+110) και του hPAI-1 (-800/+71) από την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη Smad3Δ200-230
- ✓ Η ικανότητα αλληλεπίδρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή p/CAF
- ✓ Η ενδοκυττάρια κατανομή της παρουσία και απουσία του υποδοχέα του TGFβ τύπου I

Σε παράλληλες μελέτες δημιουργήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν δυο μεταλλαγμένες μορφές της πρωτεΐνης Smad3 οι οποίες φέρουν αντικαταστάσεις των αμινοξέων τυροσίνη 237 και αργινίνη 287 από αλανίνη (Smad3 Y237A και Smad3 R287A). Χρησιμοποιώντας προγράμματα εξομοίωσης της δομής της MH2 περιοχής της Smad3, δείχθηκε ότι τα δυο αυτά αμινοξέα συμμετέχουν σε ένα δίκτυο μοριακών

αλληλεπιδράσεων μαζί με το αμινοξύ γλουταμινικό 239 (E239). Το δίκτυο αυτό οποίο φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην σταθεροποίηση και στην λειτουργία της δομικής περιοχής θηλιάς-έλικας (Loop-Helix) της Smad3 η οποία είναι υπεύθυνη για τον ομο και τον ετεροπολυμερισμό της Smad3.

Στα πλαίσια της παρούσης μελέτης χαρακτηρίστηκαν λειτουργικά οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 E239A, Y237A και R287A. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε:

- ✓ Η επίδραση των παραπάνω σημειακών μεταλλάξεων στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης
- ✓ Η επίδραση της Smad3Y237A και Smad3R287A στην μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 πρωτεΐνης
- ✓ Η ενδοκυττάρια κατανομή της Smad3Y237A και Smad3R287A παρουσία και απουσία του υποδοχέα του TGFβ τύπου I
- ✓ Η ικανότητα ομοπολυμερισμού και ετεροπολυμερισμού της Smad3Y237A και Smad3R287A με την Smad4 πρωτεΐνη

## ΥΛΙΚΑ

Τα ένζυμα περιορισμού, τα ρυθμιστικά τους διαλύματα και οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των πλασμιδίων, αγοράστηκαν από τις εταιρείες Gibco-BRL, New England Biolabs και Minotech.

Τα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia, ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια (βλ. Πίνακα 1) από το εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) την Gibco-BRL ή την Invitrogen.

Για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών Smad χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA1amp της Invitrogen, η Rnase A και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma.

Ο δείκτης μοριακού βάρους λBstEII κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από τη New England Biolabs.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων LB περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract της εταιρείας Difco.

Η αгарόζη που χρησιμοποιήθηκε αγοράστηκε από την εταιρεία EMS.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Kit της εταιρείας Qiagen.

Για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel Extraction kit της εταιρείας Qiagen.

Ο ο-νιτροφαινυλογαλακτοπυρανοζίτης (ONPG), που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma.

Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega.

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β1 (TGF-β1), που αποτελεί τον συνδέτη (ligand) των αντίστοιχων υποδοχέων TGF-βRI και TGF-βRII, είναι από την εταιρεία R & D Systems.

Το συζευγμένο με fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG αντίσωμα (FITC) καθώς και το συζευγμένο με horseradish peroxidase goat anti-mouse αντίσωμα (HRP) από την Chemicon.

Το μονοκλωνικό mouse anti-Flag M2, καθώς και το mouse anti-myc (9E10) αντισώμα αγοράστηκαν από την Sigma.

Η αραρόζη στρεπταβιδίνης και η στρεπταβιδίνη ομοιοπολικά συζευγμένη με HRP αγοράστηκαν από την Sigma καθώς και οι αναστολείς πρωτεασών από την Sigma.

Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκαν από την εταιρεία Schleicher & Schuell.

Για την ανίχνευση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) και υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (ECL-hyperfilm) της εταιρείας Amersham Pharmacia Biotech και της Pierce.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα το θρεπτικό υλικό Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), ο ορός Fetal Bovine Serum (FBS), το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS), το ένζυμο Trypsin - EDTA καθώς και τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη αγοράστηκαν από την Gibco/BRL.

Χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα χημικά των εταιρειών Merck και Sigma καθώς και άλλων εμπορικών πηγών στην μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα.

## **ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αραρόζης (agarose gel)**

Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αραρόζης 1% και 0,8% (παρασκευαστικό gel) τα οποία παρασκευάστηκαν ως εξής : Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 150ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1,5 gr αραρόζης. Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αραρόζη και αφού κρυώσει προστίθενται 7,5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική για το DNA), και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα - φορέα της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 Volt, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel γίνεται στα 50 Volt.

### **Απομόνωση τμημάτων DNA**

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) και τα ενθέματα (inserts), τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού,

ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης και οι ζώνες αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας. Ακολούθως, οι ζώνες τοποθετούνται σε κολώνες του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen για τον καθαρισμό των τμημάτων DNA.

### **Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)**

Οι αντιδράσεις σύνδεσης έγιναν σε τελικό όγκο 10μl ή 20μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 200 ng. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε:

- το DNA του πλασμιδιακού φορέα
- το DNA του ενθέματος
- ένζυμο T4 DNA ligase
- 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.
- Απιονισμένο νερό

### **Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B της *E.coli* (transformation)**

- Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 150μl βακτηριακών κυττάρων DH10B (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells)
- Πρόσθεση των 10 μl ή 20 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή του πλασμιδίου
- Τοποθέτηση στον πάγο για 30΄
- Θερμικό σοκ στους 42° C για 45΄΄
- Πρόσθεση 900 μl θρεπτικού LB στο μείγμα (LB : 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl).
- Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο 37°C για 60΄
- Φυγοκέντρηση για 5΄στις 3500 rpm
- Απομάκρυνση των 900 μl του θρεπτικού και διάλυση της πελέτας με πιπετάρισμα
- Απλώνουμε την υπόλοιπη καλλιέργεια σε τρυβλίο ( με θρεπτικό LB -άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (50 μg/ml)), που είχε τοποθετηθεί σε επωστήρα 37°C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία, με αποστειρωμένη γυάλινη ράβδο
- Επώση στους 37°C για 16 - 18 ώρες (overnight)

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

Έπειτα από καλλιέργεια κάθε αποικίας, η οποία λαμβάνεται από το τρυβλίο με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα, σε 2 ml LB-ampicillin, για 16 -18 ώρες, στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση ακολουθεί:

- Φυγοκέντρηση 1,5ml σε 13000 rpm για 2 min RT
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου με πιπέττα Pasteur υπό κενό
- Επαναδιάλυση σε 600μl διαλύματος λύσης (lysis buffer : 8% sucrose, 5% Triton-100x, 500mM EDTA pH8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5)
- Πρόσθεση 20 μl λυσοζύμης (10 mg/ml), vortex, 10' RT
- Βρασμός για 90'', μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15' RT
- Απομάκρυνση του ιζήματος (debris) με οδοντογλυφίδα
- Κατακρήμνιση του πλασμιδιακού DNA με 600 μl παγωμένης ισοπροπανόλης στους -20°C για 30'
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15' , RT
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και πρόσθεση 500 μl 75% αιθανόλης
- Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5' RT
- Αναρρόφηση της αλκοόλης
- Air dry των δειγμάτων υπό κενό
- Επαναδιάλυση του DNA σε 30 μl αποστειρωμένου nanopure νερού ή TE που περιέχει RNase (10 mg/ml)

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

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν κολώνες Qiagen, βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας. Το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλο όγκο διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8). Η συγκέντρωσή του μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm, ενώ η ποιότητά του εκτιμάται μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

## Κατασκευή μεταλλάξεων

Με εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) κατασκευάστηκαν οι σημειακά μεταλλαγμένες Smad3Y237A, Smad3Y238A, Smad3R279A και Smad3R287A. Για την εισαγωγή αυτών των σημειακών μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκαν δύο PCR αντιδράσεις, Α και Β. Ως εκμαγείο για κάθε μία αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pcDNA3amp6mycSmad3. Στην αντίδραση Α χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 1N-Smad3myc sense και Y237A-Smad3 antisense που περιγράφονται στον **Πίνακα 1**. Στην αντίδραση Β χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Smad3Y237A sense και 425C-Smad3 antisense. Τα προϊόντα των παραπάνω αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο (template) για overlap extension PCR (Ho et al, 1989), με εκκινητές τους 1N-Smad3myc sense και 425C-Smad3 antisense. Η βασική αρχή της μεθόδου της overlap extension PCR δείχνεται στην **Εικόνα 12**.

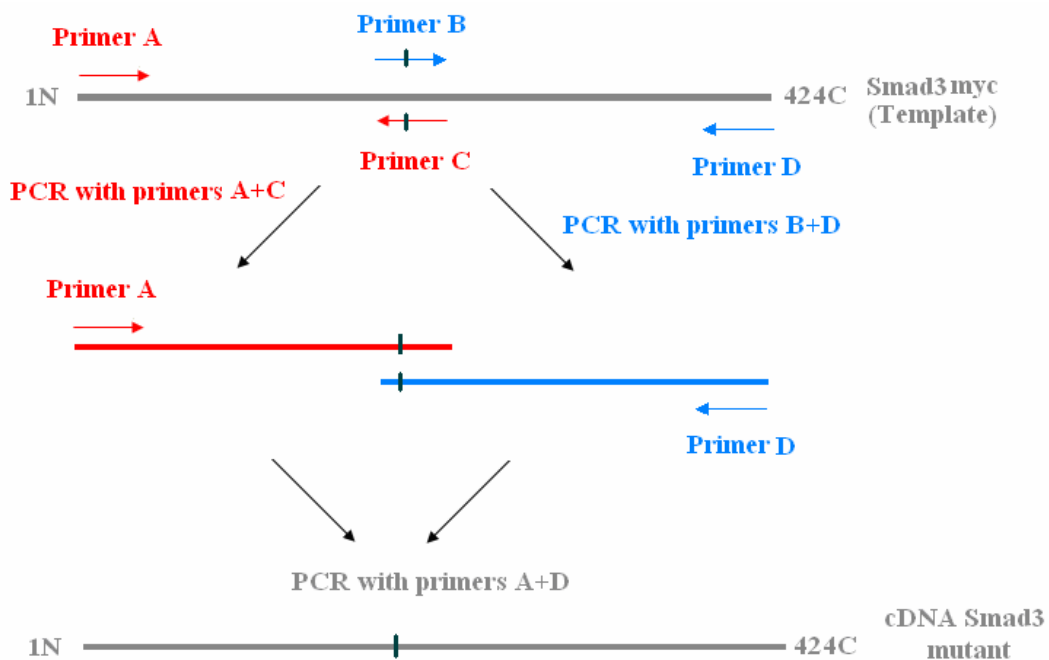
Οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50μl με 1ng από το εκμαγείο, 50pmol από κάθε εκκινητή, 2mM δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), 0.5μl Vent πολυμεράσης, 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ένζυμου και 5μl DMSO. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις ήταν:

1. 94°C για 1'30''
2. 94°C για 1'
3. 66°C για 1'30''
4. 72°C για 2'
5. 25 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 72°C για 5'
7. 4°C

Για την κατασκευή μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που να μπορούν να βιοτινυλιωθούν *in vivo* χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3amp στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί το 22 αμινοξέων πεπτίδιο Bio, στις θέσεις EcoRI και BamHI. Τα προϊόντα της overlap extension PCR υπέστησαν πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και NotI για 5 ώρες και στη συνέχεια εντέθηκαν στον φορέα pcDNA3Bio (**Εικόνα 13**) ο οποίος είχε υποστεί πέψη με τα ίδια ένζυμα. Τα πλασμίδια που προέκυψαν μετά το ligation είναι:

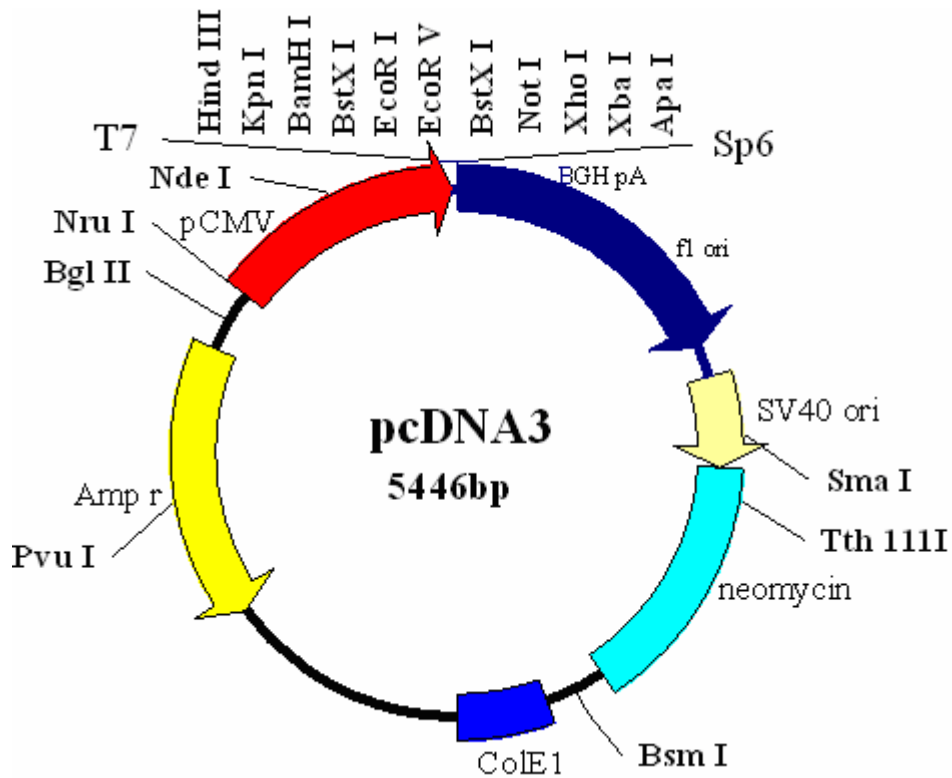
pcDNA3BioSmad3Y237A, pcDNA3BioSmad3Y238A, pcDNA3BioSmad3R279A και pcDNA3BioSmad3R287A.

Οι μεταλλαγμένες αυτές μορφές της Smad3 πρωτεΐνης εντέθηκαν επίσης στο πλασμίδιο pcDNAIamp6myc το οποίο προέκυψε από την πέψη του ΔMH2pcDNAIamp6myc με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και NotI. Συγκεκριμένα, οι μεταλλαγμένες μορφές Smad3Y238A και Smad3R287A κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο έκφρασης pcDNAIamp6myc ύστερα από την πέψη των pcDNA3BioSmad3Y238A και pcDNA3BioSmad3R287A με τα ένζυμα EcoRI και NotI. Οι κατασκευές στάλθηκαν για sequencing εντεθειμένες στο pcDNAIamp6myc πλασμίδιο και αποδείχτηκε ότι οι μεταλλαγμένες Smad3Y237A και Smad3R287A έφεραν την επιθυμητή μετάλλαξη και την σωστή αλληλουχία. Οι μεταλλάξεις αυτές βρίσκονται στην MH2 περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης.



**Εικόνα 12. Βασική αρχή της overlap extension PCR.** Η γραμμή | υποδεικνύει την θέση της σημειακής μετάλλαξης.





**Εικόνα 13. Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3.** Σε αυτόν τον φορέα κλωνοποιήθηκε το 22 αμινοξέων Βιο πεπτιδίο, κατόπιν πέψης με τα ένζυμα EcoRI και BamHI. Οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκαν στον φορέα αυτόν κατόπιν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και NotI, με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρουν το Βιο στο Ν-τερματικό τους άκρο.

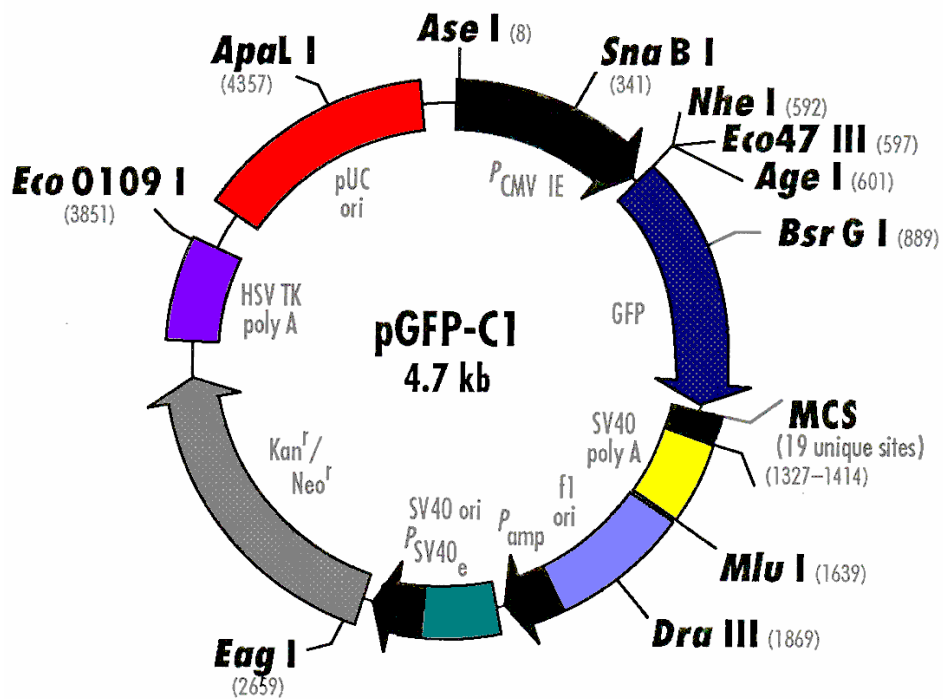
## Κατασκευή των pGFP-C1 Smad3Y237A και pGFP-C1 Smad3R287A πρωτεϊνών

Για την κατασκευή των pGFP-C1Smad3Y237A και pGFP-C1Smad3R287A πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης όπου ως εκμαγείο στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pcDNA3BioSmad3Y237A και στην δεύτερη το πλασμίδιο pcDNA1amp6mycSmad3R287A. Ως εκκινήτες χρησιμοποιήθηκαν οι 1N-Smad3 sense και 425C-Smad3 antisense που περιγράφονται στον **Πίνακα 1**. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε για τις αντιδράσεις ήταν

1. 94°C για 1'30''
2. 94°C για 1'
3. 63°C για 1'30''
4. 72°C για 2'
5. 25 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 72°C για 5'
7. 4°C

Ακολούθησε πέψη των προϊόντων με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και NotI. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3Bio, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Στη συνέχεια, τα πλασμίδια pcDNA3BioSmad3Y237A και pcDNA3BioSmad3R287A υπέστησαν διαδοχικές πέψεις το καθένα με τα ένζυμα περιορισμού ApaI (3 ώρες, 25°C) και EcoRI (3 ώρες, 37°C) αντίστοιχα. Τα προϊόντα της πέψης εντέθηκαν σε αυτές τις θέσεις στον πλασμιδιακό φορέα pGFP-C1, ο οποίος είχε υποστεί πέψη με τα προαναφερθέντα ένζυμα. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής: pGFP-C1 Smad3Y237A και pGFP-C1 Smad3R287A.

Οι πρωτεΐνες που κλωνοποιήθηκαν στον pGFP-C1 (**Εικόνα 14**), ο οποίος περιέχει το GFP(Green fluorescent protein) γονίδιο, μπορούν να παρατηρηθούν σε μικροσκόπιο φθορισμού, χάρη στον πράσινο φθορισμό που εκπέμπει η GFP.



Εικόνα 14. Ο πλασμιδιακός φορέας pGFP-C1. Σε αυτόν τον φορέα κλωνοποιήθηκαν οι Smad3Y237A και Smad3R287A πρωτεΐνες, κατόπιν πέψης με τα ένζυμα EcoRI και ApaI.

## **Κυτταροκαλλιέργειες**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK293T και HepG2 που προέρχονται από νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου και ηπατικά κύτταρα ανθρώπου αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα COS-7 και MDA-MB-468 (Smad4<sup>-/-</sup>) που είναι νεφρικά κύτταρα πιθήκου και καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου αντίστοιχα.. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα JEG (Smad3<sup>-/-</sup>) που είναι κύτταρα χοριοκαρκινώματος. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm<sup>2</sup> και σε τρυβλία 6-well , p60, και p100 (διαμέτρου 6, 60, 100 mm)σε επωαστήρα 37°C και σε συνθήκες 5% CO<sub>2</sub> . Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48 - 72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραιώση στις φλάσκες 1/10). Αποθέματα καλλιεργείων (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80°C σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO.

## **Παροδικές επιμόλυνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)**

Οι παροδικές επιμόλυνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμισης Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> με τα εκάστοτε κατάλληλα και επιθυμητά πλασμίδια. Τα COS-7, MDA-MB-468, και 293T αραιώνονται σε 2.5x10<sup>5</sup> κύτταρα ανά well και σε 5x10<sup>5</sup> κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και p100, ενώ τα HepG2 και JEG Smad3<sup>-/-</sup> σε διπλάσιες ποσότητες αντίστοιχα, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει συνήθως 2 μg πλασμιδίου αναφοράς, 6 μg πλασμιδίου έκφρασης ή/και πλασμιδίου συμπλήρωσης, 2 μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31μl CaCl<sub>2</sub> 2M και 195 μl ddH<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 12 μg.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p100 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης, Western blotting) το μείγμα περιέχει μέχρι 30 μg πλασμιδίου έκφρασης, 31μl CaCl<sub>2</sub> 2M και ποσότητα ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p60 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης και σε πειράματα ανοσοφθορισμού), το μείγμα περιέχει 2 μg κάθε πλασμιδίου έκφρασης και κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίου συμπλήρωσης, ώστε η συνολική ποσότητα DNA να μην υπερβαίνει τα 17 μg, 31μl CaCl<sub>2</sub> 2M και ποσότητα ddH<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl.

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο Hepes Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mM Hepes pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και συλλέγονται σε 300 μl διαλύματος λύσης (lysis buffer) - στην περίπτωση των πειραμάτων σε 6-wells - είτε σε 1 ml PBS - στην περίπτωση των πειραμάτων σε τρυβλία p100 ή p60. Στην πρώτη περίπτωση, οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 min στους 4°C, και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο PBS (100-200 μl). Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία - 80°C.

### **Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal**

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

- Σε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται **594μl β-gal mix**:  
456 μl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3)  
132 μl ONPG (8 mg/ml σε 0.1 M Sodium Phosphate buffer)  
6 μl 100x salt (3M KCl, 1M MgCl<sub>2</sub>, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd H<sub>2</sub>O, 1ml)
- Επώαση σε υδατόλουτρο 37°C μέχρι να κιτρινίσουν τα δείγματα
- Διακοπή της αντίδρασης με προσθήκη 200 μl διαλύματος Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M που προκαλεί μεταβολή του pH
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων σε φωτόμετρο στα 410 nm.

Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

### **Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)**

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

### **Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)**

Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το 4X SDS Loading Buffer [2.5 ml Tris-HCl, 1.6 ml β-mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue]. Για τα πειράματα που εκτελέστηκαν χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 gr Tris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 185 Volt και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης με 1000 ml Transfer Buffer [700 ml H<sub>2</sub>O, 100 ml 10x TGS, 200 ml methanol].

Ακολουθεί έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20] [1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10'. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με 3x10' εκπλύσεις με διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20]. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 1 ώρα με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3x10' με διάλυμα TBS-T. Στη συνέχεια ακολουθεί έκπλυση των μεμβρανών για 1 ώρα σε κατάλληλο αντίσωμα HRP αραιωμένο 1: 10000 σε TBS-T. Κατόπιν γίνονται 3x10' εκπλύσεις με TBS-T, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS. Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου (RT).

Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε ECL - hyperfilm ή σε Fuji medical X-Ray film (Super RX) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer : 100 mM β-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) και επώαση στους 50°C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις και επώσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

### **Το σύστημα της *in vivo* βιοτινύλωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (*in vivo* biotinylation)**

Κύτταρα HEK293T επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης 1 σε σύζευξη με το πεπτίδιο Bio, 22 αμινοξέων, το οποίο υφίσταται βιοτινύλωση με την συνέκφραση της λιγάσης BirA (βακτηριακής προέλευσης). Τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν και με τον φορέα έκφρασης έστω της πρωτεΐνης 2. Περίπου 32 ώρες μετά την επιμόλυνση των κυττάρων, ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 1 ml διαλύματος

λύσης (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, 10  $\mu$ l/ml 100 mM PMSF και 10  $\mu$ l αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα τρυβλία αφήνονται σε ανακινούμενη πλατφόρμα για 20 λεπτά. Κατόπιν, τα κύτταρα αποκολλώνται με ξύστρο, φυγοκεντρώνονται στις 13000 rpm για 3 λεπτά, στους 4°C. Από το υπερκείμενο κρατείται ποσότητα 100  $\mu$ l που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνική ανάλυση. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 40  $\mu$ l 50% σφαιριδίων στρεπταβιδίνης που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια και μεγάλη ειδικότητα πρόσδεσης σε βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες και που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα TBS-T 0.1%. Στα σφαιρίδια αυτά προσκολλάται η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη 2 αν και εφόσον αυτή αλληλεπιδρά με την πρώτη. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται overnight στους 4°C.

Το επόμενο πρωί ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση και έκπλυση με 1 ml παγωμένου διαλύματος λύσης για κάθε δείγμα, με περιστροφή στους 4°C και μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Ακολουθεί προσθήκη 12.5  $\mu$ l 4x SDS Loading Buffer. Μετά από βρασμό 5 λεπτών, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε 10.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι αυτής ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 1 και 2. Η έκφραση των βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών ανιχνεύεται με χρήση ενός πολυμερούς που φέρει στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Η ανίχνευση αυτή επιτυγχάνεται με επώαση των μεμβρανών (μετά από stripping) με streptavidin-HRP σε αραιώση 1: 10000 TBS-T 0.1% για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T 0.1%, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) όπως περιγράφεται παραπάνω.



## **Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)**

Δεκαέξι ώρες μετά την επιμόλυνση κυττάρων COS-7 σε p60 τρυβλίο, τα κύτταρα αποκολλώνται με χρήση τρυψίνης και αραιώνονται σε 6-well τρυβλίο (αραίωση 1:3). Σε κάθε well έχει προηγουμένως τοποθετηθεί αποστειρωμένη καλυπτρίδα 22 x 22 mm καλυμμένη με 500  $\mu$ l/well 0.1% gelatin. Τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 24 ώρες για να ακολουθήσει στη συνέχεια η διαδικασία ανοσοφθορισμού.

Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές, για 3 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS+/- (PBS, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Ακολουθεί σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde σε PBS+/-, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές, ώστε τα αντισώματα να περνούν στο εσωτερικό τους, με χρήση διαλύματος 1 ml/well 0.5% Triton-X-100 σε Buffer 1 (10x Buffer 1 : 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6.0-6.5). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνονται 2 εκπλύσεις όπως περιγράφονται παραπάνω, καθώς και 2 ακόμα με τον ίδιο τρόπο, αλλά σε διάλυμα 1.5 ml/well PBS+/-/1.5% FBS (χρησιμοποιείται για μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων).

Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με 50  $\mu$ l πρωταρχικού αντισώματος, το οποίο αραιώνεται 1:200 σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στους 4 °C, σε επίπεδη επιφάνεια για 30 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται με 50  $\mu$ l δευτερεύοντος αντισώματος IgG-FITC, το οποίο αραιώνεται 1:50 σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι (καθώς το IgG-FITC είναι φωτοευαίσθητο), στους 4°C, σε επίπεδη επιφάνεια και για 30 λεπτά. Η περαιτέρω διεργασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Γίνονται 2 εκπλύσεις με διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS, και 2 ακόμα με διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7  $\mu$ l διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα

όρια επαφής καλυπτρίδας-αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται είτε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus BH-2) είτε σε μικροσκόπιο συνεστίασης Leica SP confocal fluorescent microscopy και η φωτογράφιση τους με 35 mm Olympus (C-35AD-4) camera.

### **Άμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών συζευγμένων με την GFP πρωτεΐνη (Green Fluorescence Protein) (Direct Immunofluorescence)**

Επαναλαμβάνεται η διαδικασία που περιγράφεται στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, με την διαφορά ότι τα κύτταρα επιμολύνονται με την υβριδική GFP πρωτεΐνη. Μετά την σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) και τις 2 εκπλύσεις με το διάλυμα PBS+/+ (PBS, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>), η πρωτεΐνη που είναι συζευγμένη με την GFP μπορεί να παρατηρηθεί άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού.

**Πίνακας 1. Ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης**

Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	Αλληλουχία	Σκοπός
1N-Smad3myc sense	5' CTGGAATTCATGTCGTCATCCTGCCTTTCCTC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό των 1-237 και 1-287 περιοχών της Smad3myc, για την κατασκευή των Smad3Y237A και Smad3-R287A (εκμαγείο: τα προϊόντα των 1N-Y237A AS και 1N-R287A AS)
425C-Smad3 Antisense	5' AATGCGGCCGCCTAAGACACACTGGAACAGCGGAT 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό των Y237A-425 and R287-425C περιοχών της Smad3myc, για την κατασκευή των Smad3Y237A και Smad3-R287A. (εκμαγείο: τα προϊόντα των Y237A S-425C και R287A S-425C)
Smad3 Y237A sense	5' TGGTGCTCCATCTCCGCCTACGAGCTGAACCAG 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 237-425 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 Y237A (εκμαγείο: Smad3myc)
Smad3 Y237A Antisense	5' CTGGTTCAGCTCGTAGGCGGAGATGGAGCACCA 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 1-237 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 Y237A (εκμαγείο: Smad3myc)
Smad3 R287A sense	5' GCAGTGGAGCTGACAGCGAGACACATCGGAAGA 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 287-425 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 R287A (εκμαγείο: Smad3myc)
Smad3 R287A Antisense	5' TCTTCCGATGTGTCTCGCTGTCAGCTCCACTGC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 1-287 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 R287A (εκμαγείο: Smad3myc)
1N-Smad3 sense	5' CTGGAATTCGCCATGTCGTCATCCTGCC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό των Smad3Y237A και Smad3R287A ώστε να κατασκευαστούν οι pGFP-C1 Smad3Y237A και pGFP-C1-Smad3R287A (εκμαγείο: Smad3mycY237A, Smad3mycR238A)

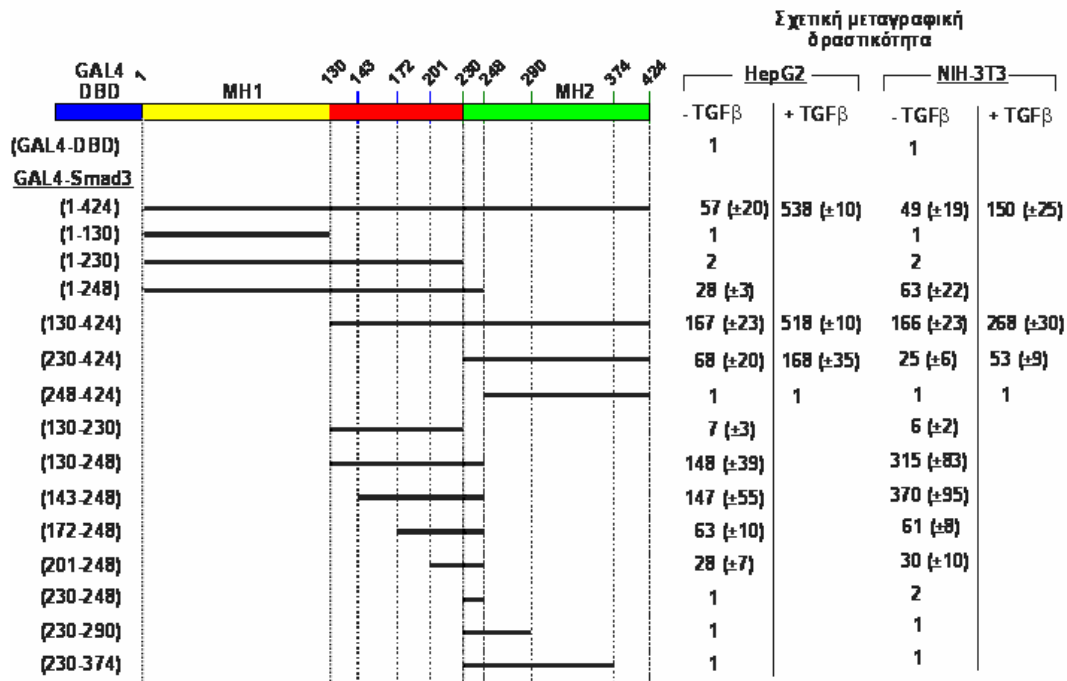
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Περιοχές της Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστηριότητα

Η πρωτεΐνη Smad3 αποτελεί έναν από τους κυριότερους μεταγωγείς της TGFβ σηματοδότησης. Προκειμένου να αναγνωριστούν και να χαρακτηριστούν περιοχές της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης που ρυθμίζουν την μεταγραφική της δράση, κατασκευάστηκαν διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της Smad3, με την μέθοδο της PCR και κλωνοποιήθηκαν σε σύζευξη, στην N-τερματική περιοχή τους, με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD), του GAL4 ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα (aa 1-147) (Prokova et al., 2005). Οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης εκφράστηκαν σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 και σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού NIH-3T3 και ελέγχθηκε η ικανότητα τους να ενεργοποιούν μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή pG5-E1B-luc, ο οποίος αποτελείται από πέντε διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 σε σύζευξη με τον ελάχιστο E1B υποκινητή και το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (γονίδιο αναφοράς). Από τις αναλύσεις αυτές διαπιστώθηκε ότι η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 που αποτελείται από την MH1 περιοχή (1-130) ή την MH1 περιοχή και την περιοχή linker (1-230) δεν είχε μεταγραφική δραστηριότητα (**Εικόνα 15**). Ενδιαφέρον παρουσίασε το εύρημα ότι η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 (1-248) που αποτελείται από την MH1 περιοχή, τον linker και τα πρώτα 18 αμινοξέα της MH2 περιοχής τα οποία περικλείουν τις δύο πρώτες β πτυχωτές επιφάνειες (β1 και β2) εμφάνισε μεγάλη μεταγραφική δραστηριότητα (**Εικόνα 15**). Το εύρημα αυτό έρχεται σε αντίθεση με την ισχύουσα θεωρία ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση από την Smad3 απαιτεί μόνο την MH2 περιοχή.

Επιπρόσθετα, μια υβριδική GAL4-Smad3 (130-424) πρωτεΐνη που στερείται της MH1 περιοχής παρουσίασε μεγάλη μεταγραφική δραστηριότητα, αποτέλεσμα αναμενόμενο καθώς προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν τον κατασταλτικό ρόλο της MH1 περιοχής στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης (Liu et al., 1996). Η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 (130-230), που αποτελείται μόνο από την περιοχή του linker παρουσιάζει ελάχιστη μεταγραφική δραστηριότητα, σε αντίθεση με την GAL4-Smad3 (230-424), που αποτελείται από την MH2 περιοχή η οποία

παρουσίασε μεγάλη μεταγραφική δραστικότητα. Η υβριδική GAL4-Smad3 (130-424) που αποτελείται από τον linker και την MH2 περιοχή παρουσίασε αύξηση της δραστικότητας κατά 3- και 6- φορές στα HepG2 και NIH-3T3 αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15** ο linker με την προσθήκη των 18 πρώτων αμινοξέων της MH2 περιοχής (130-248) αυξάνει δραματικά την μεταγραφική δραστικότητα του συνθετικού υποκινητή, ενώ η απαλοιφή αυτών των 18 αμινοξέων από την MH2 περιοχή ανέστειλε πλήρως την μεταγραφική δραστικότητα της υβριδικής GAL4-Smad3 (248-424) πρωτεΐνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η περιοχή του linker συμβάλει στην δραστικότητα της Smad3 και ότι τα 18 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής είναι απαραίτητα για την μεταγραφική της ενεργότητα. Οι παραπάνω αναλύσεις οι οποίες περιγράφονται λεπτομερέστερα στην διδακτορική διατριβή της Βασιλικής Προκόβα (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ελάχιστη περιοχή που απαιτείται για την μεταγραφική δραστικότητα της Smad3 πρωτεΐνης βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα 200 έως 248 και για τον λόγο αυτό εστίασαμε την προσοχή μας σε αυτήν την περιοχή.



**Εικόνα 15. Δομική-λειτουργική ανάλυση της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου και των διαφόρων απαλοιφών της Smad3 πρωτεΐνης, συζευγμένων με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4 (GAL4 DBD), που χρησιμοποιήθηκαν. Κύτταρα HepG2 και NIH3T3 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG<sub>5</sub>-E1B-Luc (1 μg) και με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης των μορφών της GAL4-Smad3 που υποδεικνύονται, σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του TGFβ (200 pM), όπως υποδεικνύεται, η προσθήκη του οποίου έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η μεταγραφική δραστηριότητα κάθε GAL4-Smad3 πρωτεΐνης αναλύθηκε σε σχέση με τη μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4 DBD πρωτεΐνης που τέθηκε ίση με την μονάδα. Κάθε μεταγραφική δραστηριότητα που παρουσιάζεται στα δεξιά του σχήματος, αποτελεί την μέση τιμή (+/- απόκλιση) τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1g), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004)

## **Μια εσωτερική απαλοιφή στην κεντρική περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης επηρεάζει δραστικά την μεταγραφική της δραστηριότητα**

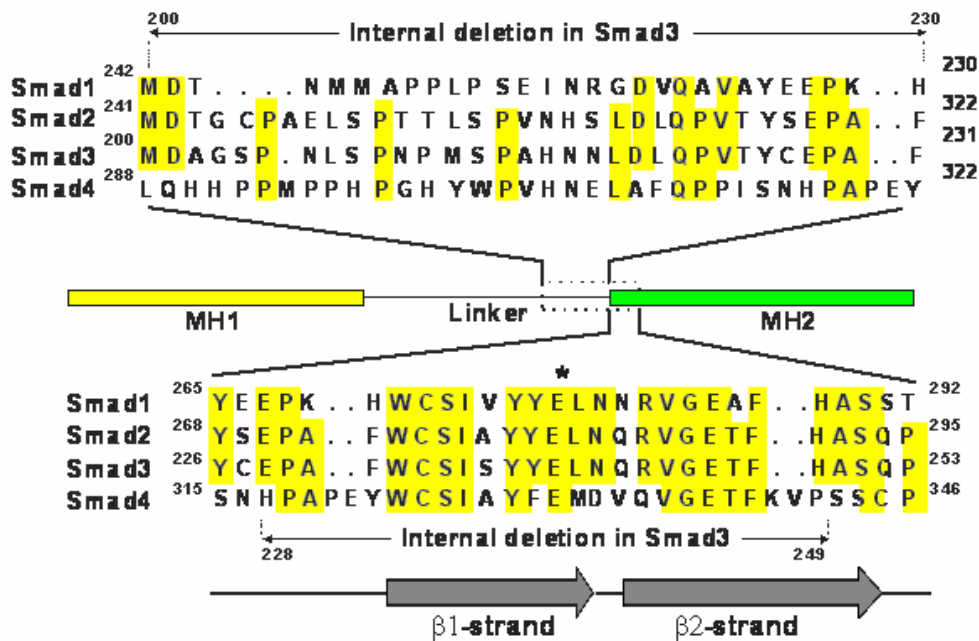
Προκειμένου να διερευνηθεί η μεταγραφική δραστηριότητα που αποδίδεται στην κεντρική περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης, κατασκευάστηκε από την Βασιλική Προκόβα η μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 που φέρει μια εσωτερική απαλοιφή στην περιοχή αυτή και συγκεκριμένα μεταξύ των αμινοξέων 200 και 230 (Smad3 Δ200-230) (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Η περιοχή αυτή αφορά μια μη συντηρημένη αλληλουχία 30 αμινοξέων που εντοπίζεται στο C-τερματικό άκρο του linker. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16** η περιοχή αυτή παρουσιάζει ομολογία κυρίως ως προς την παρουσία προλινών με τις Smad2 και Smad4 και συγκεκριμένα αποτελεί περιοχή αντίστοιχη με τμήμα της Smad4 πρωτεΐνης που ονομάζεται SAD (Smad4 Activation Domain) και ευθύνεται για την μεταγραφική ενεργότητα της τελευταίας (de Caestecker et al., 2000).

Επίσης κατασκευάστηκε μία δεύτερη μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 πρωτεΐνης η οποία αφαιρεί την περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 228 και 249 (Smad3Δ228-249). Η εξαιρετικά συντηρημένη αυτή περιοχή εντοπίζεται στο N-τερματικό άκρο της MH2 περιοχής και περιλαμβάνει τις δύο πρώτες β πτυχωτές επιφάνειες του πυρήνα β sandwich που σχηματίζει η MH2 περιοχή. Έχει δειχθεί ότι η εσωτερική απαλοιφή αυτής της περιοχής αναστέλλει πλήρως την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης (αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας).

Οι μεταλλαγμένες Smad3Δ200-230 και Smad3Δ228-249 πρωτεΐνες κλωνοποιήθηκαν αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA1amp (Invitrogen) με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο τον επίτοπο 6myc, όπως δείχνεται στην **Εικόνα 17Α**. (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Για να διερευνηθεί η σταθερότητα των μεταλλαγμένων αυτών μορφών της Smad3 πρωτεΐνης, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA1amp6mycSmad3, pcDNA1amp6mycSmad3Δ200-230 και pcDNA1amp6mycSmad3Δ228-249 απουσία ή παρουσία κυκλοεξιμίδης (cycloheximide) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Η κυκλοεξιμίδη είναι αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται για την αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό anti-myc

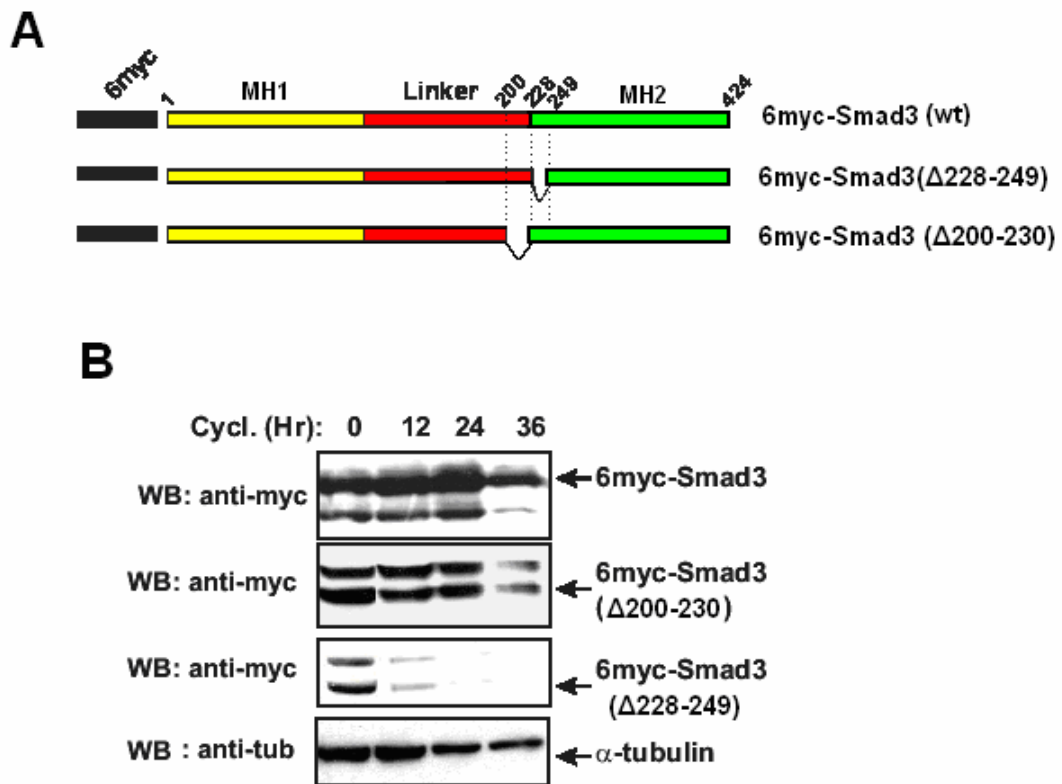
αντίσωμα ποντικού. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή  $\alpha$ -tubulin η οποία εκφράζεται σταθερά στα κύτταρα

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 17B**, η σταθερότητα της αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνης δεν επηρεάζεται σημαντικά από την κυκλοεξιμίδη καθώς συνεχίζει να εκφράζεται σε σημαντικά επίπεδα και μετά από επώαση 36 ωρών με το αντιβιοτικό. Η μεταλλαγμένη Smad3 $\Delta$ 200-230 πρωτεΐνη εκφράζεται το ίδιο σταθερά όσο και η αγρίου τύπου πρωτεΐνη σε μία χρονική περίοδο 24 ωρών επώασης με το αντιβιοτικό. Αντίθετα, η έκφραση της μεταλλαγμένης Smad3 $\Delta$ 228-249 ελαττώνεται αισθητά 12 ώρες μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού (**Εικόνα 17B**). Συμπερασματικά, από την ανάλυση ανοσοαποτύπωσης της **Εικόνας 17B** φαίνεται ότι η απαλοιφή των 30 αμινοξέων της περιοχής του linker (200-230) δεν επηρεάζει την σταθερότητα της πρωτεΐνης, ενώ η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη.



**Εικόνα 16. Ομολογία της Smad3 με άλλα μέλη της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών στην μεταγραφική ενεργή περιοχή που περικλείει τα αμινοξέα 200-249.** Χρησιμοποιήθηκε ο μονογραμματικός κώδικας για την αντιπροσώπευση των αμινοξικών αλληλουχιών. Τα αμινοξέα που είναι ταυτόσημα για τις Smad πρωτεΐνες παρουσιάζονται σκιασμένα κίτρινα. Τα λεπτά μαύρα βέλη υποδεικνύουν τις εσωτερικές απαλοιφές που έχουν εισαχθεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Τα μεγάλα γκρι βέλη αντικατοπτρίζουν τις β πτυχωτές επιφάνειες β1 και β2. Μια σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης στο συντηρημένο αμινοξύ της θέσεως 330 (E330) της Smad4, το οποίο σχετίζεται με καρκινογένεση, υποδεικνύεται με αστερίσκο.





**Εικόνα 17. Επίδραση των εσωτερικών απαλοιφών 200-230 και 228-249 στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης. Α.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου 6myc-Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της 6myc-Smad3 (Δ200-230) και 6myc-Smad3 (Δ228-249). Οι κάθετες και διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τις περιοχές των απαλοιφών. **Β.** HEK 293T κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου Smad3, της Smad3 Δ200-230 ή της Smad3 Δ228-249. Ακολούθησε επώαση των επιμολυσμένων κυττάρων με κυκλοεξιμίδη (50mg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα και τα επίπεδα έκφρασης των Smad3 πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας anti-myc μονόκλωνο αντίσωμα. Τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών εκτιμήθηκαν με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή α-tubulin.

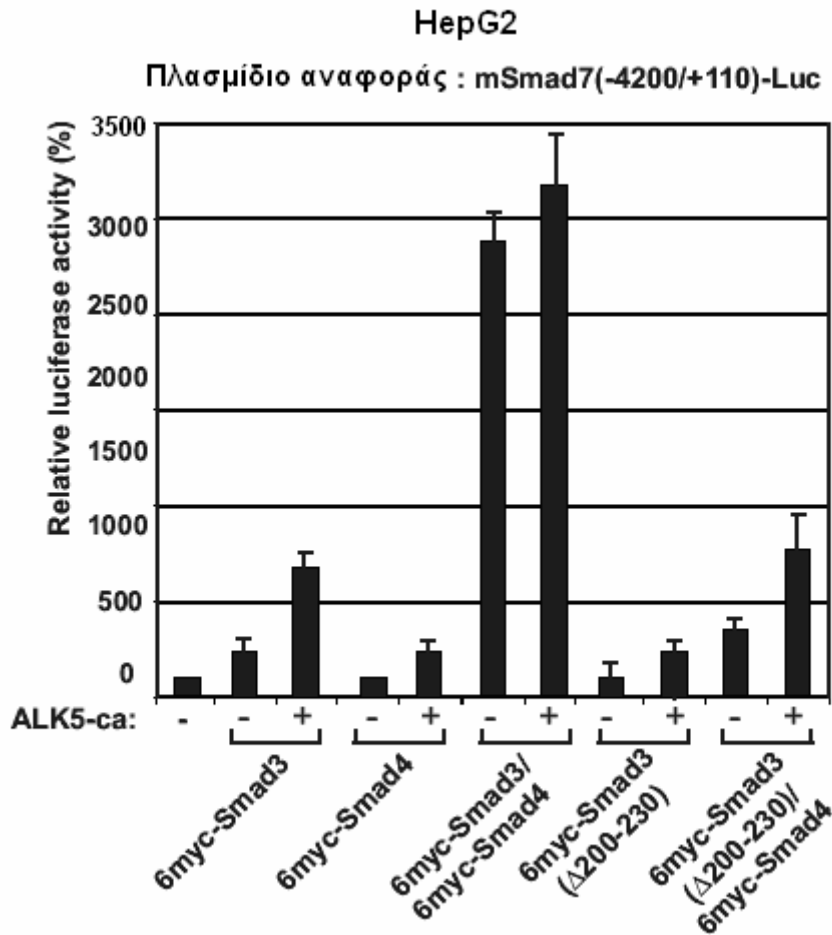
## **Η εσωτερική απαλοιφή Δ200-230 μειώνει δραστικά την μεταγραφική δραστικότητα της Smad3 πρωτεΐνης και την λειτουργική αλληλεπίδραση της με την Smad4 πρωτεΐνη**

Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι η εσωτερική απαλοιφή στην περιοχή 200-230 της Smad3 πρωτεΐνης μειώνει δραματικά την αλληλεπίδραση της με την Smad4 πρωτεΐνη (Prokova et al., 2005). Για να διερευνηθεί περαιτέρω η ικανότητα της μεταλλαγμένης μορφής της Smad3 πρωτεΐνης *6myc-Smad3Δ200-230* να αλληλεπιδρά με την Smad4 πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος HepG2 τα οποία εκφράζουν τις Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες ενδογενώς. Τα κύτταρα αυτά επιμολύνθηκαν παροδικά με δύο φυσικούς υποκινητές που αποτελούν στόχους του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ: τον υποκινητή του γονιδίου Smad7 του ποντικού (-4200/+110) και τον υποκινητή του γονιδίου του αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου του ανθρώπου PAI-1 (plasminogen activator inhibitor 1) (-800/+71) (Brodin et al., 2000, Keeton et al., 1991).

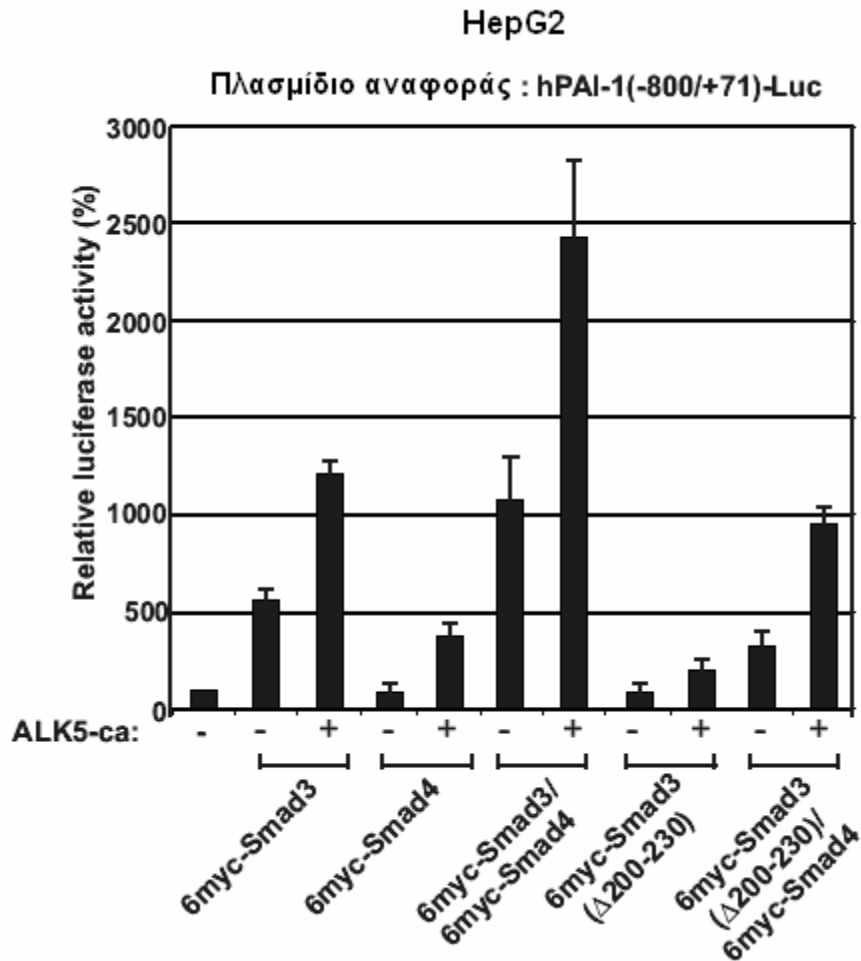
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 18**, η μεταγραφική δραστικότητα του υποκινητή του γονιδίου Smad7 αυξήθηκε κατά 2,5 και 7 φορές από την έκφραση της *6myc-Smad3* πρωτεΐνης, απουσία και παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα τύπου I του TGFβ (ca-ALK5) αντίστοιχα. Ο ca-ALK5 περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη (αντικατάσταση της θρεονίνης 204 από ασπαρτικό οξύ, T204D), η οποία τον καθιστά συνεχώς ενεργό, ακόμα και απουσία του συνδέτη TGFβ. Η υπερέκφραση της *6myc-Smad4* αύξησε την μεταγραφική δραστικότητα του υποκινητή κατά 2,5 φορές παρουσία του ca-ALK5. Η συνέκφραση των *6myc-Smad3* και *6myc-Smad4* προκάλεσε δραματική αύξηση της δραστικότητας του υποκινητή κατά 24 και 27 απουσία και παρουσία του ca-ALK5 αντίστοιχα. Η μεταγραφική ενεργότητα της *6myc-Smad3Δ200-230* ήταν πολύ χαμηλή μόνο παρουσία του ca-ALK5 (2.5 φορές), ενώ δεν υπήρξε ενεργοποίηση απουσία του ca-ALK5. Η συνέκφραση των *6myc-Smad3Δ200-230* και *6myc-Smad4* ενεργοποίησε μεν τον υποκινητή κατά 4 και 8 φορές απουσία και παρουσία του ca-ALK5 αντίστοιχα, υποδηλώνοντας ότι η *Smad3Δ200-230* διατηρεί την ικανότητα να αλληλεπιδρά λειτουργικά με την Smad4, αλλά η ενεργότητα της είναι σημαντικά μειωμένη συγκρινόμενη με την ενεργότητα του υποκινητή παρουσία της αγρίου τύπου Smad3, τόσο απουσία όσο και παρουσία του ca-ALK5 και της Smad4.

Σε μια σειρά παράλληλων πειραμάτων, μελετήθηκε η δράση των μεταλλαγμένων Smad3 πρωτεϊνών στην ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου PAI-1 του ανθρώπου. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 19**, η μεταγραφική ενεργότητα του φυσικού υποκινητή hPAI-1 αυξήθηκε κατά 5,5 και 12 φορές από την έκφραση της 6myc-Smad3, απουσία και παρουσία του ca-ALK5 αντίστοιχα, ενώ με την υπερέκφραση της 6myc-Smad4 υπήρξε ενεργοποίηση του hPAI-1 κατά 4 φορές μόνο παρουσία του ca-ALK5. Η συνέκφραση των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 προκάλεσε δραματική αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 10,5 και 24 φορές απουσία και παρουσία του ca-ALK5 αντίστοιχα. Η 6myc-Smad3Δ200-230 δεν ενεργοποίησε τον υποκινητή απουσία του ca-ALK5, ενώ υπήρξε ελάχιστη ενεργοποίηση παρουσία αυτού. Παρατηρήθηκε λίγο αυξημένη ενεργοποίηση με την συνέκφραση της Smad4 (ενεργοποίηση κατά 4 φορές) και η ενεργοποίηση αυτή αυξήθηκε περαιτέρω με την παρουσία του ca-ALK5 (κατά 9 φορές).

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μεταλλαγμένη Smad3Δ200-230 πρωτεΐνη παρουσιάζει σημαντικά μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου Smad3 αλλά διατηρεί την ικανότητα λειτουργικής συνεργασίας με την Smad4.



**Εικόνα 18.** Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης της 6myc-Smad3 Δ200-230 με την αγρίου τύπου Smad4 πρωτεΐνη. Ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς ποντικού Smad7(-4200/+110)-luc και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3 ή 6myc-Smad3Δ200-230. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του υποδοχέα ALK5-ca (2μg) και του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4 (1μg). Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την διαδικασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (2μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



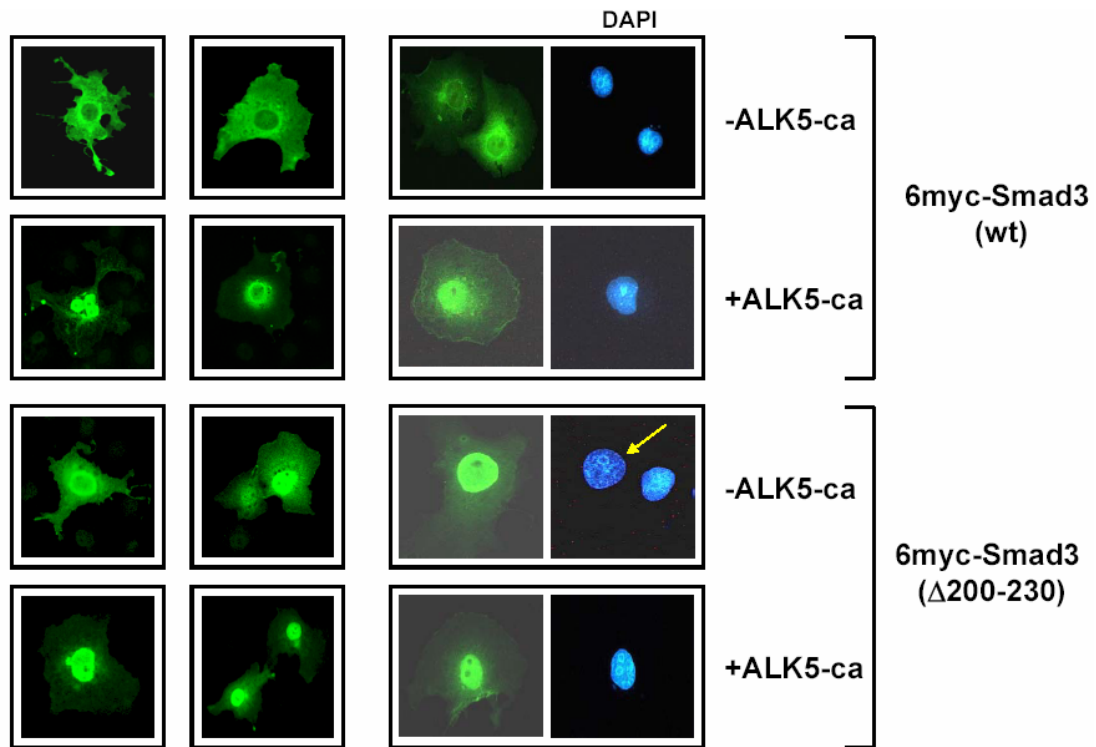
**Εικόνα 19.** Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης της 6myc-Smad3 Δ200-230 με την αγρίου τύπου Smad4 πρωτεΐνη. Ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς hPAI-1(-800/+71)-luc και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3 ή 6myc-Smad3Δ200-230. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του υποδοχέα ALK5-ca (2μg) και του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4 (1μg). Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την διαδικασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (2μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

## **Η εσωτερική απαλοιφή Δ200-230 δεν επηρεάζει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα**

Προκειμένου να ελεγχθεί ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός της *δmyc-Smad3Δ200-230* πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε πείραμα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε νεφρικά κύτταρα πιθήκου COS-7, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επιτόπου *δmyc* που φέρει η πρωτεΐνη στο N-τερματικό της άκρο.

Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε για να διερευνηθεί εάν η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα της *δmyc-Smad3Δ200-230* οφείλεται σε πιθανή μεταβολή του ενδοκυττάρου εντοπισμού της πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20**, η αγρίου τύπου *δmyc-Smad3* εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα απουσία της έκφρασης του υποδοχέα *ca-ALK5* (1η σειρά), ενώ η συνέκφραση του *ca-ALK5* οδήγησε στην συσσώρευση της πρωτεΐνης στον πυρήνα (2η σειρά). Αντιθέτως η *δmyc-Smad3Δ200-230* εντοπίζεται κυρίως περιπυρηνικά και στον πυρήνα απουσία του *ca-ALK5* (3η σειρά) ενώ με την συνέκφραση του υποδοχέα η πρωτεΐνη γίνεται αποκλειστικά πυρηνική (4η σειρά). Πραγματοποιήθηκε παράλληλη χρώση με DAPI η οποία εντοπίζει τον πυρήνα κάθε κυττάρου.

Τα αποτελέσματα του πειράματος της **Εικόνας 20**, υποδηλώνουν ότι η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας της *δmyc-Smad3Δ200-230* πρωτεΐνης δεν οφείλεται στην παρεμπόδιση της εισόδου της στον πυρήνα. Το γεγονός της ενισχυμένης πυρηνικής έκφρασης της *δmyc-Smad3Δ200-230* απουσία του *ca-ALK5*, μπορεί να αποδοθεί σε πιθανή διαταραχή της αλληλεπίδρασης της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με πρωτεΐνες που συγκατούν την *Smad3* στο κυτταρόπλασμα απουσία του TGFβ.



**Εικόνα 20. Η εσωτερική απαλοιφή Δ200-230 δεν επηρεάζει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της αγρίου 6myc Smad3, pcDNAIamp6myc Smad3 (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> σειρά), και με τον αντίστοιχο φορέα έκφρασης της Smad3 Δ200-230 (3<sup>η</sup>,4<sup>η</sup> σειρά) απουσία ή παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου (ca) υποδοχέα ALK5 όπως υποδεικνύεται στο σχήμα. Χρησιμοποιήθηκαν 2 μg από κάθε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης και ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-myc (9E10) έναντι του επίτοπου που φέρουν οι Smad3 πρωτεΐνες, anti-mouse FITC-συζευγμένο δευτερεύον αντίσωμα και μικροσκόπιο συνεστίασης. Πραγματοποιήθηκε και χρώση με DAPI για τον εντοπισμό του πυρήνα επιλεγμένων κυττάρων.

## Απαλοιφή της περιοχής Δ200-230 επηρεάζει την φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση μεταξύ της Smad3 και του συνενεργοποιητή p/CAF

Προκειμένου να ελεγχθεί περαιτέρω ο μηχανισμός της μεταγραφικής απενεργοποίησης της μεταλλαγμένης Smad3 πρωτεΐνης που φέρει την εσωτερική απαλοιφή των 30 αμινοξέων (Smad3 Δ200-230), κρίθηκε σκόπιμο να αναλυθεί η ικανότητα αλληλεπίδρασής της, φυσικά αλλά και λειτουργικά, με τον συνενεργοποιητή p/CAF. Έχει δειχθεί προηγουμένως ότι η αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με αυτόν τον συνενεργοποιητή όπως και με τον ομόλογο του GCN5 (Itoh et al., 2000, Kahata et al., 2004). Για την ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα σύγχρονο και ευαίσθητο σύστημα μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση (de Boer et al., 2003). Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής παρουσιάζεται στην **Εικόνα 21**. Στο σύστημα αυτό χρησιμοποιείται Smad3 πρωτεΐνη κλωνοποιημένη στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3Bio σε σύντηξη, στο N-τερματικό της άκρο, με ένα πεπτίδιο 23 αμινοξέων το οποίο είναι στόχος βιοτινυλίωσης από την βακτηριακή λιγάση βιοτίνης BirA. Η BioSmad3 πρωτεΐνη βιοτινυλιώνεται σε κύτταρα θηλαστικών όταν συνεκφράζεται στα κύτταρα αυτά η BirA. Η βιοτινυλίωση της Smad3 *in vivo* μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Οποιαδήποτε πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την Bio-Smad3 συνκατακρημνίζεται με την αγαρόζη-στρεπταβιδίνη και η ανάλυση γίνεται με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση με την χρήση των κατάλληλων αντισωμάτων. Με το σύστημα της βιοτινυλίωσης *in vivo* έχει δειχθεί πρόσφατα ότι η απαλοιφή της περιοχής 200-230 δεν επηρεάζει την ικανότητα ομοπολυμερισμού και ετεροπολυμερισμού της Smad3 πρωτεΐνης (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004).

Οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε ανθρώπινα νεφρικά εμβρυικά κύτταρα HEK293T απουσία ή παρουσία της αγρίου τύπου και των μεταλλαγμένων μορφών της 6mycSmad3 κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης ή μη από τον συστασιακά ενεργό υποδοχέα ca-ALK5. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22B**, η αγρίου τύπου Bio-Smad3 μετά την βιοτινυλίωση της αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή p/CAF μόνο μετά την ενεργοποίηση της από τον ca-ALK5 (διαδρομή 3, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Αντιθέτως, η Bio-Smad3Δ200-230 δεν μπορεί να συνκατακρημνίσει τον p/CAF ακόμα και μετά την βιοτινυλίωση και ενεργοποίηση

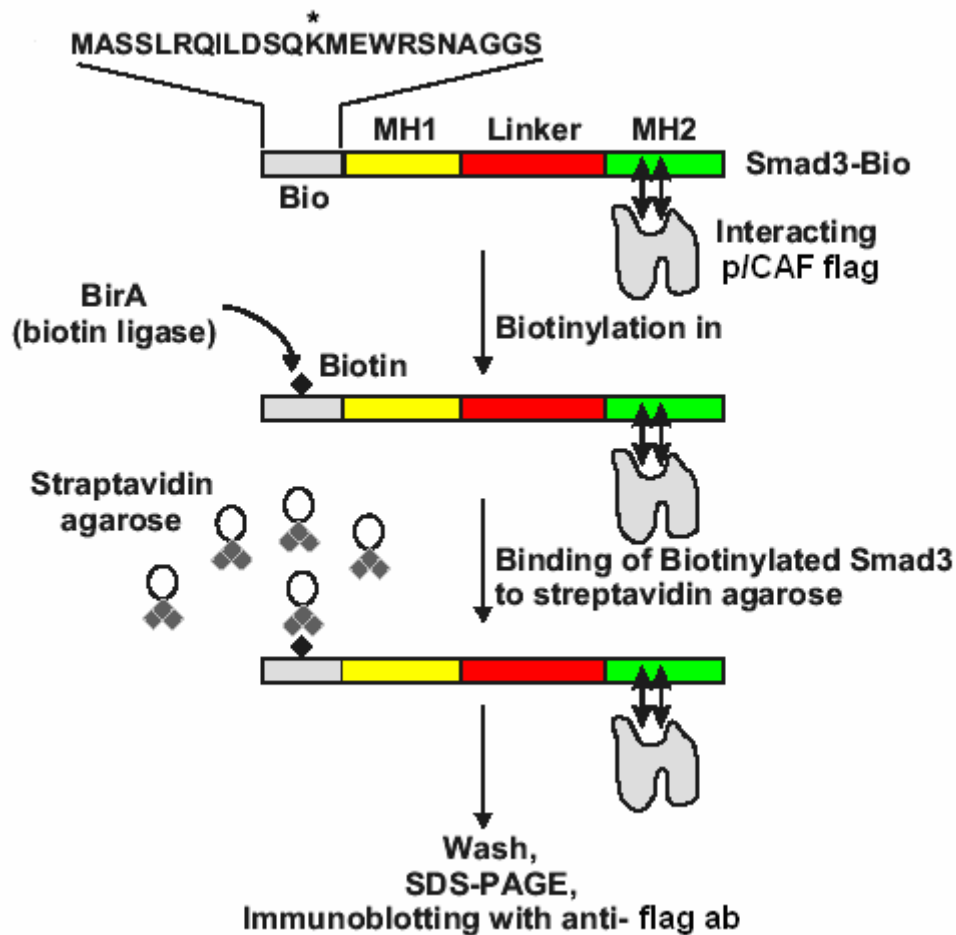


της από τον ca-ALK5 (διαδρομή 3, δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Από το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνουμε ότι η περιοχή 200-230 του linker είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της Smad3 με τον p/CAF.

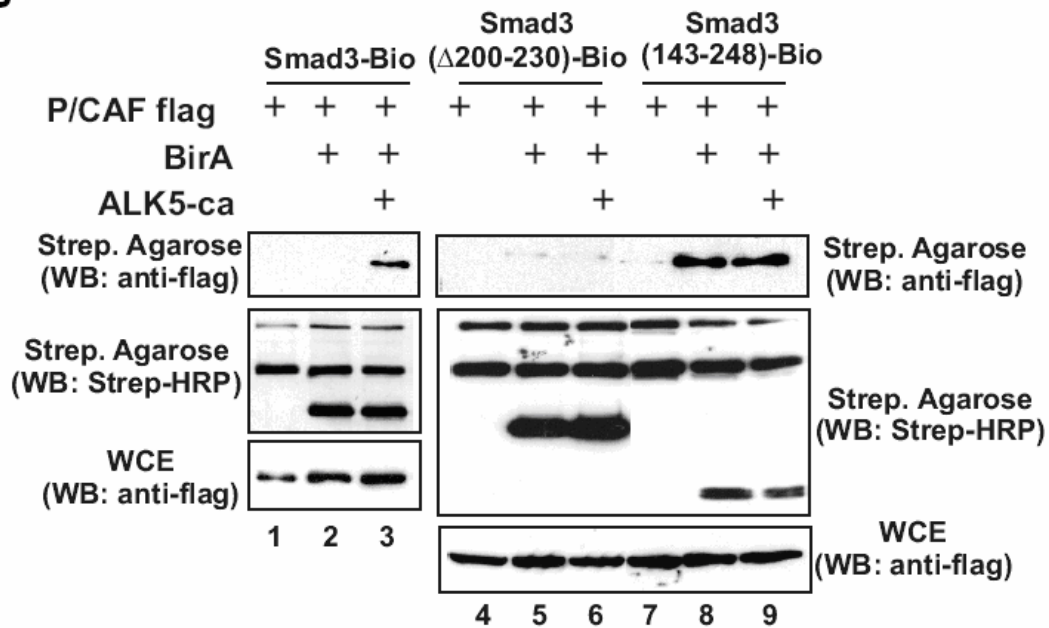
Σε ένα αντίστοιχο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε η Bio-Smad3 143-248 η οποία αποτελείται μόνο από την περιοχή του linker και τα πρώτα 18 αμινοξέα της περιοχής MH2 και εμφανίζει υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 22B** η Bio-Smad3 143-248 αλληλεπιδρά ισχυρά μετά την βιοτινυλίωση της με τον συνενεργοποιητή p/CAF ακόμη και χωρίς την ενεργοποίηση της από τον ca-ALK5 (διαδρομή 5,6, δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς η Bio-Smad3 143-248 στερείται των C-τερματικών θέσεων φωσφορυλίωσης από τον υποδοχέα ALK5 στην MH2 περιοχή. Όπως δείχνει το τρίτο ανοσοαποτύπωμα δεξιά όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επίτοπου flag που φέρει ο p/CAF σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, η έλλειψη αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης Smad3 Δ200-230 με τον p/CAF δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση του συνενεργοποιητή. Επίσης, οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αναλύσεις εκφράζονται σε συγκρίσιμα επίπεδα όπως δείχνει το δεύτερο ανοσοαποτύπωμα δεξιά, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα στρεπταβιδίνης συζευγμένο με HRP.

Για τον περαιτέρω έλεγχο της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad3 Δ200-230 και Smad3 143-248 πρωτεϊνών παρουσία η απουσία του p/CAF, χρησιμοποιήθηκε το ετερόλογο σύστημα GAL4. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάστηκαν πλασμίδια έκφρασης που φέρουν τις ελλειμματικές μορφές της Smad3 πρωτεΐνης σε σύντηξη στο N-τερματικό τους άκρο με την περιοχή DBD της GAL4. Η μεταγραφική δραστηριότητα των μεταλλαγμένων μορφών συγκρίθηκε με εκείνη της αγρίου τύπου GAL4-Smad3, σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα, HepG2. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 23**, η αγρίου τύπου GAL4-Smad3 πρωτεΐνη ενεργοποίησε τον συνθετικό υποκινητή G5-E1B κατά 90 φορές. Ο συνενεργοποιητής p/CAF ενεργοποίησε την αγρίου τύπου GAL4-Smad3 μόνο παρουσία του ca-ALK5. Αντιθέτως, ο p/CAF δεν είχε καμία επίδραση στη δραστηριότητα της υβριδικής GAL4-Smad3Δ200-230, απουσία η παρουσία του ca-ALK5. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ της Smad3 και του p/CAF απαιτεί την περιοχή 200-230 αλλά και την ενεργοποίηση από τον υποδοχέα ca-ALK5.

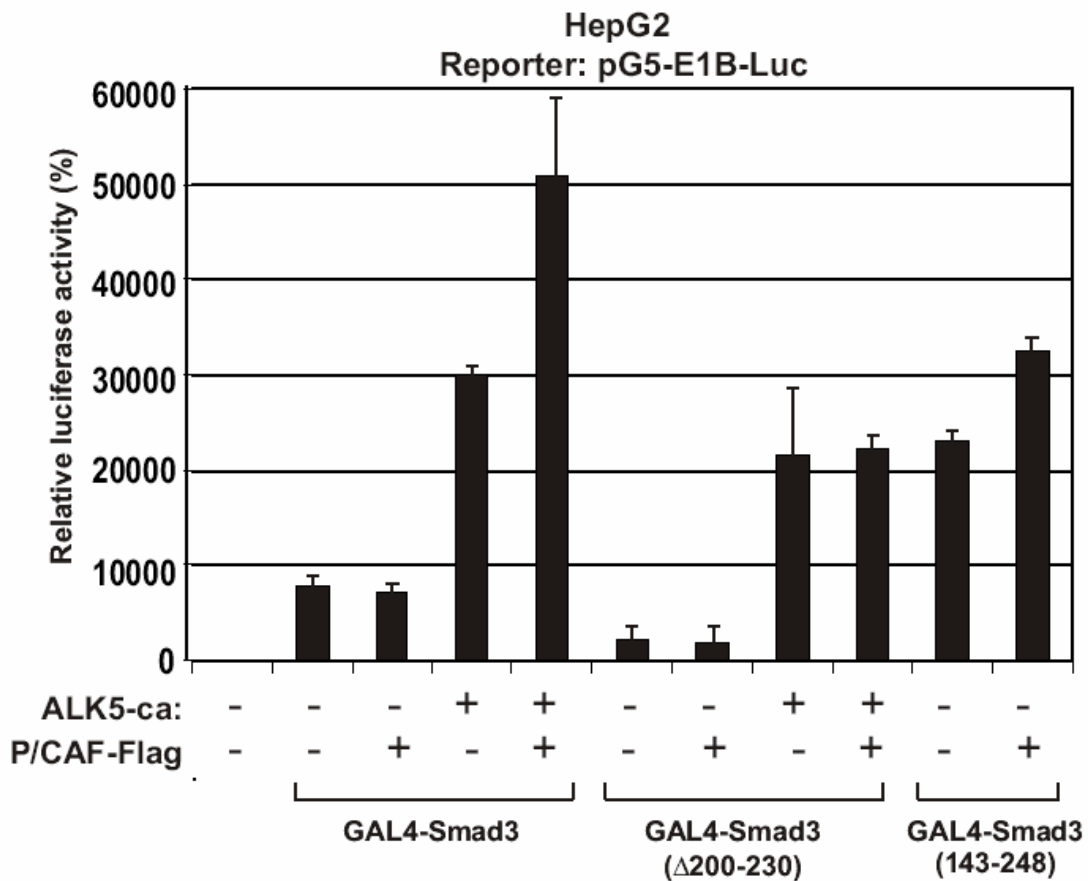
Τέλος, η GAL4-Smad3 143-248 ενεργοποίησε μεταγραφικά τον υποκινητή G5-E1B απουσία και παρουσία του p/CAF συνενεργοποιητή, παρατήρηση που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της φυσικής αλληλεπίδρασης που φαίνονται στην **Εικόνα 22**.



**Εικόνα 21. Βασική αρχή του συστήματος *in vivo* βιοτινυλίωσης των πρωτεϊνών.** Το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων της Bio-Smad3 με άλλες πρωτεΐνες. Η Smad3 βιοτινυλιώνεται από την βακτηριακή λιγάση BirA και μπορεί κατόπιν να προσδεθεί σε αгарόζη επικαλυμμένη με στρεπταβιδίνη. Οποιαδήποτε πρωτεΐνη, στη συγκεκριμένη περίπτωση ο συνενεργοποιητής p/CAF, αλληλεπιδρά με την Smad3 συν-κατακρημνίζεται με την αгарόζη στρεπταβιδίνη στην οποία έχει προσδεθεί η Bio-Smad3.

**A****B**

**Εικόνα 22. Απαλοιφή της κεντρικής περιοχής αφαιρεί την ικανότητα φυσικής αλληλεπίδρασης της Smad3 πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή p/CAF.** **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών Smad3 $\Delta$ 200-230 και Smad3 143-248, οι οποίες φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο το 22 αμινοξέων Bio πεπτίδιο που είναι στόχος βιοτινυλίωσης από την BirA λιγάση βιοτίνης. **B.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio, της πρωτεΐνης Bio Smad3 ( $\Delta$ 200-230), της πρωτεΐνης Bio-Smad3 ( $\Delta$ 228-249) ή της πρωτεΐνης Bio Smad3 143-248 και τον φορέα έκφρασης του συνενεργοποιητή p/CAF Flag, σε ποσότητα 7.5  $\mu$ g από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5  $\mu$ g) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGF $\beta$ , ca-ALK5 (7.5  $\mu$ g), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αγαρόζη στρεπταβιδίνης (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμιση της p/CAF Flag ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-Flag αντίσωμα (1:2500) έναντι του επίτοπου Flag του p/CAF Flag και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Strep.:στρεπταβιδίνη (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004).



**Εικόνα 23.** Απαλοιφή της κεντρικής περιοχής αφαιρεί την ικανότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης της Smad3 με τον συνενεργοποιητή p/CAF. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5-E1B-Luc (3μg) και τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της GAL4-Smad3, ή της GAL4-Smad3 $\Delta$ 200-230, ή της GAL4-Smad3 (143-248), (1.5μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του υποδοχέα ALK5-ca και του συνενεργοποιητή p/CAF. Η % δρατικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την διαδικασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (2μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

## **Μια σημειακή μετάλλαξη στην αμινοξική θέση 239 της Smad3 πρωτεΐνης αναστέλλει την μεταγραφική της ενεργότητα**

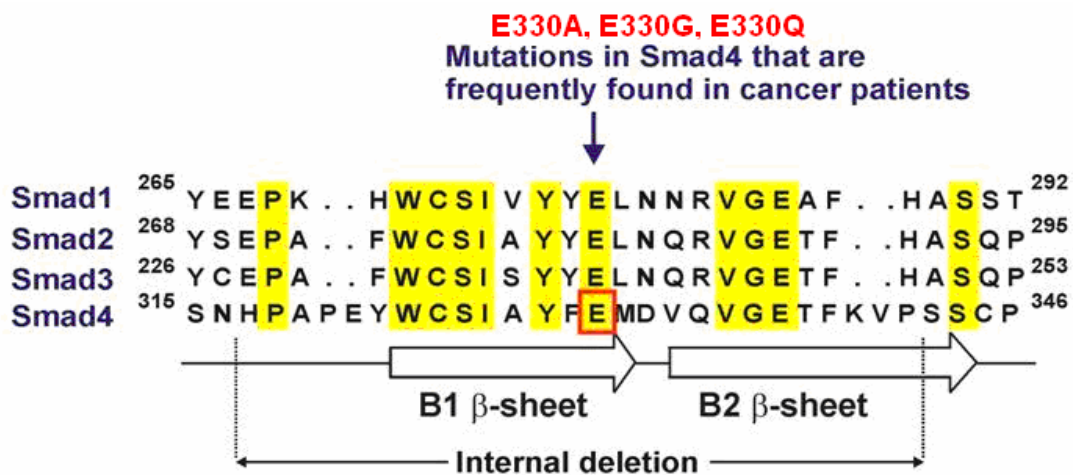
Η Smad4 πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί σημειακά μεταλλαγμένη ή ελλειμματική σε μεγάλο αριθμό καρκίνων του παγκρέατος (Massague '98). Το γλουταμινικό οξύ της θέσεως 330 στην Smad4 πρωτεΐνη έχει ανιχνευθεί μεταλλαγμένο σε αλανίνη, σε ασθενείς με καρκίνο του παχέος εντέρου (Hata et al, 2003) και συνδέεται με το σύνδρομο εμφάνισης πολυπόδων σε έφηβους (Juvenile Polyposis Syndrome, JPS)(Waite et al, 2003). Το αμινοξύ Glu330 της Smad4 πρωτεΐνης είναι ομόλογο του αμινοξέος Glu239 της Smad3 πρωτεΐνης. Στην **Εικόνα 24** φαίνεται η ομολογία μεταξύ των Smads.

Πρόσφατα κατασκευάστηκε μια μεταλλαγμένη Smad3 πρωτεΐνη που φέρει στην θέση 239 αντί του γλουταμινικού οξέος το αμινοξύ αλανίνη, η Smad3E239A (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Η μεταλλαγμένη αυτή πρωτεΐνη κατασκευάστηκε για να διερευνηθούν λεπτομερέστερα και πιο ειδικά, αμινοξικές θέσεις που παίζουν ρόλο στην μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 πρωτεΐνης. Επίσης, η μετάλλαξη E239A βρίσκεται μέσα στην περιοχή 230-248 της MH2 περιοχής της Smad3 πρωτεΐνης που όπως προαναφέρθηκε είναι απαραίτητη για την μεταγραφική της ενεργότητα.

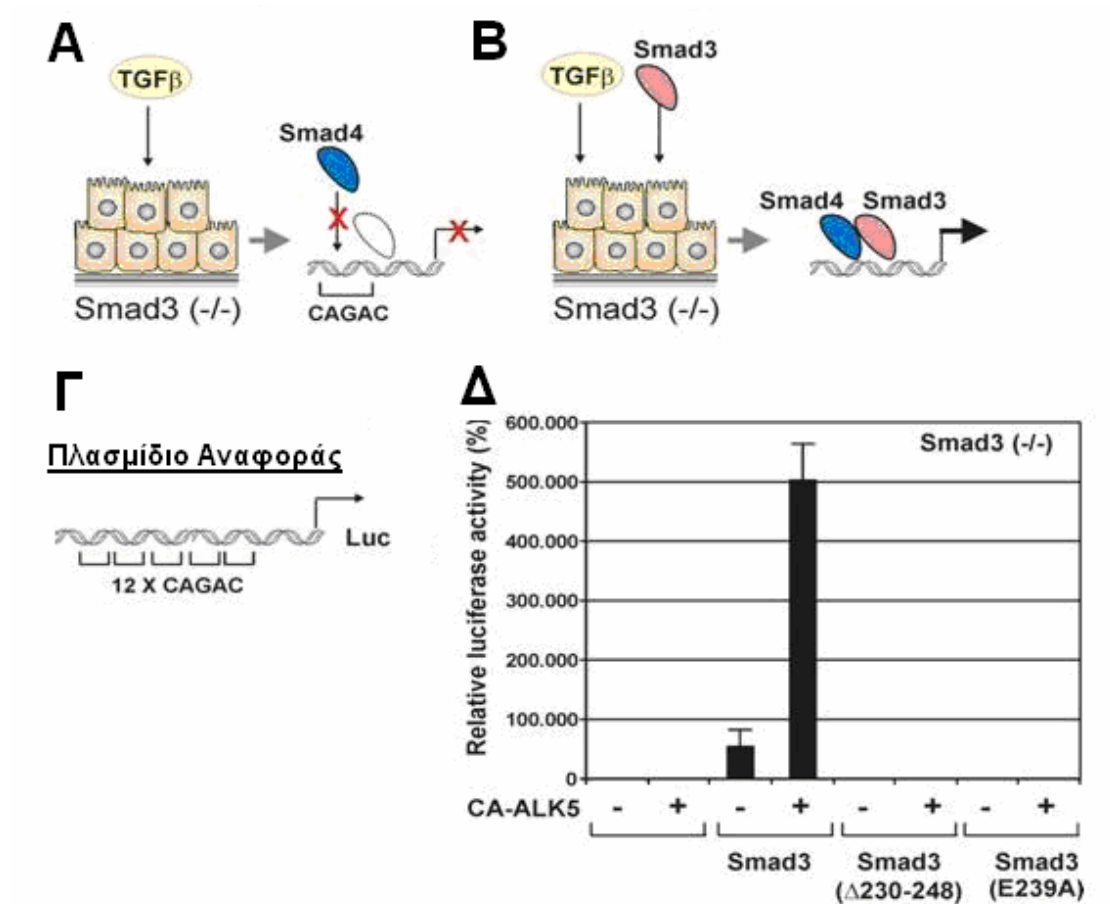
Η Smad3 E239A κλωνοποιήθηκε αρχικά στο πλασμιδιακό φορέα pcDNA1amp, με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει τον επίτοπο 6myc στο N-τερματικό άκρο της. Η μεταγραφική της δραστηριότητα ελέγχθηκε αρχικά σε κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3, που στερούνται των ενδογενών Smad3 πρωτεϊνών (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Όπως ήταν αναμενόμενο, η μεταγραφική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή (CAGA)<sub>12</sub>-E1B δεν αυξήθηκε από την έκφραση του υποδοχέα ca-ALK5, όπως και φαίνεται στην **Εικόνα 25**. Η αγρίου τύπου 6myc-Smad3 ενεργοποίησε την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή κατά 5 και 50 φορές απουσία και παρουσία του ca-ALK5 αντίστοιχα. Αντίθετα, η 6myc-Smad3Δ228-249 πρωτεΐνη δεν ενεργοποίησε τον υποκινητή τόσο απουσία, όσο και παρουσία του ca-ALK5. Αυτό το εύρημα πιθανόν να οφείλεται σε ελαττωμένη σταθερότητα της πρωτεΐνης λόγω της μετάλλαξης. Για να εξακριβωθεί αυτή η πιθανότητα, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA1amp6mycSmad3 και pcDNA1amp6mycSmad3E239A απουσία ή παρουσία της κυκλοεξιμίδης

(cycloheximide) αντιβιοτικό που αναστέλλει την σύνθεση πρωτεϊνών στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 26** φαίνεται ότι η σημειακά μεταλλαγμένη *6myc-Smad3E239A* χάνει τελείως την σταθερότητα της, ακόμη και μετά από 6 ώρες επώασης των κυττάρων με το αντιβιοτικό. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή *α-tubulin* η οποία εκφράζεται σταθερά στα κύτταρα.

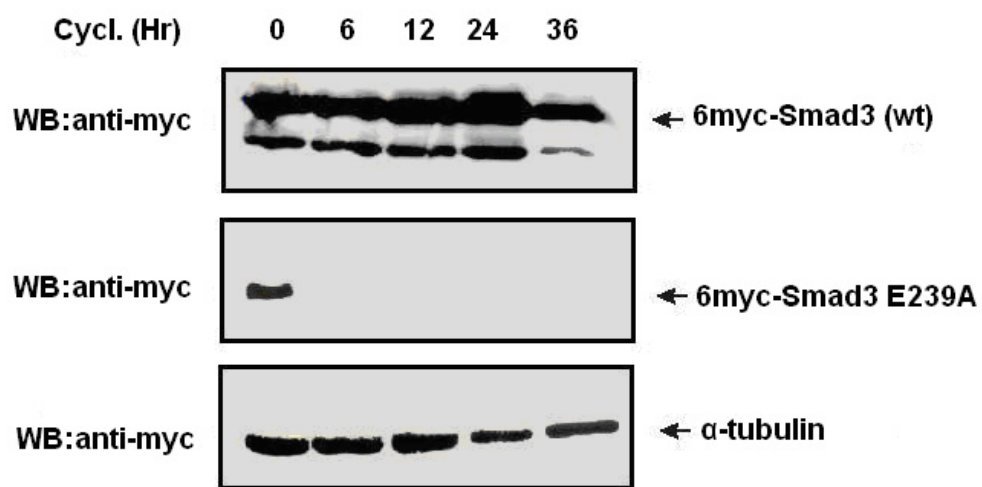
Τα αποτελέσματα των **Εικόνων 25, 26** υποδεικνύουν ότι η εισαγωγή της καρκινογόνου μετάλλαξης της *Smad4 E330A* στην *Smad3* πρωτεΐνη (E239A) αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα της *Smad3* και την αποσταθεροποιεί πλήρως. Έχει δειχθεί επίσης ότι η μετάλλαξη E239A αναστέλλει την ενεργοποίηση της *Smad3* πρωτεΐνης από τον TGF- $\beta$ , την ικανότητα αλληλεπίδρασης της με τον συνενεργοποιητή p/CAF, τον ομοπολυμερισμό της και τον ετεροπολυμερισμό της με την *Smad4* πρωτεΐνη (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004).



**Εικόνα 24. Ομολογία ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών στην περιοχή 230-248 της MH2 περιοχής.** Υποδεικνύονται με βέλος οι μεταλλάξεις που έχουν ανιχνευθεί στο συντηρημένο γλουταμινικό αμινοξύ της θέσεως 330 της *Smad4* πρωτεΐνης. Με κίτρινο επισημαίνονται τα συντηρημένα αμινοξέα ανάμεσα στις Smads. Με κόκκινο τετράγωνο υποδεικνύεται η σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης στο αμινοξύ 330 της *Smad4*, το οποίο σχετίζεται με καρκινογένεση. Οι διακεκομμένες γραμμές περικλείουν την ενεργή περιοχή που περικλείει τα αμινοξέα 228-248 της *Smad3* πρωτεΐνης. Τα μεγάλα λευκά βέλη αντιπροσωπεύουν τις  $\beta$  πτυχωτές επιφάνειες  $\beta 1$  και  $\beta 2$  της MH2 περιοχής.



**Εικόνα 25. Επίδραση της σημειακής μετάλλαξης E239A στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης. Α.** Κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3 (Smad3<sup>-/-</sup>) που στερούνται των ενδογενών Smad3 μορίων εάν επιμολυνθούν μόνο με την Smad4 πρωτεΐνη δεν θα ενεργοποιήσουν το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-Luc. **Β** Συνέκφραση των Smad3 (wt) και Smad4 θα οδηγήσει στην ενεργοποίηση του υποκινητή. **Γ.** Σχηματική αναπαράσταση του συνθετικού υποκινητή (CAGA)<sub>12</sub> που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις που δείχνονται στο Δ. **Δ.** Κύτταρα JEG-3 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-Luc (1μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, ή της 6myc-Smad3 E239A (1μg) πρωτεΐνης, ή της 6myc-Smad3 Δ230-248 απουσία ή παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5 (1μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1μg).



**Εικόνα 26. Επίδραση της σημειακής μετάλλαξης E239A στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης** HEK 293T κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου Smad3 ή της Smad3 E239A. Υπήρξε επώαση των επιμολυμένων κυττάρων με κυκλοεξιμίδη (50mg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα και τα επίπεδα έκφρασης των Smad3 πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας anti-myc μονόκλωνο αντίσωμα. Τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών εκτιμήθηκαν με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή  $\alpha$ -tubulin.

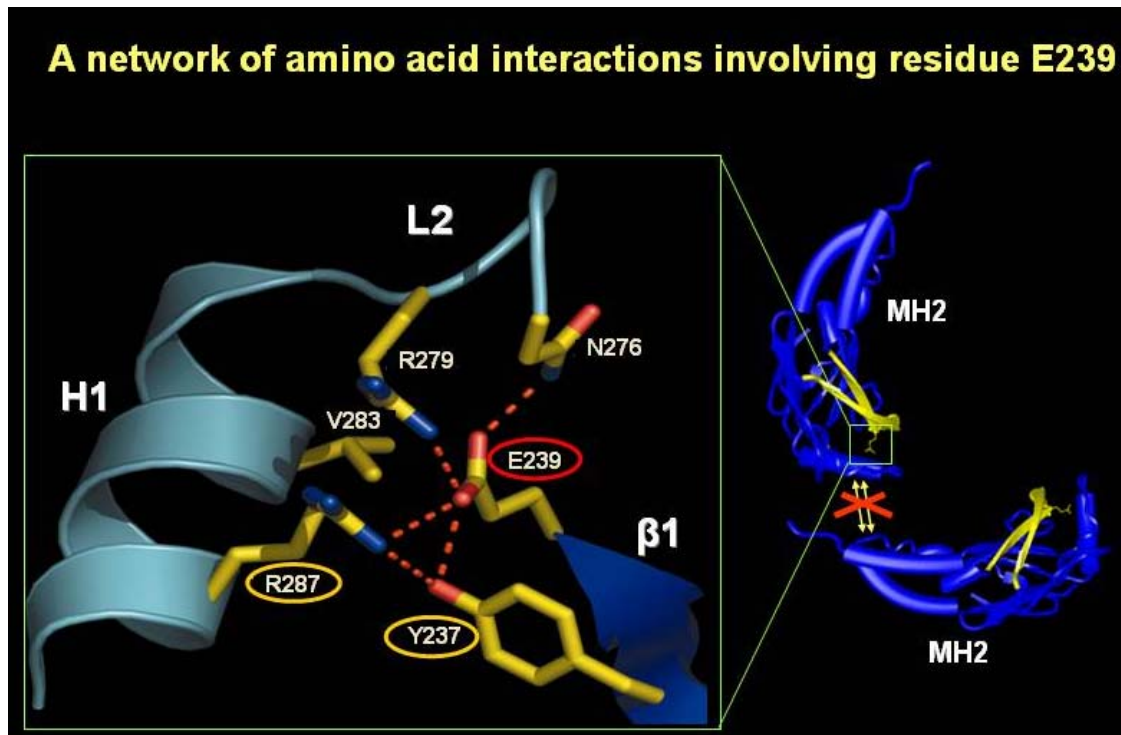


## Επίδραση σημειακών μεταλλάξεων της Smad3 πρωτεΐνης στην λειτουργία της

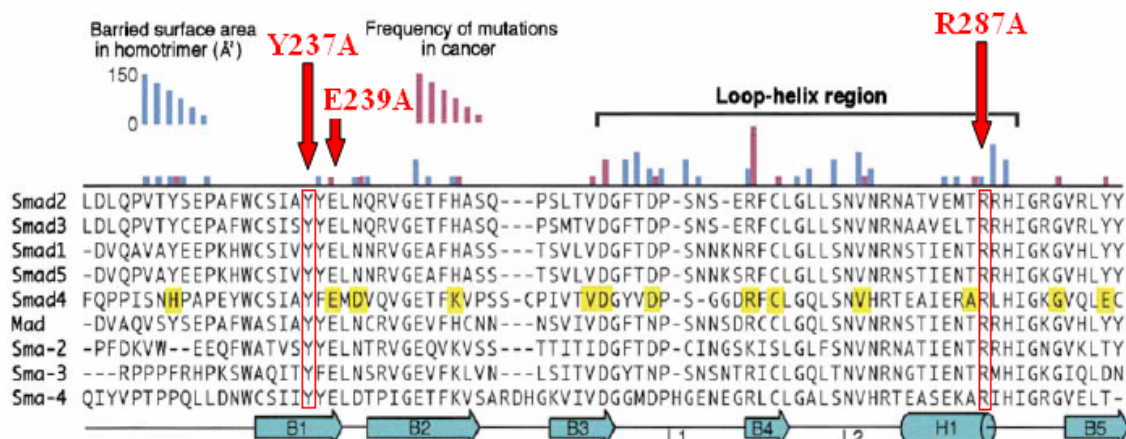
Η σημαντική επίδραση της σημειακής μετάλλαξης E239A στην λειτουργία της Smad3 πρωτεΐνης, η ανάγκη για λεπτομερέστερο και πιο συγκεκριμένο χαρακτηρισμό αμινοξικών θέσεων που παίζουν ρόλο στην λειτουργία της, καθώς και η ανάγκη συσχετισμού των ευρημάτων με τον βιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης, έστρεψαν την προσοχή μας στην περιοχή που περικλείει την θέση της μετάλλαξης E239A. Το γλουταμινικό οξύ της θέσεως 239 της Smad3 πρωτεΐνης βρίσκεται στην β1 πτυχωτή επιφάνεια της MH2 περιοχής και αλληλεπιδρά με τα γειτονικά αμινοξέα των θέσεων 237, 276, 279, 287. Το σύμπλεγμα των παραπάνω αμινοξέων, καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ τους παρουσιάζεται στην **Εικόνα 27**. Η αλληλεπίδραση των αμινοξέων με το γλουταμινικό οξύ της θέσης 239 οδήγησε στον σχεδιασμό δύο νέων σημειακών μεταλλάξεων. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε μια μεταλλαγμένη Smad3 που φέρει στην θέση 237 αντί της τυροσίνης το αμινοξύ αλανίνη (Smad3 Y237A) και μια δεύτερη που φέρει στην θέση 287 αντί της αργινίνης το αμινοξύ αλανίνη (Smad3 R287A). Στην **Εικόνα 28** υποδεικνύεται η ομολογία μεταξύ των Smads και οι θέσεις των σημειακών μεταλλάξεων.

Οι Smad3 Y237A και Smad3 R287A κλωνοποιήθηκαν στο πλασμιδιακό φορέα pcDNA1amp, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρουν τον επίτοπο 6myc στο N-τελικό άκρο. Προκειμένου να ελεγχθεί η σταθερότητα αυτών των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια έκφρασης pcDNA1amp6mycSmad3, pcDNA1amp6mycSmad3Y237A και pcDNA1amp6mycSmad3R287A απουσία ή παρουσία κυκλοεξιμίδης (cycloheximide) σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό anti-myc αντίσωμα ποντικού. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή  $\alpha$ -actin και  $\alpha$ -tubulin οι οποίες εκφράζονται σταθερά στα κύτταρα. Όπως δείχνεται στις **Εικόνες 29, 30** οι σημειακές μεταλλάξεις Y237A και R287A μειώνουν την σταθερότητα, αλλά δεν αποσταθεροποιούν την Smad3 πρωτεΐνη καθώς η 6myc-Smad3Y237A και η 6myc-Smad3 R287A εκφράζονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα και μετά από 24 ώρες επώασης των κυττάρων με την κυκλοεξιμίδα.

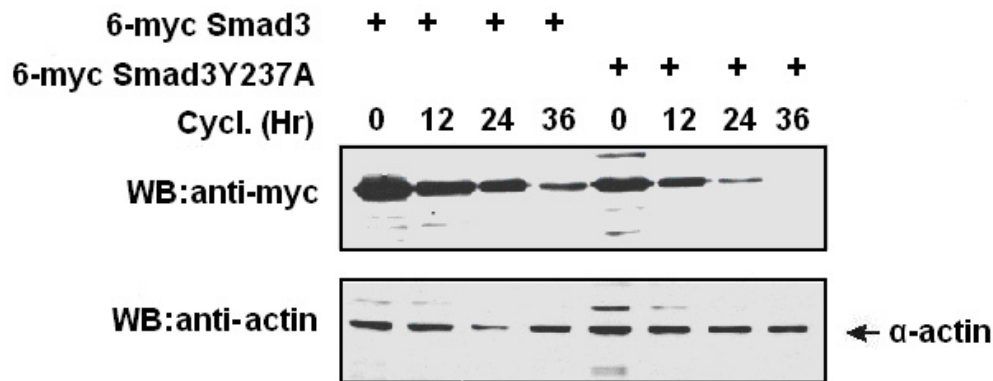
Συμπερασματικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η αντικατάσταση της τυροσίνης της θέσεως 237 καθώς και η αντικατάσταση της αργινίνης της θέσεως 287 με αλανίνη δεν επηρεάζει την σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης.



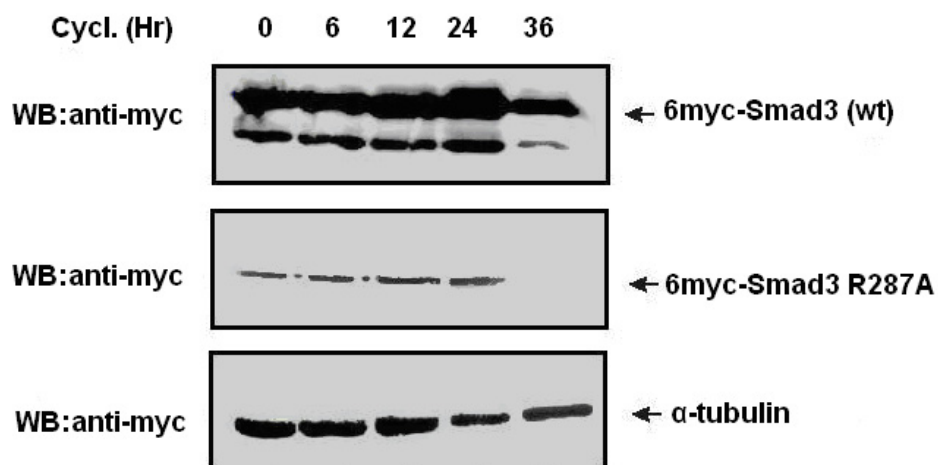
**Εικόνα 27.** Αλληλεπίδραση των κρίσιμων υπό μελέτη αμινοξέων στην MH2 περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης. Αλληλεπίδραση του αμινοξέως Glu239 της β1 πτυχωτής επιφάνειας της Smad3 πρωτεΐνης με την γειτονική Tyr237, την Asn276 της L2 θηλιάς και τις Arg279 και Arg287 της α-έλικας 1 (H1). Επισημαίνονται με κύκλο οι σημειακές μεταλλάξεις υπό μελέτη.



**Εικόνα 28.** Θέση των υπό μελέτη μεταλλάξεων της Smad3 πρωτεΐνης (Hata et al, 1998)



**Εικόνα 29.** Επίδραση της σημειακής μετάλλαξης Y237A στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης HEK 293T κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου Smad3 ή της Smad3 Y237A. Υπήρξε επώαση των επιμολυμένων κυττάρων με κυκλοεξιμίδη (50mg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα και τα επίπεδα έκφρασης των Smad3 πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας anti-myc μονόκλωνο αντίσωμα. Τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών εκτιμήθηκαν με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή α-actin.



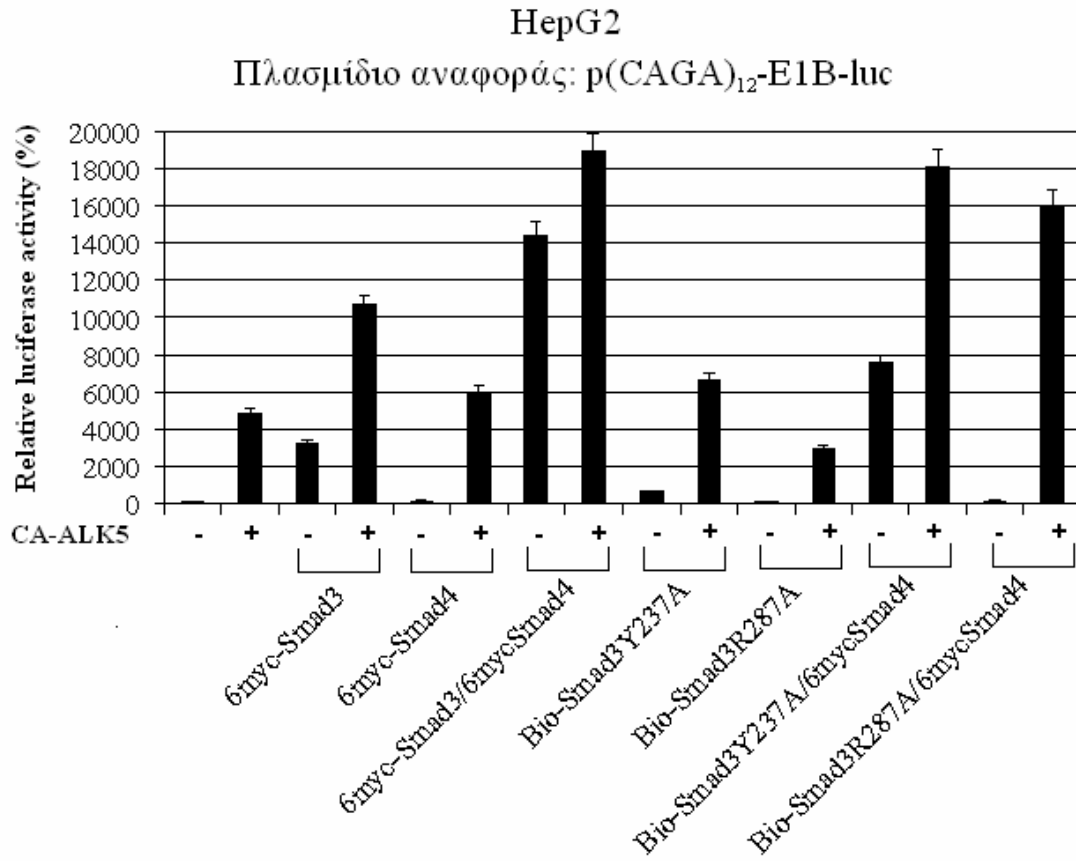
**Εικόνα 30.** Επίδραση της σημειακής μετάλλαξης R287A στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης HEK 293T κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου Smad3 ή της Smad3 R287A. Υπήρξε επώαση των επιμολυμένων κυττάρων με κυκλοεξιμίδη (50mg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα και τα επίπεδα έκφρασης των Smad3 πρωτεϊνών παρατηρήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας anti-myc μονόκλωνο αντίσωμα. Τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών εκτιμήθηκαν με την χρήση αντισώματος που αναγνωρίζει την ενδογενή α-tubulin.

## Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης των Smad3 Y237A και Smad3 R287A με την Smad4 πρωτεΐνη

Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα αλληλεπίδρασης των δύο σημειακά μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης, Smad3 Y237A και Smad3 R287A με την Smad4, πραγματοποιήθηκε πείραμα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε ηπατικά κύτταρα ανθρώπου HepG2. Χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης Bio-Smad3Y237A και Bio-Smad3R287A οι οποίοι φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο το Bio πεπτίδιο. Ο συνθετικός υποκινητής p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc που χρησιμοποιήθηκε, αποτελείται από δώδεκα διαδοχικές θέσεις επαναλήψεις της αλληλουχίας 5' CAGAC 3' που είναι το στοιχείο πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών (Smad Binding Element, SBE) και τον ελάχιστο E1B υποκινητή σε σύζευξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης. Όπως φαίνεται στο γράφημα (**Εικόνα 31**), παρουσία του ca-ALK5 ο συνθετικός υποκινητής p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά κατά 48 φορές. Η έκφραση της αγρίου τύπου 6myc-Smad3 αύξησε την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή κατά 32 φορές απουσία του ca-ALK5 και κατά 106 φορές παρουσία αυτού (αύξηση κατά 3,3 φορές). Η έκφραση της 6myc-Smad4 προκάλεσε ελάχιστη αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή απουσία του ca-ALK5, ενώ παρουσία αυτού κατά 60 φορές. Η συνέκφραση των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 προκάλεσε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή τόσο απουσία του ca-ALK5 (144 φορές) όσο και παρουσία αυτού (189 φορές). Η έκφραση της Bio-Smad3 Y237A ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 6,6 και 66 φορές, απουσία και παρουσία του υποδοχέα ca-ALK5 αντίστοιχα. Η συνέκφραση της Bio-Smad3 Y237A με την 6myc-Smad4 ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 76 φορές απουσία του ca-ALK5 και 180 φορές παρουσία αυτού, περίπου όσο ενεργοποίησε τον υποκινητή η συνέκφραση της αγρίου τύπου 6myc-Smad3 με την 6myc-Smad4 παρουσία του ca-ALK5. Η έκφραση της Bio-Smad3 R287A δεν ενεργοποίησε σε καμία περίπτωση τον υποκινητή απουσία του ca-ALK5, ενώ παρατηρήθηκε ενεργοποίηση κατά 30 φορές παρουσία αυτού, ενεργοποίηση μικρότερη από αυτήν που παρουσίασε ο υποκινητής παρουσία του ca-ALK5. Η συνέκφραση των Bio-Smad3 R287A και 6myc-Smad4 δεν προκάλεσε ενεργοποίηση του υποκινητή απουσία του ca-ALK5, ενώ σημειώθηκε δραματική αύξηση παρουσία αυτού (κατά 160 φορές).

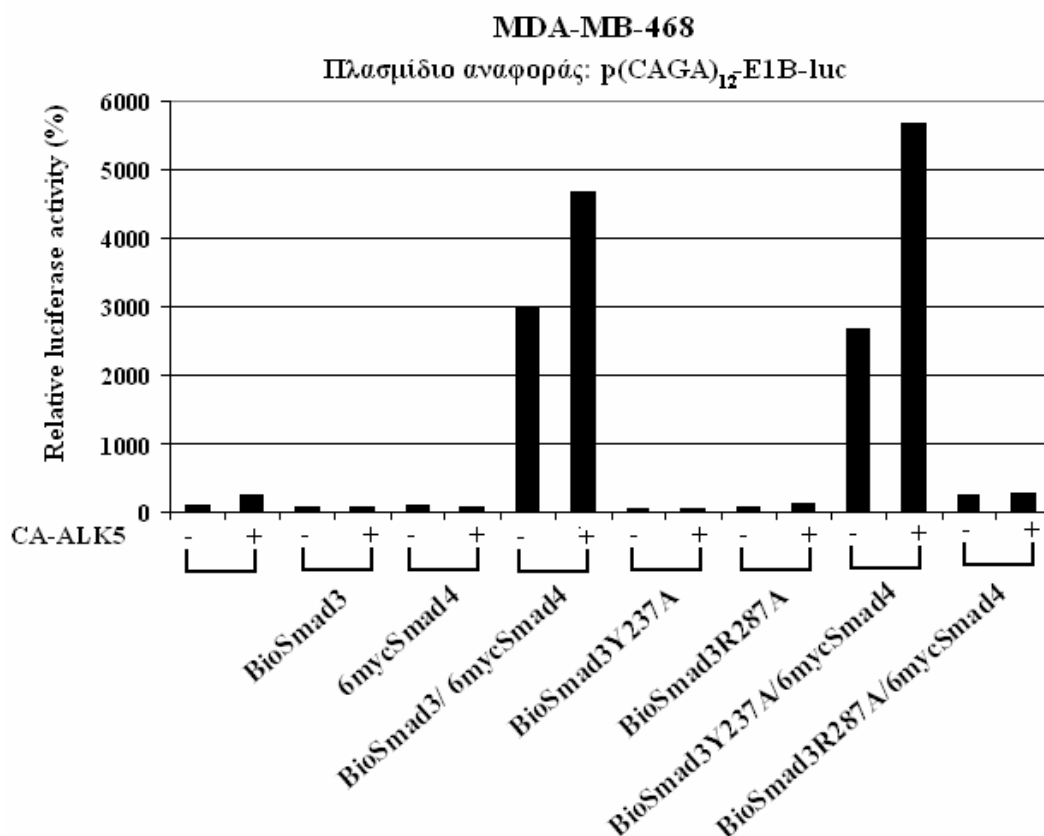
Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η σημειακή μετάλλαξη Y237A μειώνει λίγο την μεταγραφική δραστικότητα της Smad3 πρωτεΐνης. Αντιθέτως, η μετάλλαξη R287A αναστέλλει την δραστικότητα της Smad3 αλλά η συνέκφραση της *6myc-Smad4* προκαλεί μία ALK5-εξαρτώμενη δράση της μεταλλαγμένης αυτής Smad3 πρωτεΐνης.

Για να ελεγχθεί περαιτέρω η ικανότητα αλληλεπίδρασης των δύο σημειακά μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης με την Smad4 πρωτεΐνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468, τα οποία στερούνται ενδογενούς Smad4 πρωτεΐνης. Τα κύτταρα αυτά επιμόλυνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της Bio-Smad3, *6myc-Smad4*, Bio-Smad3 Y237A ή Bio-Smad3 R287A. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του Ca-ALK5. Όπως δείχνει η **Εικόνα 32**, η αγρίου τύπου Bio-Smad3 ενεργοποιεί τον υποκινητή (κατά 29,5 φορές) παρουσία της συνεκφραζόμενης Smad4, ενώ η ενεργοποίηση αυτή αυξήθηκε περαιτέρω από την παρουσία του ca-ALK5 (κατά 46,5 φορές). Η Bio-Smad3 Y237A ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 27 φορές παρουσία της εξωγενούς Smad4 και η ενεργοποίηση αυτή αυξήθηκε περίπου 2 φορές παρουσία του ca-ALK5 (συνολική ενεργοποίηση κατά 56 φορές). Αντιθέτως, η Bio-Smad3 R287A δεν αλληλεπιδρά λειτουργικά με την εξωγενή Smad4 πρωτεΐνη, αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του πειράματος στα HepG2 κύτταρα. Για αυτόν τον λόγο θα διερευνηθεί περαιτέρω η μεταγραφική δραστικότητα της Smad3-R287A.



**Εικόνα 31. Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων Y237A και R287A της Smad3 πρωτεΐνης στην λειτουργική της αλληλεπίδραση με την Smad4 πρωτεΐνη.**

Ηπατικά κύτταρα ανθρώπου HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc (1μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, 6myc-Smad4, Bio-Smad3 Y237A ή Bio-Smad3 R287A σε ποσότητα 2μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα Ca-ALK5 (2μg). Η % δραστηκότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1μg).



**Εικόνα 32. Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων Y237A και R287A της Smad3 πρωτεΐνης στην λειτουργική της αλληλεπίδραση με την Smad4 πρωτεΐνη.**

Καρκινικά κύτταρα ανθρώπου επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc (1μg) και τον πλασμιακό φορέα έκφρασης της Bio-Smad3, 6myc-Smad4, Bio-Smad3 Y237A ή Bio-Smad3 R287A σε ποσότητα 2μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα Ca-ALK5 (2μg). Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιακό φορέα pCMVβ-gal (1μg).

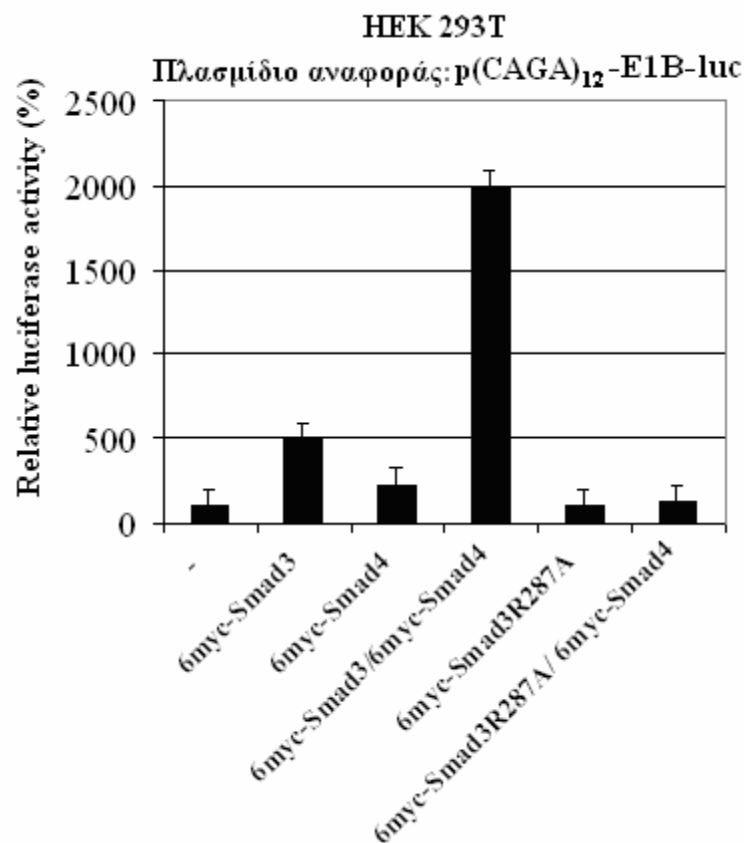
## Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης της Smad3 R287A με την Smad4 πρωτεΐνη

Για να εξακριβωθεί η ικανότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης της Smad3 R287A με την Smad4 πρωτεΐνη, νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον συνθετικό υποκινητή p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης των 6myc-Smad3, 6myc-Smad3R287A παρουσία ή απουσία του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 33** φαίνεται ότι ο υποκινητής p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά κατά 5 φορές από την αγρίου τύπου 6myc-Smad3 και κατά 2 φορές από την 6myc-Smad4. Η συνέκφραση των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 προκάλεσε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή κατά 20 φορές. Αξιοσημείωτη ήταν η παρατήρηση ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή από την 6myc-Smad3R287A ήταν αμελητέα με την συνέκφραση της 6myc-Smad4. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την συνέκφραση της 6myc-Smad4 με την μεταλλαγμένη μορφή της Smad3, η μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή ήταν χαμηλότερη συγκρινόμενη με την ενεργοποίηση μόνο από την 6myc-Smad4. Αυτή η παρατήρηση υποδηλώνει ότι η 6myc-Smad3R287A καταστέλλει πλήρως την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή και μας οδήγησε στην υπόθεση ότι μπορεί να συμπεριφέρεται ως dominant negative.

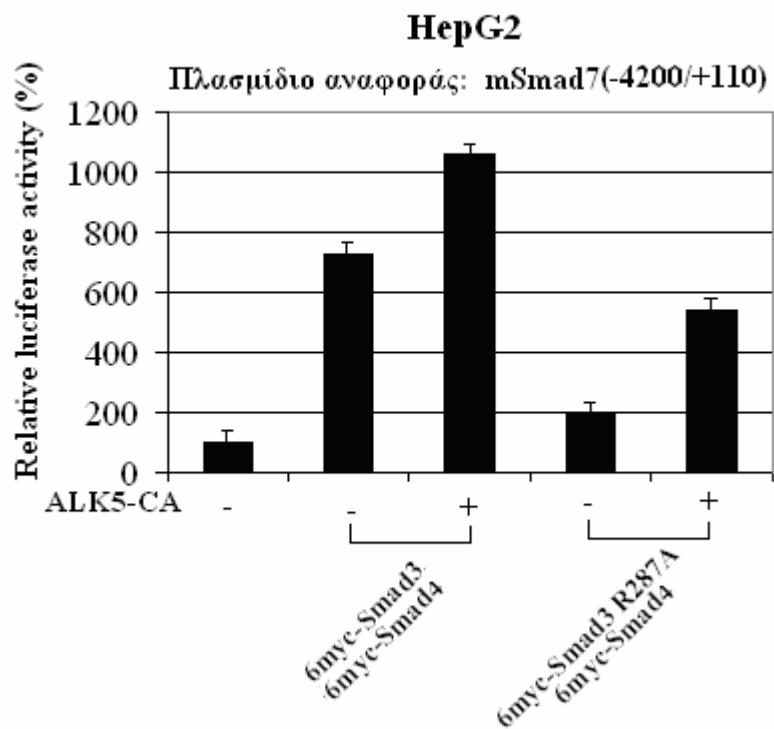
Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η μεταγραφική δραστηριότητα της 6myc-Smad3 R287A πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε πείραμα σε κύτταρα HepG2, χρησιμοποιώντας τον υποκινητή του γονιδίου Smad7 του ποντικού και τον υποδοχέα ca-ALK5. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34**, η συνέκφραση των 6mycSmad3 και 6mycSmad4 ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 7 και 10,5 φορές απουσία και παρουσία του ca-ALK5 αντίστοιχα. Η 6myc-Smad3 R287A με την συνέκφραση της 6myc-Smad4 παρουσίασε ενεργοποίηση του υποκινητή κατά 1 φορά απουσία ca-ALK5, ενώ παρουσία αυτού υπήρξε ενεργοποίηση κατά 5 φορές, ενεργοποίηση όμως μικρότερη από αυτήν που παρουσίασε η συνέκφραση της Smad3 με την Smad4 απουσία ca-ALK5.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η σημειακή μετάλλαξη R287A αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 πρωτεΐνης και την αλληλεπίδραση της με την Smad4 πρωτεΐνη.





**Εικόνα 33. Επίδραση της μεταλλαγμένης 6myc-Smad3 R287A στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)<sub>12</sub>-E1B-luc και τον πλασμιδιακό φορέα 6myc-Smad3 ή 6myc-Smad4 ή 6myc-Smad3R287A. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal., με τον οποίο επιμολύνθηκε το κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

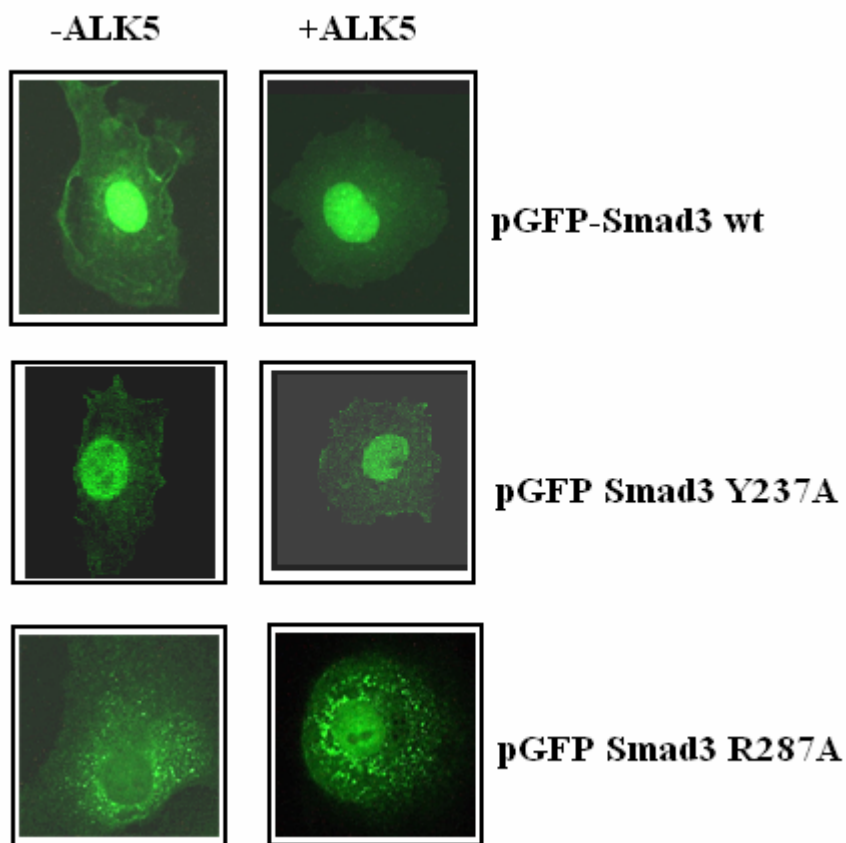


**Εικόνα 34 Επίδραση της μεταλλαγμένης 6myc-Smad3 R287A στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς mSmad7 (-4200/+110) (2μg) και τον πλασμιδιακό φορέα της 6myc-Smad3 ή 6myc-Smad4 ή 6myc-Smad3R287A (1μg), καθώς και τον υποδοχέα ALK5 (2μg). Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal., με τον οποίο επιμολύνθηκε το κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

## **Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων Y237A και R287A της Smad3 πρωτεΐνης στον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους.**

Προκειμένου να ελεγχθεί ο ενδοκυττάριος εντοπισμός αυτών των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα άμεσου ανοσοφθορισμού σε νεφρικά κύτταρα πιθήκου COS-7. Για τον σκοπό αυτό κλωνοποιήθηκαν οι μεταλλαγμένες Smad3 Y237A και Smad3 R287A στον πλασμιδιακό φορέα pGFP-C1. Τα κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τις pGFP-Smad3, pGFP-Smad3 Y237A και pGFP-Smad3 R287A τόσο απουσία όσο και παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5. Όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 35**, η αγρίου τύπου pGFP-Smad3 εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα απουσία του ca-ALK5, ενώ η συνέκφραση του ca-ALK5 οδηγεί στην συσσώρευση της στον πυρήνα. Η pGFP-Smad3Y237A τόσο απουσία όσο και παρουσία του ca-ALK5 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα. Αντιθέτως, η pGFP-Smad3R287A εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, τόσο απουσία όσο και παρουσία του ca-ALK5 καθώς είναι πιθανό να είναι εγκλωβισμένη μέσα σε ενδοσώματα, αφού παρουσιάζεται με μορφή κουκίδων (**Εικόνα 35, 3η σειρά**)

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μετάλλαξη Y237A της Smad3 πρωτεΐνης δεν εμποδίζει την είσοδο της στον πυρήνα, σε αντίθεση με την μετάλλαξη R287A η οποία φαίνεται να προκαλεί την κατακράτηση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα.



**Εικόνα 35. Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων Y237A και R287A της Smad3 πρωτεΐνης στην είσοδο τους στον πυρήνα.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς των pGFP-Smad3, ή pGFP-Smad3 Y237A, ή pGFP-Smad3 R287A απουσία και παρουσία του υποδοχέα ALK5, όλα σε ποσότητα ίση με 5μg. Οι πρωτεΐνες παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού.

## Επίδραση των σημειακών μεταλλάξεων στον ομο- και ετεροπολυμερισμό της Smad3 πρωτεΐνης

Για να ελεγχθεί η αλληλεπίδραση των σημειακά μεταλλαγμένων Smad3 Y237A και Smad3 R287A με την αγρίου τύπου Smad3, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της *in vivo* βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών. Χρησιμοποιώντας το σύστημα της βιοτινυλίωσης, ήταν δυνατή η αναπαραγωγή της γνωστής αλληλεπίδρασης της Smad3 με τον εαυτό της (ομοπολυμερισμός) και με την Smad4 (ετεροπολυμερισμός). Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν νέα πλασμίδια που εκφράζουν κάθε μια από τις μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 σε σύζευξη, στο N-τερματικό τους άκρο, με το Bio πεπτίδιο.

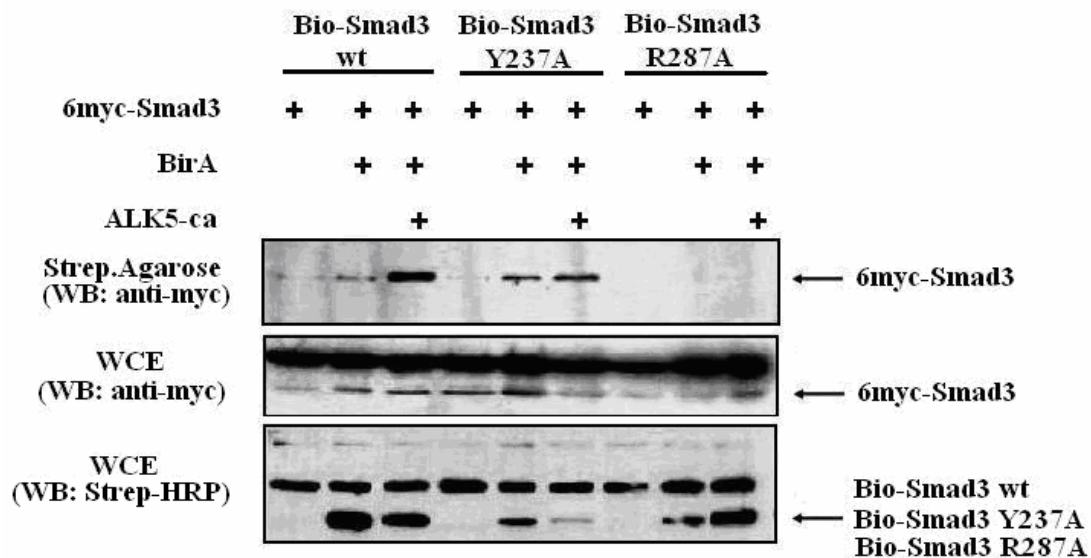
Προκειμένου να ελεγχθεί ο ομοπολυμερισμός των Smad3 Y237A και Smad3 R287A, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης της αγρίου τύπου *6myc-Smad3* και των BioSmad3, BioSmad3 Y237A, BioSmad3 R287A. Η επιμόλυνση έγινε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ1, *ca-ALK5*. Όπως δείχνει η **Εικόνα 36**, η Bio-Smad3 αλληλεπιδρά με την *6myc-Smad3* μετά την βιοτινυλίωση της από την BirA όπως επίσης και μετά την ταυτόχρονη ενεργοποίηση της από τον υποδοχέα *ca-ALK5* (πρώτο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομές 2,3). Το ίδιο ισχύει και για την BioSmad3Y237A (πρώτο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομές 5,6). Αντίθετα, η βιοτινυλιωμένη BioSmad3R287A δεν αλληλεπιδρά με την *6myc-Smad3* μετά την ενεργοποίηση της από τον υποδοχέα *ca-ALK5* (πρώτο ανοσοαποτύπωμα, διαδρομές 8,9). Η έλλειψη αλληλεπίδρασης της βιοτινυλιωμένης BioSmad3R287A με την *6myc-Smad3* δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της πρώτης (τρίτο ανοσοαποτύπωμα) ή της δεύτερης (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα), αφού ανιχνεύονται στα δείγματα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η σημειακή μετάλλαξη Y237A δεν επηρεάζει τον ομοπολυμερισμό της Smad3 πρωτεΐνης, σε αντίθεση με την R287A σημειακή μετάλλαξη η οποία φαίνεται να αναστέλλει την ικανότητα ομοπολυμερισμού της πρωτεΐνης.

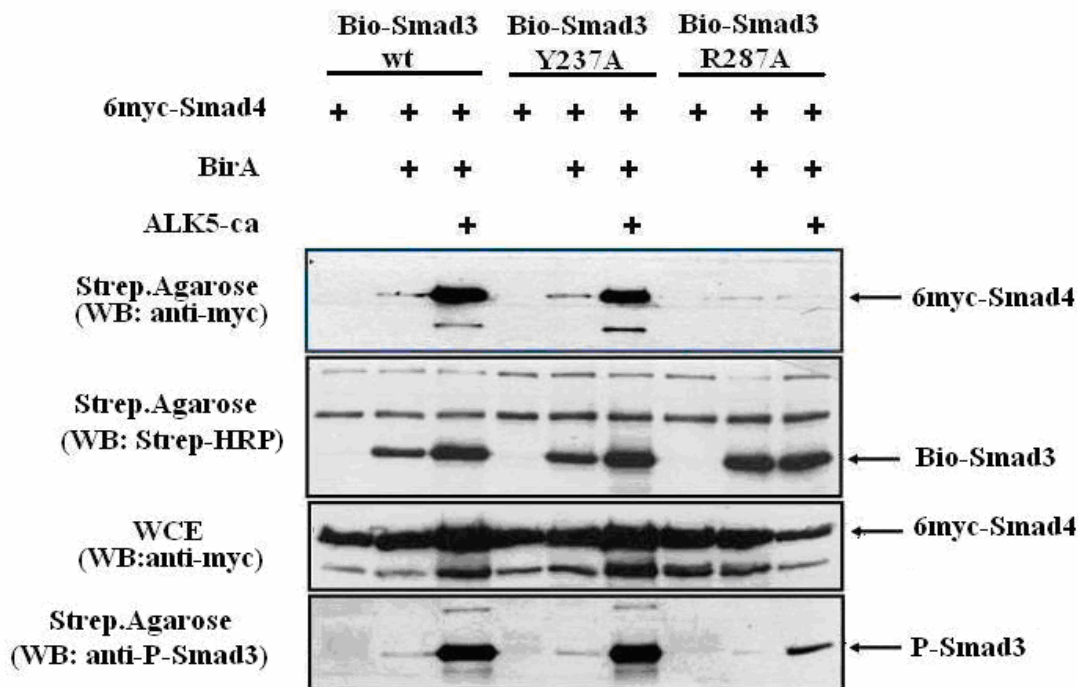
Με τον ίδιο τρόπο ελέγχθηκε και ο ετεροπολυμερισμός των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που φέρουν τις σημειακές μεταλλάξεις Y237A και R287A με την Smad4. Η **Εικόνα 37** δείχνει ότι η βιοτινυλιωμένη Bio-Smad3 Y237A

αλληλεπιδρά με την αγρίου τύπου *6myc-Smad4*, κατά έναν *ca-ALK5*-εξαρτώμενο τρόπο (διαδρομή 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα), σε αντίθεση με την *Bio-Smad3 R287A* που δεν παρουσίασε καμία αλληλεπίδραση (διαδρομές 7,8, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Επιβεβαιώθηκε και πάλι ότι η έλλειψη αλληλεπίδρασης της *Bio-Smad3 R287A* με την αγρίου τύπου *Smad4*, δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της πρώτης (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα) ή της δεύτερης (τρίτο ανοσοαποτύπωμα). Ελέγχθηκε επίσης και η ικανότητα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών από τον συστατικά ενεργοποιημένο υποδοχέα *ca-ALK5*. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα που αναγνωρίζει μόνο την φωσφορυλιωμένη μορφή της *Smad3* και όπως φαίνεται στο τέταρτο ανοσοαποτύπωμα, οι *Bio-Smad3* και *Bio-Smad3 Y237A* φωσφοριώνονται από τον *ca-ALK5* (διαδρομές 3 και 6 αντίστοιχα). Αντίθετα, η *Bio-Smad3 R287A* φαίνεται ότι φωσφορυλιώνεται σε πολύ μικρό βαθμό από τον *ca-ALK5* (διαδρομή 9, τέταρτο ανοσοαποτύπωμα).

Συνολικά, τα αποτελέσματα των **Εικόνων 36, 37** υποδηλώνουν ότι η σημειακή μετάλλαξη *Y237A* δεν επηρεάζει την ικανότητα ομοπολυμερισμού και ετεροπολυμερισμού, καθώς και φωσφορυλίωσης της *Smad3* πρωτεΐνης, ενώ η σημειακή μετάλλαξη *R287A* αναστέλλει πλήρως τις ιδιότητες ομο- και ετεροπολυμερισμού με την *Smad4*, ενώ μειώνει δραστικά και την αλληλεπίδραση της με τον υποδοχέα τύπου I.



**Εικόνα 36.** Η σημειακή μετάλλαξη R287A της Smad3 πρωτεΐνης στερείται της ικανότητας ομοπολυμερισμού με την Smad3 πρωτεΐνη. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio Smad3 Y237A ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 R287A και τον φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνη (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμνιση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό anti-myc αντίσωμα (1:2500) έναντι του επιτόπου myc της 6myc-Smad3 και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και δεύτερο ανοσοαποτύπωμα) και HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) (1:10000) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 πρωτεΐνες (τρίτο ανοσοαποτύπωμα) Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη



**Εικόνα 37.** Η Smad3 πρωτεΐνη που φέρει την σημειακή μετάλλαξη R287A στερείται της ικανότητας ετεροπολυμερισμού με την Smad4 πρωτεΐνη και φωσφορυλίωσης από τον συστασιακά ενεργοποιημένο υποδοχέα ALK5. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio Smad3 Y237A ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 R287A και τον φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνη (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμιση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-myc αντίσωμα (1:1000) έναντι του επίτοπου myc της 6myc-Smad4 και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 πρωτεΐνες (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Όπως φαίνεται στο τέταρτο ανοσοαποτύπωμα χρησιμοποιήθηκε rabbit anti-P-Smad3 αντίσωμα(1:1000). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### Η εσωτερική απαλοιφή στην κεντρική περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης επηρεάζει την λειτουργία της

Στο πρώτο μέρος της μελέτης εξετάσαμε τον ρόλο της κεντρικής περιοχής της Smad3 πρωτεΐνης, η οποία αποτελεί τον ενδοκυττάριο διαμεσολαβητή 'κλειδί' του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού, στις διάφορες χαρακτηριστικές λειτουργίες της όπως η επαγόμενη φωσφορυλίωση από τον υποδοχέα, ο ολιγομερισμός, ο πυρηνικός εντοπισμός και η μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων από τον συνδέτη TGFβ. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε με την κατασκευή διάφορων μεταλλαγμένων ελλειμματικών μορφών της Smad3 πρωτεΐνης, με την χρήση του ετερόλογου συστήματος GAL4 όπως επίσης με το σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην βιοτινυλίωση *in vivo* (de Boer et al., 2003). Η σπουδαιότητα της κεντρικής περιοχής της Smad3 στην μεταγραφική της δραστηριότητα καθορίστηκε με πείραμα μεταγραφικής ενεργοποίησης, όπου δείχθηκε ότι, η εσωτερική απαλοιφή 200-230 μειώνει δραστικά την μεταγραφική της ικανότητα. Η περιοχή 200-230 επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση διότι ήταν το μικρότερο κομμάτι της περιοχής του linker, με αυτόνομη μεταγραφική δραστηριότητα στο ετερόλογο σύστημα GAL4 (**Εικόνα 15**). Η απαλοιφή αυτή δεν είχε καμία επίδραση στην σταθερότητα της Smad3 όπως δείχνεται στην **Εικόνα 17**. Επίσης, με πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού δείξαμε ότι η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας της ελλειμματικής Smad3 δεν οφείλεται στην παρεμπόδιση της TGF-β επαγόμενης εισόδου της στον πυρήνα.

Όπως προαναφέρθηκε και δείχνει η **Εικόνα 15** η κεντρική περιοχή 143-248 της Smad3 πρωτεΐνης είναι μεταγραφικά ενεργή και αυτή η δραστηριότητα θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει, στην αλληλεπίδραση αυτής της περιοχής με πυρηνικούς συνενεργοποιητές, όπως η ακετυλοτρανφεράση ιστόνων p/CAF. Είναι πιθανό η περιοχή αυτή να παίζει ρόλο αντίστοιχο με εκείνον της περιοχής SAD (Smad Activation Domain) της Smad4 πρωτεΐνης, περιοχή 48 αμινοξέων, πλούσια σε προλίνες η οποία εντοπίζεται στην περιοχή του linker της Smad4 και έχει δειχθεί ότι είναι επαρκής για την ενεργοποίηση της μεταγραφής της πρωτεΐνης στο σύστημα GAL4 (de Caestecker et al., 2000). Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ της περιοχής 200-230 της Smad3 και της SAD περιοχής της Smad4 (**Εικόνα 16**)

αποκάλυψε την παρουσία πολλών συντηρημένων προλινών (αμινοξικές θέσεις 201, 208, 213, 222 και 228) καθώς και άλλων αμινοξέων που θα μπορούσαν να είναι σημαντικά για τη μεταγραφική δραστηριότητα των περιοχών αυτών, αλλά αυτή η υπόθεση απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση με χρήση σημειακά μεταλλαγμένων μορφών αυτών των περιοχών.

Χρησιμοποιώντας το σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση επαναλάβουμε τις καταγεγραμμένες, εξαρτώμενες από τον συνδέτη, ομοπολυμερικές και ετεροπολυμερικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad πρωτεϊνών και αναλύσαμε την επίδραση μεταλλάξεων σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Το σύστημα αυτό είναι πολύ πιο ειδικό και ευαίσθητο από το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα συν-ανοσοκατακρήμνισης (co-immunoprecipitation), λόγω της εξαιρετικά υψηλής συνάφειας και ειδικότητας της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με την στρεπταβιδίνη. Η πρόσδεση των ενδογενώς βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια αγαρόζης στρεπταβιδίνης που είναι ανιχνεύσιμες στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, δεν παρεμβαίνει στην πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών καθώς και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτές στα σφαιρίδια αγαρόζης στρεπταβιδίνης.

Το προαναφερθέν σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της μεταλλαγμένης μορφής της Smad3 που φέρει την εσωτερική απαλοιφή 200-230 ως προς την ικανότητα της να αλληλεπιδρά με την ακετυλοτρανσφεράση ιστόνων p/CAF (**Εικόνα 22**). Από την **Εικόνα 22** φαίνεται ότι αυτή η εσωτερική απαλοιφή, παρά το γεγονός ότι αφήνει άθικτη την MH2 περιοχή, αναστέλλει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή p/CAF, ενώ η περιοχή 143-248 της Smad3 αλληλεπιδρά με αυτόν. Η αναστολή αυτή πιθανότητα να είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα που παρουσιάζει η μεταλλαγμένη Smad3 $\Delta$ 200-230 (**Εικόνες 18, 19**). Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να αντιδιαστέλλονται με προηγούμενες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες η μεταλλαγμένη Smad3 που στερείται της MH2 περιοχής (Smad3 $\Delta$ MH2) δεν αλληλεπιδρά με τον p/CAF (Itoh et al., 2001). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η περιοχή 200-230, εκτός από την λειτουργία της ως δευτερεύουσα θέση πρόσδεσης του p/CAF, να σταθεροποιεί την MH2 δομή και να επάγει κάποιες από τις λειτουργίες της, όπως η αλληλεπίδραση με τον συγκεκριμένο συνενεργοποιητή. Η συνεισφορά της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Smad3 και p/CAF στις Smad-επαγόμενες μεταγραφικές αποκρίσεις *in vivo*, χρήζει αποσαφήνισης με πειράματα γονιδιακής καταστολής (gene knock out).

Η περιοχή του linker της Smad3 πρωτεΐνης περιέχει αρκετές σερίνες, μερικές από τις οποίες έχει δείχθει ότι δρουν ως σημεία φωσφορυλίωσης από κινάσες, όπως η Erk MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), η p38 και c-Jun N-terminal κινάση, η κινάση που εξαρτάται από κυκλίνες και η  $Ca^{2+}$ /calmodulin-εξαρτημένη πρωτεϊνική κινάση II (CamKII) (Kretschmar et al., 1999, Engel et al., 1999, Mori et al., 2004, Matsuura et al., 2004, Wicks et al., 2000). Η φωσφορυλίωση του linker από τις παραπάνω κινάσες μπορεί να ρυθμίσει αρκετές λειτουργίες της Smad3 πρωτεΐνης, συμπεριλαμβανομένης της πυρηνικής συσσώρευσης ως απόκριση στην ενεργοποίηση από τον συνδέτη TGFβ. Έχει δείχθει ότι η ογκογονική Ras, η οποία δρα μέσω της Erk MAP κινάσης, φωσφορυλιώνει τις Smad2, Smad3 σε συγκεκριμένα μοτίβα σερινης-προλίνης, αναστέλλει την μετατόπιση των Smads στον πυρήνα και συνεπώς τη σηματοδότηση (Kretschmar et al., 1999). Δεδομένου ότι η ίδια περιοχή της Smad3 η οποία περιέχει το παραπάνω μοτίβο σερίνης-προλίνης (περιοχή 200-230) απαιτείται για την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 και για την αλληλεπίδραση της με συνενεργοποιητές, υποθέσαμε ότι η φωσφορυλίωση αυτών των Smad3 μοτίβων από τις MAP κινάσες μπορεί να ρυθμίσει, τόσο την ενδοκυτταρική κατανομή όσο και την μεταγραφική λειτουργία της Smad3 επηρεάζοντας τις αλληλεπιδράσεις της με συνενεργοποιητές ή με άλλους βοηθητικούς παράγοντες που προσδένονται στην περιοχή αυτή.

### **Η σημειακή μετάλλαξη E239A επιδρά δραστικά στην λειτουργία της Smad3 πρωτεΐνης**

Το αμινοξύ της θέσεως 239 βρίσκεται στην MH2 περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης (**Εικόνα 27**). Η περιοχή αυτή είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ όλων των Smads και αποτελείται από πέντε  $\alpha$ -έλικες και τρεις θηλιές, που περικλείουν ένα  $\beta$ -sandwich πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από επτά αντιπαράλληλες  $\beta$  πτυχωτές επιφάνειες. Το γλουταμινικό οξύ της θέσεως 239 βρίσκεται στην  $\beta 1$  πτυχωτή επιφάνεια της MH2 περιοχής. Έχει κατασκευαστεί πρόσφατα μια μεταλλαγμένη Smad3 που φέρει στην θέση 239 αντί του γλουταμινικού οξέος το αμινοξύ αλανίνη (Smad3 E239A) (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Η μετάλλαξη E239A είναι ομόλογη της καρκινογόνου μετάλλαξης E330A της Smad4, η οποία συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του εντέρου και με το σύνδρομο εμφάνισης πολυπόδων σε έφηβους (Waite & Eng, 2003, Shi et al.,

1997). Αποδείχθηκε ότι η σημειακή μετάλλαξη E239A της Smad3 πρωτεΐνης καταστέλλει την μεταγραφική της δραστηριότητα, καθώς και την ικανότητα ολιγομερισμού και αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή p/CAF (Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004). Είναι γνωστό ότι η MH2 περιοχή είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ολιγομερών Smad3 συμπλόκων (Derynck & Zhang, 2003, Moustakas et al, 2001), πράγμα που καταστέλλεται από την σημειακή μετάλλαξη E239A όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Είναι πιθανόν τα παραπάνω αποτελέσματα να οφείλονται στο γεγονός ότι η εισαγωγή της μετάλλαξης E239A στην Smad3 πρωτεΐνη προκαλεί την πλήρη αποσταθεροποίηση της, όπως παρατηρήθηκε και αναλύθηκε παραπάνω. Η θέση αυτού του αμινοξέος είναι σημαντική και η αλληλεπίδραση του τόσο με την γειτονική τυροσίνη 237 της β1 πτυχωτής επιφάνειας, όσο και με την αργινίνη 278 και την αργινίνη 287 της α-έλικας 1 (H1) παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (**Εικόνα 27**) καθώς η α-έλικα 1 είναι σημαντική για τον ομο- και ετεροπολυμερισμό της Smad3 πρωτεΐνης.

### **Οι σημειακές μεταλλάξεις Y237A και R287A έχουν διαφορετική επίδραση στην λειτουργία της Smad3 πρωτεΐνης**

Οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης, Smad3 Y237A και Smad3 R287A κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν διότι τα συγκεκριμένα αμινοξέα (Y237 και R287) σχηματίζουν ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με το αμινοξύ E239. Συγκεκριμένα, το αμινοξύ τυροσίνη της θέσεως 237 βρίσκεται δίπλα και σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου τόσο με το γλουταμινικό οξύ της θέσης 239 όσο και με την αργινίνη στην θέση 287, ενώ η αργινίνη βρίσκεται στην α-έλικα 1 της MH2 περιοχής και σχηματίζει επίσης δεσμούς υδρογόνου με το γλουταμινικό οξύ της θέσης 239 και την τυροσίνη στην θέση 237 (**Εικόνα 27**). Τα εν λόγω αμινοξέα είναι εξαιρετικά συντηρημένα μεταξύ των Smads (**Εικόνα 28**).

Με την χρήση του αντιβιοτικού κυκλοεξιμίδη δείξαμε ότι η μετάλλαξη Y237A δεν αποσταθεροποιεί την Smad3 πρωτεΐνη (**Εικόνα 29**), ενώ με πειράματα μεταγραφικής δραστηριότητας δείξαμε ότι η μετάλλαξη Y237A δεν επηρεάζει την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης (**Εικόνα 31**). Τα πειράματα ανοσοφθορισμού που πραγματοποιήσαμε υποδεικνύουν ότι η σημειακή μετάλλαξη Y237A δεν εμποδίζει την είσοδο της πρωτεΐνης στον πυρήνα απουσία και παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5. Χρησιμοποιώντας το σύστημα

της *in vivo* βιοτινυλίωσης δείξαμε ότι η μεταλλαγμένη Smad3Y237A πρωτεΐνη ομοπολυμερίζεται με την αγρίου τύπου Smad3 (**Εικόνα 36**). Αυτό υποδηλώνει ότι αυτή η σημειακή μετάλλαξη δεν επηρεάζει τον διμερισμό της πρωτεΐνης. Επίσης με την χρήση του ίδιου συστήματος δείξαμε ότι η μετάλλαξη της θέσεως 237 δεν παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση της Smad3 με την Smad4 πρωτεΐνη, καθώς και την φωσφορυλίωση της από τον υποδοχέα τύπου I (**Εικόνα 37**).

Το αμινοξύ αργινίνη 287 βρίσκεται στην α-έλικα 1 (H1) της MH2 περιοχής και σχηματίζει δεσμό με το αμινοξύ Glu239. Η MH2 περιοχή είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ολιγομερών Smad συμπλόκων, την αναγνώριση από τους υποδοχείς τύπου I και την αλληλεπίδραση με κυτταροπλασματικούς και μεταγραφικούς παράγοντες (Derynck et al., 2003, Moustakas et al., 2001). Ο ολιγομερισμός υποβοηθάται από εκτεταμένες επαφές μεταξύ της θηλιάς-έλικας (loop-helix) περιοχής της μίας υπομονάδας και την ομάδα τριών ελίκων (three-helix bundle) της άλλης υπομονάδας - περιοχές των Smads εξελικτικά συντηρημένες (Shi, 2001). Δεδομένου ότι η α-έλικα 1 (H1) εμπλέκεται άμεσα στον σχηματισμό ολιγομερών των Smads αποτελώντας μέρος της θηλιάς-έλικας της MH2 περιοχής, είναι πιθανόν μεταλλάξεις στην περιοχή αυτή να επηρεάζουν και να αναστέλλουν τον σχηματισμό ολιγομερών. Η κατασκευή της μεταλλαγμένης μορφής της Smad3 πρωτεΐνης, η οποία φέρει αντικατάσταση της αργινίνης της θέσεως 287 με αλανίνη, είχε σκοπό την μελέτη της επίδρασης της στην λειτουργία της. Θέλοντας να δούμε την επίδραση της σημειακής αυτής μετάλλαξης στην σταθερότητα της Smad3 πρωτεΐνης χρησιμοποιήσαμε το αντιβιοτικό κυκλοεξιμίδη, το οποίο σταματά την πρωτεϊνοσύνθεση και παρατηρήσαμε ότι δεν αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη. Με πειράματα μεταγραφικής δραστηριότητας δείξαμε ότι η μετάλλαξη R287A αναστέλλει την ικανότητα της Smad3 πρωτεΐνης για μεταγραφή. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση που παρατηρήθηκε με την συνέκφραση της Smad4 πρωτεΐνης σε κύτταρα HepG2 (**Εικόνα 31**) πιθανόν να οφείλεται σε παρουσία ενδογενούς Smad3 πρωτεΐνης. Για να διερευνήσουμε εάν η μετάλλαξη αυτή επηρεάζει τον ομο- και ετεροπολυμερισμό της Smad3 πρωτεΐνης χρησιμοποιήσαμε το σύστημα της *in vivo* βιοτινυλίωσης. Από τα αποτελέσματα των **Εικόνων 36, 37** φαίνεται ότι η μετάλλαξη R287A αναστέλλει τις Smad3/Smad3 και Smad3/Smad4 αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αργινίνη 287 αλλάζει την διαμόρφωση της πρωτεΐνης με τέτοιο τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται ο σχηματισμός συμπλόκων των Smads. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι η Smad3 R287A φωσφορυλιώνεται μερικώς από τον υποδοχέα

τύπου I, αποτέλεσμα που υποδηλώνει ότι επηρεάζεται η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον υποδοχέα. Η παρατήρηση αυτή εξηγεί τουλάχιστον μερικώς την παρεμπόδιση της εισόδου της πρωτεΐνης στον πυρήνα, όπως παρατηρήθηκε στα πειράματα ανοσοφθορισμού.

Είναι προφανές ότι η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης θα μπορούσε να οδηγήσει σε καταστολή της καρκινογένεσης και το ενδεχόμενο αυτό καθιστά το TGFβ μονοπάτι ελκυστικό στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων. Η αργινίνη 287 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι αναστέλλει τις λειτουργίες της Smad3 πρωτεΐνης και έρχεται σε επαφή με το καρκινογόνο αμινοξύ της θέσεως 239. Όπως προαναφέρθηκε η μετάλλαξη της αργινίνης 287 σε αλανίνη επηρεάζει την MH2 περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης και ανήκει στις μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης των μονομερών που σχηματίζουν το MH2 ομοτριμερές. Μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν την θηλιά-έλικα περιοχή έχουν ανιχνευθεί στην Smad4 πρωτεΐνη σε καρκίνους και έχουν ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του ομοτριμερούς και την αναστολή σχηματισμού Smad2-Smad4 συμπλόκων (Shi et al., 1997). Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής υποδεικνύουν την σημασία του N-τερματικού άκρου της MH2 περιοχής και της αργινίνης 287 στην λειτουργία της Smad3 πρωτεΐνης.

Περαιτέρω πειράματα αλληλεπιδράσεων της μεταλλαγμένης Smad3R287A με άλλες βοηθητικές/scaffolding πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα, όπως η SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) και με συνενεργοποιητές όπως ο p/CAF θα αποσαφηνίσουν τον ακριβή ρόλο της αργινίνης 287. Μελλοντικές μελέτες οι οποίες θα αποκαλύψουν τον μηχανισμό της μετατόπισης των Smad πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα καθώς και μελέτες που θα βοηθήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών που μετατρέπουν τον TGFβ σε παράγοντα καρκινογένεσης, θα συμβάλλουν στην επίτευξη αποτελεσματικών παρεμβάσεων.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L. and Wrana, J. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 27678-27685
- Alliston, T., Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G. and Derynck, R., *EMBO J.* 2001, 20: 2254-2272
- Bai, S., Shi, X., Yang, X. and Cao, X., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 8267-8270
- Bandyopadhyay, A. *et al.*, *Cancer Res.*, 1999, 59: 5041–5046
- Barbara, N. P., Wrana, J. L. & Letarte, M., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 584–594
- Blanco J.C., Minucci S., Lu J., Yang X.-J., Walker K.K. Chen H., Evans R.M., Nakatani Y., & Ozato K., *Genes and Development*, 1998, 12: 1638-1651
- Blobe, G. C., Liu, X., Fang, S. J., How, T. and Lodish, H. F. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 39608-39617
- Brodin G., Ahgren A., ten Dijke P., Heldin C. H. & Heuchel R., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 29023–29030
- Chacko, B. M., Qin, B., Correia, J. J., Lam, S. S., de Caestecker, M. P. and Lin K., *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8: 248-253
- Chen Y-G., Hata A., Lo R.S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N., and Massagué J., *Genes and Development*, 1998, 12: 2144-2152
- Chen, C. R., Kang, Y. & Massagué, J., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 992–999
- Chen, C. R., Kang, Y., Siegel, P. M. & Massagué, J., *Cell*, 2002, 110: 19–32
- Choy, L. & Derynck, R., *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 9609–9619
- Comijn, J. *et al.*, *Mol. Cell*, 2001, 7: 1267–1278
- Correia, J. J., Chacko, B. M., Lam, S. S. and Lin, K. *Biochem.* 2001, 40: 1473-1482
- Cui, W. *et al.*, *Genes Dev.*, 1995, 9: 945–955
- Cui, W. *et al.*, *Cell*, 1996, 86: 531–542
- de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F., & Strouboulis, J., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 7480–7485

- de Caestecker, M. P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W. T., Huang, S., Hill, C. S., Shioda, T., Roberts, A. B. and Lechleider, R. J., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000b, 275: 2115-2122
- Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A., *Nature Genet.*, 2001, 29: 117–129
- Derynck, R. & Feng, X.-H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1333: F105–F150
- Derynck, R. & Zhang Y, E., *Nature Rev. Articles.*, 2003, 425: 557–584
- Dickson, M. C. *et al.*, *Development*, 1995, 121: 1845–1854
- Dong, Y., Tang, L., Letterio, J. J. & Benveniste, E. N., *J. Immunol.*, 2001, 167: 311–319
- Dumont, N. & Arteaga, C. L., *Cancer Cell*, 2003, 3: 531–536
- Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. and Moses, H. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 37413-37420
- Enholt, B. *et al.*, *Oncogene*, 1997, 14: 2475–2483
- Eppert, K. *et al.*, *Cell*, 1996, 86: 543–552
- Factor, V. M. *et al.*, *Cancer Res.*, 1997, 57: 2089–2095
- Feng, X. H., Lin, X. and Derynck, R. *EMBO J.*, 2000, 19: 5178-5193
- Furuta, K. *et al.*, *Int. J Cancer*, 1999, 81: 851–853
- Geissmann, F. *et al.*, *J. Immunol.*, 1999, 162: 4567–4575
- Goggins, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 1998, 58: 5329–5332
- Goumans, M. J. *et al.*, *EMBO J.*, 2002, 21: 1743–1753
- Hahn, S.A. *et al.*, *Science*, 1996, 271: 350–353
- Hanyu, A. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2001, 155: 1017–1027
- Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Lagna, G. and Massagué, J., *Nature*, 1997, 388: 82-87
- Hata, A., Shi Y., & Massagué J., *Molecular Medicin Today*, 1998, 257-262
- Hill-Kapturczak, N., Truong, L., Thamilselvan, V., Visner, G. A. and Nick, H. S. (*The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 40904-40909
- Ho, S.-N., Hunt, H.-D., Horton, R.-M., Pullen, J.-K. and Pease, L.-R. *Gene*, 1989, 77: 51-59



- Hoodless, P. A., Tsukazaki, T., Nishimatsu, S., Attisano, L., Wrana, J. L. and Thomsen, G. H., *Dev. Biol.*, 1999, 207:364-379
- Huse, M. et al., *Mol. Cell*, 2001, 8: 671–682
- Inman, G. J., Nicolas, F. J. & Hill, C. S., *Mol. Cell*, 2002, 10: 283–294
- Itoh, S., Ericsson, J., Nishikawa, J.-I., Heldin, C.-H. and ten Dijke, P., *Nucl. Acid. Res.*, 2000a, 28: 4291-4298
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J. and ten Dijke, P. *Eur.J. Biochem.*, 2000b, 267: 6954-6967
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C.-H., ten Dijke, P. and Itoh, S., *EMBO J.* 2001, 20: 4132-4142
- Izumoto, S. et al., *Cancer Lett.*, 1997, 112: 251–256
- Jayaraman, L. and Massagué, J., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 40710-40717
- Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, U., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T. Miyazono, K., *Genes Cells*, 2004, 9: 143-151
- Kang, Y., Chen, C.-R. & Massagué, J., *Mol. Cell*, 2003, 11: 915–926
- Kang, Y. et al., *Cancer Cell*, 2003, 3: 537–549
- Kawabata M., Inoue H., Hanyu A., Imamura T., Miyazono K., *EMBO J.*, 1998, 17: 4056-4065
- Keeton, M.R., Curriden, S.A., van Zonneveld, A.J. and Loskutoff, D.J., *J. Biol. Chem.*, 1991, 266: 23048-23052
- Kim, S.K. et al., *Cancer Res.*, 1996, 56: 2519–2521
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massagué, J., *Genes Dev.*, 1999, 13: 804-816
- Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.-H. and Moustakas, A., *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12: 1079-1091
- Kusanagi, K., Kawabata, M., Mishima, H. K. and Miyazono, K., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 28155-28163
- Labbé, E., Silvestri, C., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. and Attisano, L., *Mol. Cell*, 1998, 2: 109-120
- Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. & Massagué, J., *Cell*, 1990, 62: 175–185

- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. and Massagué, J., *Nature*, 1996, 383: 832-836
- Laping, N. J. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2002, 62: 58–64
- Larsson, J. *et al.*, *EMBO J.*, 2001, 20: 1663–1673
- Lei, J. *et al.*, *Oncogene*, 1996, 13: 2459–2462
- Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R. and Walker, J. C., *J. Cell Sci.*, 2000, 113: 4143-4149
- Liberati, N. T., Moniwa, M., Borton, A. J., Davie, J. R. & Wang, X.-F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 22595–22603
- Liu F., Poupponnot C., and Massague J., *Genes and Denelopment*, 1997, 11: 3157-3167
- Liu, F., Hata, A., Baker, J. C., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R. M. and Massagué, J., *Nature*, 1996, 381: 620-623
- Liu, X. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 9139–9144
- Lo R.S., Chen Y-G, Shi Y., Pavletich N.P., Massague J., *EMBO J.*, 1998, 17: 996-1005
- MacGrogan, D., Pegram, M., Slamon, D. and Bookstein, R., *Oncogene*, 1997, 15: 1111–1114
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L. and Wrana, J. L., *Cell*, 1996, 87: 1215-1224
- Markowitz, S. *et al.*, *Science*, 1995, 268: 1336–1338
- Massagué J., *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67: 753-791
- Massagué J., *Nature Cell Biology*, 1999, Vol.:1, E117-E119
- Massagué J., and Wotton D., *EMBO J.*, 2000, Vol.:19, 1745-1754
- Massagué, J., Blain, S. W. and Lo, R. S., *Cell*, 2000, 103: 295-309
- Massagué, J., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1:169–178
- Matsura, I., Denissova, N.G., Wang, G., He, D., Long, J. and Liu, F. *Nature*, 2004, 430: 226-231
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R., *J. Cell Biol.*, 1994, 127: 2021–2036

- Mori N., Morishita M., Tsukazaki T., Yamamoto N., *Int. J. Cancer*, 2003, 105: 661-668
- Morén, A., Itoh, S., Moustakas, A., ten Dijke, P. and Heldin, C.-H., *Oncogene*, 2000, 19: 4396-4404
- Moustakas A., and Heldin C.-H., *Genes Dev.*, 2002, 16: 1867-1871
- Moustakas A., and Kardassis D., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, Vol. 95, 6733-6738
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. & Heldin, C.-H. J., *Cell Sci.*, 2001, 114: 4359–4369
- Muraoka, R. S. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2002, 109: 1551–1559
- Myeroff, L. L. *et al.*, *Cancer Res.*, 1995, 55: 5545–5547
- Oft, M. *et al.*, *Genes Dev.*, 1996, 10: 2462–2477
- Oft, M., Heider, K. H. & Beug, H., *Curr. Biol.*, 1998, 8: 1243–1252
- Oh, S. P. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 2626–2631
- Pertovaara, L. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 6271–6274
- Pierreux, C. E., Nicolas, F. J. and Hill, C. S., *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 9041-9054
- Prokova, V., Mavridou, S., Papakosta, P., and Kardassis, D., *Nucl. Acid Res.* 2005, 33, No.12: 3708-3721
- Προκόβα Β., Διδακτορική Διατριβή, Ιατρική Σχολή Παν/μίου Κρήτης, 2004
- Pulaski, L., Landström, M., Heldin, C.-H. and Souchelnytskyi, S., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 14344-14349
- Reguly T. and Wrana J.L., *Trends in Cell Biology*, 2003, Vol.13, No.5: 216-220
- Roberts, A. B. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 4167–4171
- Siegel, P. M. & Massague, J., *Nature Rev.*, 2003, 3: 807-820
- Schutte, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 1996, 56: 2527–2530
- Shi Y., Hata A., Lo R.S., Massague J., Pavletich N.P., *Nature*, 1997, 388: 87-93
- Shi, Y. *Bioessays*, 2001, 23: 223-232
- Shi Y., & Massague J., *Cell*, 2003, 113: 685-700

- Shimo, T. *et al.*, *Oncology*, 2001, 61: 315–322
- Siegel, P. M. & Massague, J., *Nature Rev.*, 2003, 3: 807-820
- Stearns, M. E., Garcia, F. U., Fudge, K., Rhim, J. & Wang, *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5: 711–720
- Tada, K., Inoue, H., Ebisawa, T., Makuuchi, M., Kawabata, M., Imamura, T. and Miyazono, K., *Genes Cells*, 1999, 4: 731-741
- Takagi, Y. *et al.*, *Gastroenterology*, 1996, 111: 1369–1372
- ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C.-H., *Trends. Biol. Sci.*, 2000, 25: 64-70
- Thiery, J. P., *Nature Rev. Cancer*, 2002, 2: 442–454
- Tomita, S. *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 1999, 53: 33–39
- Tsukazaki T., Chiang T.A., Davison A.F., Attisano L., Wrana J.L., *Cell*, 1998, 95: 779-791
- Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Yang, F., Dang, T. D. & Rowley, D., *Cancer Res.*, 2002, 62: 6021–6025
- Uchida, K. *et al.*, *Cancer Res.*, 1996, 56: 5583–5585
- Waite K., & Eng C., *Nature Rev.*, 2003, 4: 763-773
- Wang, D. *et al.*, *Cancer Res.*, 2000, 60: 4507–4512
- Wang W., Mariani F.V., Harland R.M., Luo K., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2000, 97: 14393-14399
- Wang, X. J., Liefer, K. M., Tsai, S., O'Malley, B. W. & Roop, D. R., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 8483–8488
- Wakefield, L. M. & Roberts, A. B., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, 12: 22–29
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. and Nishida, E., *EMBO Rep.* 2000, 1: 176-182
- Wicks, S. J., Lui, S., Abdel-Wahab, N., Mason, R. M. and Chantry, A., *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 8103-8111
- Wotton, D., Lo, R. S., Lee, S. and Massagué, J., *Cell*, 1999, 97: 29-39
- Wu, J. W., Fairman, R., Penry, J. and Shi, Y., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 20688-20694

Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I. and Lodish, H. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 7853-7858

Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C. and Lodish, H. F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 39404-39410

Xiao Z., et al., *Oncogene*, 2003,22:1057-1069

Xu, L., Chen, Y. G. and Massagué, J., *Nat. Cell. Biol.*, 2000, 2: 559-562

Xu, G., Chakraborty, C., & Lala, P.K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 287: 47-55

Xu, L., Kang, Y., Col, S. & Massagué, J., *Mol. Cell*, 2002, 10:271–282

Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 703-709

Yang, Y. A. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2002, 109: 1607–1615

Yin, J. J., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1999, 103: 197–206