

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

Διδακτορική Διατριβή

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΗ-ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ TGF-Β ΚΑΙ ΤΗΣ
ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ ΠΟΥ
ΕΠΙΤΕΛΟΥΝΤΑΙ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕΣΩ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ
RHO ΚΑΙ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ ΤΗΣ ΑΚΤΙΝΗΣ**

Ελπίδα-Έλσα Παπαδημητρίου

Επιβλέπων Καθηγητής: Χ.Στουρνάρας

Ηράκλειο 2011

Η μελέτη αυτή συγχρηματοδοτήθηκε κατά:

- 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο
- 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
- και από τον Ιδιωτικό Τομέα

στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της διατριβής μου με βρίσκει γεμάτη αντιφατικά συναισθήματα, χαράς και ανακούφισης, αλλά και νοσταλγίας για όλα όσα έζησα κατά τη διάρκεια αυτής της πορείας και για όλες τις στιγμές που μοιράστηκα με τόσους ανθρώπους. Η πορεία της διατριβής μου δεν ήταν μόνο ένα ταξίδι αναζήτησης απαντήσεων σε επιστημονικά ερωτήματα και μία πορεία στο άγνωστο γεμάτη αντιξοότητες, απογοητεύσεις, αλλά και ευχάριστες εκπλήξεις, ήταν και μία πορεία αυτογνωσίας, ένας δρόμος υπομονής και επιμονής, αλλά και μία επιβεβαίωση ότι πάντα μπορούμε να καταφέρουμε περισσότερα από όσα πιστεύουμε για τον εαυτό μας, όταν με πίστη και πείσμα παλεύουμε για κάτι. Θέλω να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους που ο καθένας με τον τρόπο του με στήριξε και μου συμπαραστάθηκε στην πορεία αυτή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Χρήστο Στουρνάρα για την καθοδήγηση του όλα αυτά τα χρόνια, τις συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις του, αλλά κυρίως για την πίστη του σε μένα ακόμη και τις στιγμές εκείνες που έχανα το κουράγιο μου και την πίστη στον ίδιο μου τον εαυτό.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Δημήτρη Καρδάση για τις πολύτιμες συμβουλές του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής και τον κ. Άρη Ηλιόπουλο για τις χρήσιμες συζητήσεις μας. Τα μέλη της επταμελούς επιτροπής κ. Αχιλλέα Γραβάνη και κ. Γιώργο Σουρβίνο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για τη διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους για την κρίση της διατριβής μου και τη Λίσα Παπακωνσταντή για την πολύτιμη βοήθειά της και τις χρήσιμες συμβουλές της σε κρίσιμες στιγμές του διδακτορικού.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Άρη Μουστάκα για την εξαιρετική συνεργασία μας, την ακούραστη διάθεση του για βοήθεια και συζήτηση και για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να εργαστώ στο εργαστήριο του στο Ludwig Institute for Cancer Research στην Ουψάλα για τέσσερις μήνες. Η συνεργασία μας έπαιξε καθοριστικό ρόλο στην πορεία αυτής της διατριβής και αποτέλεσε για μένα πολύτιμη πηγή έμπνευσης, γνώσης και νέων ιδεών. Τον ευχαριστώ γιατί μου εμφύσησε τον ενθουσιασμό για την έρευνα και μου μετέδωσε την αισιοδοξία του και την όρεξη για δουλειά σε μία πολύ δύσκολη περίοδο για μένα. Ευχαριστώ όλα τα παιδιά της ομάδας του για τη καλή τους διάθεση να με βοηθήσουν και ιδιαίτερα τον Peter, τον Stefan, και την Erna για την ειλικρινή τους βοήθεια και τη Sinnisky για τη βοήθεια, τις συμβουλές της και τη φιλία της. Ευχαριστώ επίσης τον Ulf Helman για την ουσιαστική του βοήθεια και καθοδήγηση στα πειράματα φασματομετρίας μάζας, αλλά και γιατί φρόντιζε με τον τρόπο του να μου φτιάχνει πάντα τη διάθεση.

Ευχαριστώ τον κ. Δημήτρη Ηλιόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του και την ουσιαστική συνεισφορά του στη δημοσίευση και τη Χριστίνα Βόρβη για την ανάλυση των καρκινικών δειγμάτων μαστού και τα πειράματα διεισδυτικότητας της δημοσίευσης.

Ευχαριστώ τα παιδιά του εργαστηρίου μου, τη Λίνα, για την ειλικρινή και ακούραστη διάθεση της για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην αρχή της διατριβής μου, το Γιώργο, για

τη θετική του ενέργεια, τα γέλια αλλά και τους προβληματισμούς που μοιραστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια, τη Βάλια, για τις ατελείωτες συζητήσεις μας, την αλληλοκατανόηση και τη φιλία της και τη Ναταλία μου, για όλες τις στιγμές, τις ανησυχίες, τις σκέψεις και τις χαρές που μοιραστήκαμε, αλλά κυρίως για την πολύτιμη φιλία της.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά από τα γειτονικά εργαστήρια και ιδιαίτερα τη Βέτα, την Ιωάννα, τον Παναγιώτη, τη Γιάννα και την Έφη για τη βοήθεια και την καλή συνεργασία μας. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Ελευθερία για τις επικοινωνιακές συζητήσεις μας, την αισιοδοξία που μου μετέδιδε απαλύνοντας τις αγωνίες μου, για την ουσιαστική βοήθειά της καθόλη τη διάρκεια της διατριβής και την καθοριστική συνεισφορά της στα πειράματα ανοσοφθορισμού της δημοσίευσης.

Ευχαριστώ τους γονείς μου, Αντώνη και Ματίνα, και τον αδελφό μου Βασίλη για την αγάπη τους, την πίστη τους σε μένα, την οικονομική και ηθική τους στήριξη, τα οποία αποτέλεσαν τα πολυτιμότερα εφόδια μου όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

| | |
|--|------------|
| Περίληψη | I |
| Summary | III |
| 1. Εισαγωγή | 1 |
| 1.1 Η οικογένεια των μικρών Rho GTPασών | 1 |
| 1.1.1 Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μικρών Rho GTPασών | 1 |
| 1.1.2 Ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού των Rho GTPασών μέσω των RhoGDI πρωτεϊνών και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων | 3 |
| 1.2 Οι Rho-GEF πρωτεΐνες ως ενεργοποιητές των Rho GTPασών | 4 |
| 1.2.1 Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης των Rho GTPασών μέσω της DH καταλυτικής περιοχής | 5 |
| 1.2.2 Ο ρόλος της PH περιοχής | 5 |
| 1.2.3 Η ρύθμιση των Rho-GEFs | 6 |
| 1.3 Οι Rho-GAP πρωτεΐνες ως αρνητικοί ρυθμιστές των Rho GTPασών | 8 |
| 1.4 Οι τελεστές των Rho GTPασών | 9 |
| 1.4.1 Πρωτεΐνες τελεστές των Rac και Cdc42 GTPασών | 9 |
| 1.4.2 Πρωτεΐνες τελεστές της Rho GTPάσης | 10 |
| 1.5 Η υποοικογένεια RhoA | 11 |
| 1.5.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός των RhoA, RhoB και RhoC | 11 |
| 1.5.2 Διαφορές των RhoA, RhoB και RhoC ως προς την έκφραση και την αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες τελεστές | 12 |
| 1.5.3 Ο ρόλος των RhoA, RhoB και RhoC στον καρκίνο | 13 |
| 1.6 Βιολογικές δράσεις των Rho GTPασών | 14 |
| 1.6.1 Μετανάστευση | 14 |
| 1.6.2 Διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και επιθηλιακή πολικότητα | 15 |
| 1.7 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β | 18 |
| 1.7.1 Σηματοδότηση από τους υποδοχείς του TGF-β | 18 |
| 1.7.2 Λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά των Smad πρωτεϊνών | 19 |
| 1.7.3 Ρύθμιση των Smad πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης | 20 |
| 1.7.4 Ολιγομερισμός των Smads και είσοδος τους στον πυρήνα | 21 |
| 1.7.5 Πυρηνική σηματοδότηση | 21 |
| 1.7.6 Αρνητική ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smads | 22 |
| 1.7.7 Ρύθμιση της σηματοδότησης από τους υποδοχείς του TGF-β μέσω διαφορετικών μηχανισμών ενδοκυττάρωσης | 23 |
| 1.8 Smad-ανεξάρτητη σηματοδότηση από τον TGF-β | 24 |
| 1.8.1 Ενεργοποίηση των MAPK μονοπατιών από τον TGF-β | 25 |
| 1.8.2 Ενεργοποίηση του PI3K/Akt μονοπατιού από τον TGF-β | 26 |
| 1.8.3 Η ρύθμιση των μικρών Rho GTPασών από τον TGF-β | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 1.9 Ο βιολογικός ρόλος του TGF-β | 28 |
| 1.9.1 Αναστολή του πολλαπλασιασμού | 29 |
| 1.9.2 Απόπτωση | 29 |
| 1.9.3 Επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή | 30 |
| 1.9.3.1 Αποδόμηση των διακυτταρικών συνδέσεων και απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας | 32 |
| 1.9.3.2 Προσκόλληση στην εξωκυττάρια ουσία | 33 |
| 1.9.3.3 Μεταγραφική ρύθμιση της EMT από τον TGF-β | 34 |
| 1.9.3.4 Ο ρόλος των <i>microRNA</i> στην EMT που επάγεται από τον TGF-β | 35 |
| 1.10 Ο ρόλος του TGF-β στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης | 36 |
| 1.10.1 Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η ενεργοποίηση των Rho κατά την EMT που επάγεται από τον TGF-β | 36 |
| 1.10.2 Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η ενεργοποίηση των Rho από τον TGF-β σε ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα | 37 |
| 1.10.3 Η ενεργοποίηση των Rho GTPασών από τον TGF-β μέσω Smad-εξαρτώμενων και Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών | 37 |
| 1.11 Η Net1 GEF ως μεταγραφικός στόχος του TGF-β | 38 |
| 1.11.1 Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της Net1 GEF | 39 |
| 1.11.2 Ο ρόλος της Net1 στη ρύθμιση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων και την EMT | 40 |
| 1.12 Ερευνητικοί στόχοι | 42 |
| 2. Υλικά και Μέθοδοι | 43 |
| 2.1 Καλλιέργεια κυττάρων | 43 |
| 2.1.1 Παροδική επιμόλυνση κυττάρων | 44 |
| 2.1.2 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς | 45 |
| 2.1.3 Αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών | 46 |
| 2.2 Ανοσοφθορισμός | 47 |
| 2.2.1 Άμεσος ανοσοφθορισμός των μικροϊνιδίων της ακτίνης | 47 |
| 2.2.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός | 48 |
| 2.3 Απομόνωση πρωτεϊνικών κυτταρικών εκχυλισμάτων | 49 |
| 2.3.1 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών πρωτεϊνών | 49 |
| 2.3.2 Απομόνωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων | 49 |
| 2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος | 50 |
| 2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης παρουσία SDS (SDS-PAGE) | 50 |
| 2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων | 50 |
| 2.4.2 Προετοιμασία πηκτώματος | 50 |
| 2.4.3 Ηλεκτροφόρηση | 51 |
| 2.5. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot) | 51 |
| 2.5.1 Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot) | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 2.5.2 Διαδικασία ανοσοανίχνευσης | 51 |
| 2.5.3 Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (stripping) | 53 |
| 2.6 Προσδιορισμός της ενεργοποίησης των μικρών Rho GTPασών RhoA/B | 53 |
| 2.7 Απομόνωση RNA | 54 |
| 2.7.1 Απομόνωση RNA με το αντιδραστήριο TRIzol | 54 |
| 2.7.2 Απομόνωση RNA με χρήση ειδικών στηλών | 55 |
| 2.8 Φωτομέτρηση RNA και DNA | 56 |
| 2.9 Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) | 56 |
| 2.10 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR) | 57 |
| 2.10.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης | 57 |
| 2.10.2 RT-PCR | 58 |
| 2.10.3 Ποσοτική PCR με τη χρήση SYBR Green I | 58 |
| 2.11 Αναγνώριση των microRNAs που στοχεύουν στην 3' UTR περιοχή του mRNA της Net1 με βιοπληροφορική ανάλυση | 62 |
| 2.12 Ποσοτικός προσδιορισμός των microRNA miR-24 και miR-155 | 62 |
| 2.12.1 Αντίστροφη μεταγραφή | 62 |
| 2.12.2 Προσδιορισμός των microRNAs με ποσοτική RT-PCR (qRT-PCR) | 63 |
| 2.12.3 Προσδιορισμός των microRNAs με απλή RT-PCR | 64 |
| 2.13 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου Net1 και του υποθετικού υποκινητή της ισομορφής Net1A | 65 |
| 2.13.1 Ενίσχυση των γενωμικών περιοχών (-909/+57) Net1 και (926/+126) Net1A με PCR | 65 |
| 2.13.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης | 67 |
| 2.13.3 Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης | 67 |
| 2.13.4 Κατακρήμνιση DNA με απόλυτη αιθανόλη (ethanol precipitation) | 68 |
| 2.13.5 Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction) | 68 |
| 2.13.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B της E.coli (transformation) | 68 |
| 2.13.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini preparation) | 68 |
| 2.13.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation) | 69 |
| 2.14 Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal | 70 |
| 2.15 Μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης (Luciferase assay) | 71 |
| 2.16 Προσδιορισμός των ενεργών πρωτεϊνών Rho-GEFs σε κυτταρικά εκχυλίσματα | 71 |
| 2.16.1 Αρχή της μεθόδου | 71 |
| 2.16.2 Έκφραση και καθαρισμός της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης | 72 |
| 2.16.3 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης στα σφαιρίδια σεφαρόζης | 73 |
| 2.16.4 Πείραμα κατακρήμνισης συγγένειας (pull down) των GEFs με χρήση των σφαιριδίων GST-RhoA (G17A) | 73 |

| | |
|---|-----------|
| 2.17 Ανοσοκατακρήμνιση των υπερεκφρασμένων υποδοχέων του TGF-β, ΤβRI και ΤβRII με FLAG M2 σφαιρίδια αгарόζης | 74 |
| 3. Αποτελέσματα | 77 |
| 3.1 Μελέτη της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β στα JEG3 κύτταρα χοριοκαρκινώματος | 77 |
| 3.1.1 Η RhoA και η RhoB ενεργοποιούνται από τον TGF-β στα JEG3 κύτταρα | 77 |
| 3.1.2 Η γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών | 78 |
| 3.1.3 Η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β εξαρτάται από φωσφορυλίωση τυροσινών | 80 |
| 3.1.4 Ο TGF-β ενεργοποιεί τη Src κινάση και τη Vav2 GEF | 80 |
| 3.1.5 Η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β εξαρτάται από τη Src κινάση και την Vav2 GEF | 82 |
| 3.2 Μελέτη της ρύθμισης των ισομορφών της Net1 GEF, Net1 και Net1A, από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα | 85 |
| 3.2.1 Η ισομορφή Net1A και όχι η Net1 επάγεται από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα | 85 |
| 3.2.2 Η αύξηση των επιπέδων της Net1A από τον TGF-β οφείλεται σε μεταγραφική ενεργοποίηση | 87 |
| 3.2.3 Το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών χρειάζεται για την επαγωγή της Net1A από τον TGF-β | 88 |
| 3.2.4 Το MEK/ERK μονοπάτι των MAPK κινασών συμμετέχει στη ρύθμιση της επαγωγής της Net1A από τον TGF-β | 90 |
| 3.2.5 Ο TGF-β ενεργοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου της Net1 | 93 |
| 3.3 Η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β | 95 |
| 3.3.1 Η επαγωγή της Net1A από τον TGF-β οδηγεί στην αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της | 95 |
| 3.3.2 Η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β | 96 |
| 3.4 Μελέτη της ρύθμισης της ισομορφής Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β | 98 |
| 3.4.1 Η Net1A στοχεύεται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β | 98 |
| 3.4.2 Τα microRNA miR-24 και miR-155 στοχεύουν άμεσα στην 3'UTR της Net1A | 99 |
| 3.4.3 Τα microRNA miR-24 και miR-155 επάγονται από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα | 102 |
| 3.4.4 Το microRNA miR-24 αποτελεί άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β | 104 |

| | |
|--|------------|
| 3.5 Ο ρόλος της μείωσης των επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β στο φαινόμενο της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) | 106 |
| 3.5.1 Η μείωση της Net1A και σε μικρότερο βαθμό της Net1 παίζει ρόλο στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF-β EMT | 106 |
| 3.5.2 Το microRNA miR-24 εμπλέκεται στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF-β EMT | 110 |
| 3.6 Μελέτη της ρύθμισης των Net1A, Net1, miR-24 και miR-155 από τον TGF-β σε καρκινικά κύτταρα | 114 |
| 3.6.1 Μελέτη των βασικών επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές | 114 |
| 3.6.2 Επίδραση του TGF-β στα mRNA επίπεδα των ισομορφών Net1 και Net1A στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7 | 115 |
| 3.6.3 Επίδραση του TGF-β στα επίπεδα των microRNA miR-24 και miR-155 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7 | 116 |
| 3.6.4 Το miR-24 εμπλέκεται στη διεισδυτικότητα και τη μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων μαστού | 118 |
| 3.7 Ο ρόλος της α-SMA στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τον TGF-β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες | 120 |
| 3.7.1 Μελέτη της έκφρασης της α-SMA από τον TGF-β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες | 120 |
| 3.7.2 Μελέτη της ενσωμάτωσης της α-SMA στα ινίδια της ακτίνης | 122 |
| 3.8 Αναζήτηση μορίων που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF-β, TβRI και TβRII με φασματομετρία μάζας | 124 |
| 4. Συζήτηση | 131 |
| 4.1 Μελέτη της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β στα JEG3 κύτταρα χοριοκαρκινώματος | 131 |
| 4.2 Μελέτη της ρύθμισης των ισομορφών της Net1 GEF, Net1 και Net1A, από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα | 137 |
| 4.3 Η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β | 141 |
| 4.4 Μελέτη της ρύθμισης της ισομορφής Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β | 142 |
| 4.5 Ο ρόλος της μείωσης των επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β στο φαινόμενο της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) | 146 |
| 4.6 Το microRNA miR-24 εμπλέκεται στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF-β EMT | 152 |
| 4.7 Μελέτη της ρύθμισης των Net1A, Net1, miR-24 και miR-155 από τον TGF-β σε καρκινικά κύτταρα | 154 |
| 4.8 Αναζήτηση μορίων που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF-β, TβRI και TβRII με φασματομετρία μάζας | 158 |

Περιεχόμενα

| | |
|---------------------|------------|
| Συμπεράσματα | 161 |
| Βιβλιογραφία | 163 |
| Δημοσιεύσεις | 176 |

Περίληψη

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) ρυθμίζει πολλές πτυχές της κυτταρικής συμπεριφοράς, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η μεταναστευτικότητα, διαδικασίες οι οποίες χρειάζονται την ενεργή αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, αλλά και τη ρύθμιση της συσταλτικότητας του κυττάρου. Ο TGF-β έχει δείχθει, ότι ρυθμίζει τη σύντομη και μακροχρόνια αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω των Rho GTPασών σε μία ποικιλία κυτταρικών τύπων, όπως ινοβλάστες, επιθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Ένα σύνολο άμεσων γονιδίων στόχων του TGF-β έχει αναφερθεί, ότι ρυθμίζει τη μακρόχρονη ενεργοποίηση των Rho GTPασών και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως η α-λεία μυϊκή ακτίνη, η RhoB GTPάση και η Net1 GEF (guanine exchange factor). Παρόλα αυτά οι μηχανισμοί που διέπουν τη ρύθμιση της πρώιμης και καθυστερημένης ενεργοποίησης των Rho GTPασών από τον TGF-β παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι. Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η αποσαφήνιση των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν τη γρήγορη και τη μακρόχρονη ενεργοποίηση της Rho GTPάσης από τον TGF-β, καθώς και η διερεύνηση του ρόλου τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και σε βιολογικές αποκρίσεις, όπως η επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EMT) και η διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων.

Χρησιμοποιώντας την κυτταρική σειρά χοριοκαρκινώματος JEG3, η οποία δεν εκφράζει ενδογενώς τη Smad3, βρέθηκε ότι ο TGF-β ενεργοποιεί ταχύτατα τις RhoA και RhoB, ενώ η αποσιώπηση της Smad2 με siRNA ή η αναστολή της φωσφορυλίωσης της μέσω του αναστολέα του TβRI υποδοχέα, SB431542, δεν επηρέασε την ενεργοποίηση των RhoA/B από τον TGF-β, υποδεικνύοντας ότι αυτή η ενεργοποίηση είναι ανεξάρτητη από τις Smad2/3. Ακολούθως, η χρήση του γενικού αναστολέα τυροσινών Genistein ανέστειλε την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β, υποδηλώνοντας ότι σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκεται η σηματοδότηση από κινάσες τυροσίνης. Προς αυτήν την κατεύθυνση η διέγερση με TGF-β είχε ως αποτέλεσμα την ταχύτατη ενεργοποίηση της κινάσης τυροσινών Src, καθώς και την ενεργοποίηση της GEF πρωτεΐνης Vav2 με παρόμοια κινητική. Επιπλέον, η αναστολή της Src κινάσης με τη χρήση του αναστολέα PP2 μπλόκαρε πλήρως και η αποσιώπηση της Vav2 με siRNA μείωσε σημαντικά την επαγόμενη από τον TGF-β ενεργοποίηση της RhoA, υποδηλώνοντας ότι η ταχύτατη ενεργοποίηση των Src/Vav2 εμπλέκεται στο μηχανισμό της ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β.

Παράλληλα μελετήθηκε ο μηχανισμός της μακρόχρονης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β εστιάζοντας στη ρύθμιση των ισομορφών της ειδικής για τη RhoA, Net1 GEF στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Ο TGF-β βρέθηκε ότι επάγει την έκφραση της ισομορφής 2 (Net1A) και όχι την ισομορφή1 (Net1) της Net1 GEF. Η επαγωγή αυτή οδήγησε στην αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A, γεγονός που ήταν απαραίτητο για την

ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β. Επίσης δείχθηκε, ότι η Net1A αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του TGF-β και ότι η επιλεκτική έκφραση της έναντι της Net1 δεν οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιου ειδικού υποκινητή, αλλά πιθανότατα στη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος από τον TGF-β. Το Smad μονοπάτι – κυρίως η Smad3 – καθώς και το ERK MAPK μονοπάτι δείχθηκε ότι εμπλέκονται στο μηχανισμό έκφρασης της Net1A από τον TGF-β

Η μακρόχρονη επίδραση με TGF-β μείωσε τα επίπεδα mRNA της Net1 ισομορφής και οδήγησε τη Net1A για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα. Επιπλέον, αναγνωρίστηκαν τα microRNAs, miR-24 και miR-155, ως νέοι μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές της έκφρασης της Net1A, τα οποία επάγονται από τον TGF-β και στοχεύουν άμεσα την 3'UTR του mRNA της Net1A (και της Net1). Η αποσιώπηση και μόνο της Net1A απορύθμισε τις διακυτταρικές συνδέσεις που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1 και οδήγησε στην έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin, fibronectin, PAI-1 και του καταστολέα της E-cadherin, Slug, ενώ ενίσχυσε το μεσεγχυματικό φαινότυπο μετά από επίδραση με TGF-β, υποδηλώνοντας ότι η μείωση των επιπέδων της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β παίζει ρόλο στην επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EMT). Το miR-24 δείχθηκε επίσης ότι εμπλέκεται στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF-β EMT και ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διεισδυτικότητα καρκινικών κυττάρων μαστού που ρυθμίζεται από τον TGF-β μέσω στόχευσης στη Net1A. Τέλος, μετά από ανάλυση 6 ζευγών πρωτογενούς και μεταστατικού καρκίνου του μαστού, τα επίπεδα του miR-24 βρέθηκαν αυξημένα, ενώ τα επίπεδα της Net1A ελαττωμένα στους μεταστατικούς σε σχέση με τους πρωτογενείς όγκους, υποδηλώνοντας ότι το μονοπάτι miR-24/Net1A ενεργοποιείται κατά τη μεταστατική διαδικασία στον καρκίνο του μαστού

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται ένας νέος μηχανισμός που ρυθμίζει τη γρήγορη και παρατεταμένη αναδιοργάνωση της ακτίνης μέσω των Rho GTPασών και ελέγχει διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η EMT και η διεισδυτικότητα τόσο σε φυσιολογικά, όσο και σε καρκινικά κύτταρα.

Summary

Transforming growth factor- β (TGF- β) controls many fundamental aspects of cellular behavior, such as cell division, differentiation and migration, which require active reorganization of actin and microtubule cytoskeleton and regulation of contractile forces.

TGF- β has been shown to induce short- and long-term actin reorganization by controlling Rho-GTPase signaling in a variety of cell types, such as fibroblasts, epithelial and smooth muscle cells. A number of direct target genes, activated by TGF- β , have been previously reported to control the long-term Rho activation and actin reorganization, such as α -smooth muscle actin (α -SMA), RhoB GTPase and the guanine nucleotide exchange factor (GEF) Net1. However, the molecular mechanisms that regulate the prompt and long term stimulation of Rho GTPases by TGF- β remain poorly understood. The purpose of the present study was to delineate the mechanisms of the rapid and long term activation of Rho GTPase by TGF- β , as well as to study their role in actin cytoskeleton reorganization and in biological processes such as epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer cell invasiveness.

By using JEG3, choriocarcinoma cells that lack endogenous Smad3 we found that TGF- β rapidly stimulated RhoA and RhoB activation, whereas inhibition of Smad2 expression via siRNA-mediated silencing or by blocking its phosphorylation using the T β RI inhibitor, SB431542, did not prevent the early RhoA/B activation by TGF- β , indicating that this effect is Smad2/3-independent. When we pre-treated cells with the general tyrosine kinase inhibitor Genistein we observed that the TGF- β -induced early RhoA activation was blocked, implying that tyrosine phosphorylation signaling is involved in this process. In line with this finding, TGF- β -stimulation resulted in a quick activation of the non-receptor tyrosine kinase Src, followed by activation of the Vav2 GEF. Furthermore, the early TGF- β -induced RhoA activation was totally blocked after inhibition of Src kinase by the selective inhibitor of the Src family tyrosine kinases PP2 and was reduced after Vav2 silencing via siRNA, supporting the notion that the rapid Src/Vav2 stimulation is implicated in the regulation of early RhoA activation by TGF- β .

In parallel, we studied the mechanism of long term activation of RhoA GTPase by TGF- β by focusing on the regulation of the two isoforms of the RhoA-specific Net1 GEF by TGF- β in HaCaT keratinocytes. We found that short-term TGF- β treatment selectively induced Net1 isoform2 (Net1A) but not Net1 isoform1. This led to up-regulation of cytoplasmic Net1A protein levels that were necessary for TGF- β -mediated RhoA activation. We also showed that Net1A is a direct transcriptional target of TGF- β and its selective induction is not due to the activation of a unique promoter, but rather due to regulation of alternative splicing by TGF- β . Smad signaling – mainly Smad3 – and the ERK MAPK pathway were found to be involved in Net1A up-regulation by TGF- β .

Interestingly, long-term TGF- β treatment resulted in Net1 mRNA down-regulation and Net1A protein degradation by the proteasome. Furthermore, we identified the microRNAs, miR-24 and miR-155, as novel post-transcriptional regulators of Net1A expression, which are upregulated by TGF- β and directly target the 3'UTR of Net1A (and Net1) mRNA. Silencing of Net1A alone resulted in disruption of E-cadherin and zonula occludens-1 (ZO-1) mediated junctions, as well as expression of the mesenchymal markers N-cadherin, fibronectin and PAI-1 and the transcriptional repressor of E-cadherin, Slug and enhanced the mesenchymal phenotype in the presence of TGF- β stimulation, indicating that late TGF- β -induced downregulation of Net1A is involved in epithelial to mesenchymal transition (EMT). The microRNA miR-24 was also found to be implicated in the regulation of the EMT program in response to TGF- β and was shown to be directly involved in the TGF- β induced breast cancer cell invasiveness through Net1A regulation. Finally, after analyzing 6 pairs of primary and metastatic breast tumors we found that miR-24 was upregulated and Net1A downregulated in metastatic versus primary tumors, implying that the miR-24/Net1A pathway is activated during breast cancer metastasis.

In conclusion, the present study presents a novel mechanism which regulates the short- and long-term actin reorganization through Rho GTPase signaling and controls cellular responses such as cytoskeleton organization, EMT and invasiveness in normal and tumor cells.

1. Εισαγωγή

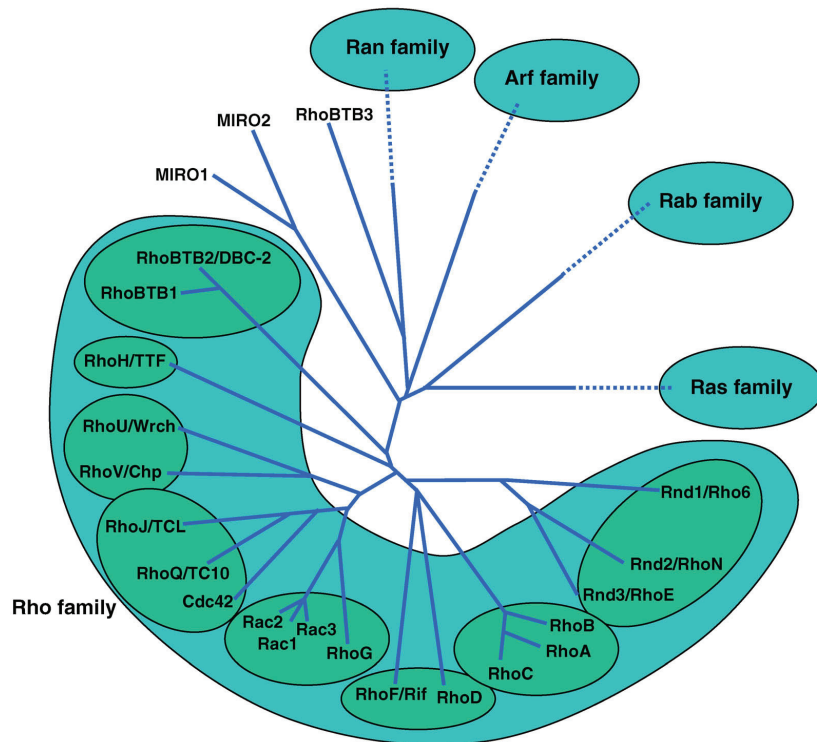
1.1 Η οικογένεια των μικρών Rho GTPασών

Οι Rho GTPάσες ελέγχουν πολλές πτυχές της κυτταρικής συμπεριφοράς μέσω της ρύθμισης πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών. Τα πρώτα μέλη της οικογένειας, Rho, Rac και Cdc42 αναγνωρίστηκαν από την ικανότητα τους επάγουν συγκεκριμένες δομές στα ινίδια της ακτίνης σε ινοβλάστες, ινίδια του στρες, λαμελιπόδια (lamellipodia/ membrane ruffles) και φιλοπόδια (filopodia) αντίστοιχα [1]. Με το πέρασμα των χρόνων έχει συσσωρευτεί γνώση η οποία καταδεικνύει, ότι σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα οι Rho GTPάσες εμπλέκονται στις περισσότερες – αν όχι σε όλες – τις κυτταρικές διεργασίες που βασίζονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως είναι η μετανάστευση, η προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους και με την εξωκυττάρια ουσία, η μορφογένεση και η φαγοκυττάρωση. Παράλληλα με τους καθιερωμένους ρόλους τους στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν τον κυτταροσκελετό των μικροσωληνίσκων, την κυτταρική πολικότητα, την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου, τη γονιδιακή έκφραση και μονοπάτια μετακίνησης κυστιδίων [2,3].

Με βάση την αμινοξική τους αλληλουχία, τα δομικά τους μοτίβα και τη βιολογική τους δράση, η οικογένεια των Rho GTPασών, η οποία αποτελείται από 20 μέλη, διαχωρίζεται σε 6 υποοικογένειες: τη RhoA υποοικογένεια (RhoA, RhoB και RhoC), τη Rac1 υποοικογένεια (Rac1 (και η ισομορφή της Rac1b), Rac2, Rac3 και RhoG), τη Cdc42 υποοικογένεια (Cdc42 (και η ειδική για τον εγκέφαλο ισομορφή της G25K), TC10, TCL, Chp/Wrch-2 και Wrch-1), τη Rnd υποοικογένεια (Rnd1, Rnd2 και RhoE/Rnd3), τη RhoBTB υποοικογένεια και την πρόσφατα χαρακτηρισμένη Miro υποοικογένεια (Miro-1 και Miro-2) (**Εικόνα 1.1**). Επιπλέον οι Rho GTPάσες RhoD, Rif και TTF/RhoH δεν εμπίπτουν σε καμία από τις παραπάνω υποοικογένειες [4].

1.1.1 Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά των μικρών Rho GTPασών

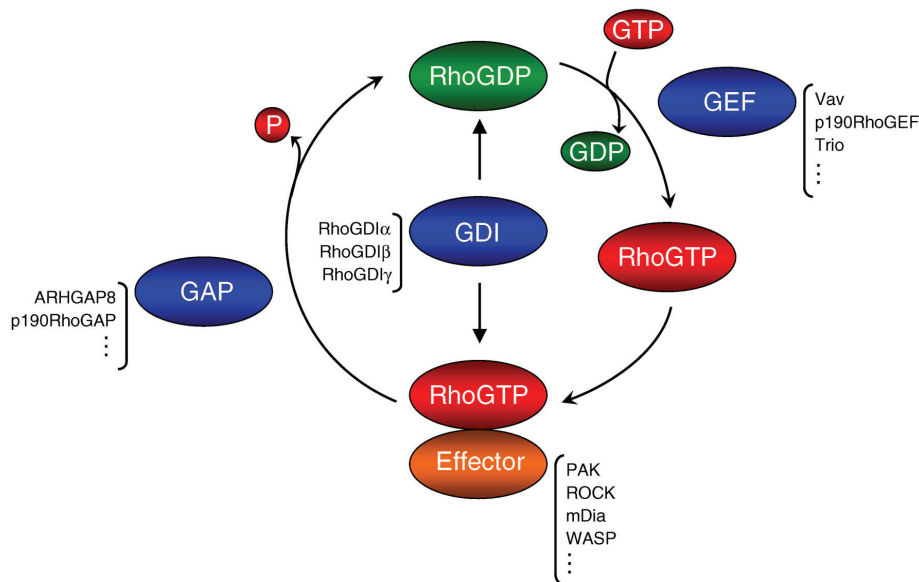
Οι πρωτεΐνες της Rho οικογένειας χαρακτηρίζονται από την παρουσία μίας Rho-τύπου (Rho-type) περιοχή GTPάσης. Το δομικό χαρακτηριστικό που τις διαφοροποιεί από τις άλλες μικρές GTPάσες είναι η επονομαζόμενη Rho ένθετη περιοχή (Rho insert domain), η οποία βρίσκεται ανάμεσα στην πέμπτη β πτυχωτή αλυσίδα και την τέταρτη α έλικα στην περιοχή της GTPάσης. Οι πιο τυπικές Rho πρωτεΐνες είναι μικρές (190-250 αμινοξέα) και αποτελούνται μόνο από την περιοχή της GTPάσης και από μικρές αμινο- και καρβοξυ-τελικές προεκτάσεις. Παρόλα αυτά κάποια μη τυπικά μέλη της οικογένειας περιέχουν επιπρόσθετες περιοχές και μπορεί να είναι μεγαλύτερα από 700 αμινοξέα. Η περιοχή της GTPάσης της οικογένειας των Rho GTPασών εμφανίζει 40-95% ομολογία μεταξύ των μελών της [2,4].



Εικόνα 1.1: Φυλογενετικό δέντρο της υπεροικογένειας των Ras GTPασών. Τα 20 μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών ομαδοποιούνται σε 8 υποοικογένειες. Οι Miro και RhoBTB3 πρωτεΐνες δημιουργούν ανεξάρτητες ομάδες, ξεχωριστά από τις Rho GTPάσες [5].

Όλα τα μέλη περιέχουν μοτίβα τα οποία είναι χαρακτηριστικά για όλες τις πρωτεΐνες που προσδέουν GTP, προσδέουν GDP και GTP με μεγάλη συγγένεια και εναλλάσσονται μεταξύ μίας ενεργού GTP-προσδεμένης και μιας ανενεργού GDP-προσδεμένης μορφής. Η ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών μεσολαβείται από ειδικούς παράγοντες που ανταλλάσσουν νουκλεοτίδια γουανίνης **Rho-GEFs** (Rho guanine-nucleotide exchange factors), οι οποίοι καταλύουν την ανταλλαγή του GDP με GTP, ενώ το σήμα τερματίζεται με υδρόλυση του GTP σε GDP που καταλύεται από πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη δράση GTPάσης **Rho-GAPs** (Rho GTPase activating proteins) (**Εικόνα 1.2**) [2-4].

Οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες έχουν μία ενδογενή δραστηριότητα GTPάσης και επομένως μπορούν να υδρολύσουν το GTP σε GDP και ανόργανο φωσφόρο, η ικανότητα αυτή όμως ενισχύεται σημαντικά από τις πρωτεΐνες Rho-GAPs. Οι Rho πρωτεΐνες Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE, RhoH, RhoBTB1 και RhoBTB2, λόγω αντικατάστασης καίριων αμινοξέων δε μπορούν να υδρολύσουν το GTP σε GDP με αποτέλεσμα να βρίσκονται μόνιμα προσδεμένες με GTP [6]. Η ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών φαίνεται να πραγματοποιείται στο επίπεδο της έκφρασης τους, της φωσφορυλίωσης τους και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μέσω ειδικών δομικών περιοχών. Η φωσφορυλίωση ρυθμίζει επίσης τη δράση και τον υποκυτταρικό εντοπισμό των RhoA και Rnd3/RhoE, οι οποίες φωσφορυλιώνονται από την κινάση PKA που εξαρτάται από το cAMP (cAMP-dependent Protein Kinase A) και τη ROCK κινάση αντίστοιχα [5,7,8].



Εικόνα 1.2: Ο βασικός κύκλος ενεργοποίησης των Rho GTPασών. Η πρόσδεση του GTP και η επακόλουθη ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών καταλύεται από τις GEF πρωτεΐνες. Στην GTP-προσδεσμένη μορφή τους οι Rho GTPάσες προσδένουν διαφορετικούς τελεστές μεταβιβάζοντας τις δράσεις τους. Οι GAP πρωτεΐνες προάγουν την υδρόλυση του GTP και την απενεργοποίηση των Rho, ενώ οι RhoGDI πρωτεΐνες οδηγούν τις Rho στο κυτταρόπλασμα εμποδίζοντας τη δράση τους [5].

1.1.2 Ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού των Rho GTPασών μέσω των RhoGDI πρωτεϊνών και μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων

Η λειτουργία των Rho πρωτεϊνών εξαρτάται σημαντικά από τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό και τη σύνδεση τους με μεμβράνες, γεγονός που καθορίζεται από λιπιδικές τροποποιήσεις στο καρβοξυ-τελικό άκρο τους καθώς και από την αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες **RhoGDIs** (Rho guanine-nucleotide dissociation inhibitors).

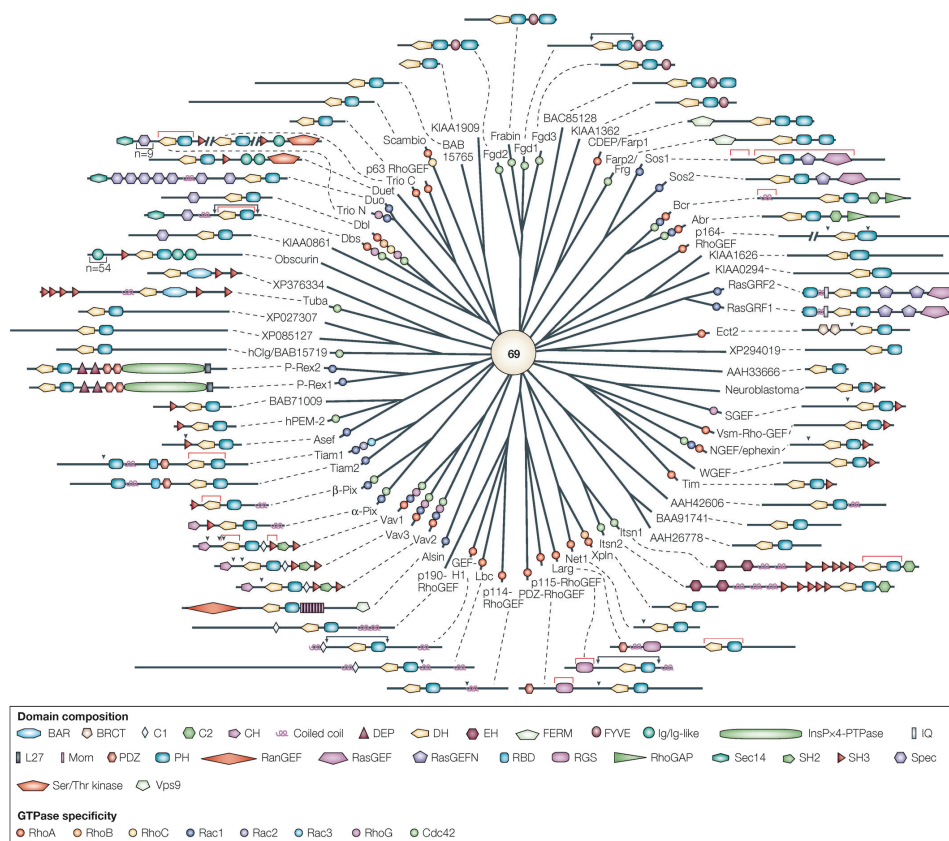
Η πλειοψηφία των Rho πρωτεϊνών υφίσταται καρβοξυ-τελικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από λιπιδικές ομάδες, όπως ισοπρενυλίωση (φαρνεσυλίωση, γερανυλ-γερανυλίωση) ή/και παλμιτυλίωση (palmitoylation), οι οποίες ενισχύουν την αλληλεπίδραση τους με τις μεμβράνες. Οι περισσότερες Rho GTPάσες καταλήγουν σε CAAX τετραπεπτιδικές αλληλουχίες, οι οποίες ισοπρενυλιώνονται. Η ισοπρενυλίωση από μόνη της δεν επαρκεί για να καθορίσει τον υποκυτταρικό εντοπισμό των Rho πρωτεϊνών και ένα δεύτερο καρβοξυ-τελικό σήμα είναι απαραίτητο. Κάποια μέλη τροποποιούνται επιπλέον με την προσθήκη της παλμιτύλο-ομάδας (palmitate) σε κατάλοιπα κυστεΐνης αμέσως πάνω από το CAAX μοτίβο.

Ένα άλλο επίπεδο ρύθμισης του εντοπισμού και της ενεργοποίησης των Rho GTPασών αποτελεί η αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες RhoGDIs, οι οποίες προσδένονται στο καρβοξυ-τελικό ισοπρενυλιωμένο άκρο των Rho πρωτεϊνών εμποδίζοντας έτσι τη δέσμευσή τους στις μεμβράνες [4]. Οι RhoGDIs φαίνεται να οδηγούν τις GDP-προσδεσμένες Rho GTPάσες στο κυτταρόπλασμα, όπου μπλοκάρουν την αυθόρμητη ανταλλαγή του GDP με GTP, όμως ο ακριβής τους ρόλος δεν είναι απόλυτα κατανοητός [9]. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι η συγκέντρωση των RhoGDIs στο κύτταρο είναι παρόμοια με αυτή των Rho GTPασών

στόχων τους. Η στοιχειομετρία αυτή υποδηλώνει ότι ένα μεγάλο κλάσμα των Rho πρωτεϊνών στο κύτταρο είναι προσδεμένες και απενεργοποιημένες από τις GDIs και επομένως η πρόσδεση αυτή είναι ένας πιθανός μηχανισμός ρύθμισης των Rho πρωτεϊνών, ενώ έχει προταθεί ότι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις RhoGDIs μπορεί να ανταγωνίζονται την πρόσδεση των Rho, οδηγώντας στην απελευθέρωση τους από τα σύμπλοκα αυτά σε μεμβρανικές περιοχές όπου χρειάζονται [4,10,11]. Προς αυτή την κατεύθυνση έχει δειχθεί ότι η RhoGDI οδηγεί τις Rac1 και Cdc42 σε νέες θέσεις προσκόλλησης που μεσολαβούνται από ιντεγκρίνες για να επιτρέψουν τη δημιουργία προεκβολών της μεμβράνης στο οδηγό άκρο (leading edge) των κυττάρων που μεταναστεύουν [12,13].

1.2 Οι Rho-GEF πρωτεΐνες ως ενεργοποιητές των Rho GTPασιών

Περισσότερες από 70 Rho-GEF πρωτεΐνες (Εικόνα 1.3) και 80 Rho-GAPs κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα παρέχοντας τη δυνατότητα στο κύτταρο να ρυθμίσει τη δραστηριότητα των Rho πρωτεϊνών μέσω πολλαπλών μονοπατιών. Η πρώτη GEF στα θηλαστικά απομονώθηκε ως ογκογονίδιο από κύτταρα Β-λεμφώματος (diffuse B-cell lymphoma) και για αυτό ονομάστηκε Dbl.



Εικόνα 1.3: Η Dbl οικογένεια των GEF πρωτεϊνών. Η Dbl οικογένεια αποτελείται από 69 μέλη, παρουσιάζεται η ειδικότητα του κάθε μέλους για τις Rho GTPάσες καθώς και οι δομικές του περιοχές [14].

Η Dbl αργότερα δείχθηκε ότι λειτουργεί ως GEF για τη Cdc42. Για τη GEF δραστηριότητα χρειαζόταν μία συντηρημένη περιοχή ~200 αμινοξέων μεταξύ της Dbl και της ομόλογης πρωτεΐνης της ζύμης (yeast) Cdc24, η οποία είναι σήμερα γνωστή ως **DH** (Dbl Homology) περιοχή. Σχεδόν όλες οι GEFs περιέχουν μία **PH** (Pleckstrin Homology) περιοχή γειτονικά, προς το καρβοξυ-τελικό άκρο σε σχέση με τη DH περιοχή. Μαζί, στις περισσότερες περιπτώσεις, παρέχουν την ελάχιστη δομική μονάδα που απαιτείται για την κατάλυση της ανταλλαγής του GDP σε GTP (**Εικόνα 1.4**) [3,14,15].

Μία δεύτερη υποοικογένεια Rho GEF πρωτεϊνών έχει περιγραφεί πρόσφατα, η οποία δεν σχετίζεται με την υποοικογένεια των Dbl GEFs που περιέχουν την DH περιοχή. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται CZH (CDM and Zizimin Homology) ή Dock180-related πρωτεΐνες, οι οποίες αντί για την κλασική DH καταλυτική περιοχή διαθέτουν δύο περιοχές υψηλής ομολογίας που μεσολαβούν την ανταλλαγή νουκλεοτιδίων στις Rho πρωτεΐνες (Dock homology region, DHR1 και 2) [16].

1.2.1 Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης των Rho GTPασών μέσω της DH καταλυτικής περιοχής

Οι Rho GTPάσες διαθέτουν θήκες πρόσδεσης των νουκλεοτιδίων και του Mg^{2+} . Η μορφή του νουκλεοτιδίου (GTP ή GDP) που είναι προσδεδεμένο στη Rho GTPάση τροποποιεί τη διαμόρφωση των Switch 1 και 2 περιοχών της GTPάσης, ενώ το Mg^{2+} είναι απαραίτητο για την πρόσδεση των νουκλεοτιδίων γουανίνης με υψηλή συγγένεια. Οι DH περιοχές είναι υπεύθυνες για την προώθηση ενδιάμεσων καταστάσεων των Rho GTPασών που δεν είναι προσδεδεμένες ούτε με το GDP ούτε με το Mg^{2+} (nucleotide-free) με αποτέλεσμα στη συνέχεια την πρόσδεση κατά προτίμηση του GTP, επειδή το GTP βρίσκεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με το GDP στο κύτταρο .

1.2.2 Ο ρόλος της PH περιοχής

Οι PH περιοχές λόγω πρόσδεσης φωσφοϊνοσιτιδίων (phosphoinositides) έχει προταθεί ότι στοχεύουν τις GEF πρωτεΐνες στις μεμβράνες και ότι ρυθμίζουν τη GEF δραστηριότητα μέσω αλλοστερικών μηχανισμών. Πρόσφατες ενδείξεις υποστηρίζουν ότι οι PH περιοχές συνεργάζονται για να διευκολύνουν την αντίδραση ανταλλαγής νουκλεοτιδίων και την επακόλουθη ενεργοποίηση των Rho GTPασών μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τη GTPάση. Για παράδειγμα, αρκετές μελέτες έδειξαν ότι τα τμήματα DH-PH εμφανίζουν μεγαλύτερη δραστικότητα κατά την αντίδραση ανταλλαγής νουκλεοτιδίων σε σχέση μόνο με την αντίστοιχη DH περιοχή. Οι πρώτες μελέτες υποστήριζαν ότι οι PH περιοχές παίζουν ρόλο στη στόχευση των GEFs στις μεμβράνες, όπως έχει προταθεί για άλλες PH περιοχές. Παρόλα αυτά είναι πλέον αποδεκτό ότι οι PH περιοχές των Rho-GEFs της Dbl οικογένειας προσδένουν τα φωσφολιπίδια με χαμηλή συγγένεια και μικρή ειδικότητα, καθιστώντας αυτές τις αλληλεπιδράσεις ανεπαρκείς για τη στόχευση των GEFs στις μεμβράνες, φαίνεται πως δρουν

ως περιοχές αγκυροβόλησης (docking sites) πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζονται από τις Rho GTPάσες [14]. Για παράδειγμα η PH περιοχή της Dbp αλληλεπιδρά άμεσα με την ezrin, μία πρωτεΐνη που συνδέει την πλασματική μεμβράνη με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και ενεργοποιείται από τις Rho GTPάσες [17].

1.2.3 Η ρύθμιση των Rho-GEFs

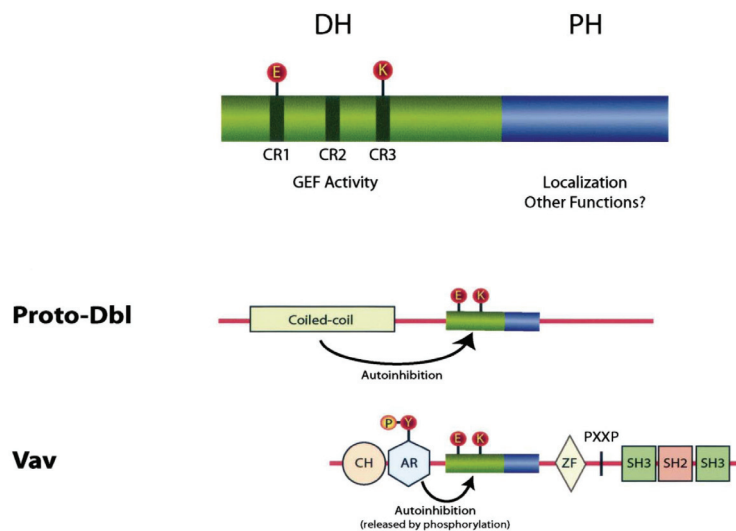
Ένα εντυπωσιακό χαρακτηριστικό των Rho GEFs είναι το γεγονός ότι ξεπερνούν αριθμητικά τις GTPάσες στόχους τους κατά τρεις φορές, το οποίο μεταφράζεται στο ότι πολλαπλές GEFs μπορούν να ενεργοποιήσουν την ίδια GTPάση. Επιπλέον πολλές GEFs μπορούν να ενεργοποιήσουν περισσότερες από μία Rho GTPάσες. Οι περισσότερες GEFs εκφράζονται ευρέως και έτσι μια ιστοειδική κατανομή τους δεν αποτελεί εξήγηση του τόσο μεγάλου αριθμού τους. Μία πιθανότητα είναι το ότι οι GEFs δεν ενεργοποιούν απλά μία συγκεκριμένη GTPάση, αλλά μέσω του υποκυτταρικού τους εντοπισμού ή μέσω επιπρόσθετων αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες συνεργάζονται ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνδεση του άνωθεν σήματος με τους καθοδικούς τελεστές [3].

Ενδομοριακές ανασταλτικές αλληλουχίες: Αρκετές GEF πρωτεΐνες περιέχουν μία ρυθμιστική περιοχή, η οποία μπλοκάρει τη δραστηριότητα τους μέσω μιας ενδομοριακής αυτοκατασταλτικής αλληλεπίδρασης, η οποία αίρεται με φωσφορυλίωση ή με αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, επιτρέποντας έτσι την ενεργοποίηση της GEF. Το πιο κατανοητό παράδειγμα είναι η Vav GEF, η οποία ενεργοποιείται καθοδικά από υποδοχείς κινασών τυροσίνης (receptor tyrosine kinases, RTKs), όπως οι EGFR και PDGFR. Μετά από τη διέγερση του υποδοχέα, η Vav φωσφορυλιώνεται ταχύτατα και παροδικά από μέλη των Src και Syk οικογενειών κινασών τυροσίνης, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της καταλυτικής της δραστηριότητας. Με φωσφορυλίωση ρυθμίζεται επίσης η Dbp GEF (**Εικόνα 1.4**) [3,18].

Ένας δεύτερος αυτοκατασταλτικός περιορισμός φαίνεται ότι τίθεται από την PH περιοχή της Vav. Όταν προσδένεται στα φωσφοϊνοσιτίδια PI-4,5-P₂ η PH περιοχή αλληλεπιδρά ισχυρά με τη DH περιοχή καλύπτοντας την περιοχή πρόσδεσης στη Rac GTPάση. Η μετατροπή όμως των PI-4,5-P₂ σε PI-3,4,5-P₃ φωσφοϊνοσιτίδια εξασθενεί τη DH/PH αλληλεπίδραση, ενώ θεωρείται προαπαιτούμενο για την επακόλουθη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της Vav [19,20]. Αυτός ο αυτοκατασταλτικός μηχανισμός από την PH περιοχή φαίνεται να ισχύει και για τις Sos1, Dbp, P-Rex1 GEFs [3].

Άμεση ενεργοποίηση μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων: Η ενεργοποίηση των GEF πρωτεϊνών μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων δεν περιλαμβάνει την άρση μιας αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης. Η p115RhoGEF έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά και ενεργοποιείται από την α₁₃ υπομονάδα της ετεροτριμερούς G-πρωτεΐνης G₁₃ [21]. Η ρύθμιση των GEFs από τις υπομονάδες των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών φαίνεται να είναι ένας πιο γενικός μηχανισμός ρύθμισης και έχει βρεθεί ότι ισχύει και για τις PDZ-GEF και LARG. Επίσης

οι Dbl και P-Rex1 GEFs έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρούν με τις Gβγ υπομονάδες των G-πρωτεϊνών [3,14,22].



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση της DH-PH μονάδας μαζί με τις τρεις συντηρημένες περιοχές CR1, CR2 και CR3. Παρουσίαση των πιο καλά μελετημένων GEF πρωτεϊνών Dbl και Vav με τις περιοχές που συμμετέχουν στην αυτοκαταστολή τους [23].

Ρύθμιση μέσω εντοπισμού: Η ρύθμιση του υποκυτταρικού εντοπισμού των GEFs είναι ένα μέσο ελέγχου της τοπικής και χρονικής ρύθμισης των Rho GTPασών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η PH περιοχή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον εντοπισμό των GEFs όχι τόσο μέσω πρόσδεσης σε μεμβρανικά λιπίδια αλλά κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων με διάφορες πρωτεΐνες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι Tiam1 και Ras-GRF1 GEFs, οι οποίες στοχεύονται στη μεμβράνη μέσω μίας δεύτερης PH περιοχής και όχι αυτής που βρίσκεται γειτονικά στην DH περιοχή, ενώ σε αντίθεση με ότι πιστευόταν, ο εντοπισμός τους στη μεμβράνη δεν μεσολαβείται από αλληλεπίδραση της PH περιοχής με λιπίδια της μεμβράνης αλλά από την αλληλεπίδραση της με την πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού αγκυρίνη και το μεμβρανικό υποδοχέα CD44 [3,24,25]. Άλλες GEF πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω των PH περιοχών τους είναι οι Dbl και Trio GEFs, οι οποίες αλληλεπιδρούν με την ezrin και τις filamin και Tara αντίστοιχα [3]. Αλληλεπίδραση με τους μικροσωληνίσκους έχει αναφερθεί για την GEF-H1, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της ως προς τη RhoA στην πλασματική μεμβράνη, ενώ ο αποπολυμερισμός της τουμπουλίνης ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα οδηγεί στην ενεργοποίηση της RhoA μέσω απελευθέρωσης της GEF-H1 από τους μικροσωληνίσκους [14,26].

Ο εντοπισμός των GEFs μπορεί επίσης να ρυθμίζεται μέσω στρατολόγησης σε ενεργοποιημένους μεμβρανικούς υποδοχείς και να μεσολαβείται από αλληλεπιδράσεις με adaptor πρωτεΐνες μέσω SH2/SH3 ή PDZ ρυθμιστικών περιοχών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι Sos1 και Vav, οι οποίες στρατολογούνται στη μεμβράνη μετά από

ενεργοποίηση υποδοχέων κινάσης τυροσίνης μέσω SH2/SH3 εξαρτώμενων αλληλεπιδράσεων με τις adaptor πρωτεΐνες, όπως οι Grb2 και Shc [3,18,19,27].

Πρόσφατα, πρωτεΐνες που περιέχουν PDZ μοτίβα έχουν αναδειχθεί σε οργανωτές πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων που ρυθμίζουν τον εντοπισμό των GEF πρωτεϊνών. Για παράδειγμα η PDZ πρωτεΐνη synectin προσδένει και οδηγεί στην πλασματική μεμβράνη την ειδική για τη RhoA GEF Syx1 προάγοντας την εντοπισμένη ενεργοποίηση της RhoA [15].

Τέλος, ένας πολύ διαφορετικός μηχανισμός ρύθμισης του υποκυτταρικού εντοπισμού έχει αναγνωριστεί για τις ειδικές GEFs για τη Rho GTPάση, Net1 και Ect2. Οι πρωτεΐνες αυτές διαθέτουν δύο NLS (nuclear localization signals) στην αμινο-τελική περιοχή τους και μέσω εισόδου στον πυρήνα θεωρείται ότι διατηρούνται μακριά από το υπόστρωμά τους. Η μετατόπιση της Net1 μετά από κάποια διέγερση στο κυτταρόπλασμα σχετίζεται με ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης [28,29]. Παρομοίως η Ect2, η οποία παίζει ρόλο στην κυτοκίνηση (cytokinesis), απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα μετά από την κατάρρευση του πυρηνικού φακέλου, παρέχοντας έτσι έναν κομψό τρόπο για τον έλεγχο της πρόσβασης στη Rho κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου [30].

1.3 Οι Rho-GAP πρωτεΐνες ως αρνητικοί ρυθμιστές των Rho GTPασών

Η οικογένεια των RhoGAPs χαρακτηρίζεται από την παρουσία μίας συντηρημένης RhoGAP περιοχής, η οποία εμφανίζει τουλάχιστον 20% ομολογία με άλλα μέλη της οικογένειας. Το ανθρώπινο γονιδίωμα προβλέπεται ότι κωδικοποιεί από 59-70 πρωτεΐνες που περιέχουν μία RhoGAP περιοχή, κατά πολύ υπερβαίνοντας τον αριθμό των Rho GTPασών, που αποτελούνται από 20 μέλη. Αυτή η υπερπληθώρα σε RhoGAPs υπονοεί, όπως και στην περίπτωση των Rho GEFs, ότι η κάθε RhoGAP μπορεί να παίζει έναν πολύ εξειδικευμένο ρόλο στη ρύθμιση της κάθε Rho GTPάσης και επομένως η βιοχημική της δράση ως GAP πρέπει να ρυθμίζεται πολύ αυστηρά τόσο χρονικά όσο και τοπικά.

Οι RhoGAPs φαίνεται ότι ρυθμίζονται από διάφορους μηχανισμούς, όπως η πρόσδεση λιπιδίων, η αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, η φωσφορυλίωση και η πρωτεολυτική αποικοδόμηση [31,32]. Για παράδειγμα, φωσφορυλίωση της p190RhoGAP σε τυροσίνη από τη Src κινάση έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για την ενεργοποίησή της [33], καθώς επίσης η FilGAP (Filamin A associated RhoGAP) φωσφορυλιώνεται από τη ROCK κινάση και ρυθμίζεται θετικά η RacGAP δραστηριότητα της [34]. Από την άλλη μεριά, η φωσφορυλίωση έχει αναφερθεί ότι μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά τη δραστηριότητα κάποιων RhoGAPs [32].

Μερικές RhoGAPs παρουσιάζουν ιστοειδική έκφραση, παρόλα αυτά οι περισσότερες εκφράζονται ευρέως, ενώ κάποιες RhoGAPs φαίνεται να δρουν σε μία συγκεκριμένη Rho GTPάση, όπως οι p112RhoGAP, GMIP, ArhGAP6 και η ARAP3, οι οποίες είναι ειδικές για τη RhoA, οι πλειονότητα όμως των RhoGAPs εμφανίζει διευρυμένη ειδικότητα έναντι διαφορετικών RhoGTPασών.

Δεδομένου ότι οι Rho GTPάσες εμπλέκονται σε ένα μεγάλο αριθμό βιολογικών αποκρίσεων, η κάθε GAP μπορεί να ρυθμίζει επιλεκτικά ένα συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι της Rho GTPάσης. Αποτελεί ενδιαφέρον ότι η RhoGAP περιοχή μπορεί να εξυπηρετεί απλά ως μία περιοχή αλληλεπίδρασης χωρίς να εμφανίζει GAP δραστηριότητα και έτσι οι RhoGAPs μπορεί να λειτουργούν ως scaffold πρωτεΐνες ή τελεστές των Rho GTPασών [31,32] Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K p85, η οποία διαθέτει μία μη λειτουργική RhoGAP περιοχή και μέσω αυτής προσδένεται ειδικά στις Rac και Cdc42 πρωτεΐνες δρώντας τόσο ανοδικά (upstream) όσο και καθοδικά (downstream) από αυτές και όχι ως απενεργοποιητής τους [32]. Σχεδόν όλες οι RhoGAPs είναι μεγάλες πρωτεΐνες, οι οποίες εκτός από τη RhoGAP περιοχή, διαθέτουν επιπρόσθετες λειτουργικές περιοχές και θεωρείται ότι ενσωματώνουν σήματα από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα η Bcr RhoGAP περιέχει τόσο μία RhoGAP όσο και μία RhoGEF περιοχή, οι οποίες είναι ενεργές ως προς τη Rac1 και τη Cdc42 αντίστοιχα. Η Bcr επομένως μπορεί ταυτόχρονα να απενεργοποιήσει τη Rac1 και να ενεργοποιήσει τη Cdc42 [32,35].

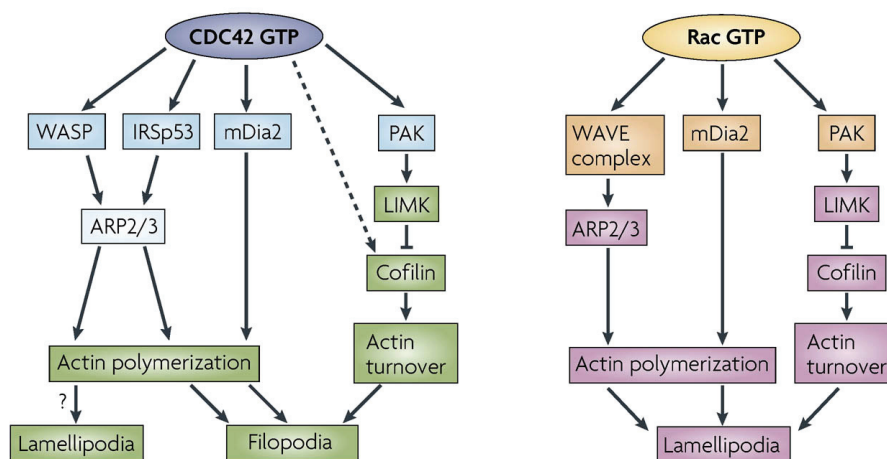
1.4 Οι τελεστές των Rho GTPασών

Η ενεργοποίηση των RhoA, Rac1 και Cdc42 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ινιδίων ακτομυοσίνης, προεκβαλλόντων λαμελιποδίων και προεκβαλλόντων φιλοποδίων αντίστοιχα. Αυτές οι ειδικές επιδράσεις στον κυτταροσκελετό της ακτίνης υποδεικνύουν μία σειρά καλά χαρακτηρισμένων σηματοδοτικών μονοπατιών που ελέγχονται από κάθε GTPάση και οδηγούν τόσο στη δημιουργία (πολυμερισμός της ακτίνης), όσο και στην οργάνωση (filament bundling) των ινιδίων της ακτίνης [36].

1.4.1 Πρωτεΐνες τελεστές των Rac και Cdc42 GTPασών

Παρόλο που η Rac και η Cdc42 οδηγούν σε μορφολογικά διαφορετικές προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης, ξεκινούν και οι δύο τον πολυμερισμό της περιφερειακής ακτίνης μέσω του συμπλόκου **Arp2/3**. Και οι δύο GTPάσες ενεργοποιούν έμμεσα το σύμπλοκο Arp2/3, μέσω των μελών της **WASP** (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) οικογένειας [36]. Η Cdc42-GTP προσδένεται στην N-WASP πρωτεΐνη απελευθερώνοντας την από μία ενδομοριακή αυτοκατασταλτική αλληλεπίδραση ή όπως έχει πιο πρόσφατα αναφερθεί από μία trans-κατασταλτική αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη Toca-1 [37]. Η ενεργοποίηση του συμπλόκου Arp2/3 από τη Rac1 μεσολαβείται από τις πρωτεΐνες της οικογένειας **WAVE**, οι οποίες παρότι είναι δομικά συγγενείς με τη N-WASP, δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τη Rac. Πρόσφατα δείχθηκε ότι η WAVE1 εντοπίζεται σε σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες HSPC300, Nap125 και PIR121, τα οποία εμποδίζουν την ενεργοποίηση της. Η Rac1 αλληλεπιδρά άμεσα με τις Nap125 και PIR121, προάγοντας την αποσύνδεση αυτών των πρωτεϊνών από τη WAVE1 και την ακόλουθη αλληλεπίδραση της με το σύμπλοκο Arp2/3 [36,38].

Άλλοι γνωστοί τελεστές των Rac1 και Cdc42 είναι οι κινάσες της **PAK** οικογένειας, οι οποίες ενεργοποιούνται μέσω αλληλεπίδρασης με τις GTPάσες και την επακόλουθη άρση μιας ενδομοριακής αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης, η οποία εκθέτει την περιοχή της κινάσης [9]. Διάφορες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την PAK1 ή αποτελούν υποστρώματα της έχουν αναφερθεί, όπως μεταξύ άλλων η filamin, η LIMK και η μυσίνη II [2]. Η **filamin** εντοπίζεται στις μεμβρανικές αναδιπλώσεις (membrane ruffles), όπου πιστεύεται ότι αφενός διασυνδέει τα ινίδια της F ακτίνης, σταθεροποιώντας το δίκτυο της ακτίνης που στηρίζει αυτές τις προεκβολές και αφετέρου λειτουργεί ως scaffold πρωτεΐνη για την PAK1, την οποία και ενεργοποιεί [39].



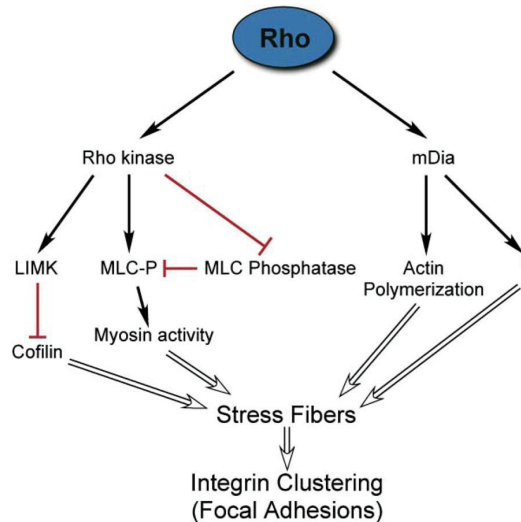
Εικόνα 1.5: Οι τελεστές των Cdc42 και Rac GTPάσων που ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης και το σχηματισμό φιλοποδίων και λαμελιποδίων αντίστοιχα [40].

Η **LIMK** ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την PAK1 [41] και στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την cofilin, μία πρωτεΐνη που προάγει τον αποπολυμερισμό της F-ακτίνης. Το καθαρό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της LIMK από την PAK1 είναι η σταθεροποίηση των ινιδίων της ακτίνης [2,36]. Η PAK1 συνεισφέρει στη μείωση των ινιδίων του στρες και των εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions) μέσω φωσφορυλίωσης και αναστολής της δραστηριότητας της **MLCK** (myosin light chain kinase), με αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλιωμένης MLC (myosin light chain), ή μέσω της φωσφορυλίωσης της βαριάς αλυσίδας της μυσίνης με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της μυσίνης II και την αποσυναρμολόγηση των δομών ακτο-μυσίνης [2,42,43].

1.4.2 Πρωτεΐνες τελεστές της Rho GTPάσης

Ένας βασικός τελεστής της Rho είναι η κινάση **ROCK** (Rho-associated coiled coil kinase), η οποία παίζει ρόλο στη δημιουργία ινιδίων ακτο-μυσίνης [2]. Μία δράση κλειδί της ROCK κινάσης είναι η αύξηση της φωσφορυλιωμένης MLC, τόσο μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης της φωσφατάσης της MLC [44], όσο και μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης της MLC [45], με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δράσης της μυσίνης II και τη δημιουργία τάσης

και συσταλτότητας στο κύτταρο μέσω των ινιδίων ακτο-μυοσίνης. (Εικόνα 1.6) [2,36,46]. Επίσης η ROCK κινάση φωσφορυλιώνει τη LIMK2, η οποία όπως προαναφέρθηκε για τη LIMK1, φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την πρωτεΐνη αποπολυμερισμού της ακτίνης, cofilin με αποτέλεσμα την προαγωγή της σταθεροποίησης των ινιδίων ακτο-μυοσίνης [2,36].



Εικόνα 1.6: Οι τελεστές της Rho GTPάσης που οδηγούν στο σχηματισμό ινιδίων του στρες [2].

Επίσης, η Rho προκαλεί πολυμερισμό της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης του μέλους της οικογένειας των formins, **mDia1** (DRF, diaphanous related formin) [36]. Οι formins μαζί με το σύμπλοκο Arp2/3 συνιστούν τους κυριότερους παράγοντες πολυμερισμού της ακτίνης. Η mDia1 αλληλεπιδρά με τη Rho-GTP με αποτέλεσμα την άρση μιας ενδομοριακής αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης, όπως και στην PAK1, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της [47].

1.5 Η υποοικογένεια RhoA

Η υποοικογένεια της RhoA περιλαμβάνει τις RhoA, RhoB και RhoC, οι οποίες εμφανίζουν μεταξύ τους περίπου 85% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, με τις μεγαλύτερες διαφορές να εντοπίζονται στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο. Στην αμινο-τελική τους περιοχή βρίσκεται η πλειοψηφία των αμινοξέων που εμπλέκονται στην πρόσδεση και υδρόλυση του GTP, καθώς και οι περιοχές Switch 1 και 2 οι οποίες αλλάζουν διαμόρφωση μεταξύ των GTP- και GDP-προσδεδωμένων μορφών. Τα αμινοξέα που είναι απαραίτητα για την καταλυτική λειτουργία είναι συντηρημένα και στις τρεις Rho ισομορφές, όπως επίσης και τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην πρόσδεση, σταθεροποίηση και ρύθμιση της υδρόλυσης του GTP [48].

1.5.1 Υποκυτταρικός εντοπισμός των RhoA, RhoB και RhoC

Δεδομένου ότι η μεγαλύτερη διαφορά στην αλληλουχία των RhoA, RhoB και RhoC εντοπίζεται στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο, ο εντοπισμός των Rho ισομορφών ρυθμίζεται διαφορετικά

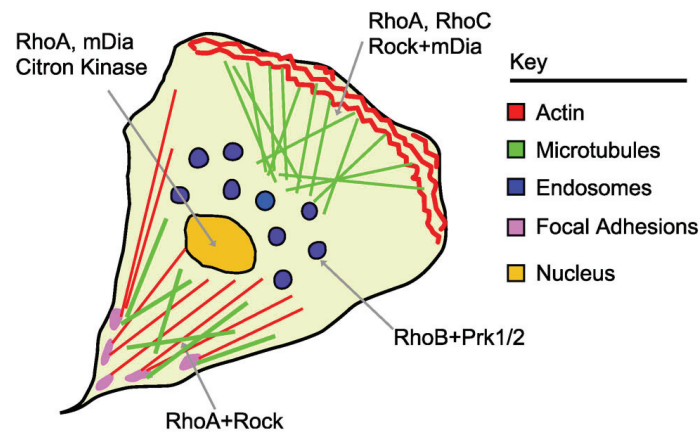
μέσω διαφορετικών μετα-μεταφραστικών λιπιδικών τροποποιήσεων στο καρβοξυ-τελικό τους άκρο. Έτσι οι RhoA και RhoC γεραφυλίζονται και εντοπίζονται είτε στη μεμβράνη, είτε στο κυτταρόπλασμα, ενώ η RhoB πρενυλιώνεται είτε με τη γεραφυλο- (GG), είτε με τη φαρνεσυλο- (F) ισοπρενυλο-ομάδα καθώς επίσης τροποποιείται με παλμυτιλίωση και βρίσκεται κυρίως στα ώριμα ενδοσώματα και λυσοσώματα. Όταν η RhoB είναι μόνο γεραφυλο-γεραφυλωμένη (π.χ. με αναστολείς των φαρνεσυλοτρανφερασών) εντοπίζεται κυρίως στη μεμβράνη, υποδεικνύοντας έτσι ότι οι διαφορετικές λιπιδικές τροποποιήσεις της RhoB οδηγούν σε διαφορετικό υποκυτταρικό εντοπισμό [4,48,49].

1.5.2 Διαφορές των RhoA, RhoB και RhoC ως προς την έκφραση και την αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες τελεστές

Σε κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια η έκφραση του γονιδίου της *RhoB* αλλά όχι της *RhoA* ή της *RhoC*, επάγεται από ένα πλήθος παραγόντων όπως η UV ακτινοβολία, κυτταροκίνες ή αυξητικοί παράγοντες, εν μέρει τουλάχιστον μέσω ενεργοποίησης του υποκινητή της [50]. Επιπλέον τα επίπεδα της RhoB ποικίλουν κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, ενώ το μετάγραφο της έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής, 30 λεπτών, ο οποίος είναι πολύ μικρότερος από αυτόν της RhoA ή της RhoC, υποδεικνύοντας έτσι ότι η λειτουργία της RhoB απαιτεί υψηλό βαθμό ελέγχου της έκφρασής της [48,51].

Η μικρή διαφορά στην αμινοξική αλληλουχία των RhoA, RhoB και RhoC που παρατηρείται στην περιοχή πρόσδεσης ρυθμιστικών πρωτεϊνών (Switch 1 περιοχή) πιθανόν να είναι υπεύθυνη για τις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις τους με ρυθμιστικές πρωτεΐνες, όπως οι Rho GEFs και οι Rho GAPs, καθώς και με τους τελεστές τους. Στην πραγματικότητα πολλοί λίγες Rho GEFs ή GAPs έχουν συγκριθεί ως προς τη σχετική τους δραστηριότητα απέναντι στις RhoA, RhoB και RhoC, ενώ από αυτές που έχουν δοκιμαστεί και στις τρεις ισομορφές, όπως οι Vav, p115RhoGEF, Bcr και p190RhoGAP δεν έχουν παρατηρηθεί σαφείς διαφορές [3,48]. Η GEF XPLN, είναι η μόνη Rho GEF που έχει δειχθεί ότι δρα στη RhoA και τη RhoB, αλλά όχι στη RhoC [52].

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 11 πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα με τη RhoA και δρουν ως τελεστές της, μεταξύ των οποίων οι ROCK1/2, η mDia1, οι PRK1/2, η Rhotekin, η RhoRhin και η Citron κινάση. Μελέτες έδειξαν ότι οι ROCK και Citron έχουν μεγαλύτερη συγγένεια για τη RhoC σε σχέση με τη RhoA και RhoB, ενώ η RhoC ενεργοποιεί ισχυρότερα τη ROCK σε επιθηλιακά κύτταρα [48,53]. Παρόλο που δεν υπάρχουν *in vitro* ενδείξεις ότι οι PRKs έχουν διαφορετική συγγένεια για κάποια από τις Rho ισομορφές, έχει βρεθεί ότι η PRK1 συνεντοπίζεται στα ενδοσώματα με τη RhoB, υποδηλώνοντας ότι είναι ένας ειδικός στόχος της RhoB, υπόθεση που ενισχύεται περαιτέρω από το εύρημα ότι η RhoB αλληλεπιδρά με την PRK για να καθυστερήσει τη μεταφορά του EGFR στα λυσοσώματα μέσω του μονοπατιού ενδοκυττάρωσης [48,50].



Εικόνα 1.7: Μοντέλο κατανομής των RhoA, RhoB και RhoC και των τελεστών τους στο μεταναστευτικό κύτταρο. Οι πρωτεΐνες mDia και ROCK έχειδειχθεί ότι σταθεροποιούν τους μικροσωληνίσκους και συνεπώς βρίσκονται στο οδηγό άκρο (leading edge) του κυττάρου υπό τον έλεγχο της RhoA. Η ROCK κινάση μέσω της RhoA είναι απαραίτητη για τη δημιουργία συσταλτότητας για το μάζεμα της ουράς (tail retraction) και την αποσυναρμολόγηση των προσκολλήσεων στο πίσω μέρος του κυττάρου. Η RhoB συνεντοπίζεται με την PRK1 στα ενδοσώματα και ρυθμίζει την κυκλοφορία των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, ενώ η RhoC παρουσιάζει μια πιο διάχυτη κατανομή στο κύτταρο και ο ρόλος της στη μετανάστευση δεν είναι σαφής [48].

Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις των RhoA, RhoB και RhoC με πρωτεΐνες τελεστές, στο βαθμό που έχουν αποσαφηνιστεί μέχρι σήμερα, αντανακλούν τις διαφορετικές τους λειτουργίες μέσα στο κύτταρο. Έτσι, οι RhoA και RhoC έχουν κατά κανόνα συσχετισθεί με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων μέσω ενεργοποίησης της ROCK κινάσης και της formin, mDia1, ενώ η RhoB κυρίως λόγω της αλληλεπίδρασης της με την PRK1 φαίνεται να παίζει ρόλο στην ενδοκυττάρωση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 1.7) [48].

1.5.3 Ο ρόλος των RhoA, RhoB και RhoC στον καρκίνο

Ίσως η πιο ξεκάθαρη απόδειξη, ότι υπάρχουν διαφορές στη λειτουργία των Rho ισομορφών παρουσιάζεται στον καρκίνο. Οι RhoA και RhoB προκαλούν μετασχηματισμό ινοβλαστών σε καλλιέργεια, ενώ η RhoA μπορεί να προάγει περαιτέρω το σχηματισμό όγκων σε ποντίκια από τα κύτταρα αυτά. Η RhoA έχει βρεθεί υπερεκφρασμένη σε διάφορες καρκινικές σειρές, πολλές από τις οποίες εμφανίζουν υψηλό βαθμό μεταστατικότητας ή απορύθμιση του ελέγχου του πολλαπλασιασμού [54]. Αντιθέτως, η RhoC δεν προκαλεί το μετασχηματισμό ινοβλαστών. Παρόλα αυτά ανάλυση μικροσυστοιχιών έδειξε ότι η έκφραση της RhoC σταδιακά αυξάνεται καθώς οι όγκοι γίνονται πιο μεταστατικοί και ότι η RhoC μέσω ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση προάγει τη διαδικασία αυτή [55]. Προς αυτή την κατεύθυνση πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι το microRNA miR-10b εκφράζεται σε μεταστατικό καρκίνο του μαστού και δείχθηκε, ότι προκαλεί έμμεσα την αύξηση της έκφρασης της RhoC μέσω αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα HOXD10 [56]. Επίσης, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι κατά την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή

(EMT) που επάγεται από τον TGF- β και τον TNF- α σε καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου αυξάνεται τόσο η έκφραση όσο και η ενεργοποίηση της RhoC με παράλληλη μείωση της ενεργοποίησης της RhoA [57]. Η υπερέκφραση της RhoC φαίνεται να επαρκεί για τη συνεισφορά της στη μετάσταση καθότι η RhoC δεν έχει βρεθεί μεταλλαγμένη σε καρκίνους [48]. Η υπερέκφραση της RhoB αντιθέτως αναστέλλει τη μετανάστευση, τη διεισδυτικότητα και τη μετάσταση σε κύτταρα μελανώματος [58] και σε αρκετούς καρκίνους τα επίπεδα έκφρασής της μειώνονται κατά την εξέλιξη του καρκίνου [54]. Μελέτες έδειξαν ότι η RhoB είναι σημαντική για την απόπτωση που επάγεται από στρες, υποδεικνύοντας ένα ρόλο αρνητικού ρυθμιστή της κυτταρικής επιβίωσης για τη RhoB [59].

Είναι ξεκάθαρο πλέον ότι οι RhoA, RhoB και RhoC δεν είναι λειτουργικά πανομοιότυπες, αλλά παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη ρύθμιση των κυτταρικών διεργασιών. Οι λειτουργικές διαφορές μπορεί να δημιουργούνται από ένα συνδυασμό διαφορετικών μηχανισμών που σχετίζονται με τη ρύθμιση της μεταγραφής τους, τον ενδοκυττάριο εντοπισμό τους και την επιλεκτική και αυστηρά ρυθμιζόμενη αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες ενεργοποιητές και τελεστές [40,48].

1.6 Βιολογικές δράσεις των Rho GTPασών

Οι Rho GTPάσες έχουν εμπλακεί σε ένα σύνολο κυτταρικών διεργασιών πέρα από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων, όπως η μεταγραφική ρύθμιση, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η μετανάστευση, η ρύθμιση των διακυτταρικών συνδέσεων και της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων και η προσκόλληση στην εξωκυττάρια ουσία μέσω των ιντεγκρινών [36].

1.6.1 Μετανάστευση

Ο πολυμερισμός της ακτίνης και η επιμήκυνση των ινιδίων της ακτίνης στο μπροστινό μέρος, σε συνδυασμό με τη σύσπαση των ινιδίων ακτο-μυοσίνης στο πίσω μέρος του κυττάρου, συνιστούν τις κυριότερες καθοδηγητήριες δυνάμεις για τη μετανάστευση των κυττάρων. Η αποτελεσματική κυτταρική μετανάστευση απαιτεί επιπρόσθετες αλλαγές στο κύτταρο μεταξύ των οποίων την πόλωση του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων και το εκκριτικό μονοπάτι [60]. Η Rac GTPάση, μέσω του μονοπατιού WAVE/Arp2/3 είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό της ακτίνης στο οδηγό άκρο (leading edge) των μεταναστεύοντων κυττάρων με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεμβρανικών προεκβολών. Η ενεργός Rac-GTP συσσωρεύεται στο μπροστινό μέρος των μεταναστεύοντων κυττάρων και διατηρείται ενεργή μέσω ενός θετικού μηχανισμού ανατροφοδότησης που περιλαμβάνει την PI3K, το σχηματισμό των PIP₃ φωσφοϊνοσιπιδίων και τον περιορισμό της φωσφατάσης των PIP₃, PTEN, στο πίσω μέρος του κυττάρου [61-63]. Το σενάριο αυτό αποτελεί πλέον μία υπεραπλούστευση, καθώς πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η Rac-GTP εντοπίζεται τόσο στο μπροστινό όσο και στο πίσω τμήμα

του μεταναστεύοντος κυττάρου, πιθανώς εκτελώντας διαφορετικές λειτουργίες στις δύο αυτές περιοχές [36].

Η Rho δρα στο πίσω μέρος του μεταναστεύοντος κυττάρου για να δημιουργήσει συσταλτικότητα (contractile force) μέσω φωσφορυλίωσης της MLC που μεσολαβείται από τη ROCK κινάση. Επιπλέον, η ROCK κινάση αναστέλλει πλευρικές αναδιπλώσεις της μεμβράνης, πιθανώς μέσω περιορισμού της δημιουργίας νέων συμπλόκων προσκόλλησης από ιντεγκρίνες [36,63,64]. Παράλληλα η E3 λιγάση Smurf1, η οποία ουμπικουτινιώνει τη RhoA, εντοπίζεται στο μπροστινό μέρος μεταναστεύοντων κυττάρων, εξασφαλίζοντας χαμηλά επίπεδα για τη RhoA στις περιοχές που δημιουργούνται νέες προεκβολές [65]. Ένας καίριος ρόλος έχει προταθεί για τη FAK κινάση στη ρύθμιση της καθοδηγούμενης μετανάστευσης, όπου αφενός φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την p190RhoGAP στις αναπτυσσόμενες εστιακές προσκολλήσεις (Focal Adhesions, FA) στο οδηγό άκρο με αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργότητας της RhoA, αφετέρου προάγει την ωρίμανση και τελικά την ανακύκλωση των FA στο πίσω μέρος στρατολογώντας την p190RhoGEF, εξασφαλίζοντας έτσι την ενεργοποίηση της RhoA στο πίσω μέρος του κυττάρου [66].

Πρόσφατες μελέτες μετανάστευσης κυττάρων σε τρισδιάστατη καλλιέργεια έδειξαν ότι τα καρκινικά κύτταρα μεταναστεύουν με μηχανισμούς που εξαρτώνται ή είναι ανεξάρτητοι από τη δραστηριότητα των Rho και ROCK. Αντιθέτως, η Rac1 χρειάζεται και στους δύο τύπους μετανάστευσης [67].

1.6.2 Διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις και επιθηλιακή πολικότητα

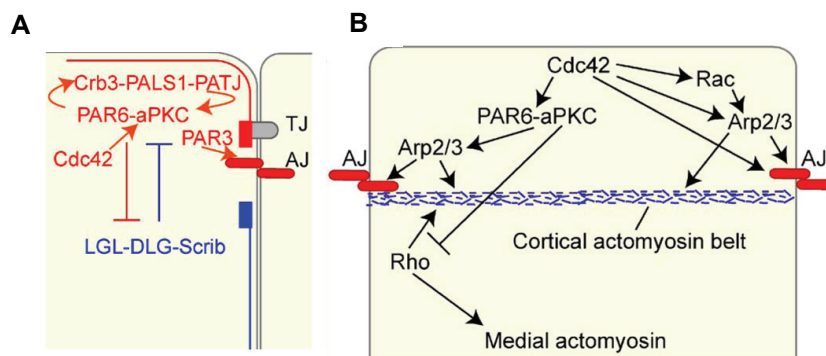
Η συγκρότηση διαφορετικών συμπλόκων διακυτταρικής προσκόλλησης και η ακόλουθη καθιέρωση της πολικότητας στα επιθηλιακά κύτταρα είναι βασικές διεργασίες κατά τη μορφογένεση, στις οποίες οι Rho GTPάσες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η E-cadherin, συμμετέχει σε ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις δημιουργώντας σταθερές συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions, AJs) μέσω στρατολόγησης ενδοκυττάρων πρωτεϊνών (όπως η α - και β -catenin) και του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Οι AJs συμβάλουν στον καθορισμό ενός κορυφαίου-βασικού (apical-basal) άξονα στα επιθηλιακά κύτταρα και λόγω αυτού δρουν ως σημείο αναφοράς για το συντονισμό της επιθηλιακής πολικότητας. Ένα χαρακτηριστικό κλειδί των AJs είναι ότι είναι δυναμικές, καθώς η συνεχής σύνδεση και αποσύνδεση είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της επιθηλιακής ακεραιότητας [68], ενώ πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η E-cadherin ανακυκλώνεται μέσω εσωτερίκευσης και επιστροφής στην πλασματική μεμβράνη με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από την ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης [68,69].

Οι Rho GTPάσες, RhoA, Rac και Cdc42 παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη δημιουργία όσο και στη διατήρηση των AJs [70]. Η καθιέρωση της αρχικής ζώνης των AJs έχει δειχθεί ότι χρειάζεται την τοπική ενεργοποίηση της Rac [71]. Η Rac προάγει τη δημιουργία νέων επαφών μεταξύ γειτονικών κυττάρων που μεσολαβούνται από την E-cadherin μέσω της δημιουργίας

1. Εισαγωγή

προεκβολών που στηρίζονται στην ακτίνη, οι οποίες μεταφέρουν την E-cadherin. Η ενεργός Rac-GTP διεγείρει επίσης την ενεργοποίηση της PI3K, τον πολυμερισμό της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης των Cdc42 και Arp2/3, τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών contractin, formin-1, PAK4, οι οποίες συμβάλουν στη διεύρυνση της ζώνης της διακυτταρικής επαφής [72].

Η συνεργασία μεταξύ των Rho GTPασών και των συστατικών των AJs διατηρείται και κατά την ωρίμανση των AJs, καθώς δημιουργούνται οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions) και καθιερώνεται η κορυφαία-βασική (apical-basal) πολικότητα με τη βοήθεια των Rac και Cdc42 [40,68]. Η αλληλεπίδραση αυτών των GTPασών με την Par6, οδηγεί στην ενεργοποίηση της aPKC (atypical Protein Kinase C), η οποία χρειάζεται για την ωρίμανση των AJs από απλές διακυτταρικές συνδέσεις σε οργανωμένα πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα [73]. Η Cdc42 έχει αναφερθεί επίσης ότι συνεργάζεται με τις κορυφαίες (apical) Par πρωτεΐνες (Par3/Par6/aPKC) για τη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης της E-cadherin κατά τη δυναμική ανακύκλωση των AJs (**Εικόνα 1.8A**) [74]. Επιπλέον η Tiam-1, μία ειδική GEF για τη Rac, έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητη για τη δημιουργία λειτουργικών στενοσυνδέσμων σε κερατινοκύτταρα και επιθηλιακά νεφρικά κύτταρα [75,76]. Διάφορες Rho GEF πρωτεΐνες έχουν εμπλακεί στις AJs, όπως η ειδική GEF για τη Cdc42, Tuba [77] και η ειδική GEF για τη Rac, Asef [78].



Εικόνα 1.8: Ο ρόλος των συνδέσεων προσκόλλησης (AJs), των Rho GTPασών και του κυτταροσκελετού στον καθορισμό της πολικότητας του επιθηλιακού κυττάρου. **A.** Οι AJs είναι απαραίτητες για τη δημιουργία ξεχωριστών κορυφαίων-βασικών περιοχών στο κύτταρο με συντηρημένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα που είναι απαραίτητα για τη δημιουργία και διατήρηση αυτών των δομών. Με κόκκινο φαίνεται το κορυφαίο (apical) σύμπλοκο Crumbs (Crb3/PALS1/PATJ) και οι Par πρωτεΐνες Par3/Par6/aPKC που συνεργάζονται με τη Cdc42, ενώ με μπλε φαίνονται οι βασικο-πλευρικές (basolateral) πρωτεΐνες LGL/DLG/Scrb. Η αμοιβαία αναστολή μεταξύ αυτών των συμπλόκων εξασφαλίζει την κορυφαία-βασική πολικότητα. **B.** Ο κυτταροσκελετός είναι επίσης πολωμένος στα επιθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζεται από τις Rho GTPάσες και τις πρωτεΐνες των συμπλόκων πολικότητας. Η Cdc42 και η Rac παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των κορυφαίων δομών του κυτταροσκελετού, ενώ η RhoA παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα στη βασικο-πλευρική περιοχή ρυθμίζοντας της δομές ακτο-μυοσίνης [68].

Η RhoA συμβάλει στη διατήρηση των AJs μέσω ενεργοποίησης της mDia1 [53] και της μυοσίνης II [79]. Μία πρόσφατη μελέτη αποκάλυψε ότι οι δύο ισομορφές της μυοσίνης II ρυθμίζουν διαφορετικά την ακεραιότητα των AJs, με τη μυοσίνη IIA να προάγει τη διακυτταρική προσκόλληση μέσω των AJs και τη μυοσίνη IIB να στηρίζει την κορυφαία (apical)

περιφερειακή (cortical) ακτίνη [80]. Η δραστηριότητα της RhoA και η συσταλτικότητα μέσω της ακτο-μυοσίνης έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στην ομοίωση των διακυτταρικών συνδέσεων σε διάφορα κυτταρικά συστήματα καθώς και σε αναπτυξιακά μοντέλα [68].

Επιπλέον η σηματοδότηση μέσω της Rho έχει εμπλακεί και στην αποδιάταξη των διακυτταρικών συνδέσεων κατά την EMT, όπου έχει αναφερθεί ότι η RhoA είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF- β και τον HGF (Hepatocyte Growth Factor) καταστροφή των AJs [81,82].

Τέλος, οι πρωτεΐνες Cdc42, Par6 και α PKC έχουν επιπροσθέτως εμπλακεί στη ρύθμιση της δραστηριότητας της RhoA στις AJs (**Εικόνα 1.8B**). Μελέτες στη *Drosophila* έδειξαν ότι η ρύθμιση της δραστηριότητας της Rho από το μονοπάτι Cdc42-Par6- α PKC είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ακεραιότητας των AJs και τη ρύθμιση της κορυφαίας τάσης στο επιθηλιακό κύτταρο [83,84].

1.7 Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β

Η υπεροικογένεια του μετασχηματίζοντος αυξητικού παράγοντα-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) αποτελείται από ένα μεγάλο σύνολο πολυλειτουργικών κυτταροκινών και περιλαμβάνει τις ισομορφές του TGF-β (TGF-β1, TGF-β2 και TGF-β3), τις BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), τους παράγοντες ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Growth and Differentiation Factors, GDFs), τις ακτιβίνες (activins), τις inhibins και την MIS (Muellerian Inhibiting Substance) Ο TGF-β και άλλα μέλη της οικογένειας του ρυθμίζουν πολλές θεμελιώδεις πτυχές της κυτταρικής συμπεριφοράς, μεταξύ των οποίων τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση, την απόπτωση, την προσκόλληση, την αγγειογένεση, την τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος και την επιθηλιομεσεγχευματική μετατροπή. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGF-β παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, όσο και κατά την ενήλικη ζωή, όπου ρυθμίζουν την ομοιόσταση των ιστών, ενώ η απορύθμιση τους εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η ίνωση και ο καρκίνος [85-88].

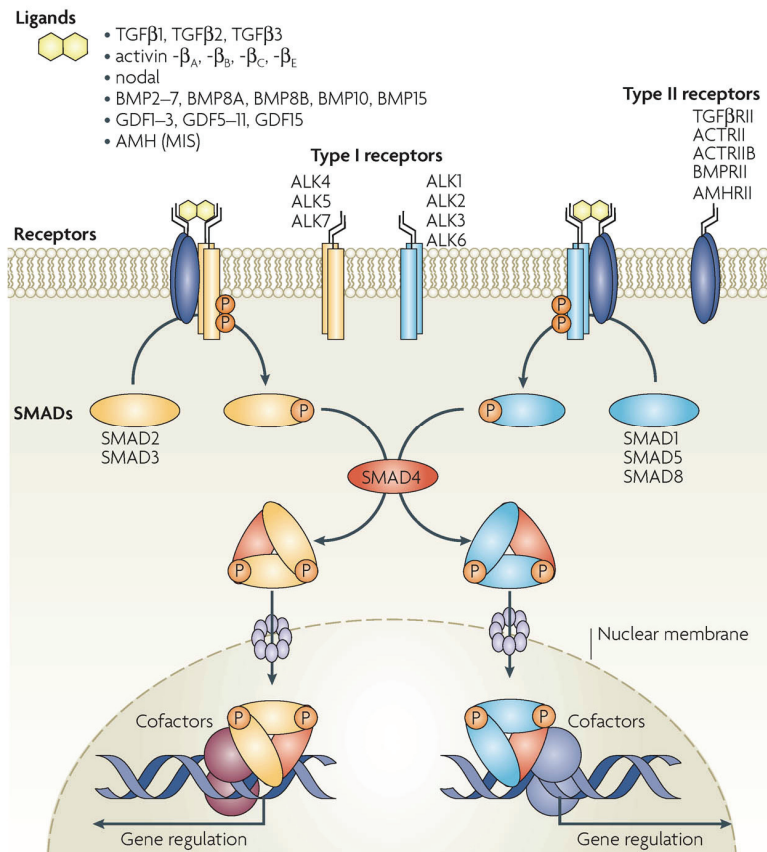
1.7.1 Σηματοδότηση από τους υποδοχείς του TGF-β

Η υπεροικογένεια του TGF-β κωδικοποιείται από τουλάχιστον 30 γονίδια, περιλαμβάνοντας 3 ισομορφές του TGF-β, 4 β-αλυσίδες της ακτιβίνης, την πρωτεΐνη Nodal, 10 BMP πρωτεΐνες και 11 GDF πρωτεΐνες και διαχωρίζεται σε 2 υποοικογένειες, την TGF-β/Activin/Nodal υποοικογένεια και την BMP/GDF/MIS υποοικογένεια, με βάση την ομοιότητα των αλληλουχιών και την ειδικότητα των σηματοδοτικών μονοπατιών που ενεργοποιούν. Η ενεργός μορφή μίας κυτταροκίνης της οικογένειας του TGF-β είναι ένα διμερές το οποίο σταθεροποιείται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες περαιτέρω ισχυροποιούνται από δισουλφιδικούς δεσμούς [87,89].

Η οικογένεια των υποδοχέων κινάσης σερίνης/θρεονίνης στο ανθρώπινο γονιδίωμα αποτελείται από 12 μέλη – 7 τύπου I και 5 τύπου II υποδοχείς – όλοι αφιερωμένοι στο μονοπάτι του TGF-β. Και οι δύο τύποι υποδοχέων κινάσης σερίνης/θρεονίνης διαθέτουν μία αρκετά μεταβλητή εξωκυττάρια περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, μία διαμεμβρανική περιοχή α-έλικας και μία αρκετά συντηρημένη ενδοκυττάρια περιοχή, η οποία πρωτίστως αποτελείται από την κινάση σερίνης/θρεονίνης και δευτερευόντως από επιπρόσθετες αλληλουχίες οι οποίες εξυπηρετούν είτε ως θέσεις φωσφορυλίωσης είτε ως περιοχές αλληλεπίδρασης (docking sites) με adaptor ή σηματοδοτικές πρωτεΐνες.

Η πρόσδεση του συνδέτη γεφυρώνει τα προσχηματισμένα διμερή υποδοχέων τύπου II με τα διμερή υποδοχέων τύπου I και σχηματίζει ετεροτετραμερή σύμπλοκα ενεργών υποδοχέων. Στη συνέχεια η κινάση του υποδοχέα τύπου II, η οποία θεωρείται συνεχώς ενεργή, φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I σε διαφορά κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε μία συντηρημένη και πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες περιοχή (GS-region).

Η φωσφορυλίωση της GS-περιοχής προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωσή της και την επακόλουθη απομάκρυνση αρνητικών ρυθμιστών όπως η chaperone FKBP12, επιτρέποντας την αλλαγή της διαμόρφωσης της περιοχής της κινάσης και την καταλυτική της ενεργοποίηση. Ο ενεργοποιημένος τύπου I υποδοχέας καταλύει τη φωσφορυλίωση των σηματοδοτικών τελεστών της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών καθώς και άλλα σηματοδοτικά γεγονότα, τα οποία θα συζητηθούν στη συνέχεια [89].



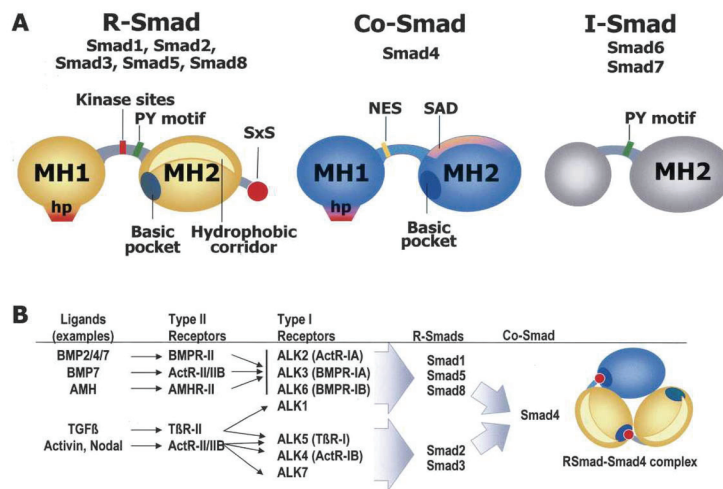
Εικόνα 1.9: Το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι. Παρουσιάζεται ο βασικός μηχανισμός ενεργοποίησης των Smad πρωτεϊνών από τον τύπου I υποδοχέα μέχρι τη μετατόπισή τους στον πυρήνα και τη ρύθμιση της μεταγραφής. Το μονοπάτι διαχωρίζεται σε δύο κλάδους: οι ALK4,5,7 τύπου I υποδοχείς φωσφορυλιώνουν τις Smad2,3 και οι ALK1,2,3,6 ενεργοποιούν τις Smad1,5,8 [87].

1.7.2 Λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά των Smad πρωτεϊνών

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί 8 μέλη της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών, οι οποίες εκφράζονται συνεχώς καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και σε όλους τους ενήλικους ιστούς. Λειτουργικά οι Smad πρωτεΐνες διακρίνονται σε 3 υποκατηγορίες:

- **R-Smads** (Receptor-activated Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 και Smad8), οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους τύπου I υποδοχείς.
- **Co-Smads** (Common mediator Smads: Smad4), οι οποίες σχηματίζουν ολιγομερή με τις ενεργές R-Smads.

- **I-Smads** (Inhibitory Smads: Smad6 και Smad7), οι οποίες δρουν ανασταλτικά μέσω ανταγωνισμού με τις R-Smads ως προς την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα τύπου I και μέσω στόχευσης των υποδοχέων για αποικοδόμηση.



Εικόνα 1.10: Οι Smad πρωτεΐνες και τα δομικά τους χαρακτηριστικά. A. Οι Smads αποτελούνται από τις συντηρημένες MH1 και MH2 περιοχές και από τη μεταβλητή περιοχή του linker. Η hp (hairpin) β-δομή φουρκέτας είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA. Το PY μοτίβο εξασφαλίζει την αναγνώριση από τις Smurf1 λιγάνες ουμπικιτίνης. Η βασική περιοχή (basic pocket) είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τους ενεργοποιημένους τύπου I υποδοχείς, αλλά και για τον ολιγομερισμό των R-Smads με την Co-Smad, ενώ η υδρόφοβη περιοχή (hydrophobic corridor) λειτουργεί ως περιοχή πολλαπλών αλληλεπιδράσεων. **B.** Οι σχέσεις κάποιων εκπροσώπων της υπεροικογένειας του TGF-β με τους 5 τύπου II, τους 7 τύπου I υποδοχείς, τις 5 R-Smads και τη μοναδική Co-Smad [90].

Οι Smads αποτελούνται από δύο συντηρημένες περιοχές, την αμινο-τελική περιοχή **MH1** (Mad Homology 1) και την καρβοξυ-τελική περιοχή **MH2** (Mad Homology 2). Οι δύο αυτές περιοχές διαχωρίζονται από μία λιγότερο συντηρημένη και πλούσια σε προλίνες περιοχή σύνδεσης (linker region) (Εικόνα 1.10A). Η MH1 περιοχή εμφανίζει υψηλό βαθμό συντήρησης μεταξύ των R-Smads και της Co-Smad – σε αντίθεση με την αμινοτελική περιοχή των I-Smads που εμφανίζει πολύ μικρή ομοιότητα με αυτή την περιοχή – και ρυθμίζει την είσοδο στον πυρήνα και τη μεταγραφή μέσω πρόσδεσης στο DNA και αλληλεπίδρασης με πυρηνικές πρωτεΐνες. Η MH2 περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη μεταξύ όλων των Smad πρωτεϊνών και ρυθμίζει τον ολιγομερισμό των Smads, την αναγνώριση από τους υποδοχείς τύπου I και αλληλεπιδρά με adaptor πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα, όπως η πρωτεΐνη SARA, καθώς και με μεταγραφικούς παράγοντες, συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς [91].

1.7.3 Ρύθμιση των Smad πρωτεϊνών μέσω φωσφορυλίωσης

Η φωσφορυλίωση των R-Smads από τις κινάσες των υποδοχέων τύπου I είναι ένα καίριο βήμα στο σηματοδοτικό μονοπάτι της οικογένειας του TGF-β. Τα δύο πιο ακραία ως προς το καρβοξυ-τελικό άκρο κατάλοιπα σερίνης φωσφορυλιώνονται και μαζί με ένα μη

φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο σερίνης σχηματίζουν ένα εξελικτικά συντηρημένο SSXS μοτίβο σε όλες τις R-Smads. Η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης των ενεργοποιημένων υποδοχέων τύπου I με τις R-Smads καθορίζεται από την L45 θηλειά (L45 loop) των υποδοχέων τύπου I και κατά κανόνα την L3 θηλειά (L3 loop) στην MH2 περιοχή των R-Smads. Έτσι οι υποδοχείς της υποοικογένειας των TGF- β /Activin φωσφορυλιώνουν τις Smad2 και Smad3, ενώ οι υποδοχείς της υποοικογένειας των BMPs φωσφορυλιώνουν τις Smad1, Smad5 και Smad8 (**Εικόνα 1.10B**). Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης των R-Smads είναι ο σχηματισμός συμπλόκων με την Co-Smad, Smad4 και την είσοδο τους στον πυρήνα, όπου συμμετέχουν στη μεταγραφική ρύθμιση διαφόρων γονιδίων στόχων [89]. Εκτός από την κινάση των υποδοχέων τύπου I, οι R-Smads φωσφορυλιώνονται κυρίως στην περιοχή του linker και από άλλες κινάσες, όπως η Erk MAPK [92], η CamKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II) [93], η PKC (Protein Kinase C) [94] και οι CDKs (Cyclin Dependent Kinases) [95] με αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης τους.

1.7.4 Ολιγομερισμός των Smads και είσοδος τους στον πυρήνα

Οι μη φωσφορυλιωμένες R-Smad πρωτεΐνες υπάρχουν κατά κανόνα ως μονομερή και μόνο μετά τη φωσφορυλίωση τους σχηματίζουν ομο-ολιγομερή, τα οποία γρήγορα μετατρέπονται σε ετερο-ολιγομερή που περιέχουν τη Smad4. Μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο ετερο-διμερή όσο και ετερο-τριμερή είναι πιθανό να σχηματιστούν μεταξύ των R-Smads και της Smad4. Στην ανενεργή τους μορφή οι κυτταροπλασματικές R-Smads έχουν μία αυτοκατασταλτική διαμόρφωση λόγω μίας ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των MH1 και MH2 περιοχών, η οποία όμως αίρεται μόλις φωσφορυλιωθούν από την κινάση των υποδοχέων τύπου I, με αποτέλεσμα την έκθεση επιτόπων απαραίτητων για τον ολιγομερισμό τους, την είσοδο τους στον πυρήνα, την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες για τη μεταγραφική ρύθμιση και την αποικοδόμηση τους.

Αφού μεταβούν τα σύμπλοκα αυτά στον πυρήνα, συμμετέχουν θετικά ή αρνητικά στη ρύθμιση της μεταγραφής ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων στόχων (~300) είτε μέσω άμεσης πρόσδεσης στους υποκινητές των Smad γονιδίων-στόχων, είτε μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι προσδένονται στο DNA. Έτσι οι Smad πρωτεΐνες δρουν είτε ως άμεσοι μεταγραφικοί παράγοντες, είτε ρυθμίζουν τη μεταγραφή συνεργαζόμενες με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες δρώντας ως συν-ενεργοποιητές ή ως συν-καταστολείς [89,91].

1.7.5 Πυρηνική σηματοδότηση

Όλες οι Smads έχουν μεταγραφική δραστηριότητα, με τα ετερομερή R-Smad-Co-Smad σύμπλοκα να συνιστούν τις κύριες μεταγραφικές οντότητες in vivo. Οι Smad3 και Smad4 προσδένονται απευθείας αλλά με χαμηλή συγγένεια στα SBEs (Smad-binding elements) τα οποία περιέχουν τη στοιχειώδη αλληλουχία 5'CAGAC3', μέσω μίας συντηρημένης β -

φουρκέτας (β -hairpin) στην MH1 περιοχή τους (**Εικόνα 1.10A**). Αντίθετα η Smad2 δεν μπορεί να προσδεθεί στα SBEs λόγω μιας μοναδικής αλληλουχίας που κωδικοποιείται από το εξώνιο 3 και αναστέλλει την πρόσδεση στο DNA. Λόγω της χαμηλής συγγένειας πρόσδεσης των Smads στα SBEs, η άμεση μεταγραφή των Smad γονιδίων-στόχων επιτυγχάνεται μέσω της παρουσίας πολλαπλών SBE μοτίβων στους υποκινητές των γονιδίων αυτών, τα οποία αυξάνουν τη συγγένεια πρόσδεσης των Smad συμπλόκων στο DNA.

Οι περισσότεροι όμως ενισχυτές ή υποκινητές που αποκρίνονται στις Smad πρωτεΐνες διαθέτουν μόνο ένα SBE. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη χαμηλή συγγένεια πρόσδεσης των Smads στις αλληλουχίες αυτές, καθιστά αναγκαία τη συνεργασία των Smad με άλλους παράγοντες που προσδένονται ισχυρότερα στο DNA για να επιφέρουν συγκεκριμένες μεταγραφικές αποκρίσεις. Κάποιοι από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να εκφράζονται ευρέως και να μεσολαβούν την ίδια απόκριση σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, ενώ άλλοι παράγοντες ή οι ενεργοποιητές τους μπορεί να εκφράζονται σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, οδηγώντας έτσι σε κυτταροειδικές γονιδιακές αποκρίσεις. Πολλά μέλη από διαφορετικές οικογένειες πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA – forkhead (π.χ. Fast1), homeobox (π.χ. Mixer), E-box, Jun/Fos, CREBP και E2F έχει δειχθεί ότι λειτουργούν ως συνεργάτες των Smads [89-91,96].

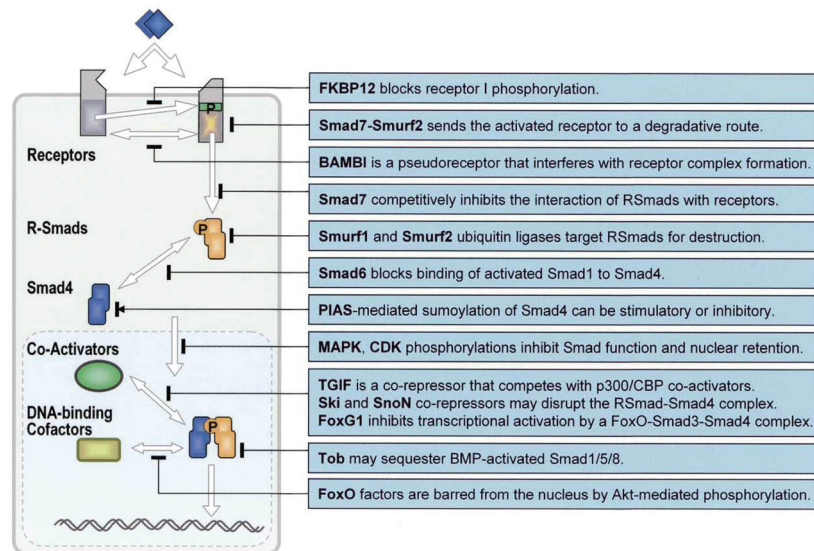
Οι R-Smads και η Smad4 μπορεί επίσης να συνδέονται άμεσα με τη βασική μεταγραφική μηχανή μέσω της MH2 περιοχής τους, η οποία αλληλεπιδρά με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές CBP, p300, ARC105 και Smif [89,91,96,97] αλλά και τους συνκαταστολείς Ski, SnoN και TGIF [89,98,99]. Η Smad4 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης (transactivation) των Smad συμπλόκων στον πυρήνα μέσω της SAD (Smad-activation domain) (**Εικόνα 1.10**) την οποία διαθέτει αποκλειστικά και η οποία επιτρέπει ισχυρότερη σύνδεση με τους συνενεργοποιητές [100].

1.7.6 Αρνητική ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smads

Η αποφωσφορυλίωση από άγνωστες φωσφατάσες αλλά και η ουμπικουτινίωση και αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα των ενεργοποιημένων R-Smads συνιστούν δύο από τους μηχανισμούς τερματισμού του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smads. Η ενεργοποιημένη Smad2 ουμπικουτινιώνεται από την E3 λιγάση Smurf2 στον πυρήνα και στοχεύεται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα (**Εικόνα 1.11**) [101], ενώ η ουμπικουτινίωση της ενεργοποιημένης Smad3 μεσολαβείται από μία διαφορετική E3 λιγάση, το σύμπλοκο SCF/Roc1 [102].

Οι λιγάσες Smurf1 και 2 παίζουν επίσης ρόλο στην ουμπικουτινίωση και αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα των υποδοχέων του TGF- β μέσω της I-Smad, Smad7. Η πυρηνική Smad7 αλληλεπιδρά με τις Smurf1 και Smurf2 μετά από διέγερση με TGF- β ή BMP. Το σύμπλοκο Smurf-Smad7 μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα καταλήγοντας στην πλασματική μεμβράνη ή τα ενδοσώματα, όπου αφενός η Smad7 προσδένεται απευθείας

στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I εμποδίζοντας την περαιτέρω φωσφορυλίωση των R-Smads, αφετέρου η Smurf1 ουμπικουτινώνει και στοχεύει για αποικοδόμηση τους υποδοχείς (Εικόνα 1.11) [103,104]. Στα πλαίσια αυτής της διαδικασίας η Smad7 επίσης στοχεύεται για ουμπικουτινίωση και αποικοδόμηση, γεγονός που αντισταθμίζεται όμως από την παράλληλη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της από τον TGF- β (και τις BMPs) [89].



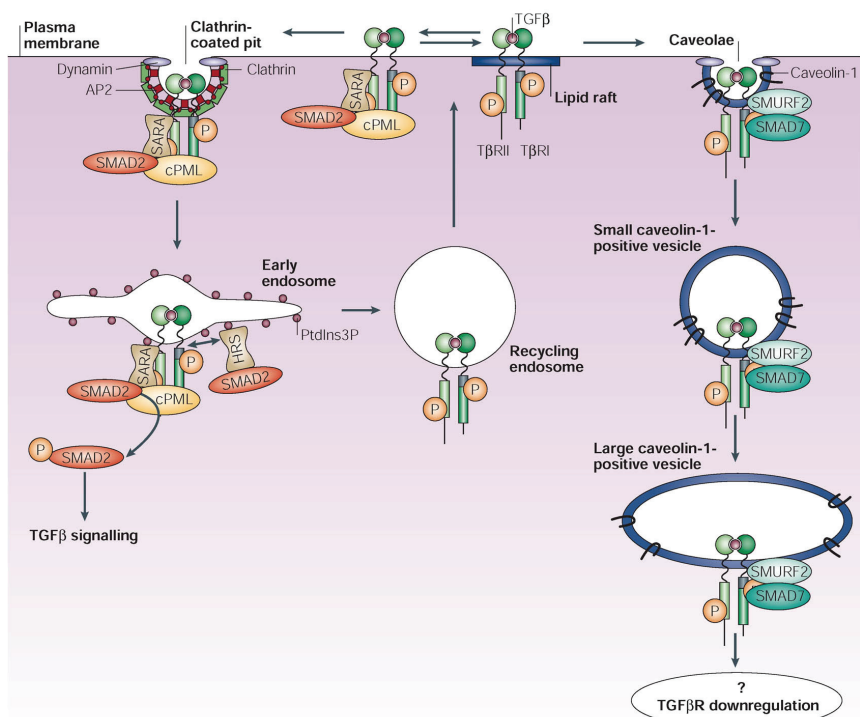
Εικόνα 1.11: Μηχανισμοί απενεργοποίησης του TGF- β μονοπατιού σε διάφορα επίπεδα από τη μεμβράνη στον πυρήνα [90].

1.7.7 Ρύθμιση της σηματοδότησης από τους υποδοχείς του TGF- β μέσω διαφορετικών μηχανισμών ενδοκυττάρωσης

Βοηθητικές πρωτεΐνες, οι οποίες στρατολογούν τις Smads στον ενεργοποιημένο τύπου I υποδοχέα, έχουν αναγνωριστεί και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την πρωτεΐνη SARA (Smad anchor for receptor activation) [105] και την Hrs [106] για το σηματοδοτικό μονοπάτι της υποοικογένειας του TGF- β και την Endofin για το μονοπάτι των BMPs [107,108]. Η SARA αλληλεπιδρά ειδικά με τη μη ενεργοποιημένη Smad2 και την οδηγεί κοντά στον T β RI. Η φωσφορυλίωση της Smad2 από τον υποδοχέα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας της για τη Smad4 και την ταυτόχρονη μείωση της συγγένειας της για τη SARA, προάγοντας της αποδέσμευσή της από τη SARA και τη μετατόπιση της στον πυρήνα λόγω της αποκάλυψης ενός NLS (nuclear localization signal) [105,109]. Όλες αυτές οι πρωτεΐνες περιέχουν την FYVE αλληλουχία, η οποία προσδένει την 3' φωσφορική φωσφατιδύλο ινοσιτόλη (PIP₃) και εντοπίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα [110].

Η παρουσία αυτών των πρωτεϊνών στα πρώιμα ενδοσώματα θέτει το ερώτημα εάν η σηματοδότηση των υποδοχέων μπορεί να λάβει χώρα από την πλασματική μεμβράνη ή απαιτείται η εσωτερίκευση (internalisation) των υποδοχέων στα ενδοσώματα, το οποίο παραμένει ανοιχτό. Οι T β RI και T β RII υποδοχείς εσωτερικεύονται μέσω δύο διαφορετικών οδών ενδοκυττάρωσης, το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που μεσολαβείται από την κλαθρίνη

(clathrin-coated vesicle-mediated route, CCVMR) και το μονοπάτι που μεσολαβείται από την καβεολίνη (caveolin/lipid rafts), τα οποία εξυπηρετούν διαφορετικές λειτουργίες στη σηματοδότηση από τον TGF-β (Εικόνα 1.12). Η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων μέσω κυστιδίων κλαθρίνης προωθεί τη σηματοδότηση από τον TGF-β, καθώς τα ενδοσώματα (EEA1-positive) είναι εμπλουτισμένα με σύμπλοκα των R-Smad με την πρωτεΐνη SARA. Από την άλλη μεριά η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων που πραγματοποιείται μέσω των lipid rafts (caveolin-1 positive) οδηγεί στην αποικοδόμησή τους και έτσι στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης από τον TGF-β, καθώς είναι πλούσια σε σύμπλοκα των Smad7/Smurf2 [111,112].



Εικόνα 1.12: Τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων του TGF-β. Οι TβRI και TβRII υποδοχείς εσωτερικεύονται μέσω δύο διαφορετικών οδών ενδοκυττάρωσης, το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που μεσολαβείται από την κλαθρίνη, το οποίο προάγει τη σηματοδότηση και το μονοπάτι που μεσολαβείται από την καβεολίνη (caveolin/lipid rafts) και οδηγεί στην αρνητική ρύθμιση του TGF-β μονοπατιού [112].

1.8 Smad-ανεξάρτητη σηματοδότηση από τον TGF-β

Είναι πλέον αποδεκτό, ότι ο TGF-β, εκτός από το καλά καθιερωμένο κεντρικό μονοπάτι των Smad ενεργοποιεί ένα σύνολο εναλλακτικών μονοπατιών για να ρυθμίσει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών διεργασιών. Τα εναλλακτικά αυτά μονοπάτια συνεισφέρουν στις φυσιολογικές αποκρίσεις του TGF-β με τρεις γενικούς μηχανισμούς:

1) Τροποποιούν άμεσα τις Smads (π.χ. μέσω φωσφορυλίωσης) ρυθμίζοντας έτσι τη δραστηριότητα των κεντρικών τελεστών.

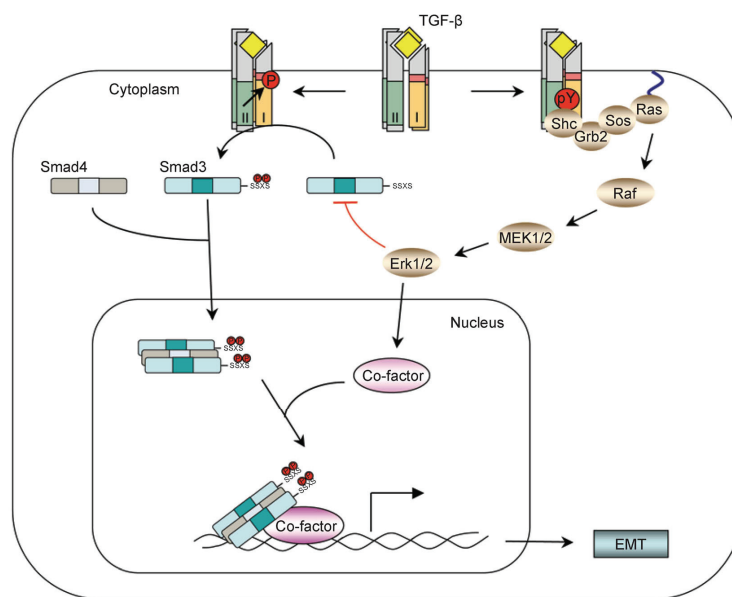
2) Οι Smads τροποποιούν άμεσα τη δράση άλλων σηματοδοτικών πρωτεϊνών (π.χ. κινασών) μεταβιβάζοντας τα σήματα σε άλλα μονοπάτια.

3) Οι υποδοχείς του TGF- β αλληλεπιδρούν άμεσα ή φωσφορυλιώνουν άλλες πρωτεΐνες, εκκινώντας έτσι παράλληλα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία σε συνέργια με το Smad μονοπάτι ρυθμίζουν τις κυτταρικές αποκρίσεις.

Αυτά τα ανεξάρτητα των Smad μονοπάτια περιλαμβάνουν αρκετά μονοπάτια των MAPK κινασών (ERK, p38, JNK), των Rho-GTPασών (Ras, Rho, Cdc42) καθώς και το μονοπάτι της PI3K/AKT [113,114].

1.8.1 Ενεργοποίηση των MAPK μονοπατιών από τον TGF- β

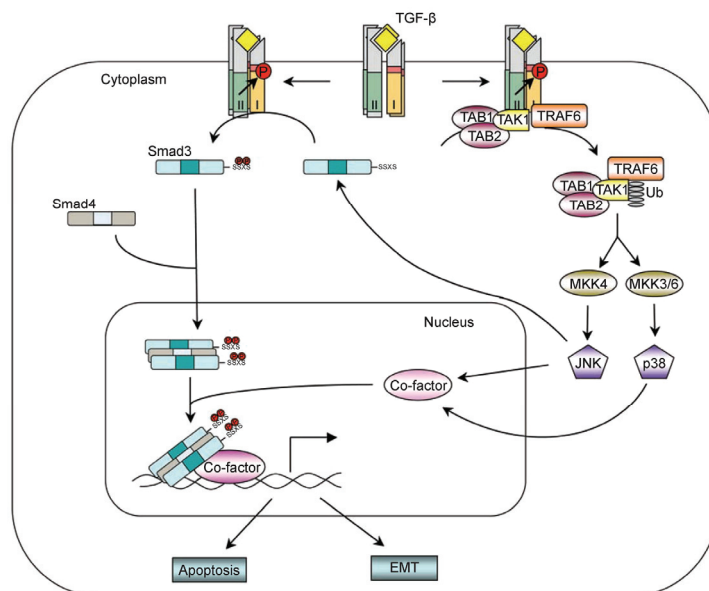
Γρήγορη ενεργοποίηση της Erk από τον TGF- β έχει παρατηρηθεί σε επιθηλιακά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα μαστού και σε ινοβλάστες [115-117]. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης της Erk περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της adaptor πρωτεΐνης ShcA σε κατάλοιπα τυροσίνης και σερίνης από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I του TGF- β με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου ShcA/Grb2/SOS, το οποίο στη συνέχεια μέσω της GEF πρωτεΐνης SOS ενεργοποιεί τη Ras GTPάση στην πλασματική μεμβράνη, οδηγώντας στην ακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού c-Raf/MEK/Erk (**Εικόνα 1.13**) [118].



Εικόνα 1.13: Το Smad ανεξάρτητο μονοπάτι ενεργοποίησης της Erk MAPK από τον TGF- β [114].

Παρότι οι υποδοχείς τύπου I και II του TGF- β είναι καλά χαρακτηρισμένες κινάσες σερίνης/θρεονίνης, ο T β RII υποδοχέας έχει αναφερθεί ότι αυτοφωσφορυλιώνεται σε 3 κατάλοιπα τυροσίνης, σε πολύ χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με τα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης [119], ενώ όπως προαναφέρθηκε η κινάση του T β RI υποδοχέα λειτουργεί σε μικρό βαθμό και ως κινάση τυροσίνης, αφού έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει την adaptor πρωτεΐνη ShcA και σε κατάλοιπα τυροσίνης. Επίσης, ο T β RI υποδοχέας μπορεί ο ίδιος να φωσφορυλιωθεί σε κατάλοιπα τυροσίνης μετά από διέγερση με TGF- β , χωρίς να είναι ξεκάθαρο αν αυτή η φωσφορυλίωση προέρχεται από την αυτοφωσφορυλίωση του T β RI ή αν αποτελεί trans-φωσφορυλίωση από το T β RII [118].

Ενδιαφέρον αποτελεί ότι ο TβRII υποδοχέας φωσφορυλιώνεται από τη Src κινάση, η οποία είναι μία non-receptor κινάση τυροσίνης, στο κατάλοιπο τυροσίνης Y²⁸⁴, το οποίο λειτουργεί ως θέση αγκυροβόλησης (docking site) για adaptor πρωτεΐνες με SH2 (Src homology 2) ή PTB (Phosphotyrosine binding) περιοχές, όπως η Grb2 και η Shc, γεφυρώνοντας έτσι τον TβRII υποδοχέα με την ενεργοποίηση των MAPK μονοπατιών και ειδικά το μονοπάτι της p38 MAPK [120].



Εικόνα 1.14: Το Smad ανεξάρτητο μονοπάτι ενεργοποίησης των JNK και p38 MAPK από τον TGF-β [114].

Τα πιο καλά χαρακτηρισμένα Smad-ανεξάρτητα μονοπάτια είναι πιθανώς τα μονοπάτια των JNK και p38 MAPKs. Έχει βρεθεί ότι ο TGF-β ενεργοποιεί ταχύτατα τη JNK μέσω της MKK4 [121,122] και την p38 MAPK μέσω της MKK3/6 σε διάφορες κυτταρικές σειρές [123,124]. Οι MKK4 και MKK3/6 MAPKKs ενεργοποιούνται από τις MAPKKKs, μία από τις οποίες είναι η TAK1 (TGF-β activated kinase-1), η οποία βρέθηκε ότι ενεργοποιείται από το μονοπάτι του TGF-β [125]. Η TAK1 έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά άμεσα με τον TβRII υποδοχέα [126], ενώ πολύ πρόσφατα δύο μελέτες αποσαφήνισαν το μηχανισμό ενεργοποίησης της από τον TGF-β και έδειξαν ότι πραγματοποιείται μέσω της TRAF6 (Εικόνα 1.14). Η TRAF6 προσδένεται στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF-β, πιθανώς μέσω του TβRI, πολυουμπικουτυλιώνεται στο κατάλοιπο λυσίνης 63 (K63), οπότε και προάγεται η αλληλεπίδραση με την TAK1, η οποία ακολούθως ενεργοποιείται μέσω πολυουμπικουτινίνωσης [127,128].

1.8.2 Ενεργοποίηση του PI3K/Akt μονοπατιού από τον TGF-β

Ο TGF-β έχει βρεθεί ότι ενεργοποιεί ταχύτατα το μονοπάτι της PI3K, όπως υποδεικνύεται από την φωσφορυλίωση του καθοδικού τελεστή της Akt [129,130], με ένα μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος των Smad2/3 [131]. Η ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K, p85, έχει βρεθεί ότι αλληλεπιδρά συνεχώς με τον TβRII υποδοχέα, ενώ η σύνδεση της με τον TβRI υποδοχέα

απαιτεί διέγερση με TGF- β . Η αλληλεπίδραση της p85 υπομονάδας με τους υποδοχείς του TGF- β δεν είναι άμεση, αλλά η καταλυτική δραστηριότητα των κινασών και των δύο υποδοχέων είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της PI3K από τον TGF- β [132]. Από την άλλη μεριά ο TGF- β έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι PI3K/Akt μέσω επαγωγής της έκφρασης της φωσφατάσης SHIP με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τις Smads [133]. Αντιστρόφως το μονοπάτι PI3K/Akt ανταγωνίζεται το μονοπάτι των Smad, προστατεύοντας τα κύτταρα από την απόπτωση και την αναστολή της ανάπτυξης που επάγεται από τον TGF- β [130]. Μία ενδιαφέρουσα εξήγηση αυτής της προστατευτικής δράσης είναι η φυσική αλληλεπίδραση της Akt με τη Smad3, η οποία εμποδίζει τη φωσφορυλίωση της Smad3 από τον T β RI και τη μεταφορά της στον πυρήνα, οδηγώντας έτσι στην αναστολή της Smad3-εξαρτώμενης μεταγραφής [134,135].

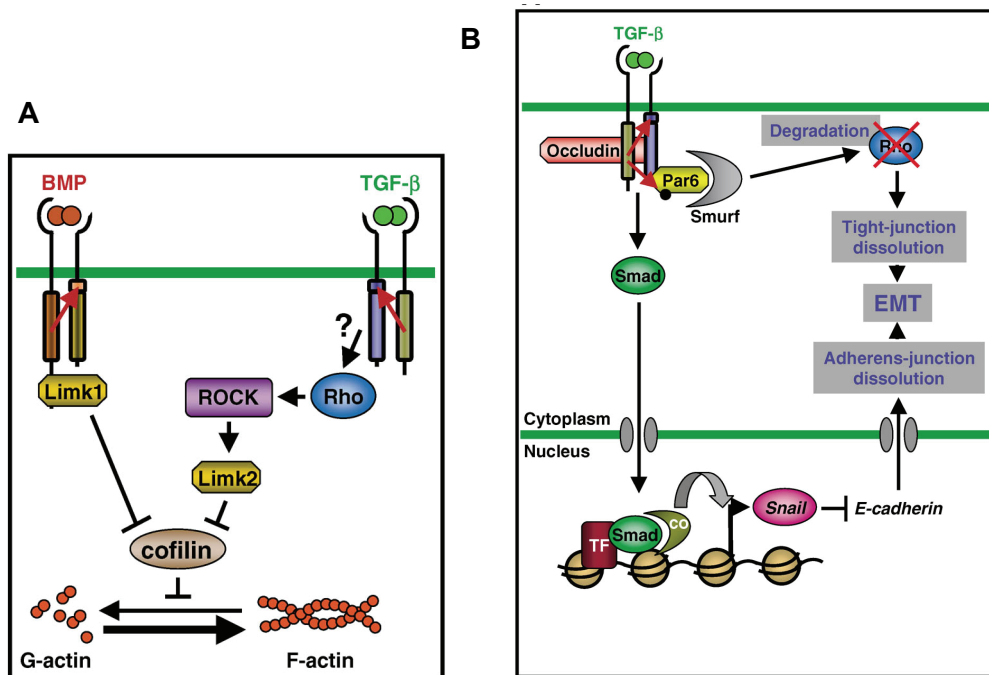
1.8.3 Η ρύθμιση των μικρών Rho GTPασών από τον TGF- β

Γρήγορη ενεργοποίηση της μικρής Rho GTPάσης RhoA από τον TGF- β έχει παρατηρηθεί σε ινοβλάστες [136], σε λεία μυϊκά κύτταρα [137,138], καθώς και σε φυσιολογικά και καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα [81,139]. Η γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA έχει δειχθεί σε ινοβλάστες ότι οδηγεί στην ενεργοποίηση της ROCK1, η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την LIMK2 η οποία ακολούθως φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την cofilin, οδηγώντας έτσι σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και σε δημιουργία ινιδίων του στρες (**Εικόνα 1.15A**) [136]. Ένας διαφορετικός μηχανισμός έχει προταθεί για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται από τις BMPs και περιλαμβάνει την άμεση αλληλεπίδραση της LIMK1 με την κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα τύπου II των BMPs (BMPII), στην ενεργοποίηση της οποίας φαίνεται να παίζει ρόλο η μικρή GTPάση Cdc42 μετά από διέγερση με τις BMPs (**Εικόνα 1.15A**) [140,141].

Παρόλα αυτά μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της RhoA στους στενοσύνδεσμους (tight junctions) των επιθηλιακών κυττάρων από τον TGF- β έχει επίσης αναφερθεί (**Εικόνα 1.15B**). Η Par6 μία scaffold πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζει την πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων, αλληλεπιδρά με τον T β RI υποδοχέα στους στενοσύνδεσμους [142]. Η διέγερση με TGF- β προκαλεί τη συγκρότηση και τη συσσώρευση των T β RI/T β RII συμπλόκων στους στενοσύνδεσμους, όπου ο T β RII υποδοχέας φωσφορυλιώνει την Par6, με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της E3 λιγάσης Smurf1 στο σύμπλοκο των ενεργοποιημένων υποδοχέων. Το σύμπλοκο Par6/Smurf1 μεσολαβεί την ουμπικουτινίωση και αποικοδόμηση της RhoA, γεγονός που οδηγεί στην τοπική αποδιοργάνωση των στενοσυνδέσμων, το οποίο είναι ένα χαρακτηριστικό στάδιο κατά την EMT [65,142].

Εκτός από τη RhoA ο TGF- β ενεργοποιεί και τη μικρή Rho GTPάση Cdc42 σε καρκινικά κύτταρα προσάτη και ινοβλάστες [139,143]. Η ενεργοποίηση της Cdc42 φαίνεται να είναι ανεξάρτητη των Smads, καθώς η αναστολή της φωσφορυλίωσης της Smad2 ή της Smad3 ξεχωριστά ή και των δύο ταυτόχρονα δεν επηρέασε την ενεργοποίηση του τελεστή της Cdc42,

PAK2 [131,143], μία άλλη μελέτη όμως αναφέρει ότι η ενεργοποίηση της Cdc42 από τον TGF-β εξαρτάται από την ανασταλτική Smad, Smad7 [144] αντανακλώντας πιθανώς την κυτταροειδική απόκριση στον TGF-β.



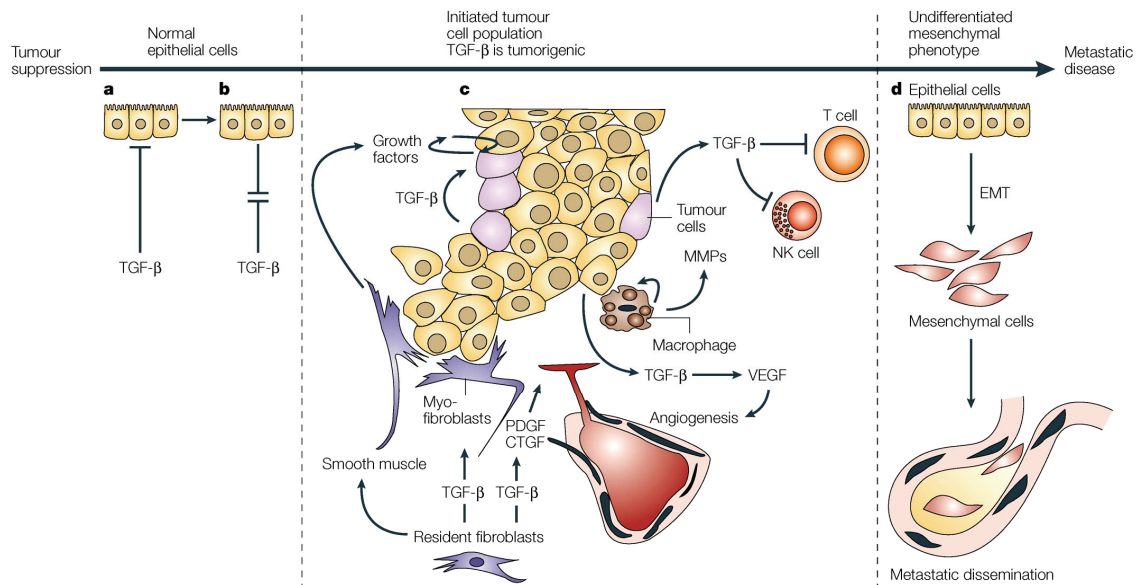
Εικόνα 1.15: Smad ανεξάρτητοι μηχανισμοί θετικής (A) και αρνητικής ρύθμισης (B) των Rho GTPασών από τον TGF-β. A. Το μονοπάτι Rho/ROCK/LIMK2/cofilin οδηγεί στην αναδιοργάνωση του πολυμερισμού της ακτίνης. **B.** Η λιγάση Smurf1 στρατολογείται στο σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF-β στους στενοσύνδεσμους από τη φωσφορυλιωμένη Par6 και στοχεύει τη RhoA για αποικοδόμηση [113].

Φυσική αλληλεπίδραση της Cdc42 με τα σύμπλοκα των υποδοχέων του TGF-β έχει αναφερθεί μαζί με ένα σύνολο πρωτεϊνών, το οποίο περιλαμβάνει εκτός από τη Cdc42, τις GEF πρωτεΐνες α-PIX και β-PIX, την PAK1 και την occludin, μία πρωτεΐνη των στενοσυνδέσμων [145]. Επίσης η ενεργοποίηση της Rac1 GTPάσης από τον TGF-β έχει αναφερθεί σε καρκινικά κύτταρα μαστού που υπερεκφράζουν το ογκογονίδο HER2 (epidermal growth factor 2) καθώς και σε ινοβλάστες [143,146].

1.9 Ο βιολογικός ρόλος του TGF-β

Η βιολογία του TGF-β είναι ιδιαίτερα σύνθετη και περιλαμβάνει πτυχές ογκοκατασταλτικής αλλά και ογκογονικής συμπεριφοράς. Ο TGF-β αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επάγει απόπτωση σε διάφορους κυτταρικούς τύπους εκδηλώνοντας έτσι την ογκοκατασταλτική του δράση. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρκίνου και κατά τη δημιουργία μεταστάσεων, τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ανθεκτικά στην κυτταροστατική δράση του TGF-β, ενώ στην πλειονότητά τους υπερεκφράζουν TGF-β, ο οποίος δρα προς όφελος της ανάπτυξης και εξέλιξης των όγκων μέσω αυτοκρινών και παρακρινών δράσεων, όπως είναι η επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή, η προαγωγή της κινητικότητας και της

δυσδουλικότητας, η ανοσοκαταστολή, η αγγειογένεση και η τροποποίηση της εξωκυττάριας ουσίας (Εικόνα 1.16) [88,147].



Εικόνα 1.16: Η ογκοκατασταλτική και ογκογονική δράση του TGF-β [147].

1.9.1 Αναστολή του πολλαπλασιασμού

Ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε επιθηλιακά, ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα, καθώς και σε πρωτογενείς ινοβλάστες εμβρυϊκής προέλευσης [148], ενώ έχει μιτογόνο δράση σε αθανατοποιημένους ινοβλάστες και σε συγκεκριμένα μετασχηματισμένα κύτταρα [149]. Το κυτταροστατικό μονοπάτι που επάγεται από τον TGF-β περιλαμβάνει τη μεταγραφική ρύθμιση μέσω των Smads κρίσιμων ρυθμιστών της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου, όπως είναι η επαγωγή της έκφρασης των αναστολέων του κυτταρικού κύκλου p15, p21 και p27 και η γονιδιακή καταστολή του c-Myc και των αναστολέων της διαφοροποίησης (Id1, Id2 και Id3) [150,151]. Η μεταγραφική καταστολή του c-Myc, ενός από τους σημαντικότερους μιτογόνους μεταγραφικούς παράγοντες, είναι ένα γεγονός-κλειδί κατά το κυτταροστατικό πρόγραμμα που επάγει ο TGF-β στα επιθηλιακά κύτταρα. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την πρόσδεση στον υποκινητή του c-Myc ενός συμπλόκου που περιέχει τη Smad3, τη Smad4, τον μεταγραφικό παράγοντα E2F4 και τον συν-καταστολέα p107 [152].

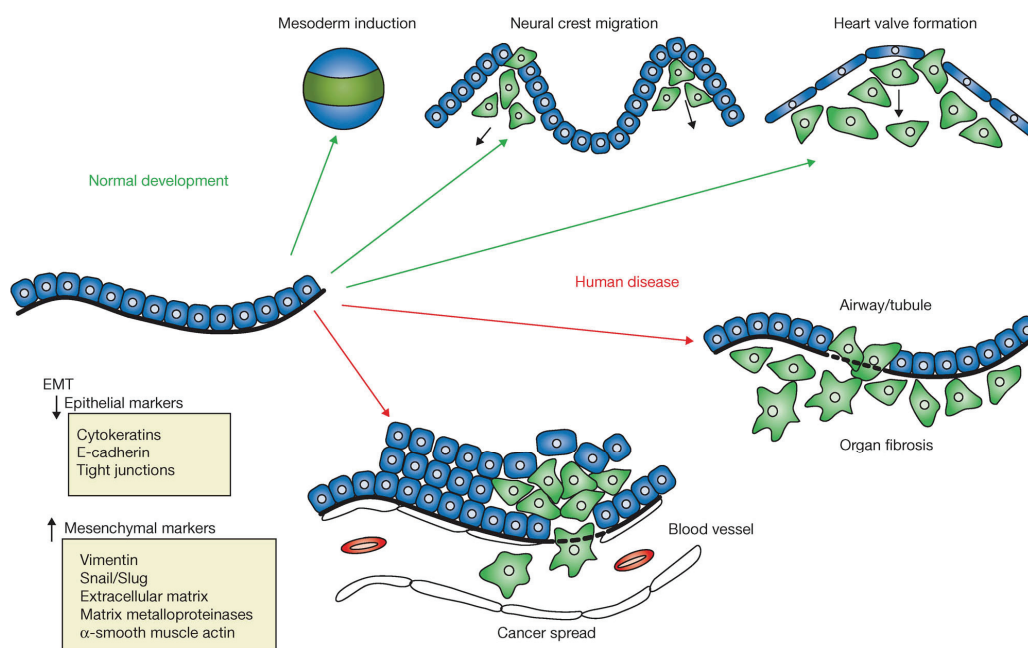
1.9.2 Απόπτωση

Στα πλαίσια της ογκοκατασταλτικής δράσης του ο TGF-β επάγει απόπτωση με έναν κυτταροειδικό τρόπο σε κύτταρα ηπατώματος, επιθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα. Το μονοπάτι των Smads ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, τα οποία μεσολαβούν τις προ-αποπτωτικές δράσεις του TGF-β. Τέτοια γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες όπως ο μεταγραφικός παράγοντας TIEG1 (TGF-β-inducible early response gene-1), ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση άλλων προ-αποπτωτικών γονιδίων, το σηματοδοτικό μόριο GADD45β, το οποίο αλληλεπιδρά

με τη MAPKK, MKK4 ενεργοποιώντας έτσι το p38 MAPK μονοπάτι και περαιτέρω μονοπάτια κασπασών, το προ-αποπτωτικό μόριο Bix και η κινάση DAPK (Death-associated protein kinase), τα οποία δρουν στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιούν τα μονοπάτια των κασπασών και η φωσφατάση των φωσφολιπιδίων SHIP, η οποία ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι επιβίωσης PI3K/AKT [88,151].

1.9.3 Επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή

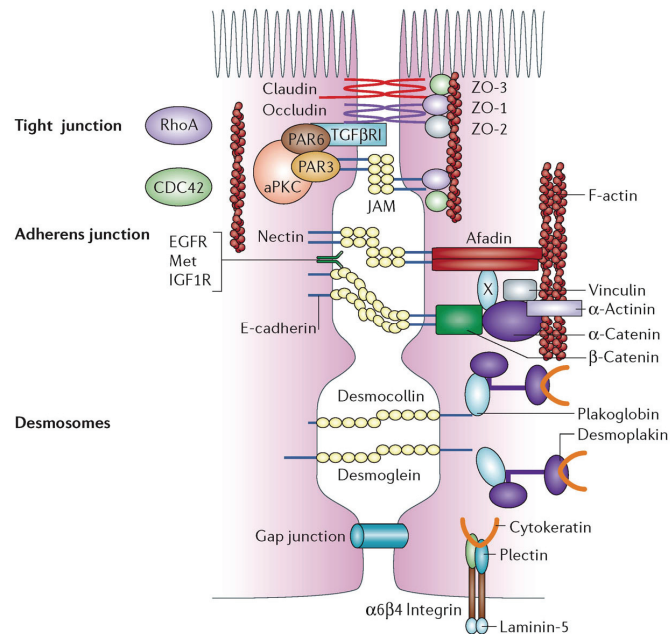
Η επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή (EMT, epithelial mesenchymal transition) είναι η διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε μεσεγγυματικά. Ο όρος EMT περιγράφει μία σειρά γεγονότων κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν πολλά από τα χαρακτηριστικά τους και αποκτούν ιδιότητες που τυπικά αποδίδονται σε μεσεγγυματικά κύτταρα, ενώ απαιτούνται σύνθετες αλλαγές τόσο στη μορφολογία όσο και στη συμπεριφορά των κυττάρων. Η EMT είναι μία φυσιολογική διαδικασία απαραίτητη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, η οποία όμως λαμβάνει χώρα και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο προχωρημένος καρκίνος και η ίνωση (**Εικόνα 1.17**).



Εικόνα 1.17: Η επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή στην ανάπτυξη και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ο καρκίνος και η ίνωση. Παρουσιάζονται παραδείγματα επιθηλιακών και μεσεγγυματικών μορίων που μειώνονται και αυξάνονται αντιστοίχως κατά την EMT [153].

Τα επιθηλιακά κύτταρα οργανώνονται σε στοιβάδες ή μονοστοιβάδες, οι οποίες είναι στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω εξειδικευμένων μεμβρανικών δομών, όπως οι στενοσύνδεσμοι (tight junctions), οι συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions), τα δεσμοσώματα (desmosomes) και οι χασμοσύνδεσμοι (gap junctions). Χαρακτηριστικό των επιθηλιακών κυττάρων είναι η κορυφαία-βασική (apical-basal) πολικότητα τους, η οποία εξασφαλίζεται από την εντοπισμένη κατανομή μορίων προσκόλλησης, όπως οι cadherins και

συγκεκριμένες ιντεγκρίνες, από την πολωμένη οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων και από την παρουσία μίας εξειδικευμένης δομής της εξωκυττάριας ουσίας τη βασική λάμινα (basal lamina, basement membrane) κάτω από τη βασική τους επιφάνεια (**Εικόνα 1.18**).

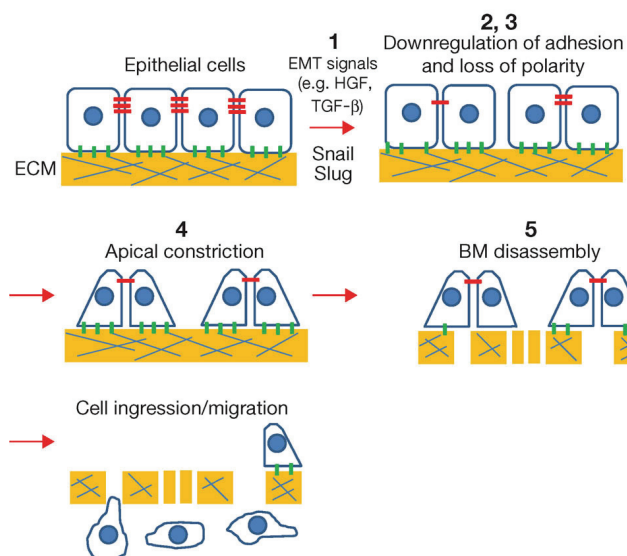


Εικόνα 1.18: Μοριακά χαρακτηριστικά των επιθηλιακών συνδέσεων: στενοσύνδεσμοι (*tight junctions*), συνδέσεις προσκόλλησης (*adherens junctions*) και δεσμοσώματα, προσκόλληση στη λαμινίνη μέσω ιντεγκρινών [154].

Τα μεσεγχυματικά κύτταρα από την άλλη μεριά δε σχηματίζουν οργανωμένες στοιβάδες, ούτε εμφανίζουν την κορυφαία-βασική οργάνωση, ούτε την πόλωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και επιφανειακών μορίων, όπως συμβαίνει στα επιθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα τα μεσεγχυματικά κύτταρα διαθέτουν μία ινοβλαστοειδή μορφολογία και έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν [154].

Προαπαιτούμενες κυτταρικές αλλαγές κατά την EMT είναι η καταστροφή των διακυτταρικών συνδέσεων, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η άρση της επιθηλιακής πολικότητας και η τροποποίηση της προσκόλλησης στην εξωκυττάρια ουσία (**Εικόνα 1.19**). Παράλληλα, τα μεταναστευτικά ινοβλαστοειδή κύτταρα ενεργοποιούν μοριακά προγράμματα τα οποία τους προσδίδουν την ικανότητα να αποικοδομούν αλλά και να συνθέτουν *de novo* συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας (ECM, extracellular matrix), επιτρέποντας τους να διαπερνούν τις βασικές μεμβράνες και να εξέρχονται στην ECM συνεχίζοντας τη μετανάστευση τους, μία διαδικασία η οποία καθορίζει κατά κανόνα την διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων (*tumor invasiveness*). Τα καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να αποκτήσουν επιπρόσθετες ικανότητες ως μία προέκταση της κοινής EMT που τους επιτρέπουν να δημιουργούν μεταστάσεις. Τέτοιες ικανότητες είναι η αντίσταση στην

απόπτωση, η προσκόλληση σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η αυτόνομη ανάπτυξη και η έκκριση παραγόντων αγγειογένεσης [155].



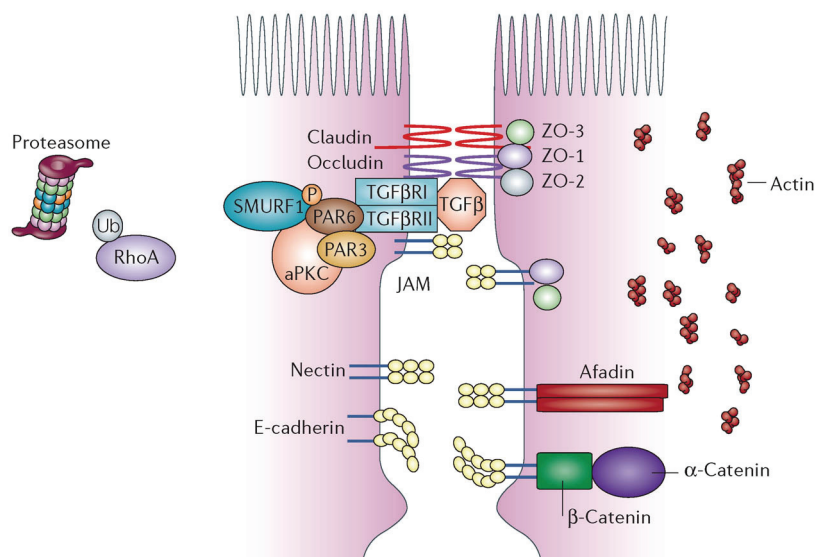
Εικόνα 1.19: Τα βασικά βήματα κατά την επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή. 1) Η EMT προκαλείται από παράγοντες όπως ο HGF και ο TGF-β. 2) Απώλεια της διακυτταρικής προσκόλλησης. 3) Απώλεια της κορυφαίας-βασικής πολικότητας. 4) Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού – περίσφιξη της κορυφής του κυττάρου (apical constriction). 5) Αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα τη διείσδυση του κυττάρου στην εξωκυττάρια ουσία και τη μετανάστευση [156].

1.9.3.1 Αποδόμηση των διακυτταρικών συνδέσεων και απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας

Ένα πολύ σημαντικό στάδιο κατά την EMT είναι η αποδόμηση των διακυτταρικών συνδέσεων (tight junctions, adherens junctions, desmosomes). Οι **στενοσύνδεσμοι (tight junctions)** μεσολαβούνται από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες claudin και occludin και από scaffold πρωτεΐνες, όπως η ZO-1, η οποία συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Κατά την EMT οι στενοσύνδεσμοι αποδιατάσσονται και τα βασικά πρωτεϊνικά συστατικά τους ρυθμίζονται αρνητικά. Ο μηχανισμός αποδόμησης των στενοσυνδέσμων από τον TGF-β έχει πρόσφατα αποσαφηνισθεί (**Εικόνα 1.20**). Η διέγερση με TGF-β επιτρέπει στον TβRII υποδοχέα, ο οποίος αλληλεπιδρά με την occludin και εντοπίζεται στους στενοσύνδεσμούς, να φωσφορυλιώσει την Par6. Η Par6 αποτελεί βασικό συστατικό των συμπλόκων πολικότητας τα οποία ρυθμίζουν τη συγκρότηση των στενοσυνδέσμων. Η φωσφορυλίωση της Par6 της επιτρέπει να στρατολογήσει την E3 λιγάση Smurf1, η οποία και υμπικουτινώνει τη RhoA οδηγώντας τη για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα [65,142]. Η RhoA στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα παίζει ρόλο στη διατήρηση της κορυφαίας-βασικής πολικότητας και στη σταθερότητα των συνδέσεων [157].

Οι **συνδέσεις προσκόλλησης (adherens junctions)** μεσολαβούνται από ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις των εξωκυττάρων περιοχών της E-cadherin. Το ενδοκυττάριο τμήμα της αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των α- και β-catenins. Η αποδόμηση

των συνδέσεων προσκόλλησης και ο μηχανισμός μείωσης των επιπέδων της E-cadherin μέσω ενδοκυττάρωσης και μεταγραφικής καταστολής της έκφρασης της έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η αποδόμηση των συνδέσεων προσκόλλησης της E-cadherin από τον TGF- β μεσολαβείται από πρωτεολυτική διάσπαση μέσω της πρεσενιλίνης-1 (presenilin-1/ γ -secretase) με ένα μηχανισμό ο οποίος δεν είναι ακόμη γνωστός [155,158,159].



Εικόνα 1.20: Μοριακά γεγονότα που λαμβάνουν χώρα στις διακυτταρικές συνδέσεις κατά την EMT. Ο TGF- β αποσταθεροποιεί τους στενοσύνδεσμους (tight junctions) στοχεύοντας τη RhoA για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της περιφερειακής F-ακτίνης (cortical actin) [154].

Καθώς καταστρέφονται οι διακυτταρικές συνδέσεις, οι καλά οργανωμένες επιθηλιακές στοιβάδες απελευθερώνουν μοναδιαία ινοβλαστοειδή κύτταρα με εξαφανιζόμενη πολωμένη οργάνωση. Έτσι, ο επιθηλιακός δείκτης E-cadherin μειώνεται και αντικαθίσταται από τη μεσεγχυματική N-Cadherin [160], ενώ ο επιθηλιακός δείκτης πολικότητας, η κορυφαία διαμεμβρανική πρωτεΐνη mucin-1 (MUC1) είτε επαναδιανέμεται είτε μειώνονται τα επίπεδά της [161]. Επίσης η βασική ιντεγκρίνη $\alpha 5 \beta 4$ που μεσολαβεί την αλληλεπίδραση των επιθηλιακών κυττάρων με τη βασική λάμινα αντικαθίσταται από τη μεσεγχυματική ιντεγκρίνη $\alpha 5 \beta 1$ [155,162].

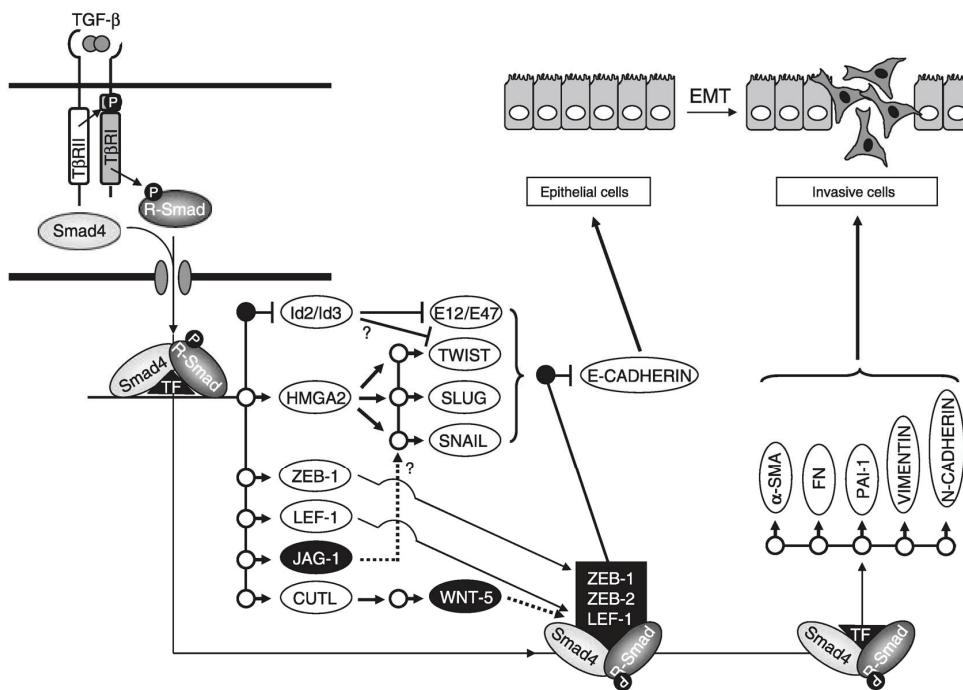
1.9.3.2 Προσκόλληση στην εξωκυττάρια ουσία

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

[155,163]. Επίσης ο TGF-β επάγει την έκφραση της adaptor πρωτεΐνης Dab-2 (Disabled-2), η οποία αλληλεπιδρά με την ιντεγκρίνη β1 και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της από τον TGF-β. Αναστολή της Dab-2 μπλοκάρει την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών και την προσκόλληση των κυττάρων που υφίστανται EMT, προκαλώντας αναστολή της EMT και απόπτωση [164].

1.9.3.3 Μεταγραφική ρύθμιση της EMT από τον TGF-β

Κατά την EMT που μεσολαβείται από τον TGF-β, οι Smads καταστέλλουν μεταγραφικά την έκφραση των *Id* (Inhibitor of differentiation) γονιδίων *Id2* και *Id3*, ένα γεγονός το οποίο είναι απαραίτητο για την αρνητική ρύθμιση (downregulation) των E-cadherin και ZO-1 και την τελική καθιέρωση της EMT [165]. Επιπλέον οι μεταγραφικοί καταστολείς του γονιδίου της *E-cadherin*, **Snail**, **Slug**, **ZEB1**, **ZEB2**, **E12/E47**, **Twist** και **LEF-1** εμπλέκονται στην EMT που επάγεται από τον TGF-β [151,166]. Οι καταστολείς αυτοί αναγνωρίζουν E-box DNA αλληλουχίες κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής στον υποκινητή του γονιδίου της *E-cadherin* στρατολογώντας μεταγραφικούς συν-καταστολείς και αποακετυλάσες των ιστονών (HDACs, histone deacetylases). Ο TGF-β επάγει την αλληλεπίδραση των Smads με τις ZEB1 ή ZEB2, οδηγώντας στη δημιουργία συμπλόκων καταστολής στην E-box περιοχή του γονιδίου της *E-cadherin* καθώς και σε άλλα γονίδια στόχους (Εικόνα 1.21) [167,168].



Εικόνα 1.21: Το μεταγραφικό πρόγραμμα που ενεργοποιείται από τον TGF-β κατά την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EMT). (Οι λευκοί κύκλοι υποδηλώνουν ενεργοποίηση ενώ οι μαύροι καταστολή της γονιδιακής έκφρασης) [169].

Επιπλέον ο TGF-β επάγει την έκφραση της Slug, της Snail μέσω της Smad3 ή των μονοπατιών των Erk και PI3K, καθώς και του LEF-1 μέσω των Smad, σε διαφορετικά

κυτταρικά συστήματα [170,171]. Το ερώτημα εάν όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί καταστολής του γονιδίου της *E-cadherin* δρουν σε συνεργασία ή αντανακλούν ιστοειδικές αποκρίσεις κατά την επαγόμενη από τον TGF-β EMT παραμένει ανοιχτό. Πρόσφατα βρέθηκε ένας νέος ρυθμιστής κλειδί στη σηματοδότηση του TGF-β κατά την EMT, ο πυρηνικός παράγοντας **HMGA2**, ο οποίος επάγεται από τον TGF-β και ακολούθως επάγει την έκφραση των Snail, Slug και Twist (**Εικόνα 1.21**) [151,172].

Παρά την κατανόηση του πως ρυθμίζεται η καταστολή του γονιδίου της E-Cadherin από τον TGF-β, πολύ λίγα είναι γνωστά για τη μεταγραφική ρύθμιση άλλων γονιδίων τα οποία είναι απαραίτητα για την καθιέρωση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου. Ο TGF-β μέσω του Smad μονοπατιού επάγει την έκφραση του συνδέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, **Jagged1**, εκκινώντας έτσι το μονοπάτι Notch σε συνεργασία με το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του μεταγραφικού καταστολέα Hey1, ο οποίος μεσολαβεί πολλές δράσεις του Notch μονοπατιού σχετικές με την EMT [159].

Παρομοίως, ο TGF-β επάγει την έκφραση των συνδετών και των υποδοχέων του **PDGF**, ενεργοποιώντας έτσι το PDGF μονοπάτι, το οποίο έχει δείχθει ότι δρα αυτοκρινώς προάγοντας την EMT, την *in vivo* μετάσταση και την *in vivo* ανάπτυξη των όγκων [173,174]. Επίσης ο TGF-β πέρα από την επαγωγή των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2 και MMP9, όπως προαναφέρθηκε, επάγει την έκφραση ενζύμων που ρυθμίζουν την ECM, όπως η **PAI-1** (plasminogen activator inhibitor-1), καθώς και συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας, όπως η **fibronectin (FN)** (**Εικόνα 1.21**). Το μονοπάτι των Smad ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της PAI-1 σε συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο Sp1 και ο TFE3, ενώ σήματα από την ERK και τη Rac1 επίσης χρειάζονται [175-177]. Η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της FN δείχθηκε αρχικά ότι εξαρτάται από το μονοπάτι της JNK MAPK με ένα Smad-ανεξάρτητο μηχανισμό, στη συνέχεια όμως αποδείχθηκε ότι το μονοπάτι των Smad επίσης χρειάζεται [113,122,178].

1.9.3.4 Ο ρόλος των microRNA στην EMT που επάγεται από τον TGF-β

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται η γνώση γύρω από το ρόλο των microRNAs στη ρύθμιση της EMT που προκαλείται από τον TGF-β. Η οικογένεια των microRNA miR-200, έχει συσχετισθεί με τον επιθηλιακό φαινότυπο, όπου αποτρέποντας την έκφραση των μεταγραφικών καταστολέων ZEB1 και ZEB2, επιτρέπει την πλήρη έκφραση της *E-cadherin* και άλλων επιθηλιακών γονιδίων. Έχει δείχθει πρόσφατα, ότι ο TGF-β προκαλεί αύξηση των επιπέδων των ZEB1 και ZEB2, προάγοντας τη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου της *E-cadherin* κατά την EMT, μέσω καταστολής των μελών της miR-200 οικογένειας (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-419) και του miR-205. Ο μηχανισμός της καταστολής των miR-200 από τον TGF-β δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά περιλαμβάνει τη μεθυλίωση των υποκινητών τους, όπως έχει δείχθει για τους γενετικούς τόπους miR-200b~200a~429 και miR-200c~141, ενώ πρόσφατα δείχθηκε ότι όλα τα μέλη της miR-200 οικογένειας αποτελούν μεταγραφικούς

στόχους των ίδιων των ZEB1/2 στα πλαίσια ενός διπλού αρνητικού ανατροφοδοτούμενου μηχανισμού [179-182].

Επίσης μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο TGF- β επάγει την έκφραση του miR-155 μέσω ενός Smad4-εξαρτώμενου μηχανισμού, το οποίο στοχεύει στη RhoA. Υπερέκφραση του miR-155 κατέστειλε τη σύνθεση της RhoA, ενώ η καταστολή του εμπόδισε την επαγόμενη από τον TGF- β EMT, καθώς και τη μετανάστευση και διεισδυτικότητα των κυττάρων [183].

1.10 Ο ρόλος του TGF- β στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης

Στοχεύοντας στον κυτταροσκελετό της ακτίνης το μονοπάτι του TGF- β στοχεύει κατά κανόνα σε δύο διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις: πρώτον αλλάζει τη συνολική αρχιτεκτονική του κυττάρου, γεγονός το οποίο έχει επίπτωση στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση και δεύτερον διευκολύνει την κυτταρική κινητικότητα μέσω αλλαγής της οργάνωσης του κυτταροσκελετού και την τροποποίηση της εξωκυττάριας ουσίας [184].

1.10.1 Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η ενεργοποίηση των Rho κατά την EMT που επάγεται από τον TGF- β

Ίσως οι πιο καλά μελετημένες επιδράσεις του TGF- β στον κυτταροσκελετό της ακτίνης αφορούν τη διαδικασία της EMT και τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες [184,185]. Τα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από περιφερειακά (cortical) ινίδια ακτίνης, τα οποία συνδέονται με ενδοκυττάρια συστατικά των συνδέσεων προσκόλλησης, όπως οι α - και β -catenins. Η απώλεια της κορυφαίας-βασικής πολικότητας και η αποδιάταξη των διακυτταρικών συνδέσεων συνοδεύεται από μία θεμελιώδη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό εστιακών προσκολλήσεων (focal adhesions) και ινιδίων του στρες, τα οποία διασυνδέουν αυτές τις εστιακές προσκολλήσεις, και την απόκτηση μιας ινοβλαστοειδούς μορφολογίας (spindle-like morphology) [155]. Επίσης κατά την EMT το σύστημα των ενδιάμεσων ινιδίων κυτταροκερατίνης αλλάζει σε νέου τύπου κυτταροκερατίνες και σε ένα σκελετό που βασίζεται στη vimentin. Το μονοπάτι των Smad σε συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες επάγει την έκφραση του γονιδίου της *vimentin* κατά το φαινόμενο της EMT που επάγεται από τον TGF- β [184,186]. Ο TGF- β ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης σε ένα σύνολο κυτταρικών συστημάτων μέσω των μικρών Rho GTPασών, RhoA, RhoB, Rac και Cdc42 [81,136,138,139,143,146]. Γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης και του καθοδικού τελεστή της ROCK έχει αναφερθεί ως ένα από τα πρώτα γεγονότα σε διάφορα μοντέλα επαγόμενης EMT από τον TGF- β κάτω από φυσιολογικές ή παθολογικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα κατά την ανάπτυξη της καρδιάς σε έμβρυα κοτόπουλου [187] ή σε ασθένειες όπως η ίνωση (tubulointerstitial fibrosis) [188] και η ρετινοπάθεια (proliferative vitreoretinopathy) [189].

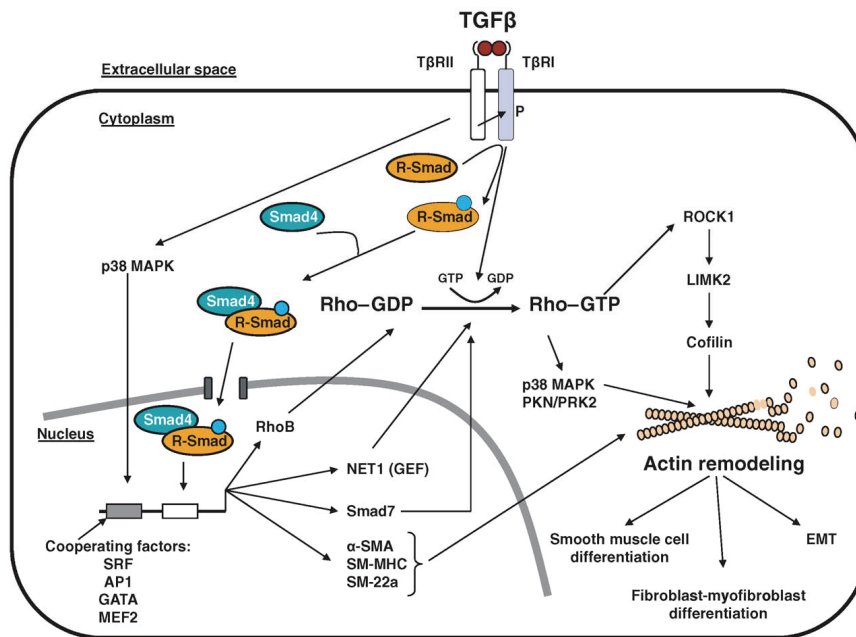
1.10.2 Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η ενεργοποίηση των Rho από τον TGF-β σε ινοβλάστες και λεία μυϊκά κύτταρα

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μετά από σύντομη ή μακρόχρονη διέγερση με TGF-β έχει μελετηθεί εκτενώς σε κυτταρικά συστήματα ινοβλαστών, όπως σε NIH3T3 ινοβλάστες που έχουν μετασηματιστεί από το ογκογονίδιο H-Ras [190], σε εμβρυικούς ινοβλάστες [191] και σε Swiss3T3 ινοβλάστες [136]. Σε Swiss3T3 ινοβλάστες ο TGF-β οδήγησε σε γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB μικρών GTPασών μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης και στη συνακόλουθη ενεργοποίηση των καθοδικών τους τελεστών ROCK1 και LIMK2 με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και απενεργοποίηση του παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης κοφιλίνης και την αναδιοργάνωση της ακτίνης προς το σχηματισμό ινιδίων του στρες (Εικόνα 1.22) [136]. Η επαγωγή της έκφρασης της α-SMA από τον TGF-β είναι ένα χαρακτηριστικό της διαφοροποίησης των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες. Για παράδειγμα ο TGF-β οδήγησε στην επαγωγή της έκφρασης της α-SMA και τη συνακόλουθη ενσωμάτωσή της στα ινίδια της ακτίνης κατά τη διαφοροποίηση των Swiss3T3 ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες [192].

Επίσης, ο TGF-β προάγει τη διαφοροποίηση λείων μυϊκών κυττάρων μέσω γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA και ενεργοποίησης των καθοδικών κινασών ROCK, PKN/PRK2, καθώς και της p38 MAPK, αλλά και μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης ειδικών για τα λεία μυϊκά κύτταρα γονιδίων όπως α-SMA, SM-MHC και SM-22a μέσω συνεργασίας των μεταγραφικών παραγόντων SRF (serum response factor), GATA και MEF2 (myosin enhancer factor 2) (Εικόνα 1.22) [138].

1.10.3 Η ενεργοποίηση των Rho GTPασών από τον TGF-β μέσω Smad-εξαρτώμενων και Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών

Η γρήγορη ενεργοποίηση των Rho GTPασών από τον TGF-β υπονοεί την εμπλοκή Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών, όπως έχουν δείξει μελέτες για τη γρήγορη ενεργοποίηση της Cdc42 σε ινοβλάστες [131,143]. Παρόλα αυτά ο μηχανισμός της γρήγορης ενεργοποίησης των μικρών Rho GTPασών και ιδιαίτερα της RhoA δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Για παράδειγμα η χρήση μίας μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGF-β, η οποία φέρει μετάλλαξη στην περιοχή πρόσδεσης των R-Smad, L45 loop, έδειξε ότι η αλληλεπίδραση των R-Smad με τον υποδοχέα τύπου I είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των Rho GTPασών και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β [136]. Ενδιαφέρον αποτελεί το εύρημα ότι η ενεργοποίηση της Cdc42 λαμβάνει χώρα στην περιοχή των υποδοχέων μέσω ενός πολύ καλά οργανωμένου συμπλόκου πρωτεϊνών που περιλαμβάνει τόσο τους ενεργοποιητές της α-PIX και β-PIX GEFs, όσο και τον τελεστή της PAK1 [145]. Πιθανώς η ενεργοποίηση της RhoA να περιλαμβάνει το σχηματισμό ενός αντίστοιχου πρωτεϊνικού συμπλόκου του οποίου η σταθερότητα να εξαρτάται από την πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών στον TβRI υποδοχέα.



Εικόνα 1.22: Ο ρόλος των μικρών Rho GTPασών στη σύντομη και μακρόχρονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τον TGF-β [185].

Μία άλλη μελέτη σε καρκινικά κύτταρα προστάτη έδειξε ότι ο TGF-β ενεργοποιεί γρήγορα τις μικρές GTPάσες RhoA και Cdc42 και ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β εξαρτάται από το μονοπάτι της p38 MAPK [139]. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι η ενεργοποίηση της Cdc42 εξαρτάται από την ανασταλτική Smad7, η οποία λειτουργεί ως adaptor πρωτεΐνη και πραγματοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης με τον TβRI υποδοχέα [144], ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της Smad7 αναστέλλει την ενεργοποίηση της RhoA και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, λόγω αναστολής του μονοπατιού του TGF-β [136].

Η ικανότητα του TGF-β να επηρεάζει τόσο τη γρήγορη όσο και τη μακροχρόνια αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διάφορα κυτταρικά συστήματα [136,139,192] υπονοεί ότι η μεταγραφική ρύθμιση από τον TGF-β μπορεί να εμπλέκεται στη μακροχρόνια αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (**Εικόνα 1.22**). Προς αυτή την κατεύθυνση έχει δειχθεί ότι ο TGF-β επάγει την έκφραση μίας GEF πρωτεΐνης που έχει ειδικότητα για τη RhoA, τη Net1, μέσω του Smad μονοπατιού [193], καθώς και τη μικρή GTPάση RhoB σε ινοβλάστες, ηπατοκύτταρα [192] και HaCaT κερατινοκύτταρα με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τη Smad3, την Erk και την p53 [185,194].

1.11 Η Net1 GEF ως μεταγραφικός στόχος του TGF-β

Η Net1 (Neuroepithelioma transforming gene-1) GEF αναγνωρίστηκε ως ένας νέος μεταγραφικός στόχος του TGF-β σε μία μελέτη με μικροσυστοιχίες που είχε ως στόχο τον εντοπισμό νέων γονιδίων που σχετίζονται με την επαγόμενη από τον TGF-β αλλαγή της

κυτταρικής μορφολογίας. Στη μελέτη αυτή δείχθηκε ότι ο TGF- β επάγει τη Net1 GEF σε κερατινοκύτταρα (HaCaT) και σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (A549), καθώς και στους ινοβλάστες Swiss 3T3 και BJ μετά από 1-2 ώρες επίδρασης [193].

1.11.1 Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά της Net1 GEF

Το γονίδιο της *Net1* απομονώθηκε αρχικά από NIH3T3 ινοβλάστες κατά την αναζήτηση νέων ογκογονιδίων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο μετασχηματισμού, focus formation assay [195,196]. Η Net1 GEF είναι μία ειδική GEF για τη RhoA GTPάση, ενώ δεν έχει μελετηθεί η ειδικότητά της ως προς τις RhoA, RhoB και RhoC [195]. Το γονίδιο της *Net1* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 595 αμινοξέων, η οποία περιέχει μία σειρά από σήματα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) στην αμινο-τελική της περιοχή, μία DH-PH περιοχή και ένα μικρό καρβοξυ-τελικό τμήμα που περιέχει μία PDZ περιοχή [28,29]. Ο μηχανισμός ρύθμισης της Net1 αποδείχθηκε ότι είναι διαφορετικός από αυτόν της Vav ή της Dbl GEF, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε λαμβάνουν μία αυτοκατασταλτική διαμόρφωση που αίρεται μετά από φωσφορυλίωση. Η Net1 αντιθέτως δε φαίνεται να λαμβάνει μία τέτοια διαμόρφωση και ρυθμίζεται μέσω του υποκυτταρικού εντοπισμού της, όπου εντοπίζεται στον πυρήνα και μετά από το κατάλληλο ερέθισμα μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα όπου συναντά το υπόστρωμα της RhoA, την οποία και ενεργοποιεί [29].

Ο ογκογόνος κλώνος της Net1 που απομονώθηκε από τους NIH3T3 ινοβλάστες στην αρχική μελέτη κωδικοποιούσε μία κομμένη πρωτεΐνη, από την οποία έλλειπαν τα 145 πρώτα αμινοξέα, συμπεριλαμβανομένων και των NLS και έτσι αρχικά θεωρήθηκε ότι η ανακατανομή της κομμένης πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα και η συνακόλουθη αυξημένη ενεργοποίηση της RhoA ήταν υπεύθυνη για την ικανότητα μετασχηματισμού της Net1. Παρόλα αυτά περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι η αυξημένη παρουσία της wt Net1 στο κυτταρόπλασμα οδηγεί στο σχηματισμό ινιδίων του στρες ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της RhoA, δεν επαρκεί όμως για να προκαλέσει μετασχηματισμό [28]. Αργότερα δείχθηκε ότι το PDZ μοτίβο στο καρβοξυ-τελικό άκρο είναι απαραίτητο για την ικανότητα της Net1 να προκαλεί μετασχηματισμό μέσω αλληλεπίδρασης με τις ογκοκατασταλτικές PDZ πρωτεΐνες της Discs Large (Dlg) οικογένειας, όπως είναι η Dlg1. Η αλληλεπίδραση της wt Net1 με την Dlg1 πρωτεΐνη έχει ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση τους στον πυρήνα, στις υποπυρηνικές περιοχές που ονομάζονται PML σωματίδια (promyelocytic leukemia protein bodies). Αντιθέτως η ογκογόνος Net1 η οποία στερείται των NLS προσδένει και στρατολογεί τη Dlg1 στο κυτταρόπλασμα, όπου φαίνεται ότι παρεμποδίζεται η ογκοκατασταλτική της δράση [197].

Δύο ισομορφές της Net1 υπάρχουν στα κύτταρα, η Net1 και η Net1A, η οποία δε διαθέτει τα 85 πρώτα αμινοξέα της Net1 και σε αντίθεση περιέχει ένα διαφορετικό τμήμα 31 αμινοξέων, το οποίο δεν περιέχει τα 2 NLS που διαθέτει η Net1 στο αμινο-τελικό της άκρο. Παρόλα αυτά και οι δύο ισομορφές εντοπίζονται στον πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι τα δύο NLS της Net1 δεν είναι λειτουργικά, αλλά αλληλουχίες στην κοινή αμινο-τελική περιοχή των δύο

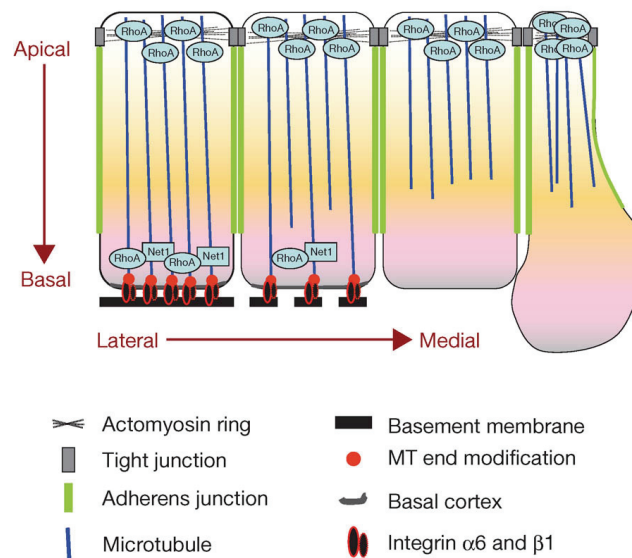
ισομορφών πρέπει να συμβάλουν στη στόχευση τους στον πυρήνα. Επιπλέον, οι δύο ισομορφές εμφανίζουν την ίδια ικανότητα να ενεργοποιούν τη RhoA στο κυτταρόπλασμα, η Net1A όμως φαίνεται να έχει λίγο μεγαλύτερη τάση να εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και αυτό οδηγεί σε αυξημένη ικανότητα να ενεργοποιεί τη RhoA [28].

1.11.2 Ο ρόλος της Net1 στη ρύθμιση της πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων και την EMT

Πρόσφατα δείχθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 ότι η Net1 είναι ασταθής πρωτεΐνη με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και ότι η αλληλεπίδραση της με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Dlg1 παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση της και την προστασία της από την αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα, αλλά και στην ενίσχυση της δράσης της ως προς τη RhoA. Επίσης βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή προάγεται υπό συνθήκες που ευνοούν την καθιέρωση των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη δημιουργία της κορυφαίας-βασικής (apical-basal) πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ η καταστροφή των συνδέσεων αυτών οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της Net1 από το σύμπλοκο με τη Dlg1 και την ουμπικουτινίωση της [198]. Τα σύμπλοκα Net1-Dlg1 εντοπίστηκαν κατά κύριο λόγο στον πυρήνα, παρότι η Dlg1 πρωτεΐνη είναι σημαντικός ρυθμιστής των συνδέσεων προσκόλλησης και της επιθηλιακής πολικότητας [199,200] και η ενεργοποίηση της RhoA είναι απαραίτητη για τη δημιουργία αυτών των συνδέσεων [201,202].

Ο ρόλος των συμπλόκων της Net1 με τη Dlg1 δεν είναι ξεκάθαρος και θα μπορούσε να αφορά στην ενεργοποίηση κάποιου πυρηνικού κλάσματος της RhoA ή στη σταθεροποίηση της Net1 στον πυρήνα με σκοπό την αποτροπή της πρόσβασης της στο κυτταρόπλασμα μέχρι τη στιγμή που θα χρειαστεί να ενεργοποιήσει τη RhoA σε κάποια συγκεκριμένη περιοχή [198]. Πρόσφατα δείχθηκε ότι πράγματι η Net1 ενεργοποιεί την πυρηνική RhoA ως απόκριση στην πρόκληση βλαβών στο DNA από τηνιονίζουσα ακτινοβολία [203], ενώ παράλληλα βρέθηκε ότι η Net1 μαζί με τη πυρηνική GEF, Ect2 ενεργοποιούν τη RhoB μετά από γενετοξικό στρες, διευκολύνοντας την απόπτωση ως απόκριση στην επίδραση με παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA [204].

Είναι πιθανό όμως, η Dlg1 να στρατολογεί τη Net1 στην πλασματική μεμβράνη, όταν τα κύτταρα δημιουργούν επαφές μεταξύ τους, όπου η ενεργοποίηση της RhoA είναι απαραίτητη, καταδεικνύοντας έτσι ένα ρόλο για τη Net1 στην καθιέρωση ή διατήρηση της κορυφαίας-βασικής επιθηλιακής πολικότητας [198]. Πράγματι σε μία μελέτη σε έμβρυα κοτόπουλου, δείχθηκε ότι η Net1 ελέγχει τη βασική (basal) δραστηριότητα της RhoA μέσω του εντοπισμού της αυστηρά στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων της επιβλάστης (epiblast). Η ενεργός βασική (basal) RhoA ρυθμίζει τη σταθερότητα ενός δικτύου μικροσωληνίσκων που εντοπίζεται στη βασική περιοχή και συμβάλει στη διατήρηση της επαφής του επιθηλιακού κυττάρου με τη βασική μεμβράνη και στη σταθερότητά της (**Εικόνα 1.23**).



Εικόνα 1.23: Ένα μοντέλο ρύθμισης της αλληλεπίδρασης των επιθηλιακών κυττάρων με τη βασική μεμβράνη (BM) από τη βασική (basal) RhoA και το δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Η διάλυση της BM προηγείται της αποδιάταξης των διακυτταρικών συνδέσεων και της αλλαγής (switch) του τύπου των cadherins και μεσολαβείται από την απώλεια της βασικής Net1 GEF και την επακόλουθη μείωση της δραστηριότητας της RhoA στα διάμεσα κύτταρα επιβλάστης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δικτύου των βασικών μικροσωληνίσκων και την καταστροφή της αλληλεπίδρασης του κυττάρου με τη BM μέσω ιντεγκρινών και τελικά τη διάλυση της BM [205].

Σε αντίθεση με την πεποίθηση ότι η καταστροφή των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης είναι ένα γεγονός κλειδί κατά την EMT, η μελέτη αυτή για πρώτη φορά έδειξε ότι το πιο πρώιμο γεγονός κατά την EMT που συντελείται κατά τη γαστριδίωση (gastrulation) είναι η αποσταθεροποίηση της επαφής του επιθηλιακού κυττάρου με τη βασική μεμβράνη και η διάλυση της (basement membrane breakdown), η οποία προκαλείται από τη μείωση της ενεργότητας της RhoA λόγω της μείωσης των επιπέδων της Net1 GEF στη βασική περιοχή με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του δικτύου των μικροσωληνίσκων (**Εικόνα 1.23**) [156,205].

1.12 Ερευνητικοί στόχοι

Η ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης από τον TGF-β έχει αναφερθεί σε αρκετές κυτταρικές σειρές [81,136-139,144,206] και έχει εμπλακεί στην αναδιοργάνωση της ακτίνης και τη δημιουργία ινιδίων του στρες σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως η διαφοροποίηση ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες [136,192], η διαφοροποίηση λειών μυϊκών κυττάρων [138] και η επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή [81,189,206]. Οι μηχανισμοί που διέπουν την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β τόσο μετά από γρήγορη, όσο και μετά από μεγαλύτερης διάρκειας επίδραση με TGF-β παραμένουν ασαφείς. Ελάχιστη είναι η γνώση γύρω από τις GEF πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β, με τη Net1 να αποτελεί – όπως προαναφέρθηκε – τη μόνη GEF με ειδικότητα για τη RhoA που επάγεται από τον TGF-β.

Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο μας έδειξε ότι οι RhoA και RhoB ενεργοποιούνται μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης με TGF-β στους Swiss 3T3 ινοβλάστες, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που καταλήγει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης της ROCK1 και της LIMK2 και αναστολής της πρωτεΐνης αποπολυμερισμού της ακτίνης, cofilin [136].

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών που διέπουν τόσο τη γρήγορη, όσο και τη μακρόχρονη ενεργοποίηση των Rho GTPασών από τον TGF-β.

Συγκεκριμένα οι στόχοι της παρούσας διατριβής συνοψίζονται ως εξής:

- Διερεύνηση των μορίων που δρουν ανοδικά των Rho GTPασών και ρυθμίζουν τη μη-γενωμική και ταχεία ενεργοποίησή τους από κυτταροκίνες της οικογένειας του TGF-β (TGF-β, ακτιβίνη). Διερεύνηση του πιθανού ρόλου των Smad πρωτεϊνών στη μη-γενωμική ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών από τον TGF-β και την ακτιβίνη. Αναζήτηση των GEF πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μηχανισμό αυτό.
- Διερεύνηση του μηχανισμού της μακρόχρονης ενεργοποίησης των Rho GTPασών από τον TGF-β. Μελέτη της μεταγραφικής ρύθμισης γονιδίων στόχων του TGF-β που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των Rho GTPασών, όπως η Net1 GEF και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως η α-λεία μυϊκή ακτίνη, α-SMA. Διερεύνηση του ρόλου των Smad πρωτεϊνών και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών στη ρύθμιση των γονιδίων Net1 και α-SMA από τον TGF-β.
- Μελέτη του ρόλου της Net1 σε κυτταρικές αποκρίσεις που μεσολαβούνται από τον TGF-β και περιλαμβάνουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως η επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή και η κυτταρική μετανάστευση.
- Διερεύνηση της ρύθμισης της Net1 από τον TGF-β σε καρκινικές κυτταρικές σειρές και του ρόλου της σε διεργασίες που σχετίζονται με τον καρκίνο, όπως η διεισδυτικότητα και η μετάσταση.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα κυτταρικά μοντέλα:

- η ανθρώπινη επιθηλιακή κυτταρική σειρά HaCaT, η οποία προήλθε από τον αυθόρμητο μετασχηματισμό κερατινοκυττάρων από ιστολογικά φυσιολογικό δέρμα.
- η ανθρώπινη επιθηλιακή καρκινική σειρά JEG3 χοριοκαρκινώματος από πλακούντα
- η ποντικίσια κυτταρική σειρά ινοβλαστών Swiss 3T3
- η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK 293T, η οποία προήλθε από τον μετασχηματισμό εμβρυϊκών κυττάρων νεφρού και χρησιμοποιήθηκε για την αναπαραγωγή των ανασυνδισμένων αδενοϊών
- οι καρκινικές κυτταρικές σειρές μαστού MCF7, T47D, MDAMB231 και η καρκινική σειρά προστάτη DU145.

Όλες οι παραπάνω κυτταρικές σειρές καλλιεργούνται σε μονοστοιβάδες μέσα σε πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 75 cm², σε επωαστήρα (Forma Series II, Thermo Electron Corporation, Ohio, USA) με υγρή ατμόσφαιρα σύστασης 5% CO₂ – 95% αέρας και θερμοκρασία 37°C. Ως βασικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιείται DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) που περιέχει GlutaMAX™ I, 4500 mg/ml γλυκόζη και πυρροβικό νάτριο (Gibco-BRL, MD, USA) (HaCaT, JEG3, Swiss 3T3, HEK293 και MDAMB231) καθώς και 10μg/ml ινσουλίνη (MDF7) ή RPMI 1640 που περιέχει L-Glutamine και 25mM HEPES (DU145), εμπλουτισμένο με 10% αδραντοποιημένο (μέσω θέρμανσης στους 56°C για 30 λεπτά) ορό εμβρύου βοός (FBS) (Biocrom, Berlin, Germany) και με προσθήκη 1% πενικιλίνης – στρεπτομυκίνης (Gibco-BRL, MD, USA). Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 48 ή 72 ώρες. Για την ανακαλλιέργεια, όταν τα κύτταρα φτάνουν σε πλήρη ανάπτυξη (100% πληρότητα στην επιφάνεια καλλιέργειας, confluence), εκτίθενται σε διάλυμα τρυψίνης (0.25% τρυψίνη – EDTA) (Gibco-BRL, MD, USA) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της φλάσκας παραλαμβάνονται με θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και μοιράζονται σε νέες φλάσκες με αραιώση 1:10 – 1:5. Στην περίπτωση διεξαγωγής πειραμάτων, τα κύτταρα - αφού προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους με τη βοήθεια αιματοκυτομέτρου – αραιώνονται στην επιθυμητή συγκέντρωση και μοιράζονται σε τρυβλία διαφόρων διαμέτρων (π.χ. 6-well, p60, p100 plates) ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Πριν από την επίδραση με TGF-β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) τα κύτταρα καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού για 24 ώρες. Για μορφολογικές παρατηρήσεις τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε εύρος 10-12 γενεών από τη στιγμή της απόψυξης των κυττάρων και της εισαγωγής τους σε καλλιέργεια.

Για την κατάψυξη των κυττάρων, κυτταρικό εναιώρημα (περίπου 1×10^6 κύτταρα/ ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας) συμπληρώνεται με DMSO (Sigma, St Louis, MI, USA) σε τελική συγκέντρωση 5% v/v θρεπτικού μέσου με 10% FBS και κλάσματα του 1.5 ml μεταφέρονται σε ειδικά φιαλίδια (cryotubes) και ακολούθως φυλάσσονται στους -80°C . Κατά την απόψυξη των κυττάρων, ένα καταψυγμένο φιαλίδιο θερμαίνεται στους 37°C , το περιεχόμενό του αραιώνεται με 5 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και ακολούθως φυγοκεντρείται σε 1200 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 5 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και τοποθετούνται σε μικρή πλαστική φλάσκα επιφάνειας 25 cm^2 . Μόλις τα κύτταρα φτάσουν σε πλήρη ανάπτυξη, αφού τρυψινοποιηθούν, μεταφέρονται σε φλάσκα επιφάνειας 75 cm^2 και ακολουθεί η καλλιέργεια τους όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.1.1. Παροδική επιμόλυνση κυττάρων

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν παροδικές επιμολύνσεις με μικρά παρεμβατικά μόρια RNA (siRNA), με microRNA μόρια (miRNA) και με πλασμιδιακό DNA. Η επιμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου Lipofectamine Reagent 2000 (Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) με τη βοήθεια του θρεπτικού μέσου OPTI-MEM® I (Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Στα πλαίσια αυτών των πειραμάτων τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών (6 well plates) σε συγκέντρωση 5×10^5 κύτταρα/ οπή σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS παρουσία αντιβιοτικών, το οποίο αντικαθίσταται με 800 μl θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 10% FBS χωρίς αντιβιοτικά 1 ώρα περίπου πριν τη διαδικασία της επιμόλυνσης. Ακολούθως σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf αναμιγνύονται 100 μl OPTI-MEM με κατάλληλη ποσότητα siRNA ή microRNA και σε ένα δεύτερο σωληνάριο αναμιγνύονται 100 μl OPTI-MEM με αντίστοιχη ποσότητα Lipofectamine Reagent 2000. Το περιεχόμενο του πρώτου σωληναρίου προστίθεται στο δεύτερο σωληνάριο και το τελικό μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20-30 λεπτά. Στο τέλος το παραπάνω μίγμα προστίθεται στάγδην σε κάθε οπή που περιέχει 800 μl θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 10% FBS χωρίς αντιβιοτικά και τα κύτταρα επωάζονται για 16-24 ώρες στους 37°C . Μετά την πάροδο των 16-24 ωρών αφαιρείται το θρεπτικό που περιέχει το σύμπλοκο νουκλεοτιδίων/ Lipofectamine και αντικαθίσταται είτε με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για τη συνέχιση του πειράματος, είτε με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS χωρίς αντιβιοτικά για ένα δεύτερο γύρο επιμόλυνσης.

Για την αποσιώπηση των Smad2 και Smad3 χρησιμοποιήθηκαν 200 pmol (10 μl siRNA συγκέντρωσης 20 μM) από το κάθε siRNA (siSmad2, siSmad3) (Eurofins MWG Operon Ebersberg, Germany) με 10 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 για τα HaCaT και JEG3 κύτταρα ή Lipofectamine RNAiMAX για τα Swiss 3T3 και η διαδικασία της επιμόλυνσης πραγματοποιήθηκε σε δύο γύρους. Για την αποσιώπηση των δύο ισομορφών της Net1, Net1

και Net1A στα HaCaT κερατινοκύτταρα, καθώς και της Vav2 στα JEG3 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 160 pmol (8 μl siRNA συγκέντρωσης 20 μM) από το κάθε siRNA (siNet1, siNet1A ή siVav2) (Eurofins MWG Operon) με 7 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 σε ένα γύρο επιμόλυνσης. Οι αλληλουχίες των siRNA δίνονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.1: Οι αλληλουχίες των siRNA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα αποσιώπησης.

| siRNA | Αλληλουχία (5'-3') |
|------------------|---------------------|
| negative control | CAGUCGCGUUUGCGACUGG |
| hNet1 | AAGAAAACGCAGAGAGAAA |
| hNet1A | CAAGAGGAGCCAAGCAAUA |
| hVav2 | CAGAAGAUAUGAAGAGGAA |
| hSmad3 | CCGCAUGAGCUUCGUCAAA |
| m/hSmad2 | GAAUUGAGCCACAGAGUAA |
| mSmad3 | GCACAGCCACCAUGAAUUA |

Για την υπερέκφραση των miRNAs, hsa-pre-miR-24 και hsa-pre-miR-155 (AMBION, Austin, USA) χρησιμοποιήθηκαν 100 pmol από κάθε miRNA (10 μl miRNA συγκέντρωσης 10 μM) σε συνδυασμό με 4 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000, ενώ για την αποσιώπηση των miRNAs, miR-24 και miR-155, χρησιμοποιήθηκαν 120 pmol (12 μl αναστολέα συγκέντρωσης 10 μM) από κάθε αναστολέα, anti-miR-24 και anti-miR-155 inhibitors (AMBION) με 5 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000.

Για τα πειράματα προσδιορισμού της ενεργότητας της λουσιφεράσης χρησιμοποιήθηκαν ανά συνθήκη 2 μg ολικού DNA με 4.5 μl αντιδραστηρίου Lipofectamine 2000 σε τρυβλία 6 οπών και κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια έκφρασης των αγρίου τύπου μορφών των Smad2 (wt-Smad2), Smad3 (wt-Smad3) και Smad4 (wt-Smad4) και της συνεχώς ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGF-β (ALK5-ca, constitutively active) καθώς και ο άδειος πλασμιδιακός φορέας pGL3b ως πλασμίδιο ελέγχου, τα οποία ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Καθ.Δ.Καρδάση. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι κατασκευές των πλασμιδίων αναφοράς (-909/+57)Net1-Luc (50-100 ng) and (-926/+126)Net1A-Luc (50-100 ng), που αντιστοιχούν σε τμήμα του υποκινητή του γονιδίου Net1 και στον υποθετικό υποκινητή της Net1A, η κατασκευή των οποίων περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.12. Τέλος σε κάθε συνθήκη πραγματοποιήθηκε παράλληλη συνεπιμόλυνση με το πλασμίδιο έκφρασης που περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (0.5 μg) με σκοπό την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης όπως περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 2.13.

2.1.2 Παροδική διαμόλυνση κυττάρων με αδenoϊούς

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών σε συγκέντρωση 3×10^4 κύτταρα/ οπή σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας εμπλουτισμένο με 10% FBS, το οποίο αντικαθίσταται με θρεπτικό

μέσο εμπλουτισμένο με 3% FBS 3 ώρες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων. Ακολούθως, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από κάθε αδενοϊό στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων και τα κύτταρα επωάζονται για 24 ώρες στους 37°C. Την επόμενη μέρα απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο που περιέχει τους αδενοϊούς και τα κύτταρα επωάζονται με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό για τη συνέχιση του πειράματος. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξής αδενοϊοί: ο αδενοϊός που εκφράζει τη β-γαλακτοσιδάση (αδενοϊός ελέγχου) (ad-Lacz), καθώς και οι αδενοϊοί που εκφράζουν τις αγρίου τύπου μορφές των πρωτεϊνών Smad2 (ad-Smad2) και Smad3 (ad-Smad3) και την συνεχώς ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGF-β (ad-ALK5-ca). Οι ανασυνδισμένοι αδενοϊοί ήταν δώρο από τον K.Miyazono, Tokyo [207].

2.1.3 Αναπαραγωγή ανασυνδισμένων αδενοϊών

Για την αναπαραγωγή των ανασυνδισμένων αδενοϊών ad-Lacz, ad-Smad2, ad-Smad3 και ad-ALK5-ca, χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK 293 (human embryonic kidney cells, packaging cell line), η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των αδενοϊών, επειδή εκφράζει τα γονίδια E1 και E2 που είναι απαραίτητα για την αναπαραγωγή των αδενοϊών, αλλά απουσιάζουν από το ανασυνδισμένο γονιδίωμά τους.

Συγκεκριμένα για την αναπαραγωγή κάθε αδενοϊού, τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm (4-5), σε συγκέντρωση 1×10^6 κύτταρα/ τρυβλίο σε θρεπτικό μέσο με 10% FBS (5-8 ml), το οποίο αντικαθίσταται με θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 3% FBS 2-3 ώρες πριν τη διαμόλυνση των κυττάρων με τον αδενοϊό. Ακολούθως προστίθενται 5-10 μl αδενοϊού παλιότερης γενιάς και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για περίπου 2-3 μέρες μέχρι να αποκολληθούν από την επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια συλλέγεται το εναιώρημα των κυττάρων από κάθε τρυβλίο, τα κύτταρα λύονται με 3 διαδοχικές επαναλήψεις ψύξης (-80°C) και απόψυξης (37°C) (freeze and thaw) και φυγοκεντρούνται στις 5.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τον ανασυνδισμένο αδενοϊό, μοιράζεται σε αποστειρωμένα φιαλίδια (cryotubes) και φυλάσσεται στους -80°C. Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη συγκέντρωση του αδενοϊού στο υπερκείμενο διάλυμα, τα κύτταρα που συλλέγονται μόλις αποκολληθούν από τα τρυβλία, φυγοκεντρούνται πρώτα στις 2.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο, ο οποίος θα είναι και ο τελικός όγκος διαλύματος που θα περιέχει τα ισοσμάτια του αδενοϊού.

Στα πειράματα διαμόλυνσης κυττάρων με αδενοϊούς χρησιμοποιήθηκε πολλαπλότητα διαμόλυνσης (multiplicity of infection) τέτοια ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός διαμόλυνσης των κυττάρων και έκφρασης των πρωτεϊνών χωρίς εμφανή κυτταροπαθολογικά αποτελέσματα. Η έκφραση των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3 από τους αντίστοιχους αδενοϊούς ελέγχεται με Western blot χρησιμοποιώντας ως πρώτο αντίσωμα το anti-flag-M5 (Sigma, St Louis, MI, USA), διότι αυτές οι ανασυνδισμένες πρωτεΐνες φέρουν τον επίτοπο flag (tag) στο αμινοτελικό τους άκρο. Η έκφραση του συνεχώς ενεργού υποδοχέα τύπου I

ALK5-ca ελέγχεται με αντίσωμα κατά του υποδοχέα ALK5 (προσφορά του Α.Μουστάκα, Ουπσάλα, Σουηδία).

2.2 Ανοσοφθορισμός

Στην παρούσα μελέτη η τεχνική του ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκε για την μικροσκοπική παρατήρηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης που μεσολαβούνται από την πρωτεΐνη E-cadherin και του μεσεγχυματικού δείκτη φιμπρονεκτίνη (fibronectin) στα πλαίσια της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) που προκαλείται από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για να προκληθεί η επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή στα HaCaT κερατινοκύτταρα είναι η εξής:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών σε θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο με 10% FBS και 24 ώρες πριν την επίδραση με TGF-β επωάζονται με θρεπτικό μέσο με 2% FBS. Μετά την πάροδο των 24 ωρών αφαιρείται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και προστίθεται διάλυμα τρυψίνης-EDTA για 2-5 λεπτά. Τα κύτταρα που αποκολλήθηκαν παραλαμβάνονται με 1 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με 2% FBS/ οπή και 150-200 μl εναιωρήματος κυττάρων/ οπή μεταφέρεται σε νέο τρυβλίο 6 οπών που περιέχει γυάλινες καλυπτρίδες διαστάσεων 22 x 22 mm και 1 ml θρεπτικού μέσου με 2% FBS/ οπή. Ακολουθεί επίδραση με 5 ng/ml TGF-β και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για 48 ώρες.

2.2.1 Άμεσος ανοσοφθορισμός των μικροϊνιδίων της ακτίνης

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός εφαρμόστηκε για την μικροσκοπική παρατήρηση των ινιδίων της ακτίνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου της φαλλοϊδίνης που είναι σημασμένο με το χρωμοφόρο ροδαμίνη. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ειδική σύνδεση της φαλλοϊδίνης με τα μικροϊνίδια της ακτίνης με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης, η οποία καθιστά δυνατή στη συνέχεια την παρατήρηση των ινιδίων με μικροσκοπία φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρατήρηση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα πλαίσια της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) που προκαλείται από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα είναι η εξής:

Μετά την πάροδο των 48 ωρών επώασης με 5 ng/ml TGF-β, αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με διάλυμα PBS (1.8 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH: 7.2) και μονιμοποιούνται με διάλυμα 3% π-φορμαλδεΰδης σε PBS για 30 λεπτά. Μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών με διάλυμα PBS, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επώαση του δείγματος με διάλυμα 0.5% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά. Μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών με διάλυμα PBS τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα PBS/ 5% FBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα φαλλοϊδίνης-ροδαμίνης (Invitrogen/ Molecular Probes) σε αραιώση

1:100 σε PBS/ 5% FBS για 40 λεπτά σε υγρό και σκοτεινό περιβάλλον. Τέλος, μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών με διάλυμα PBS οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες έχει προστεθεί μία σταγόνα από το αντιδραστήριο ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen/ Molecular Probes) για τη χρώση των πυρήνων και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

2.2.2 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Κατά τον έμμεσο ανοσοφθορισμό οι κυτταρικές πρωτεΐνες αναγνωρίζονται από ειδικά για αυτές αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από τις αντίστοιχες ανοσοσφαιρίνες που είναι σημασμένες με κάποιο φθορίζον μόριο, όπως είναι για παράδειγμα η φλουορεσκεΐνη (FITC). Το σύμπλοκο πρωτεΐνη – αντίσωμα – ανοσοσφαιρίνη – φθορίζον μόριο εκπέμπει μέσω της φθορίζουσας ουσίας φθορισμό μετά από διέγερση με ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος, καθιστώντας έτσι εφικτή την παρατήρηση του με μικροσκοπία φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την μικροσκοπική παρατήρηση της πρωτεΐνης των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης E-cadherin καθώς και της πρωτεΐνης των μεσεγχυματικών κυττάρων φιβρονεκτίνη (fibronectin) στα πλαίσια της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT) που προκαλείται από τον TGF- β στα HaCaT κερατινοκύτταρα είναι η εξής:

Μετά την πάροδο των 48 ωρών επώασης με 5 ng/ml TGF- β , αφαιρείται το θρεπτικό μέσο και τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με διάλυμα PBS (1.8 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH: 7.2). Για την χρώση της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης E-cadherin τα κύτταρα μονιμοποιούνται με μίγμα μεθανόλης – ακετόνης σε αναλογία 1:1 για 20 λεπτά στους -20°C και μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών με διάλυμα PBS τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα PBS/ 5% FBS/ 0.1 M γλυκίνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 16 περίπου ώρες στους 4°C . Για τη χρώση της φιβρονεκτίνης τα κύτταρα μονιμοποιούνται με διάλυμα 3% π-φορμαλδεϋδης σε PBS για 30 λεπτά και μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών με διάλυμα PBS, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επώαση του δείγματος με διάλυμα 0.5% Triton X-100 σε PBS για 10 λεπτά. Μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα PBS/ 5% FBS/ 0.1 M γλυκίνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 16 περίπου ώρες στους 4°C .

Την επόμενη μέρα τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές με διάλυμα PBS/ 5% FBS για 3 λεπτά και ακολούθως επωάζονται με το πρώτο αντίσωμα κατά της E-cadherin (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) σε αραιώση 1:200–1:300, ή κατά της φιβρονεκτίνης (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) σε αραιώση 1:500 σε διάλυμα PBS/ 5% FBS για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα PBS/ 5% FBS για 3 λεπτά και επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα IgG κατά αντιορού ποντικού σημασμένο με φλουορεσκεΐνη (FITC-conjugated anti-mouse IgG) (Chemicon) σε αραιώση 1:100 σε PBS/ 5% FBS για 1 ώρα. Τέλος μετά από 3 πλύσεις των 3 λεπτών με διάλυμα PBS,

οι καλυπτρίδες τοποθετούνται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες, στις οποίες έχει προστεθεί μία σταγόνα από το αντιδραστήριο ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen/ Molecular Probes) για τη χρώση των πυρήνων και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Leica DM 2500 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd., Cambridge, UK) με φακό 20x ή 40x. Η επεξεργασία των εικόνων (ρύθμιση φωτεινότητας και κοντράστ) έγινε με το λογισμικό Photoshop CS3.

2.3 Απομόνωση πρωτεϊνικών κυτταρικών εκχυλισμάτων

2.3.1 Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών πρωτεϊνών

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαφόρων διαμέτρων (6-well, p60, p100) ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και την πλύση των κυττάρων 1 φορά με παγωμένο διάλυμα φωσφορικών, PBS, τα κύτταρα λύνονται με 80-800 μl (ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων και την επιθυμητή τελική συγκέντρωση των ολικών πρωτεϊνών στο δείγμα) παγωμένου διαλύματος λύσης (50 mM Tris-HCl, pH: 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% v/v Triton X-100) που περιέχει αναστολείς πρωτεασών: 10 μg/ml aprotinin (Sigma-Aldrich), 10 μg/ml leupeptin (Sigma-Aldrich), 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich) και φωσφατασών: 1 mM Na_3VO_4 (Sodium Orthovanadate, Sigma-Aldrich), ειδικά όταν πρόκειται να προσδιοριστούν φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες. Το κυτταρικό εκχύλισμα αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Ακολούθως παραλαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις ολικές πρωτεΐνες και είτε προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του για να χρησιμοποιηθεί άμεσα στην προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και ανοσοανίχνευση είτε φυλάσσεται στους -20°C για μετέπειτα χρήση.

2.3.2 Απομόνωση πυρηνικών και κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία p100 και μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και την πλύση των κυττάρων 1 φορά με παγωμένο διάλυμα φωσφορικών, PBS, παραλαμβάνονται σε 1 ml PBS και φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 5 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 200 μl παγωμένου διαλύματος A (Buffer A: 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM EDTA, 0.5% NP-40) και επωάζεται για 15 λεπτά στον πάγο. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 6 λεπτά και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο ως το κυτταροπλασματικό κλάσμα. Το ίζημα των πυρήνων επαναδιαλύεται σε 40 μl παγωμένου διαλύματος C (Buffer C: 20 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, 25% glycerol) και επωάζεται για 30 λεπτά στον πάγο. Μετά το πέρας των 30 λεπτών προστίθενται 30 μl παγωμένου διαλύματος D (Buffer D: 20 mM HEPES pH 7.9, 0.05 M

KCl, 0.2 mM EDTA, 20% glycerol) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά. Τέλος το υπερκείμενο συλλέγεται ως το πυρηνικό κλάσμα.

Τα διαλύματα A, C και D πριν την χρήση τους εμπλουτίζονται με αναστολείς πρωτεασών (10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin και 1 mM PMSF), φωσφατασών (1 mM Na_3VO_4) και με τον αποδιατακτικό παράγοντα DTT (1 mM).

2.3.3 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών ενός κυτταρικού εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης των πρωτεϊνών στα 595 nm μετά από σύνδεσή τους με τη χρωστική Bradford. Συγκεκριμένα αναμιγνύεται 1 ml από αραιωμένο αντιδραστήριο Bradford (1:5 με απιονισμένο νερό) με 5 µl από το πρωτεϊνικό διάλυμα. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm πρότυπων διαλυμάτων βόειου αλβουμίνης (BSA) γνωστής συγκέντρωσης: 0, 2, 5, 10, 15, 20 µg/µl και από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης (µg/µl), η οποία διέπεται από εξίσωση της μορφής: $y=ax+b$. Στη συνέχεια ακολουθεί φωτομέτρηση στο ίδιο μήκος κύματος των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων εις διπλούν και υπολογισμός της μέσης τιμής της απορρόφησης κάθε δείγματος. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα. Στην περίπτωση πολύ πυκνών πρωτεϊνικών διαλυμάτων, πριν τη φωτομέτρηση πραγματοποιείται αραιώση 1:2–1:5 με το διάλυμα λύσης της ποσότητας του δείγματος που πρόκειται να φωτομετρηθεί.

2.4 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης παρουσία SDS (SDS-PAGE)

2.4.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται είτε ίσος όγκος 2X είτε το 1:3 του όγκου του πρωτεϊνικού δείγματος 4X αποδιατακτικού διαλύματος (1X sample buffer: 62.5 mM Tris-HCl, pH: 6.8, 2% w/v SDS, 10% v/v glycerol, 0.002% bromophenol blue, 5% β-μερκαπταιθανόλη ή 50 mM DTT) και ακολούθως θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών και η κάλυψή τους από μόρια SDS έχει σαν συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα στο πήκτωμα της πολυακρυλαμιδίου να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους κατά μήκος του πηκτώματος.

2.4.2 Προετοιμασία πηκτώματος

Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αναμιγνύονται όλα τα συστατικά του διαλύματος εκτός από το APS και το TEMED, τα οποία λειτουργούν ως καταλύτες για την απαρχή και διατήρηση

του πολυμερισμού αντίστοιχα, οπότε προστίθενται στο τέλος λίγο πριν την έγχυση του διαλύματος στον κενό χώρο πάχους 1.5 mm που δημιουργείται μεταξύ των δύο γυάλινων τζαμιών. Αρχικά εγχύνεται το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel: διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 10 ή 12% w/v: 0.375 M Tris-HCl, pH: 8.8, 0.1% w/v SDS, 0.1% w/v APS, 0.03% v/v TEMED) και η ελεύθερη επιφάνεια του καλύπτεται με μικρό όγκο ισοπροπανόλης μέχρι να πολυμεριστεί. Μόλις πολυμεριστεί, αφαιρείται η ισοπροπανόλη και προστίθεται το πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel: διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 4.5% w/v, 0.125 M Tris-HCl, pH: 6.8, 0.1% w/v SDS, 0.1% w/v APS, 0.03% w/w TEMED) μέσα στο οποίο προστίθεται το «χτένι» για το σχηματισμό θέσεων (πηγαδιών). Αφού ολοκληρωθεί και ο πολυμερισμός του πηκτώματος επιστοιβάξης αφαιρείται το «χτένι» και τα πρωτεϊνικά δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί με ειδικά tip που έχουν πολύ λεπτό ρύγχος.

2.4.3 Ηλεκτροφόρηση

Μόλις τοποθετηθούν τα πρωτεϊνικά δείγματα γεμίζουμε τα δοχεία της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Bio-Rad) με 1X διάλυμα ηλεκτροφόρησης (10X διάλυμα ηλεκτροφόρησης: 1.92 M γλυκίνη, 0.25 M TRIZMA-base, 1% w/v SDS). Ακολούθως εφαρμόζεται σταθερή τάση 80-90 V, έως ότου τα δείγματα να εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, οπότε η τάση αυξάνεται στα 120-150 V. Τέλος, αφού απομακρυνθεί το πήκτωμα επιστοιβάξης, το πήκτωμα διαχωρισμού υφίσταται ανοσοαποτύπωση (Western Blot).

2.5 Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

2.5.1 Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot)

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης συναρμολογείται το «σάντουιτς» μεταφοράς ως εξής: μεταξύ δύο σφουγγαριών της συσκευής και από το λευκό τμήμα του πλαστικού υλικού εντός του οποίου τοποθετείται το «σάντουιτς» προς τα πάνω τοποθετούνται κατά σειρά ένα χαρτί Whatman, το πήκτωμα, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και μετά ένα δεύτερο χαρτί Whatman, όλα εμβαπτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς και με προσοχή ώστε να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ τους. Το «σάντουιτς» τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς πρωτεϊνών (Bio-Rad) στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα μεταφοράς (1X transfer buffer: 20% v/v μεθανόλη, 10% διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X). Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο σταθερής έντασης 400 mA για 1-1.5 ώρα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς φροντίζουμε ώστε το διάλυμα μεταφοράς να διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C.

2.5.2 Διαδικασία ανοσοανίχνευσης

Η μέθοδος της ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στην ειδική σύνδεση του αντισώματος κατά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, με τον αντιγονικό επίτοπο της

πρωτεΐνης που είναι ακινητοποιημένη στη μεμβράνη. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ανοσοσφαιρίνη κατά αντιορού του ζώου-ξενιστή που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή του πρώτου ειδικού αντισώματος, η οποία στοχεύει στο πρώτο αντίσωμα και συνδέεται με αυτό. Η δεύτερη ανοσοσφαιρίνη είναι συνδεδεμένη μέσω χημικού δεσμού με το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase, HRP). Το σύμπλοκο πρωτεΐνη – πρώτο αντίσωμα – δεύτερο αντίσωμα – υπεροξειδάση ανιχνεύεται με το αντίδραστήριο ECL, το οποίο περιέχει το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης. Μόλις η υπεροξειδάση αντιδράσει με το υπόστρωμά της παράγεται χημειοφωταύγεια (chemiluminescence), η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση ειδικού φιλμ Hyperfilm ECL.

Αρχικά η μεμβράνη αναδεύεται σε διάλυμα 5% αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλακτος σε TBS-T (blocking buffer) (TBS-T: 20 mM Tris-HCl, pH:7.6, 137 mM NaCl, 0.05% v/v Tween-20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μετά από 1 έκπλυση των 5 λεπτών με TBS-T, η μεμβράνη επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα σε κατάλληλη αραίωση για περίπου 16 ώρες στους 4°C. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πρώτα αντισώματα στις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

| | |
|--|---------------------------|
| anti-actin (mouse) (Chemicon) | 1:5000 σε TBS-T |
| anti-RhoA (mouse) (Santa Cruz) | 1:100 σε TBS-T |
| anti-RhoB (rabbit) (Santa Cruz) | 1:100 σε blocking buffer |
| anti-tubulin (mouse) (Chemicon) | 1:1000 σε TBS-T |
| anti-Lamin B (rabbit) (Santa Cruz) | 1:100 σε blocking buffer |
| anti-phospho-Smad2 (rabbit) (Cell Signaling) | 1:1000 σε TBS-T/ 5% BSA |
| anti-flag-M5 (mouse) (Sigma-Aldrich) | 1:2000σε TBS-T |
| anti-Net1 (goat) (Santa Cruz) | 1:100 σε blocking buffer |
| anti-phospho-Erk1/2 (mouse) (Sigma-Aldrich) | 1:2000 σε blocking buffer |
| anti-Smad2/3 (rabbit) (Santa Cruz) | 1:100 σε blocking buffer |
| anti-Vav2 (rabbit) (Cell Signaling) | 1:500 σε blocking buffer |
| anti-phospho-Src (Y418) (rabbit) (Biosource/Invitrogen) | 1:1000 σε TBS-T/ 5% BSA |
| anti-phospho-Src (Y529) (rabbit) (Biosource/Invitrogen) | 1:1000 σε TBS-T/ 5% BSA |

Ακολούθως η μεμβράνη εκπλένεται 2 φορές για 10 λεπτά κάθε φορά με TBS-T (όταν το δεύτερο αντίσωμα είναι anti-rabbit-HRP ή anti-goat-HRP μπορούμε να αντικαταστήσουμε το TBS-T με απιονισμένο νερό για να μειωθεί το background σήμα) και επωάζεται με το δεύτερο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος:

| | |
|--|----------------------------|
| anti-mouse-HRP (Chemicon) | 1:10.000 σε TBS-T |
| anti-rabbit-HRP (Sigma-Aldrich) | 1:40.000 σε TBS-T/ 3% γάλα |
| anti-goat-HRP (Sigma-Aldrich) | 1:10.000 σε TBS-T/ 3% γάλα |

Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται 3 φορές (2x10 λεπτά και 1x20 λεπτά) με TBS-T – όταν το δεύτερο αντίσωμα είναι anti-rabbit-HRP ή anti-goat-HRP μπορούμε να αντικαταστήσουμε τις 2 πρώτες πλύσεις με απιονισμένο νερό για να μειωθεί το σήμα υποβάθρου (background) – και ακολούθως επωάζεται με το αντιδραστήριο εμφάνισης ECL detection system (GE Healthcare) για 1 λεπτό. Τέλος η μεμβράνη εκτίθεται σε ακτινογραφικό φιλμ, Fuji Medical X-Ray Film (Fujifilm) για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας.

2.5.3 Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (stripping)

Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα απομάκρυνσης (stripping buffer: 62.5 mM Tris-HCl, pH: 6.7, 2% w/v SDS, 100 mM β-μερκαπταιθανόλη) και θερμαίνεται για 30 λεπτά στους 50°C. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T και επανάληψη της ανοσοανίχνευσης από το στάδιο του blocking με διάλυμα TBS-T/ 5% γάλα.

2.6 Προσδιορισμός της ενεργοποίησης των μικρών Rho GTPασών RhoA/B

Η μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων των ενεργών RhoA, RhoB και RhoC σε κυτταρικά εκχυλίσματα βασίζεται στο γεγονός ότι οι Rho GTPάσες αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες τελεστές τους μόνο όταν είναι ενεργοποιημένες, δηλαδή είναι συνδεδεμένες με GTP (guanosine triphosphate: τριφωσφορική γουανοσίνη). Για το λόγο αυτό για την κατακρήμνιση συγγένειας των ενεργών RhoA, RhoB και RhoC χρησιμοποιούνται σφαιρίδια γλουταθιόνης – σεφαρόζης (glutathione – sepharose beads) συνδεδεμένα με τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-RBD, η οποία συνίσταται στη σύζευξη της πρωτεΐνης GST (glutathione-S-transferase) με τη δομική περιοχή που αλληλεπιδρά με την ενεργό Rho (RBD, Rho Binding Domain) της πρωτεΐνης-τελεστή Rhotekin.

Για τον προσδιορισμό της ενεργοποίησης των Rho GTPασών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία που προτείνεται από την κατασκευάστρια εταιρεία των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin sepharose beads (Cytoskeleton, Inc.). Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm (για την κυτταρική σειρά JEG3 χρησιμοποιείται 1 τρυβλίο, ενώ για τα HaCaT κερατινοκύτταρα 2 τρυβλία ανά συνθήκη). Κατά την συλλογή των κυττάρων, αφού εκπλυθούν 1 φορά με παγωμένο διάλυμα PBS, τα κύτταρα λύνονται με 700-800 μl διαλύματος λύσης/ συνθήκη (Cell lysis buffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.3 M NaCl, 2% IGEPAL) συμπληρωμένο με αναστολείς πρωτεασών και φωσφατασών (10 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 1 mM Na₃VO₄, 25 mM NaF) και παραλαμβάνονται με απόξεση. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στη συνέχεια στις 13.000 rpm για 4 λεπτά στους 4°C και ίσοι όγκοι από κάθε δείγμα επωάζονται με 60 μg σφαιριδίων GST-Rhotekin (18 μl σφαιριδίων συγκέντρωσης 3.3 μg/ml) για 1 ώρα στους 4°C με συνεχή ανάδευση. Μετά το πέρας της μίας ώρας τα σφαιρίδια εκπλένονται 3 φορές με 800 μl παγωμένου διαλύματος λύσης (Cell lysis buffer) κάθε φορά, όπου ανάμεσα σε κάθε πλύση φυγοκεντρούνται στις 5.000 rpm για 1

λεπτό. Μετά την τελευταία πλύση αφαιρείται το μέγιστο δυνατό υπερκείμενο διάλυμα, προστίθενται 20 µl 2X αποδιατακτικού διαλύματος (sample buffer) και ακολούθως τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Παράλληλα ετοιμάζεται ίσος όγκος ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα (40 µl), προστίθεται 1:3 του όγκου αυτού (13.3 µl) από το 4X αποδιατακτικό διάλυμα και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%, ανοσοαποτύπωση με ειδικά για κάθε Rho GTPάση πρώτα αντισώματα, ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με πυκνομετρία και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές που προκύπτουν από τις ζώνες των ολικών πρωτεϊνών.

2.7 Απομόνωση RNA

2.7.1 Απομόνωση RNA με το αντιδραστήριο TRIzol

Το RNA που απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστήριου TRIzol (Invitrogen) χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των microRNAs miR-24 και miR-155 με ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου, δεδομένου ότι η μέθοδος αυτή οδηγεί στην απομόνωση ολικού RNA το οποίο περιλαμβάνει ακόμη και μικρά μόρια RNA με λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια (όπως τα microRNAs, 5.8S rRNA, 5S rRNA και tRNAs). Το αντιδραστήριο αυτό είναι ένα μονοφασικό διάλυμα που περιέχει φαινόλη και ισοθειοκυανική γουανιδίνη, το οποίο συμβάλλει στη λύση των κυττάρων, βοηθάει στην απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα σύμπλοκα τους με το RNA και ταυτόχρονα αναστέλλει τις ριβονουκλεάσες (RNases) που ελευθερώνονται από οργανίδια, όπως ο πυρήνας και τα λυσοσώματα, κατά τη λύση των κυττάρων, με αποτέλεσμα να επιτρέπει την απομόνωση μη αποικοδομημένου RNA. Η προσθήκη χλωροφορμίου ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση διαχωρίζει το διάλυμα σε μία υδατική φάση, η οποία περιέχει αποκλειστικά το RNA και σε μία οργανική φάση από φαινόλη/χλωροφόρμιο, η οποία περιλαμβάνει τις περισσότερες πρωτεΐνες και μικρά κομμάτια DNA (50b – 10Kb), ενώ μεγαλύτερα κομμάτια DNA και κάποιες πρωτεΐνες παραμένουν στην ενδιάμεση φάση.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών ή διαμέτρου 60 mm και αφού εκπλυθούν 1 φορά με διάλυμα PBS λύονται με την προσθήκη 1 ml αντιδραστήριου TRIzol. Ακολούθως, το δείγμα επωάζεται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ώστε να επιτραπεί η πλήρης αποδέσμευση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων. Στη συνέχεια προστίθεται 1/5 (v/v) χλωροφόρμιο (200 µl για 1.00 ml TRIzol), το μίγμα αναδεύεται ζυγηρά με το χέρι για 10 δευτερόλεπτα και επωάζεται για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος στις 12.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C. Το διάλυμα κατά τη φυγοκέντρηση διαχωρίζεται σε τρεις φάσεις: στην κάτω οργανική φάση (κόκκινη), στην ενδιάμεση φάση και στην επάνω, άχρωμη και διαυγή υδατινή φάση, όπου βρίσκεται το ολικό RNA των κυττάρων. Η υδατική φάση μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα καθαρό σωληνάριο

τύπου erpendorf, προστίθενται 500 µl ισοπροπανόλης και το διάλυμα αναδεύεται ελαφρά. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C, όπου κατακρημνίζεται το RNA. Το ίζημα εκπλένεται με 1 ml 75 % αιθανόλης, το διάλυμα αναδεύεται και φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Αφού απορριφθεί το υπερκείμενο υγρό και στεγνώσει τελείως το ίζημα από την αιθανόλη εκτιθέμενο στον αέρα, είτε σε κενό αέρα), επαναδιαλύεται σε 25-40 µl απιονισμένου νερού απαλλαγμένο από RNάσες (RNase free water). Τέλος, 1.5 µl από το διάλυμα RNA (εις διπλούν) χρησιμοποιείται για φωτομέτρηση με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific) με σκοπό να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε ακόλουθες πειραματικές διεργασίες ή φυλάσσεται στους -80°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

2.7.2 Απομόνωση RNA με χρήση ειδικών στηλών

Για την απομόνωση RNA με χρήση ειδικών στηλών χρησιμοποιήθηκε το illustra RNAspin Mini RNA Isolation kit (GE Healthcare). Το RNA που απομονώθηκε με αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNA των Net1 και Net1A ισομορφών με ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου. Με τη διαδικασία αυτή απομονώνονται όλα τα μόρια RNA με μήκος μεγαλύτερο από 200 νουκλεοτίδια, παρέχοντας έτσι έναν εμπλουτισμό για το mRNA, δεδομένου, ότι τα περισσότερα μόρια RNA με λιγότερα από 200 νουκλεοτίδια (όπως το 5.8S rRNA, 5S rRNA και tRNAs, τα οποία συνολικά συνιστούν το 15-20% του ολικού RNA) επιλεκτικά αποκλείονται. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε συνοψίζεται παρακάτω:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών (6-well) και αφού εκπλυθούν 1 φορά με διάλυμα PBS λύνονται με την προσθήκη 350 µl διαλύματος RA1 στο οποίο έχουν προστεθεί 3.5 µl β-μερκαπταιθανόλης. Το δείγμα αναδεύεται με έντονο πιπετάρισμα και στη συνέχεια φιλτράρεται με τη μεταφορά του στη μονάδα RNAspin Mini Filter για να μειωθεί το ιξώδες του και φυγοκεντρείται στα 11.000 x g για 1 λεπτό. Στο ομογενοποιημένο εκχύλισμα προστίθενται 350 µl 70% αιθανόλης, το μίγμα αναδεύεται ισχυρά με vortex 2 x 5 δευτερόλεπτα, μεταφέρεται στη RNAspin Mini στήλη και φυγοκεντρείται στα 8.000 x g για 30 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθενται στη στήλη 350 µl διαλύματος MDB (Membrane Desalting Buffer) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 1 λεπτό. Στο στάδιο αυτό η απομάκρυνση των αλάτων θα καταστήσει την επακόλουθη πέψη με DNάση πιο αποτελεσματική. Για την πέψη του δείγματος με DNάση I πάνω στη στήλη, προετοιμάζεται το μίγμα της αντίδρασης με προσθήκη 10 µl ανασυσταμένης DNάσης I με 90 µl διαλύματος DNase reaction buffer σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf. Ακολούθως προστίθενται 95 µl από το μίγμα στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια η μεμβράνη της στήλης εκπλένεται την πρώτη φορά με 200 µl διαλύματος RA2 με συνακόλουθη φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 1 λεπτό, τη δεύτερη φορά με 600 µl διαλύματος RA3 με συνακόλουθη φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 1 λεπτό και την τρίτη φορά με 250 µl διαλύματος RA3 με συνακόλουθη φυγοκέντρηση στα 11.000 x g για 2 λεπτά.

Το προσδεδεμένο RNA στη μεμβράνη της στήλης εκλούεται με προσθήκη 25-40 μl nuclease-free dH_2O και φυγοκέντρηση στα 11.000 $\times g$ για 1 λεπτό. Τέλος, 1.5 μl από το διάλυμα RNA (εις διπλούν) χρησιμοποιούνται για φωτομέτρηση με το φασματοφωτόμετρο NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific) με σκοπό να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω σε ακόλουθες πειραματικές διεργασίες ή φυλάσσεται στους -80°C μέχρι τη χρήση του.

2.8 Φωτομέτρηση RNA και DNA

Ο προσδιορισμός της ποσότητας και καθαρότητας του RNA και του DNA κάθε δείγματος έγινε με φωτομέτρηση στα 260 και στα 280 nm με χρήση του φασματοφωτομέτρου NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific). Από την απορρόφηση στα 260 nm προσδιορίζεται η συγκέντρωση των διαλυμάτων, ενώ ο λόγος των απορροφήσεων που λαμβάνονται στα 260 nm και στα 280 nm (A_{260}/A_{280}) παρέχει μία εκτίμηση της καθαρότητας του RNA όσον αφορά στην παρουσία ανεπιθύμητων ουσιών, οι οποίες απορροφούν στο UV, όπως πρωτεΐνες ή φαινόλη. Καθαρό RNA έχει λόγο A_{260}/A_{280} ίσο με 2.00. Ένα δείγμα RNA θεωρείται κατάλληλο για χρήση σε RT-PCR όταν ο παραπάνω λόγος κυμαίνεται από 1.6 έως 2.2, ενώ υψηλή τιμή απορρόφησης στα 280 nm υποδεικνύει την ύπαρξη πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες εμποδίζουν τον ακριβή υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA και παρεμποδίζουν την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

2.9 Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η αντίστροφη μεταγραφή του mRNA προς συμπληρωματικό DNA (cDNA) πραγματοποιείται με το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript II (Invitrogen). Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιούνται ως εκμαγείο 500 ng ολικού RNA που έχει απομονωθεί από τα κύτταρα με τη χρήση ειδικών στηλών. Αρχικά παρασκευάζεται ένα 1^ο μίγμα το οποίο περιέχει τους τυχαίους εκκινήτες, τα τυχαία εξαμερή (random hexamers) (Promega), τα δεσοξυριβονουκλεοτίδια, dNTPs (Invitrogen) και το RNA (Πίνακας 2.2) και το μίγμα θερμαίνεται στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA.

Πίνακας 2.2: Συστατικά της αντίδρασης για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (1ο Μίγμα)

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Random Hexamers | 1 μl |
| dNTPs | 1 μl |
| RNA (100 ng/ μl) | 5 μl |
| Nuclease-free dH_2O | 6 μl |
| Τελικός όγκος | 13 μl |

Κατόπιν το μίγμα τοποθετείται στον πάγο, όπου προστίθεται ένα 2^ο μίγμα, το οποίο περιέχει το διάλυμα 5X First Strand Buffer (Invitrogen), τον αποδιατακτικό παράγοντα DTT (Invitrogen) και τον αναστολέα των RNασών RNase OUT (Invitrogen) (Πίνακας 2.3) και το μίγμα επωάζεται για 2 λεπτά στους 25°C.

Πίνακας 2.3: Συστατικά της αντίδρασης για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA (2ο Μίγμα)

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|------------------------|---------------------|
| 5X First Strand Buffer | 4 μl |
| DTT (0.1 M) | 2 μl |
| RNase OUT | 0.5 μl |
| Τελικός όγκος | 6.5 μl |

Μετά το πέρας των 2 λεπτών προστίθεται η Superscript II (0.5 μl, τελικός όγκος της αντίδρασης 20 μl), τα δείγματα επωάζονται στους 25°C για ακόμη 10 λεπτά και ακολούθως η αντίστροφη μεταγραφή τελείται στους 42°C για 50 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την απενεργοποίηση του ενζύμου και την αποδιάταξη των υβριδίων RNA-cDNA θερμαίνοντας τα δείγματα στους 72°C για 10 λεπτά. Το cDNA είτε χρησιμοποιείται αμέσως στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), είτε αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

2.10 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time quantitative PCR)

2.10.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis et. al. και έφερε πραγματική επανάσταση στη μοριακή βιολογία με εφαρμογές από τη μοριακή έρευνα στην κλινική πράξη. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει σε ελάχιστο χρόνο – που δεν υπερβαίνει τις 2-3 ώρες – την ενίσχυση με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη τους και ο περαιτέρω χειρισμός τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων.

Στο υπόστρωμα DNA προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση (από θερμοφιλα βακτήρια), μίγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPS) και το ζεύγος των εκκινητών (primers). Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95°C και ακολουθούν 30-40 κύκλοι αποδιάταξης στους 95°C, υβριδισμού των εκκινητών στους 55-60°C και πολυμερισμού στους 72°C. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA

2.10.2 RT-PCR

Η RT-PCR (Reverse Transcription – PCR) χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων. Ως υπόστρωμα της αντίδρασης χρησιμοποιείται συμπληρωματικό DNA (cDNA), μετά την αντίστροφη μεταγραφή του mRNA στόχου. Μαζί με το γονίδιο στόχο ενισχύεται και ένα γονίδιο αναφοράς, συνήθως ένα γονίδιο βασικής ενδοκυτταρικής λειτουργίας (housekeeping gene), το οποίο εκφράζεται χωρίς μεγάλες αποκλίσεις στον ιστό που εξετάζουμε (π.χ. β2-μικροσφαιρίνη, β-ακτίνη, GAPDH), με σκοπό την κανονικοποίηση (normalization) του mRNA στόχου.

2.10.3 Ποσοτική PCR με τη χρήση SYBR Green I

Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο βασίζεται στην ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και τη μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Ως φθορίζοντα μόρια χρησιμοποιούνται το SYBR Green το οποίο προσδένεται σε δίκλωνο μόριο DNA μη ειδικά, μόρια ιχνηθέτες τύπου TaqMan (TaqMan probes) και ιχνηθέτες υβριδισμού (hybridization probes) τα οποία είναι σημασμένα με φθορίζοντα μόρια και αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες στην αλληλουχία του DNA που ενισχύεται με PCR. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως φθορίζον μόριο το SYBR Green, η πρόσδεση του οποίου στο DNA οδηγεί σε αύξηση του φθορισμού που εκπέμπει κατά μία τάξη μεγέθους σε σχέση με τη χρωστική που βρίσκεται μη δεσμευμένη στο διάλυμα. Ο μηχανισμός της PCR πραγματικού χρόνου με χρήση του SYBR Green παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.1**.

Μία αντίδραση PCR μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελείται από τρεις φάσεις: την πρώιμη **φάση "υποβάθρου"** ή **φάση "θορύβου" (background phase)**, την **εκθετική φάση (exponential growth phase)** ή **λογαριθμική φάση (log phase)** και τη φάση **"κορεσμού" (plateau)** (**Εικόνα 2.2**). Η φάση του θορύβου διαρκεί έως ότου το σήμα του προϊόντος της PCR είναι μεγαλύτερο από το σήμα του υποβάθρου του συστήματος, οπότε η φάση της εκθετικής ανάπτυξης ξεκινά μόλις συσσωρευτεί επαρκής ποσότητα προϊόντος, έτσι ώστε να είναι ανιχνεύσιμο πάνω από το θόρυβο. Λόγω της παρουσίας αναστολέων της αντίδρασης εντός του εκμαγείου, τον περιορισμό των αντιδραστηρίων ή τη συσσώρευση πυροφωσφορικών κάποια στιγμή το προϊόν παύει να παράγεται με εκθετικό ρυθμό και η αντίδραση εισέρχεται στη φάση "κορεσμού". Κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης η ενίσχυση του προϊόντος περιγράφεται από τη σχέση:

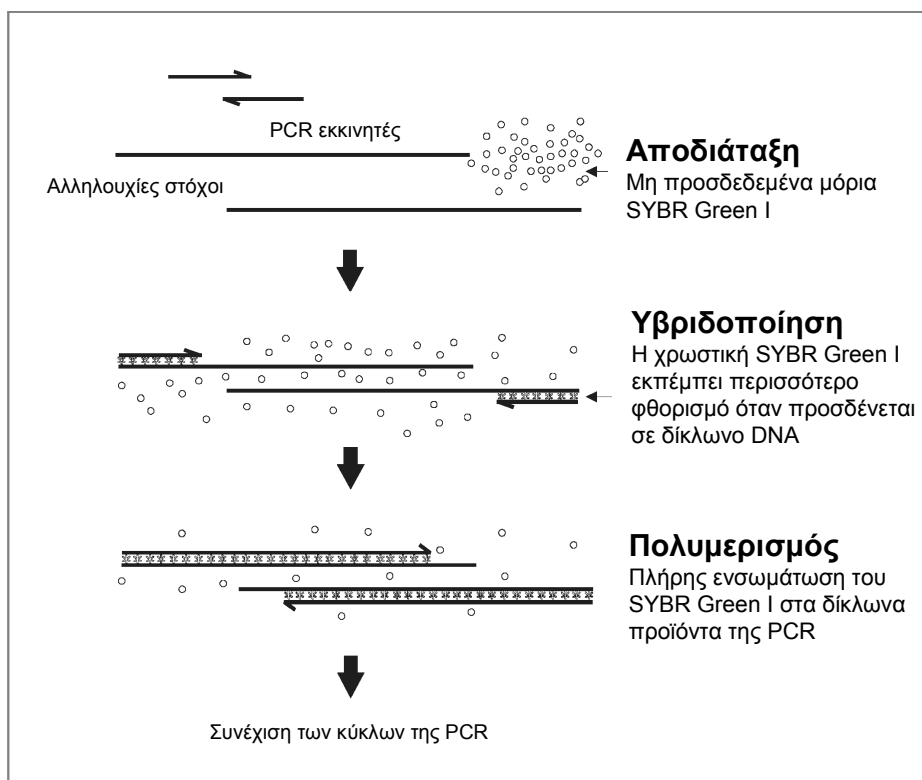
$$N = N_0 (1+E)^n$$

Όπου: **N** η ποσότητα του προϊόντος

N₀ η αρχική ποσότητα του DNA στόχου

n ο αριθμός των κύκλων της PCR και

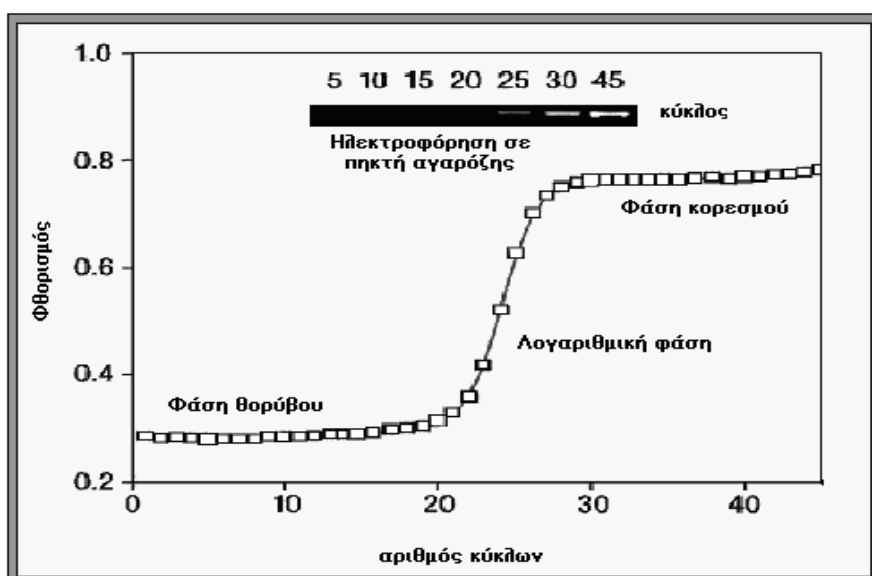
E η μέση απόδοση (efficiency) της αντίδρασης PCR για κάθε κύκλο



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.

Θεωρητικά, η μέγιστη τιμή του $1+E$ είναι 2, δηλαδή το προϊόν διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Όμως στην πράξη το E έχει μικρότερη τιμή από το 1 (απόδοση 100%), διότι εξαρτάται σημαντικά από τις πειραματικές συνθήκες, καθώς μεταβολές σε παράγοντες όπως η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, θερμοκρασία και χρόνος επηρεάζουν την απόδοση της αντίδρασης. Στο ξεκίνημα της λογαριθμικής φάσης η E θεωρείται, ότι παραμένει σταθερή για 2-5 κύκλους και μπορεί να μετρηθεί με τη βοήθεια προτύπων συγκεντρώσεων γενωμικού υλικού. Η συνεχής παρακολούθηση της έντασης φθορισμού στην αντίδραση PCR σε πραγματικό χρόνο (**Εικόνα 2.2**) κάνει εύκολη την αναγνώριση των κύκλων αυτών.

Όπως προαναφέρθηκε κατά την αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος που έχει ενισχυθεί μέχρι εκείνο το σημείο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο υπόστρωμα είναι παρόν κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος αριθμός κύκλων θα απαιτείται για να οδηγηθούμε στο σημείο στο οποίο το σήμα φθορισμού καταγράφεται ως στατιστικά σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το σήμα υποβάθρου. Αυτό το σημείο ορίζεται ως **Ct (σημείο τομής, crossing point)**. Το σημείο αυτό είναι ανάλογο της αρχικής ποσότητας του DNA ή RNA ή cDNA που υπήρχε στα δείγματα. Μικρότερα Ct υποδεικνύουν δείγματα με μεγαλύτερες αρχικές ποσότητες γενετικού υλικού [208].



Εικόνα 2.2: Παρακολούθηση των τριών φάσεων της ποσοτικής PCR σε πραγματικό χρόνο με φθορισμό και σύγκριση με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης της συμβατικής αντίδρασης PCR σε αντίστοιχο αριθμό κύκλων.

Πειραματική πορεία

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν με ποσοτική qRT-PCR τα mRNA των 2 ισομορφών του γονιδίου Net1, Net1 και Net1A. Ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης. Η ανίχνευση των σχηματιζόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το προϊόν Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas). Για την ενίσχυση των mRNA των ισομορφών Net1 και Net1A, καθώς και για το γονίδιο αναφοράς της β-ακτίνης παρασκευάζεται το μίγμα της αντίδρασης που παρουσιάζεται στον **Πίνακα 2.4**.

Πίνακας 2.4: Συστατικά της αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση του mRNA των ισομορφών Net1, Net1A και του γονιδίου β-actin.

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|---------------------------------|---------------------|
| 2X SYBR Green Master Mix | 10 μl |
| Πρόσθιος εκκινητής (10 μM) | 0.5 μl |
| Ανάστροφος εκκινητής (10 μM) | 0.5 μl |
| Nuclease-free dH ₂ O | 4 μl |
| cDNA (αραιωμένο 1:5) | 5 μl |
| Τελικός όγκος | 20 μl |

Το μίγμα της αντίδρασης για την ενίσχυση του κάθε mRNA παρασκευάζεται με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων από όλα τα παραπάνω συστατικά με τους εκκινητές για το κάθε mRNA για η αριθμό δειγμάτων χωρίς την προσθήκη του cDNA. Για κάθε ποσότητα συστατικού που πρέπει να προστεθεί για η αριθμό δειγμάτων, προσθέτουμε μία περίσσεια 10%, λόγω

σφαλμάτων και αποκλίσεων κατά το πιπετάρισμα. Αφού αναμειχθεί το μίγμα για κάθε γονίδιο προσεκτικά, μοιράζονται 15 μl σε ένα 96-well plate και ακολούθως προστίθενται 5 μl cDNA για κάθε δείγμα (το οποίο έχει ήδη αραιωθεί 1:5 με nuclease free dH₂O), ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μl. Σε κάθε πείραμα προσδιορίστηκαν στο ίδιο plate και τα 3 mRNAs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του plate στις 1000 rpm για 1 λεπτό, το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται στο μηχάνημα Mx3000 Real-Time Thermal Cycler (Stratagene). Οι συνθήκες της αντίδρασης qRT-PCR δίνονται στον **Πίνακα 2.5**.

Πίνακας 2.5: Συνθήκες για την ενίσχυση του mRNA των ισομορφών *Net1*, *Net1A* και του γονιδίου *β-actin* με qPCR.

| Στάδιο PCR | Συνθήκες |
|------------------------------------|--------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95°C/ 10 min |
| Αποδιάταξη κλώνων DNA | 95°C/ 30 sec |
| Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing) | 60°C/ 30 sec |
| Πολυμερισμός (Extension) | 72°C/ 30 sec |
| Αριθμός κύκλων | 40 |

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα με qRT-PCR παρουσιάζονται στον **πίνακα 2.6**.

Πίνακας 2.6: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα με qRT-PCR

| Εκκινητής | Αλληλουχία (5'-3') |
|-------------------------|-----------------------------|
| hNet1 πρόσθιος | TTGTAAGCCTTAGCAGCCTTGAT |
| hNet1 ανάστροφος | AAATTTGCCAAGGACGTGACA |
| hNet1A πρόσθιος | CATACGAGTCCTAGATGTCAATAACCA |
| hNet1A ανάστροφος | CACGAGCCAGAGGTCGAACT |
| hβ-actin πρόσθιος | CGGCATCGTCACCAACTG |
| hβ-actin ανάστροφος | GGCACACGCAGCTCATTG |
| hFibronectin πρόσθιος | CATCGAGCGGATCTGGCCC |
| hFibronectin ανάστροφος | GCAGCTGACTCCGTTGCCCA |
| hPAI-1 πρόσθιος | GAGACAGGCAGCTCGGATTC |
| hPAI-1 ανάστροφος | GGCCTCCCAAAGTGCATTAC |
| hN-cadherin πρόσθιος | CCTGCTTCAGGCGTCTGTAGA |
| hN-cadherin ανάστροφος | TCATGCACATCCTTCGATAAAGACT |
| hSlug πρόσθιος | AGACCCTGGTTGCTTCAAGGA |
| hSlug ανάστροφος | CTCAGATTTGACCTGTCTGCAA |
| hGAPDH πρόσθιος | GGAGTCAACGGATTTGGTCGTA |
| hGAPDH ανάστροφος | GGCAACAATATCCACTTTACCA |
| mSMA πρόσθιος | AATGGCTCTGGGCTCTGTAA |
| mSMA ανάστροφος | AGAGGCATAGAGGGACAGCA |

Μετά το πέρας των κύκλων του πολυμερισμού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τους (0.2°C/sec) από τους 55°C στους 95°C ώστε να προσδιοριστεί η καμπύλη αποδιάταξης τους (Melting curve).

2.11 Αναγνώριση των microRNAs που στοχεύουν στην 3' UTR περιοχή του mRNA της Net1 με βιοπληροφορική ανάλυση

Για τον εντοπισμό πιθανών microRNA μορίων τα οποία έχουν περιοχές πρόσδεσης στην 3'UTR περιοχή (untranslated region) του mRNA του Net1, που είναι κοινή και για την ισομορφή Net1A, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική ανάλυση με χρήση του προγράμματος RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>). Συγκεκριμένα, η 3'UTR περιοχή του Net1 mRNA συγκρίθηκε με όλες τις γνωστές, ώριμες αλληλουχίες microRNAs. Τα microRNAs που είχαν τουλάχιστον 7/8 νουκλεοτίδια της seed αλληλουχίας τους συμπληρωματικά με την 3'UTR περιοχή του Net1 mRNA θεωρήθηκαν θετικά αποτελέσματα. Οι προβλέψεις αξιολογήθηκαν στη συνέχεια με το πρόγραμμα TargetScan v.5.1 (<http://www.targetscan.org/>).

2.12 Ποσοτικός προσδιορισμός των microRNA miR-24 και miR-155

Όπως προαναφέρθηκε στην § 2.7.1, για να απομονωθεί ο πληθυσμός των microRNAs από τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) για την απομόνωση ολικού RNA.

2.12.1 Αντίστροφη μεταγραφή

Για τη σύνθεση του πρώτου κλώνου συμπληρωματικού DNA (first strand cDNA) με εκμαγείο την αλληλουχία ενός microRNA χρησιμοποιήθηκε το miR-Vana qRT-PCR detection kit (AMBION). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χρήση ειδικού εκκινητή, ο οποίος αναγνωρίζει εξειδικευμένα το κάθε microRNA, με αποτέλεσμα να δημιουργείται η συμπληρωματική αλυσίδα cDNA για το κάθε microRNA ξεχωριστά με τον κατάλληλο εκκινητή.

Πίνακας 2.7: Συστατικά της αντίδρασης για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA για τα miR-24, miR-155 και το U6 RNA.

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|--------------------------------|-----------------------------|
| miRVana 5X RT Buffer | 2 μ l |
| 1X hsa-miR24-155/U6 RT primer | 0.7 μ l |
| ArrayScript Enzyme mix | 0.4 μ l |
| RNA 120-200 ng | x μ l |
| Nuclease-free H ₂ O | (6.9-x) μ l |
| Τελικός όγκος | 10 μl |

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκαν τα microRNA hsa-miR-24 και hsa-miR-155 και χρησιμοποιήθηκε ως RNA αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων το U6 snRNA (non-coding small nuclear RNA), το οποίο είναι απαραίτητο συστατικό των ευκαρυωτικών spliceosomes. Για τη σύνθεση του cDNA του miR-24, του miR-155 και του U6 RNA χρησιμοποιήθηκαν 120 ng ολικού RNA (για το miR-155 χρησιμοποιήθηκαν 200 ng) καθώς και ειδικοί εκκινητές για κάθε μόριο RNA σε ξεχωριστές αντιδράσεις. Για τον προσδιορισμό του κάθε RNA προετοιμάστηκε το μίγμα της αντίδρασης που περιγράφεται στον **Πίνακα 2.7**. Ακολούθως το μίγμα θερμαίνεται στους 37°C για 30 λεπτά και η αντίδραση τερματίζεται με θέρμανση του μίγματος στους 95°C για 10 λεπτά.

2.12.2 Προσδιορισμός των microRNAs με ποσοτική RT-PCR (qRT-PCR)

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των microRNA miR-24 και miR-155 καθώς και του RNA αναφοράς U6 RNA με qRT-PCR, χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μίγμα 2X SYBR/ROX qPCR Green Master Mix (Fermentas) που χρησιμοποιήθηκε και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των mRNAs με qRT-PCR καθώς και PCR εκκινητές για το miR-24 και το miR-155 (mirVana miR-24/miR-155 PCR primer set) και το U6 RNA (mirVana U6 PCR primer set) που είναι ειδικά σχεδιασμένοι για το miR-Vana qRT-PCR detection kit. Για την ενίσχυση των miR-24, miR-155 και του U6 RNA προετοιμάζεται το ακόλουθο μίγμα αντίδρασης:

Πίνακας 2.8: Συστατικά της αντίδρασης qPCR για την ενίσχυση των miR-24, miR-155 και του U6 RNA

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| 2X SYBR Green Master Mix | 10 μ l |
| mirVana miR-24-155/U6 PCR primer set | 0.3 μ l |
| Nuclease-free dH ₂ O | 4.7 μ l |
| cDNA (αραιωμένο 1:5) | 5 μ l |
| Τελικός όγκος | 20 μl |

Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάζεται με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων από όλα τα παραπάνω συστατικά με τους εκκινητές του κάθε RNA για η αριθμό δειγμάτων χωρίς την προσθήκη του cDNA. Για κάθε ποσότητα συστατικού που πρέπει να προστεθεί για η αριθμό δειγμάτων, προσθέτουμε μία περίσσεια 10%, λόγω σφαλμάτων και αποκλίσεων κατά το πιπετάρισμα. Αφού αναμειχθεί το μίγμα για κάθε RNA προσεκτικά, μοιράζονται 15 μ l σε ένα 96-well plate και ακολούθως προστίθενται 5 μ l cDNA για κάθε δείγμα (το οποίο έχει ήδη αραιωθεί 1:5 με nuclease free dH₂O), ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20 μ l. Σε κάθε πείραμα προσδιορίστηκαν παράλληλα στο ίδιο plate και τα 2 RNAs. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του plate στις 1000 rpm για 1 λεπτό, το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται στο μηχάνημα Mx3000. Real-Time Thermal Cycler. Οι συνθήκες της αντίδρασης qPCR δίνονται στον **Πίνακα 2.5**.

2.12.3 Προσδιορισμός των microRNAs με απλή RT-PCR

Για τον προσδιορισμό του microRNA miR-24 και του RNA αναφοράς U6 RNA με απλή RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση σύνθεσης του συμπληρωματικού cDNA 150 ng ολικού RNA για το miR-24 και 100 ng ολικού RNA για το U6 snRNA σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στην §2.12.1.

Για την PCR αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το mirVana 5X PCR Buffer που περιέχεται στο mirVana qRT-PCR detection kit (AMBION) καθώς και το ένζυμο της πολυμεράσης, GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Για την ενίσχυση του miR-24 και του U6 RNA προετοιμάζεται το ακόλουθο μίγμα αντίδρασης:

Πίνακας 2.9: Συστατικά της αντίδρασης για την ενίσχυση των miR-24 και U6 RNA με απλή PCR

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|----------------------------------|---------------------|
| mirVana 5X PCR Buffer | 5.0 μl |
| mirVana miR-24/U6 PCR primer set | 0.4 μl |
| Nuclease-free dH ₂ O | 9.4 μl |
| GoTaq Flexi DNA Polymerase | 0.2 μl |
| cDNA | 10 μl |
| Τελικός όγκος | 25 μl |

Το μίγμα της αντίδρασης παρασκευάζεται με την προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων από όλα τα παραπάνω συστατικά με τους εκκινητές του κάθε RNA για η αριθμό δειγμάτων χωρίς την προσθήκη του cDNA. Για κάθε ποσότητα συστατικού που πρέπει να προστεθεί για η αριθμό δειγμάτων, προσθέτουμε μία περίσσεια 10%, λόγω σφαλμάτων και αποκλίσεων κατά το πιπετάρισμα. Αφού αναμειχθεί το μίγμα για κάθε RNA προσεκτικά, προσθέτουμε 15 μl στα 10 μl της αντίδρασης σύνθεσης του cDNA για κάθε δείγμα, ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 25 μl. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό κυκλοποιητή και οι συνθήκες της PCR παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.10: Συνθήκες για την ενίσχυση των miR-24 και U6 RNA με απλή PCR.

| Στάδιο PCR | Συνθήκες |
|----------------------------|--------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 95°C/ 3 min |
| Αποδιάταξη κλώνων DNA | 95°C/ 15 sec |
| Υβριδοποίηση/Πολυμερισμός | 60°C/ 30 sec |
| Αριθμός κύκλων (miR-24/U6) | 20/25 |

Τα προϊόντα της αντίδρασης αναλύονται σε πήκτωμα 3% w/v αγαρόζης σε 1X TAE διάλυμα με συσκευή ηλεκτροφόρησης (Thermo Scientific Owl Separation Systems, Thermo Fischer Scientific) που περιέχει 1X TAE διάλυμα ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης στα 100 V για 40-50

λεπτά. Το μέγεθος των προϊόντων είναι περίπου 100 bp. Η διαδικασία παρασκευής του πηκτώματος περιγράφεται αναλυτικότερα στην §2.13.2.

2.13 Κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου Net1 και του υποθετικού υποκινητή της ισομορφής Net1A

2.13.1 Ενίσχυση των γενωμικών τμημάτων (-909/+57) Net1 και (926/+126) Net1A με PCR

Τα πλασμίδια αναφοράς (-909/+57) Net1-Luc και (-926/+126) Net1A-Luc δημιουργήθηκαν με PCR ενίσχυση του αντίστοιχου τμήματος του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου Net1 και της ιντρονικής περιοχής 5' ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1) του mRNA της Net1A ισομορφής (υποθετικός υποκινητής) από γενωμικό DNA και συνεπακόλουθη κλωνοποίηση τους στον πλασμιδιακό φορέα pGL3basic (Promega) στις θέσεις περιορισμού XhoI-HindIII σε σύζευξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης. Οι συνθήκες και τα συστατικά της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση της γενωμικής περιοχής -909/+57 του υποκινητή του γονιδίου Net1 παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 2.11: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της γενωμικής περιοχής -909/+57 του υποκινητή του γονιδίου Net1.

| Στάδιο PCR | Συνθήκες |
|------------------------------------|-------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C/ 3 min |
| Αποδιάταξη κλώνων DNA | 94°C/ 1 min |
| Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing) | 64°C/ 1 min |
| Πολυμερισμός (Extension) | 72°C/ 2 min |
| Αριθμός κύκλων | 40 |

Πίνακας 2.12: Συστατικά της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της γενωμικής περιοχής -909/+57 του υποκινητή του γονιδίου Net1.

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|--|---------------------|
| 5X GoTaq Flexi Buffer | 10 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3 µl |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl |
| FpNet1XhoI πρόσθιος εκκινητής (10 µM) | 5 µl |
| RpNet1HindIII ανάστροφος εκκινητής (10 µM) | 5 µl |
| DMSO | 1 µl |
| GoTaq Flexi DNA Polymerase | 0.5 µl |
| Nuclease-free dH ₂ O | 22.5 µl |
| Γενωμικό DNA (50 ng/µl) | 2 µl |
| Τελικός όγκος | 50 µl |

2. Υλικά & Μέθοδοι

Οι συνθήκες και τα συστατικά της PCR αντίδρασης για την ενίσχυση της ιντρονικής περιοχής -926/+126 (υποθετικός υποκινητής) 5' ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής (TSS: transcription start site) του mRNA της Net1A ισομορφής παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 2.13: Συστατικά της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ιντρονικής περιοχής -926/+126 (υποθετικός υποκινητής της Net1A).

| Στάδιο PCR | Συνθήκες |
|------------------------------------|-------------|
| Αρχική αποδιάταξη | 94°C/ 3 min |
| Αποδιάταξη κλώνων DNA | 94°C/ 1 min |
| Υβριδοποίηση εκκινητών (Annealing) | 62°C/ 1 min |
| Πολυμερισμός (Extension) | 72°C/ 2 min |
| Αριθμός κύκλων | 33 |

Πίνακας 2.14: Συστατικά της αντίδρασης PCR για την ενίσχυση της ιντρονικής περιοχής -926/+126 (υποθετικός υποκινητής της Net1A).

| Αντιδραστήριο | Προστιθέμενος όγκος |
|--|-----------------------------|
| 5X GoTaq Flexi Buffer | 10 μ l |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3 μ l |
| dNTPs (10 mM) | 1 μ l |
| FpNet1AXhoI πρόσθιος εκκινητής (10 μ M) | 5 μ l |
| RpNet1AHindIII ανάστροφος εκκινητής (10 μ M) | 5 μ l |
| GoTaq Flexi DNA Polymerase | 0.5 μ l |
| Nuclease-free dH ₂ O | 21.5 μ l |
| Γενωμικό DNA (50 ng/ μ l) | 4 μ l |
| Τελικός όγκος | 50 μl |

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές για την PCR ενίσχυση των αντίστοιχων γενωμικών περιοχών παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 2.15: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του υποκινητή του γονιδίου της Net1 και για τον υποθετικό υποκινητή της Net1A.

| Εκκινητής | Αλληλουχία (5'-3') |
|-------------|-------------------------------------|
| hNet1 -909 | GCGCTCGAGACGGAGTCTCGCTCTGTCACTGGGC |
| hNet1 +57 | GCGAAGCTTGGCAGAAAGCGCCTGTCAGCGGAC |
| hNet1A -926 | GCGCTCGAGGGCCTGCCAAGCCAACAAAAGTAGTG |
| hNet1A +126 | GCGAAGCTTGCAGCGCTATGCAGAGGCACACGG |

2.13.2 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)

Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης συγκέντρωσης 1–3 % w/v και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 130 ml διαλύματος 1X TAE (50X TAE: 2M Tris-HCl, pH: 7.5, 2 mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1.3-3.9 g αγαρόζης. Το μίγμα θερμαίνεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική για το DNA) και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης (Thermo Scientific Owl Separation Systems) που περιέχει 1X TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα για την ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100 V, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel (0.5% w/v αγαρόζη) γίνεται στα 50 V.

2.13.3 Απομόνωση τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα προϊόντα της PCR, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ως ενθέματα (inserts) για την κατασκευή των πλασμιδίων αναφοράς (-909/+57) Net1-Luc και (-926/+126) Net1A-Luc, καθώς και ο πλασμιδιακός φορέας pGL3basic που προέκυψαν μετά από πέψεις με τα περιοριστικά ένζυμα XhoI και HindIII (New England Biolabs) ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης 0.5% w/v σε διάλυμα 1X TAE και οι ζώνες που περιέχουν το ζητούμενο DNA απομονώνονται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας (νυστέρι). Ακολούθως, αποδεσμεύεται το DNA από το πήκτωμα αγαρόζης με τη βοήθεια των ειδικών στηλών Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία:

Η ζώνη που περιέχει το DNA τοποθετείται σε σωληνάριο τύπου erpendorf, ζυγίζεται και προστίθεται αντίστοιχος όγκος (για κάθε 10 mg πηκτώματος προστίθενται 10 μl διαλύματος) από το διάλυμα Membrane Binding Solution. Το μίγμα θερμαίνεται στους 55°C για 10 λεπτά μέχρι να λιώσει η αγαρόζη και ακολούθως μεταφέρεται στην ειδική στήλη. Μετά από επώαση για 1 λεπτό το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο αφαιρείται, προστίθενται στη στήλη 700 μl διαλύματος πλύσης (Membrane Wash Solution) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό. Μετά από μία δεύτερη πλύση με 500 μl από το ίδιο διάλυμα και συνακόλουθη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά πραγματοποιείται ακόμη μία φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 1 λεπτό με τη στήλη άδεια, ώστε να επιτραπεί η πλήρης εξάτμιση της αιθανόλης. Στο τέλος, η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου erpendorf, όπου προστίθενται 25-40 μl nuclease-free dH₂O, αφήνεται το δείγμα για 1 λεπτό και κατόπιν φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 1 λεπτό.

Η παραπάνω διαδικασία χρησιμοποιείται και για τον καθαρισμό DNA μετά από αντιδράσεις PCR και πέψεις με περιοριστικά ένζυμα.

2.13.4 Κατακρήμνιση DNA με απόλυτη αιθανόλη (ethanol precipitation)

Για να απομονωθεί το DNA από διάλυμα όγκου α μl μετά από μία αντίδραση PCR ή μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα προστίθενται 2.5 x α μl απόλυτη αιθανόλη και 1/10 του α μl οξικό νάτριο 3 M. Το μίγμα επωάζεται περίπου 16 ώρες στους -20°C ή για 20 λεπτά στους -80°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, απομάκρυνση του υπερκείμενου και έκπλυση του ιζήματος με 75% v/v αιθανόλης με συνακόλουθη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος, αφού αφαιρεθεί το υπερκείμενο, το ίζημα του DNA επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα nuclease-free dH₂O.

2.13.5 Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης (ligation) για την ένωση του κομμένου με περιοριστικά ένζυμα ενθέματος (insert) με τον κομμένο με τα αντίστοιχα περιοριστικά ένζυμα πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιούνται σε τελικό όγκο 20 μl. Στην αντίδραση προστίθενται περίπου 20-30 ηg πλασμιδιακού DNA και περίσσεια από το DNA ένθεμα, η οποία καθορίζεται από τη σχέση μεγέθους φορέα/ ενθέματος, το ένζυμο T4 DNA ligase (Minotech Biotechnology) και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου και το μίγμα επωάζεται για περίπου 16 ώρες στους 4°C.

2.13.6 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυτάρων DH10B της E.coli (transformation)

Σε αποστειρωμένο σωληνάριο τύπου erpendorf προστίθενται 100-200 μl βακτηριακών κυτάρων DH10B (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells) και 20 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή 1-2 μl από το πλασμίδιο που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μίγμα αφήνεται στον πάγο για 30 λεπτά, κατόπιν τα κύτταρα υφίστανται θερμικό σοκ στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα και επανατοποθετούνται αμέσως στον πάγο. Ακολούθως, προστίθενται 900 μl θρεπτικού μέσου LB (LB: 1% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract και 1% w/v NaCl) και το μίγμα επωάζεται στους 37°C για 1 ώρα. Στο μεσοδιάστημα τοποθετείται ένα τρυβλίο Petri με θρεπτικό LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100 ng/ml) σε επωαστήρα 37°C για να αποκτήσει την επιθυμητή θερμοκρασία. Στην περίπτωση που πολλαπλασιάζουμε ένα πλασμίδιο, απλώνουμε 100-200 μl της βακτηριακής καλλιέργειας στο τρυβλίο με τη βοήθεια γυάλινης αποστειρωμένης ράβδου. Στην περίπτωση της αντίδρασης σύνδεσης το δείγμα φυγοκεντρείται πρώτα στις 3.000 rpm για 5 λεπτά, αφαιρούνται 800 μl θρεπτικού LB, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται στο εναπομείναν θρεπτικό και κατόπιν απλώνεται στο τρυβλίο.

2.13.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (mini preparation)

Κάθε αποικία παραλαμβάνεται από το τρυβλίο με αποστειρωμένο ρύγχος πιπέτας και καλλιεργείται σε αποστειρωμένα σωληνάρια τύπου falcon με 2 ml θρεπτικού μέσου LB που

περιέχει 50 ng/ml αμπικιλίνη στους 37°C για περίπου 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια μεταφέρεται 1 ml από κάθε καλλιέργεια σε σωληνάριο τύπου erpendorf και φυγοκεντρείται στις 13.500 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 600 µl διαλύματος λύσης (lysis buffer: 8% w/v sucrose, 5% v/v Triton X-100, 500 mM EDTA pH: 8.0, 50 mM Tris-HCl, pH: 7.5). Κατόπιν προστίθενται 20 µl λυσοζύμης (10 mg/ml) και αφού το κάθε δείγμα αναδευτεί ζωηρά (vortex) αφήνεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολουθεί βρασμός για 90 δευτερόλεπτα και μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο. Στο στάδιο αυτό το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε διαλυτή μορφή, ενώ οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου είναι δυνατό να κατακρημνιστούν, κατά συνέπεια ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 13.500 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το σχηματιζόμενο ίζημα απομακρύνεται με οδοντογλυφίδα και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με 600 µl κρύας ισοπροπανόλης (αποθηκεύεται στους -20°C). Τα δείγματα αφήνονται στους -20°C για τουλάχιστον 20 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρούνται στις 13.500 rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ίζημα του DNA εκπλένεται με 1 ml 75% αιθανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.500 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια η αιθανόλη απομακρύνεται, το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει υπό κενό και το DNA επαναδιαλύεται με 20-30 µl nuclease-free dH₂O.

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

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκαν στήλες Qiagen-tip 500 χρησιμοποιώντας το σύστημα Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε συνοψίζεται ακολουθώς:

Παραλαμβάνεται αποικία από τρυβλίο που έχει γίνει striking ή μετασχηματισμός με αποστειρωμένο ρύγχος πιπέτας και καλλιεργείται σε γυάλινη αποστειρωμένη κωνική φιάλη του 1 lt με 200 ml θρεπτικού μέσου LB που περιέχει 50 ng/ml αμπικιλίνη για περίπου 16 ώρες στους 37°C. Η καλλιέργεια στη συνέχεια μοιράζεται σε 4 σωληνάρια τύπου falcon των 50 ml και φυγοκεντρείται στις 3.500 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε 4 ml (ανά 100 ml καλλιέργειας) διαλύματος P1 (resuspension buffer: 50 mM Tris-HCl, pH: 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase), λύνονται με προσθήκη 4 ml (ανά 100 ml καλλιέργειας) διαλύματος P2 (lysis buffer: 0.2 M NaOH, 1% w/v SDS) και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίζονται με προσθήκη 4 ml (ανά 100 ml καλλιέργειας) κρύου διαλύματος P3 (neutralization buffer: 3 M οξικό κάλιο, pH: 5.5), ακολουθεί επώαση στον πάγο για 15-20 λεπτά και φυγοκέντρηση στις 3.500 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο (12 ml ανά 100 ml καλλιέργειας), το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA διηθείται με ειδικό φίλτρο και μεταφέρεται στη στήλη, η οποία έχει ήδη εξισορροπηθεί με 4 ml διαλύματος QBT (equilibration

buffer: 50 mM MOPS, pH: 7.0, 0.75 M NaCl, 0.15% v/v Triton X-100, 15% v/v αιθανόλη). Ακολουθεί εκπλύση της στήλης 2 φορές με 10 ml διαλύματος πλύσης QC (wash buffer: 50 mM MOPS, pH: 7.0, 1 M NaCl, 15% v/v αιθανόλη) και τέλος έκλουση του πλασμιδιακού DNA με 5 ml διαλύματος QF (elution buffer: 10 mM Tris-HCl, pH: 8.5, 1.25 M NaCl, 15% v/v αιθανόλη) όπου το έκλουσμα παραλαμβάνεται σε σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml. Το DNA κατακρημνίζεται με προσθήκη 3.5 ml ισοπροπανόλης (70% του όγκου του εκλούσματος) και μοιράζεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf των 1.5 ml, όπου και φυγοκεντρείται στις 13.000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το προκύπτον ίζημα εκπλένεται με 1ml 70% αιθανόλης με συνακόλουθη φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 5 λεπτά, ξηραίνεται υπό κενό, επαναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH: 8.0) και φυλάσσετε στους -20°C.

2.14 Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης των κυττάρων με πλασμίδια έκφρασης και αναφοράς στα πλαίσια των πειραμάτων μέτρησης της ενεργότητας της λουσιφεράσης. Όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.2 για κάθε συνθήκη του πειράματος τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν με 1 μg από τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης που περιέχει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του κυταρομεγαλοϊού CMV (pCMVβ-gal). Η διαδικασία του προσδιορισμού της ενεργότητας του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης περιγράφεται παρακάτω:

Τα κύτταρα εκπλένονται μία φορά με διάλυμα PBS, λύνονται με 200 μl διαλύματος λύσης 1X Cell Culture Lysis Reagent (Promega), συλλέγονται σε σωληνάριο τύπου erpendorf μετά από καλή ανάδευση και τοποθετούνται στους -80°C για περίπου 15 λεπτά και κατόπιν στους 37°C για περίπου 2 λεπτά μέχρι να ξεπαγώσουν. Ακολούθως τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 13.000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια προετοιμάζεται ένα μίγμα που περιέχει 20 μl από το κυτταρικό εκχύλισμα, 456 μl διαλύματος φωσφορικών, P-buffer (0.1 M Na₂HPO₄, pH: 7.3 και ρύθμιση του pH με 0.1M NaH₂PO₄), 132 μl διαλύματος ONPG (2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside) (8 mg/ml ONPG σε P-buffer) και 6 μl διαλύματος αλάτων 100X (1 M KCl, 0.1 M MgCl₂, 35.2% v/v β-μερκαπταιθανόλη). Ακολούθως τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200 μl διαλύματος Na₂CO₃ (1 M), το οποίο προκαλεί αλλαγή του pH. Τέλος μετράται η οπτική απορρόφηση των δειγμάτων σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή απορρόφησης που λαμβάνεται τίθεται ως 1 και οι υπόλοιπες τιμές διαιρούνται με αυτή την τιμή, οπότε προκύπτει για κάθε δείγμα ο παράγοντας κανονικοποίησης, ο οποίος θα «διορθώσει» την αντίστοιχη μέτρηση που θα ληφθεί από την μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης.

2.15 Μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης (Luciferase assay)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση ενός υποκινητή που είναι κλωνοποιημένος σε ένα πλασμίδιο αναφοράς σε σύζευξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης. Η ενεργότητα του υποκινητή μετά από επίδραση διαφόρων παραγόντων – στην παρούσα μελέτη μετά από συνεπιμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια έκφρασης για τις wt-Smad2/Smad4, wt-Smad3/Smad4 και τον ALK5-ca – αντιστοιχεί στη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της λουσιφεράσης και την συνακόλουθη έκφρασή του ενζύμου αυτού στα κύτταρα. Η εκτίμηση της ενεργότητας πραγματοποιείται με τη μέτρηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης, που συνίσταται στη μέτρηση της χημιοφωταύγειας (chemiluminescence) που παράγεται από την αντίδραση της λουσιφεράσης με το υπόστρωμά της χρησιμοποιώντας το σύστημα Luciferase Assay System (Promega). Συγκεκριμένα 40 μl κυτταρικού εκχυλίσματος (βλ. §2.13) αναμιγνύονται με 60 μl υποστρώματος λουσιφεράσης, Luciferase Assay Substrate (Promega) και η παραγόμενη χημιοφωταύγεια μετράται σε λουμινόμετρο FB 12 Luminometer (Berthold detection systems). Η τιμή που λαμβάνεται για κάθε δείγμα πολλαπλασιάζεται με τον αντίστοιχο παράγοντα κανονικοποίησης που υπολογίστηκε από τη μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης (βλ. §2.14) και έτσι διορθώνεται ως προς την απόδοση της επιμόλυνσης σε κάθε δείγμα.

2.16 Προσδιορισμός των ενεργών πρωτεϊνών Rho-GEFs σε κυτταρικά εκχυλίσματα

2.16.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος προσδιορισμού των ενεργών επιπέδων των πρωτεϊνών Rho-GEFs βασίζεται στην κατακρήμνιση συγγένειας (pull down assay) των Rho-GEFs που ενεργοποιούνται στο κύτταρο μετά από επίδραση κάποιου ερεθίσματος χρησιμοποιώντας τη μεταλλαγμένη μορφή της RhoA-GTPάσης (G17A) η οποία δεν μπορεί να προσδέσει ούτε GTP ούτε GDP και επομένως θεωρείται nucleotide free. Η μεταλλαγμένη αυτή μορφή της RhoA της επιτρέπει να αλληλεπιδράσει με μεγάλη συγγένεια με μία πρωτεΐνη GEF δεδομένου ότι η ελεύθερη από νουκλεοτίδιο GTPάση είναι μία ενδιάμεση κατάσταση κατά την αντίδραση ανταλλαγής του GDP με GTP η οποία επιτελείται κατά την αλληλεπίδραση της Rho-GTPάσης με τον GEF οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση της Rho-GTPάσης. Η ικανότητα ενός GEF να αλληλεπιδράσει με μία Rho-GTPάση ρυθμίζεται είτε με την άρση μίας ενδομοριακής ανασταλτικής διαμόρφωσης του GEF μέσω φωσφορυλίωσης (Vav2, Dbl, Asef), είτε μέσω δέσμευσης ή αποδέσμευσης από άλλες πρωτεΐνες (p115-RhoGEF, SOS, Dock180), είτε μετά από απελευθέρωση του από κάποιο υποκυτταρικό τμήμα (Net1, Ect2, GEF-H1). Δεδομένων των παραπάνω τρόπων ρύθμισης των GEFs θεωρείται ότι η nucleotide free μεταλλαγμένη RhoA θα έχει μεγαλύτερη συγγένεια για τις ενεργές GEFs και έτσι η μέθοδος αυτή δύναται να

χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της ενεργοποίησης των GEFs μετά από κάποιο ερέθισμα. Η παρούσα μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργοποίησης του GEF Van2, ο οποίος θεωρείται ότι είναι σε θέση να ενεργοποιήσει τις Rho-GTPάσες μόνο όταν φωσφορυλιωθεί σε κατάλοιπα τυροσίνης μετά από κάποιο ερέθισμα.

2.16.2 Έκφραση και καθαρισμός της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης

Αρχικά μεταφέρεται μία αποικία βακτηρίων *E.coli* τα οποία περιέχουν το πλασμίδιο pGEX-GST RhoA (G17A) (ευγενική προσφορά του Keith Burrige) σε 4 ml θρεπτικό LB που περιέχει 50 µg/ml αμπικιλίνη και τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 16-20 ώρες στους 37°C με έντονη ανάδευση. Ακολούθως μεταφέρονται τα 4 ml καλλιέργειας σε 200 ml θρεπτικού LB (αραίωση 1:50) που περιέχει 50 µg/ml αμπικιλίνη και τα κύτταρα επωάζονται στους 37°C για περίπου 2 ώρες μέχρι η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας ($OD_{600\text{ nm}}$) να είναι 0,6, οπότε και προστίθεται 1 ml IPTG (100 mM stock, 1:200 αραίωση, σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM) για να επαχθεί η σύνθεση της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης και τα κύτταρα επωάζονται για περίπου 16 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ή για 5 ώρες στους 30°C. Στη συνέχεια η καλλιέργεια μοιράζεται σε 4 σωληνάρια τύπου falcon των 50 ml, τα κύτταρα επωάζονται σε πάγο για 10 λεπτά και φυγοκεντρώνονται στις 3.500 rpm για 30 λεπτά στους 4°C. Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων επαναδιαλύεται σε 10 ml διαλύματος STE (10 mM Tris-HCl pH: 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) εμπλουτισμένο με αναστολείς (100 µg/ml λυσοζύμη (50 mg/ml stock), 5 mM DTT (1 M stock), 1 mM PMSF (0.1 M stock), 10 µg/ml aprotinin). Το διάλυμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου falcon των 50 ml και ακολουθεί sonication των κυττάρων σε πάγο με ισχύ 30% για 30 sec, 1 λεπτό παλμός, για 4 φορές (αν η ισχύς του sonicator είναι μικρότερη τότε οι επαναλήψεις αυξάνονται στις 7-10 φορές). Ακολούθως προστίθεται στο διάλυμα 1 ml Triton 10 % (τελική συγκέντρωση 1%) και επωάζεται σε πάγο για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση τις 3.500 rpm για 30 λεπτά στους 4°C και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο τύπου falcon των 15 ml όπου και προστίθενται 250 µl εκπλυμένων σφαιριδίων γλουταθιόνης-σεφαρόζης (glutathione-sepharose, 50% slurry, bed volume ~120 µl). Τα σφαιρίδια επωάζονται στους 4°C για 2-3 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1.000 rpm για 2 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε 1 ml διαλύματος STE 1% Triton, μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο και συμπληρώνονται με 9 ml διαλύματος STE 1% Triton. Ακολουθούν οι εξής εκπλύσεις:

2x με διάλυμα STE 1% Triton που περιέχει 1 mM DTT (10 ml)

2x με διάλυμα 10 mM Tris HCl pH: 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT (10 ml)

1x PBS που περιέχει 1 mM DTT (10 ml) (μεταφορά σε σωληνάριο τύπου eppendorf)

1x PBS (1 ml)

Τέλος τα σφαιρίδια επαναδιαλύονται σε ~120 µl PBS για να δημιουργηθεί slurry 50%.

Η μεταλλαγμένη nucleotide free GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνη είναι ιδιαίτερα ασταθής όταν εκφράζεται σε βακτήρια, για το λόγο αυτό τα σφαιρίδια αυτά πρέπει να παρασκευάζονται το πολύ μία μέρα πριν το πείραμα και φυλάσσονται στους 4°C.

2.16.3 Εκτίμηση της συγκέντρωσης της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης στα σφαιρίδια σεφαρόζης

Η συγκέντρωση της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης στα σφαιρίδια σεφαρόζης εκτιμάται με την έκλουση της πρωτεΐνης από τα σφαιρίδια και την ανάλυση της με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie. Συγκεκριμένα παραλαμβάνονται 5-10 µl από τα σφαιρίδια, αναμιγνύονται με 10 µl 2X αποδιατακτικού διαλύματος (sample buffer) και ακολούθως τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Παράλληλα ετοιμάζεται ίσος όγκος ολικών πρωτεϊνών από κάθε δείγμα (40 µl), προστίθεται 1:3 του όγκου αυτού (13.3 µl) από το 4X αποδιατακτικό διάλυμα και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 12%, ανοσοαποτύπωση με ειδικά για κάθε Rho GTPάση πρώτα αντισώματα, ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με πυκνομετρία και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές που προκύπτουν από τις ζώνες των ολικών πρωτεϊνών.

και θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά για να αποδεσμευτεί η GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνη από τα σφαιρίδια σεφαρόζης. Στη συνέχεια το δείγμα φορτώνεται σε gel πολυακρυλαμιδίου 12% και αναλύεται παράλληλα με γνωστές ποσότητες BSA (5-40 µg πρωτεΐνης) για την εκτίμηση της ποσότητας της GST-RhoA (G17A) πρωτεΐνης. Το εκτιμώμενο μέγεθος της GST-RhoA (G17A) είναι περίπου 50 kDa. Το gel πολυακρυλαμιδίου στη συνέχεια εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρωστικής coomassie για 5 λεπτά και ακολουθεί αποχρωματισμός του gel με διάλυμα οξικού οξέος - μεθανόλης (Fast destain: 10% v/v οξικό οξύ, 50% MeOH και Slow destain: 10% οξικό οξύ, 10% MeOH).

2.16.4 Πείραμα κατακρήμνισης συγγένειας (pull down) των GEFs με χρήση των σφαιριδίων GST-RhoA (G17A)

Την ημέρα παραλαβής των κυττάρων, τα κύτταρα λύονται με διάλυμα λύσης (20 mM Hepes pH: 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton, εμπλουτισμένο με αναστολείς πρωτεασών: 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF και φωσφατασών: 1 mM orthovanadate). Για τα πειράματα προσδιορισμού της ενεργής Vav2 και Net1 με western blot χρησιμοποιήθηκαν 2 p100 τρυβλία ανά συνθήκη και τα κύτταρα λύθηκαν με 800-1000 µl ανά p100. Για τα πειράματα χρώσης αργύρου και ανάλυσης με φασματομετρίας μάζας χρησιμοποιήθηκαν 12 p150 τρυβλία ανά συνθήκη και 1000 µl ανά τρυβλίο. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα φυγοκεντρούνται στις 12.000 rpm, για 10 λεπτά, στους 4°C, ακολούθως προσδιορίζεται η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα τα δείγματα εξισώνονται σε ποσότητα πρωτεΐνης (περίπου 2-3 mg ανά δείγμα) (120-200 µg πρωτεΐνης φυλάσσονται για τα ολικά εκχυλίσματα (total cell lysate, TCL). Ακολουθεί ένα στάδιο προεπώασης των δειγμάτων με 50 µg GST-

sepharose beads για 10 λεπτά (preclearing) ώστε να δεσμευτούν οι πρωτεΐνες εκείνες που αλληλεπιδρούν μη ειδικά με την GST πρωτεΐνη.

Τα σφαιρίδια αυτά παρασκευάζονται με την ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στην §2.16.2 για τα σφαιρίδια GST-RhoA (G17A) με τη διαφορά ότι επειδή η GST πρωτεΐνη δεν έχει πρόβλημα σταθερότητας τα σφαιρίδια αυτά μπορούν να διατηρηθούν για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4°C ή με προσθήκη γλυκερόλης στους -20°C παρουσία 0,01% NaN₃.

Μετά από μία φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 2 λεπτά στους 4°C παραλαμβάνεται με προσοχή το υπερκείμενο, προστίθενται σε αυτό 20 µg GST-RhoA (G17A) sepharose beads και τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 1 ώρα. Για τα πειράματα με χρώση αργύρου και φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκαν 30-40 µg GST-RhoA (G17A) sepharose beads για περίπου 10 mg ολικής πρωτεΐνης για κάθε δείγμα. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια εκπλένονται 3-4 φορές με 1 ml διαλύματος λύσης, ενώ για τα πειράματα φασματομετρίας μάζας εκπλένονται 6 φορές. Τέλος αφού απομακρυνθεί προσεκτικά όλο το υπερκείμενο, προστίθενται στα σφαιρίδια 40 µl 1X αποδιατακτικού διαλύματος (sample buffer) και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά ώστε να αποδεσμευτούν οι πρωτεΐνες που έχουν αλληλεπιδράσει με τα σφαιρίδια. Παράλληλα ετοιμάζονται τα δείγματα των ολικών πρωτεϊνών για κάθε δείγμα (120-200 µg) με προσθήκη 1:3 του όγκου των δειγμάτων από το 4X αποδιατακτικό διάλυμα και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%, ανοσοαποτύπωση με ειδικά για κάθε GEF (Van2, Net1) πρώτα αντισώματα, ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών με πυκνομετρία και κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές που προκύπτουν από τις ζώνες των ολικών πρωτεϊνών.

2.17 Ανοσοκατακρήμνιση των υπερεκφρασμένων υποδοχέων του TGF-β, TβRI και TβRII με FLAG M2 σφαιρίδια αγαρόζης

Το πείραμα αυτό διενεργήθηκε στα πλαίσια αναζήτησης μορίων που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF-β, TβRI και TβRII, με φασματομετρία μάζας. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα 293T στα οποία υπερεκφράστηκαν οι υποδοχείς του TGF-β flag-TβRI και flag-TβRII μόνοι τους ή σε συνδυασμό και κατακρημνίστηκαν χρησιμοποιώντας σφαιρίδια αγαρόζης συζευγμένα με αντίσωμα anti-FLAG-M2 (Sigma). Χρησιμοποιήθηκαν 5 x p100 τρυβλία ανά συνθήκη και τα κύτταρα επιμολύνθηκαν ανά p100 με 6 µg πλασμιδίου που εκφράζει τον υποδοχέα flag-TβRI ή τον υποδοχέα flag-TβRII ή με 3 µg από κάθε πλασμίδιο για κάθε υποδοχέα με τη μέθοδο του φωσφορικού ασβεστίου. Συγκεκριμένα αναμιγνύονται x µl πλασμιδιακού DNA (6 µg συνολικά) με 450-x µl απιονισμένου νερού, ακολούθως προστίθενται 500 µl διαλύματος 2X BBS, το οποίο αναδεύεται πριν τη χρήση και τέλος 50 µl διαλύματος 2,5 M CaCl₂. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά με vortex και μετά από 15-30 λεπτά προστίθεται σε 9 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας DMEM ανά p100. Τα κύτταρα επωάζονται

με το μίγμα για 4 ώρες, το οποίο στη συνέχεια αφαιρείται και αντικαθίσταται από θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS και 1% penistrep. 24 ώρες μετά την επιμόλυνση των κυττάρων, προστίθεται θρεπτικό μέσο απουσία ορού και 24 ώρες μετά τα κύτταρα διεγείρονται με TGF- β για 5 λεπτά. Στα δείγματα που υπερεκφράστηκε ο υποδοχέας τύπου I, T β RI, είτε μόνος είτε σε συνδυασμό με τον υποδοχέα τύπου II, T β RII, τα κύτταρα προεπεωάστηκαν για 45 λεπτά με 5 μ M από τον αναστολέα του T β RI, GW4406. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται σε 2 ml PBS ανά p100 τρυβλίο, φυγοκεντρώνται στις 1000 rpm για 5 λεπτά και επαναδιαλύονται σε 2 ml διαλύματος A (10 mM HEPES, pH: 7,9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA) με σκοπό την παραλαβή του κυτταροπλασματικού εκχυλίσματος. Ακολούθως, επωάζονται για 10 λεπτά σε πάγο, προστίθενται 20 μ l NP-40 10% (τελική συγκέντρωση 0,1%) και επωάζονται για άλλα 10 λεπτά σε πάγο. Τέλος φυγοκεντρώνται στις 6.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C και παραλαμβάνεται το κυτταροπλασματικό εκχύλισμα. Ακολουθεί ένα στάδιο προεπεωάσης των κυττάρων με 80 μ l (50% slurry) protein A σφαιρίδια σεφαρόζης για 1 ώρα στους 4°C με σκοπό την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν μη ειδικά με τα σφαιρίδια. Μετά από μία σύντομη φυγοκέντρωση στις 1000 rpm για 1 λεπτό για την απομάκρυνση των σφαιριδίων, προστίθενται στο υπερκείμενο 80 μ l (50% slurry σε TBS) FLAG-M2 σφαιρίδια αγαρόζης και ακολουθεί επώαση για 2 ώρες στους 4°C με σκοπό την πρόσδεση των υπερεκφρασμένων και συζευγμένων με το flag πεπτιδίου πρωτεϊνών. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια φυγοκεντρώνται στις 5.000 rpm για 1 λεπτό, απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο και ακολουθούν οι εξής εκπλύσεις:

2x με διάλυμα λύσης (50 mM Tris HCl pH: 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton) (μετά την πρώτη έκπλυση τα σφαιρίδια μεταφέρονται σε νέο σωληνάριο).

1x με διάλυμα λύσης υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα (50 mM Tris HCl pH: 7,4, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton)

1x με διάλυμα λύσης (50 mM Tris HCl pH: 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton)

1x με διάλυμα TBS

Αφού απομακρυνθεί προσεκτικά το υπερκείμενο, ακολουθεί έκλυση των κατακρημνισμένων πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια με την προσθήκη του FLAG πεπτιδίου. Για το σκοπό αυτό προστίθενται στα σφαιρίδια 100 μ l από διάλυμα FLAG πεπτιδίου σε TBS (500 ng/ μ l) και τα δείγματα επωάζονται για 45 λεπτά υπό ανάδευση στους 4°C. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται το υπερκείμενο, προστίθενται 33,3 μ l 4X διαλύματος αποδιάταξης με 40 mM DTT και τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά. Τα δείγματα ακολούθως επωάζονται για 20 λεπτά στο σκοτάδι με 20 mM διαλύματος ιωδοακεταμιδίου (1:25 αραίωση από φρέσκο stock 500 mM σε απιονισμένο νερό). Τέλος τα δείγματα αναλύονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και ακολουθεί χρώση αργύρου για την ανάλυση με φασματομετρία μάζας.

Υποσημείωση

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και δεν αναφέρονται στην περιγραφή των μεθόδων είναι ο αναστολέας της MEK κινάσης UO126 (Millipore/ Upstate), ο οποίος ήταν μία ευγενική προσφορά του εργαστηρίου του Καθ.Δ.Καρδάση. Επίσης, οι αναστολείς της JNK κινάσης SP600125, της PI3K κινάσης LY294002, της ROCK κινάσης Y27632 και ο αναστολέας του υποδοχέα τύπου I του TGF- β (ALK5) SB431542 προήλθαν από τη Sigma-Aldrich και οι αναστολείς της Src κινάσης PP2 και του πρωτεοσώματος MG-132 από την Calbiochem/ Merck.

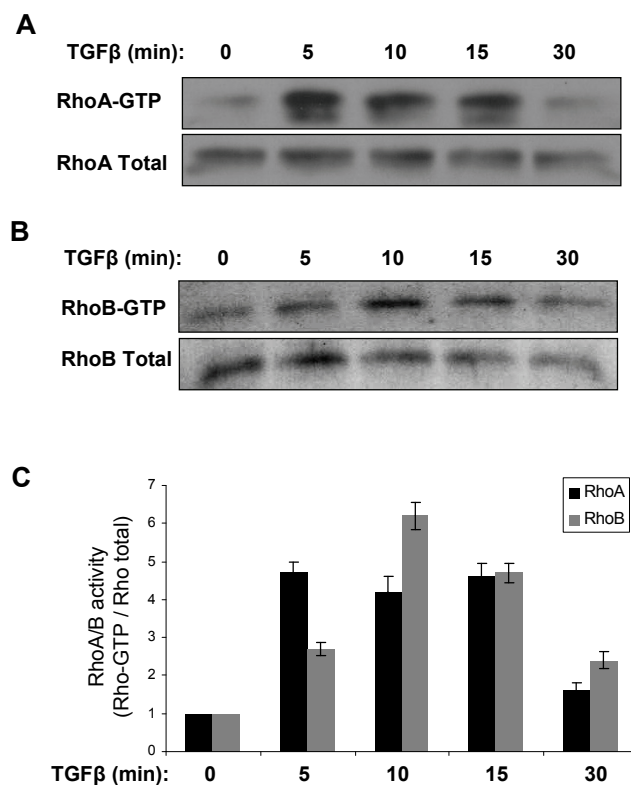
Επίσης όλα τα κοινά χημικά αντιδραστήρια ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τις εταιρείες Merck, Sigma-Aldrich και ROTH.

3. Αποτελέσματα

3.1 Μελέτη της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β στα JEG3 κύτταρα χοριοκαρκινώματος

3.1.1 Η RhoA και η RhoB ενεργοποιούνται από τον TGF-β στα JEG3 κύτταρα

Ένα βασικό ερώτημα της παρούσας μελέτης ήταν η αποσαφήνιση του μηχανισμού της γρήγορης ενεργοποίησης των Rho GTPασών RhoA και RhoB από τον TGF-β. Σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο μας βρέθηκε ότι οι RhoA και RhoB ενεργοποιούνται μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης με TGF-β στους Swiss 3T3 ινοβλάστες, με αποτέλεσμα την εν συνεχεία ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που καταλήγει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης της ROCK1 και της LIMK2 και αναστολής της cofilin [136]. Κατά την αναζήτηση των μορίων που συνδέουν τους υποδοχείς του TGF-β (TβRI και TβRII) με την ενεργοποίηση των RhoA και RhoB διερευνήθηκε αρχικά ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.1.1: Οι μικρές GTPάσες RhoA και RhoB ενεργοποιούνται στα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3.

A. Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της RhoA (RhoA-GTP/RhoA total) και **(B)** της RhoB (RhoB-GTP/RhoB total) στα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3 (*Smad3^{-/-}*) με χρήση των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin, μετά από επώαση με 5 ng/ml TGF-β για διάφορους μικρούς χρόνους 5–30 λεπτά. **C.** Γραφική απεικόνιση της ενεργοποίησης των RhoA (RhoA-GTP/RhoA total) και RhoB (RhoB-GTP/RhoB total) μετά από ποσοτικοποίηση των ζωνών με πυκνομετρία.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά χοριοκαρκινώματος JEG3, η οποία δεν εκφράζει ενδογενώς την πρωτεΐνη Smad3 (Smad3^{-/-}) και έτσι με την αποσιώπηση μόνο της Smad2 καθίσταται εφικτή η μελέτη των εξαρτώμενων από τις Smad2/3 πρωτεΐνες μονοπατιών.

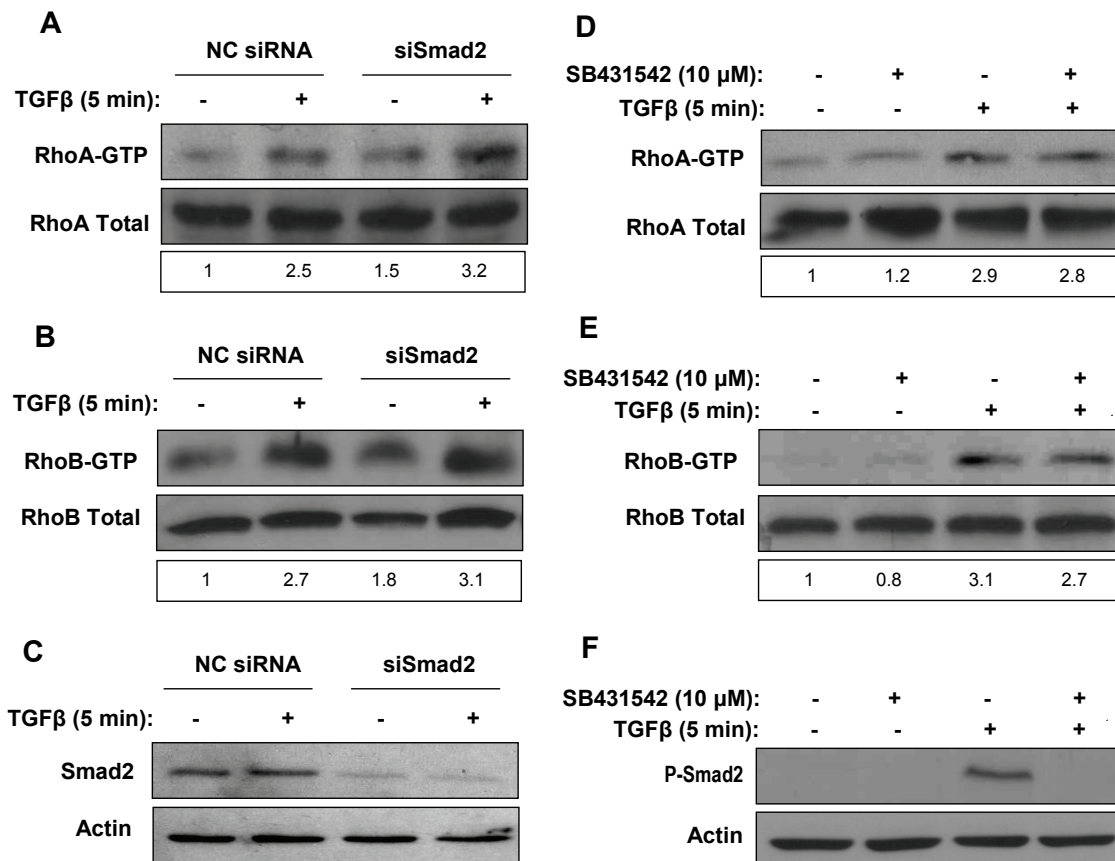
Αρχικά μελετήθηκε η ενεργοποίηση των RhoA και RhoB στα JEG3 κύτταρα μετά από επίδραση με TGF-β. Συγκεκριμένα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες και ακολούθως επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για διάφορα μικρά χρονικά διαστήματα (5–30 λεπτά) και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των ενεργών RhoA (RhoA-GTP) και RhoB (RhoB-GTP) με τη μέθοδο κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin. Η διάκριση μεταξύ των RhoA και RhoB πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων κατά την ανοσοανίχνευση (western blot) που αναγνωρίζουν ειδικά την κάθε πρωτεΐνη. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.1.1** τόσο η RhoA όσο και η RhoB ενεργοποιήθηκαν στα JEG3 κύτταρα μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης με TGF-β γεγονός που διατηρήθηκε μέχρι τα 15 λεπτά για τη RhoA και μέχρι τα 30 λεπτά για τη RhoB. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από τη Smad3.

3.1.2 Η γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών

Για να διερευνηθεί αν η ενεργοποίηση των RhoA και RhoB οφείλεται στην παρουσία της Smad2, η οποία είναι γνωστό ότι παρουσιάζει αλληλεπικαλυπτόμενες δράσεις με την Smad3, πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια πειράματα αποσιώπησης της Smad2. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) και το siRNA που στοχεύει ειδικά στη Smad2 (siSmad2), επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα ενεργά επίπεδα των RhoA και RhoB με τη μέθοδο κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin. Η αποσιώπηση της Smad2 παρουσία TGF-β για 5 λεπτά δεν οδήγησε σε μείωση των ενεργών επιπέδων τόσο της RhoA, όσο και της RhoB (**Εικόνα 3.1.2A και B**), γεγονός που υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από τις Smad2/3. Η αποσιώπηση της Smad2 με τη χρήση του siRNA για τη Smad2 (siSmad2) παρουσιάζεται στην **εικόνα 3.1.2.C**.

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και ο αναστολέας του υποδοχέα τύπου I του TGF-β (TβRI, ALK5), SB431542, με σκοπό την αναστολή της φωσφορυλίωσης της Smad2 και ευρύτερα για τη διερεύνηση της εξάρτησης της ενεργοποίησης των RhoA και RhoB από την κινάση του υποδοχέα τύπου I. Για το σκοπό αυτό, τα κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, προεπωάστηκαν για 1 ώρα με τον αναστολέα SB431542 (10 μM), στη συνέχεια διεγέρθηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά και τέλος προσδιορίστηκαν τα ενεργά επίπεδα των RhoA και RhoB με τη μέθοδο κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.1.2.D και E** η αναστολή του

ALK5 δεν επηρέασε την ενεργοποίηση τόσο της RhoA, όσο και της RhoB, ένα εύρημα το οποίο συνάδει με τα αποτελέσματα αποσιώπησης της Smad2. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από τη Smad2 και τη φωσφορυλίωση της, ούτε από την κινάση του υποδοχέα τύπου I του TGF-β. Η αναστολή της φωσφορυλίωσης της Smad2 από τον αναστολέα SB431542 παρουσιάζεται στην εικόνα 3.1.2.F.

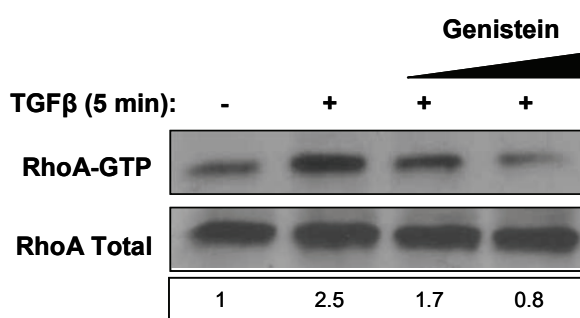


Εικόνα 3.1.2: Η γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από τις Smad2/3.

A. Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της RhoA (RhoA-GTP/RhoA total) και **(B)** της RhoB (RhoB-GTP/RhoB total) στα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3 με χρήση των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin, μετά από επιμόλυνση των κυττάρων με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) ή το siRNA για τη Smad2 (siSmad2) και επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά. **C.** Ανάλυση των επιπέδων της Smad2, όπου δείχνεται η αποτελεσματικότητα του siRNA που χρησιμοποιήθηκε για την αποσιώπηση της στα πειράματα που παρουσιάζονται στα πάνελ A και B. **D.** Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της RhoA (RhoA-GTP/RhoA total) και **(E)** της RhoB (RhoB-GTP/RhoB total) στα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3 με χρήση των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin, μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά παρουσία ή όχι του αναστολέα του υποδοχέα τύπου I του TGF-β (ALK5), SB431542 (10 μM). **F.** Ανάλυση των επιπέδων της P-Smad2, όπου δείχνεται η αποτελεσματικότητα του αναστολέα SB431542 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα που παρουσιάζονται στα πάνελ D και E.

3.1.3 Η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β εξαρτάται από φωσφορυλίωση τυροσινών

Πολλοί από τους ενεργοποιητές (GEFs) των μικρών GTPασών (Rho, Ras) ρυθμίζονται από μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται κινάσες τυροσίνης [3,14]. Ως εκ τούτου διερευνήθηκε στη συνέχεια η πιθανή εμπλοκή κινάσων τυροσίνης στο μηχανισμό της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β. Τα κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, προεπεβάστηκαν με τον γενικό αναστολέα κινάσων τυροσίνης, genistein (50 και 100 μM) για 1 ώρα, στη συνέχεια επεβάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα ενεργά επίπεδα της RhoA με τη χρήση των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin.



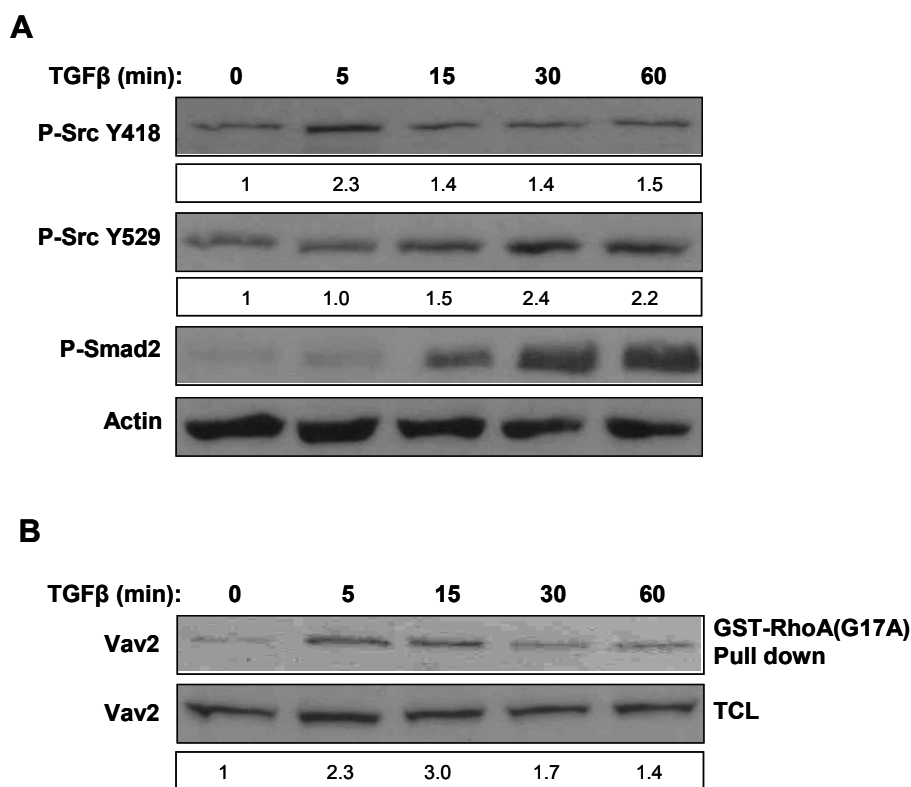
Εικόνα 3.1.3: Η ενεργοποίηση της RhoA εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση κινάσων τυροσίνης.

Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της RhoA (RhoA-GTP/RhoA total) με τη χρήση των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin στα JEG3 κύτταρα, μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά παρουσία ή όχι του γενικού αναστολέα τυροσινών, Genistein (50 μM και 100 μM, τρίγωνο).

Η χρήση του αναστολέα genistein ειδικά στη συγκέντρωση των 100 μM (η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιβλιογραφία) οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων της RhoA (Εικόνα 3.1.3), γεγονός που υποδεικνύει την εμπλοκή κινάσων τυροσίνης στο μηχανισμό της ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β.

3.1.4 OTGF-β ενεργοποιεί τη Src κινάση και τη Vav2 GEF

Με βάση αυτό το εύρημα μελετήθηκε η εμπλοκή της Src κινάσης στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β. Η Src κινάση έχει δείχθει στη βιβλιογραφία ότι ρυθμίζεται από τον TGF-β σε διάφορα κυτταρικά συστήματα είτε θετικά, είτε αρνητικά [120,209-211]. Με βάση αυτά τα δεδομένα, διερευνήθηκαν αρχικά στα JEG3 κύτταρα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Src μετά από επίδραση με TGF-β για μικρά χρονικά διαστήματα (5–60 λεπτά). Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.1.4A, ο TGF-β αυξάνει τα επίπεδα αυτοφωσφορυλίωσης της Src κινάσης στο κατάλοιπο τυροσίνης Y418 μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης, ενώ αυξάνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης στο κατάλοιπο τυροσίνης Y529 (αρνητική ρύθμιση) μετά από 15-30 λεπτά επίδρασης, γεγονός που σημαίνει ότι η Src κινάση ενεργοποιείται πολύ γρήγορα από τον TGF-β και ότι αυτή η ενεργοποίηση είναι αυστηρά ρυθμιζόμενη.



Εικόνα 3.1.4: Ο TGF-β ενεργοποιεί τη Src κινάση και τη Vav2 GEF.

A. Ανάλυση των επιπέδων της φωσφορυλίωσης της Src κινάσης στα κατάλοιπα Y418 (θέση αυτοφωσφορυλίωσης απαραίτητη για πλήρη καταλυτική δραστηριότητα) και Y529 (θέση αρνητικής ρύθμισης) μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για μικρά χρονικά διαστήματα (5-60 λεπτά). Η ανάλυση των επιπέδων της P-Smad2 δείχνει την ενεργοποίηση του κλασικού μονοπατιού των Smad. **B.** Ανάλυση της ενεργοποίησης του GEF Vav2 με χρήση των σφαιριδίων GST-RhoA (G17A) που φέρουν μία μεταλλαγμένη μορφή της RhoA (nucleotide free) η οποία παρουσιάζει μεγάλη συγγένεια για τις ενεργοποιημένες GEF πρωτεΐνες, μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για μικρά χρονικά διαστήματα (5-60 λεπτά).

Στη βιβλιογραφία η Src κινάση έχει συνδεθεί με τη ρύθμιση της Vav2 GEF. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί σε αρκετές μελέτες, ότι η Src φωσφορυλιώνει τη Vav2 με αποτέλεσμα την άρση μιας αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης, την έκθεση της καταλυτικής περιοχής DH που αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τις Rho GTPάσες και κατά συνέπεια την ενεργοποίηση της [18]. Η Vav2 ως GEF έχει ειδικότητα και για τις τρεις κύριες μικρές Rho GTPάσες, RhoA, Rac1 και Cdc42 [212], επομένως θα μπορούσε να αποτελεί μία υποψήφια GEF για την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β. Για να διερευνηθεί αυτό το ενδεχόμενο προσδιορίσαμε αρχικά την ενεργοποίηση της Vav2 από τον TGF-β στα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας μία μεταλλαγμένη μορφή της RhoA (nucleotide-free) προσδεσμένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GST-RhoA (G17A), η οποία έχει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια για τις ενεργές GEF πρωτεΐνες σε σχέση με την ανενεργή της (RhoA-GDP) και την ενεργή της μορφή (RhoA-GTP). Με το πείραμα αυτό μπορεί κανείς να προσδιορίσει τα ενεργά επίπεδα μιας GEF που έχει ειδικότητα

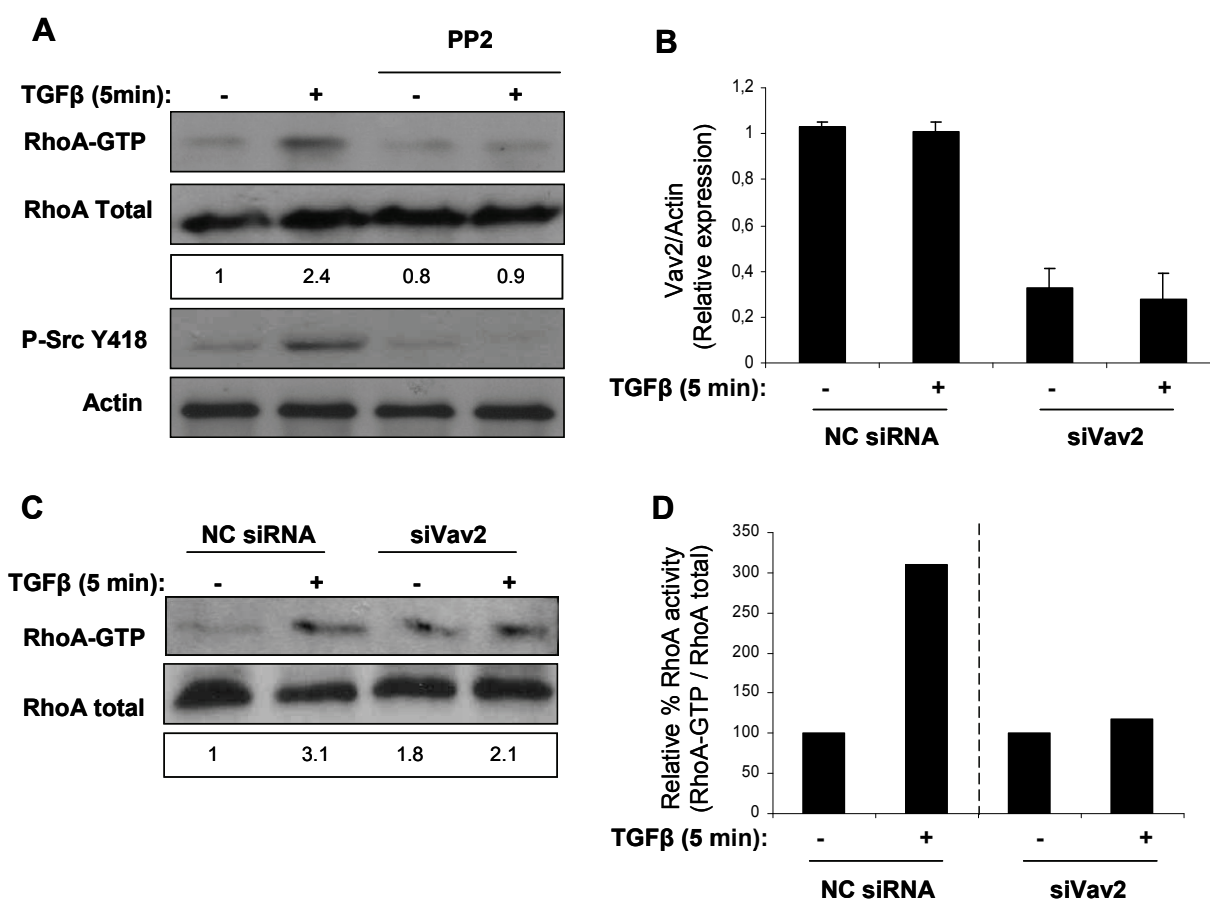
για τη RhoA, δεδομένου ότι μόνο στην ενεργή της μορφή μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη RhoA και ακόμη πιο ισχυρά με τη RhoA (G17A) [213]. Τα κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, διεγέρθηκαν με 5 ng/ml TGF-β για μικρά χρονικά διαστήματα (5–60 λεπτά) και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η ενεργοποίηση της Vav2 με τη χρήση των σφαιριδίων GST-RhoA (G17A). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.1.4B** ο TGF-β οδήγησε στην ενεργοποίηση της Vav2 μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης, η οποία διατηρήθηκε μέχρι περίπου τα 15-30 λεπτά. Η κινητική αυτής της ενεργοποίησης είναι παρόμοια με την κινητική της αυτοφωσφορυλίωσης της Src κινάσης και της ενεργοποίησης της RhoA.

3.1.5 Η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β εξαρτάται από τη Src κινάση και την Vav2 GEF

Ακολούθως, διερευνήθηκε αν η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β εξαρτάται από τη Src κινάση. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, προεπώαστηκαν με τον αναστολέα της οικογένειας των Src κινάσεων PP2 (10 μM) για 1 ώρα, στη συνέχεια διεγέρθηκαν με TGF-β για 5 λεπτά και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα ενεργά επίπεδα της RhoA με τη χρήση των σφαιριδίων GST-RBD Rhotekin. Η αναστολή της Src κινάσης είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της ενεργοποίησης της RhoA παρουσία TGF-β (**Εικόνα 3.1.5A**), γεγονός που σημαίνει ότι η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β εξαρτάται από τη Src κινάση.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η εμπλοκή της Vav2 στην ενεργοποίηση της RhoA, για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης της Vav2 με χρήση κατάλληλου siRNA. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) και το siRNA που στοχεύει ειδικά στη Vav2 (siVav2), επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 5 λεπτά και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα ενεργά επίπεδα της RhoA με τη μέθοδο κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin. Η αποσιώπηση της Vav2 είχε ως αποτέλεσμα μία μικρή αλλά επαναλήψιμη αύξηση των ενεργών επιπέδων της RhoA (1,8 φορές) απουσία TGF-β, τα οποία όμως δεν αυξήθηκαν σημαντικά περαιτέρω μετά την προσθήκη TGF-β (2,1 φορές) (**Εικόνα 3.1.5C**).

Κανονικοποιώντας την ενεργοποίηση της RhoA παρουσία TGF-β με την αντίστοιχη ενεργοποίηση απουσία TGF-β, παρουσία του NC siRNA ή του siVav2 αντίστοιχα (**Εικόνα 3.1.5D**), παρατηρούμε ότι στα κύτταρα που έχει αποσιωπηθεί η Vav2, ο TGF-β δεν ενεργοποιεί τη RhoA πέρα από τα επίπεδα ενεργοποίησης της απουσία TGF-β. Επομένως η εξαρτώμενη από τον TGF-β ενεργοποίηση της RhoA αναστέλλεται σε σημαντικό βαθμό απουσία της Vav2, γεγονός που υποδηλώνει ότι η Vav2 εμπλέκεται ότι στο μηχανισμό ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β.



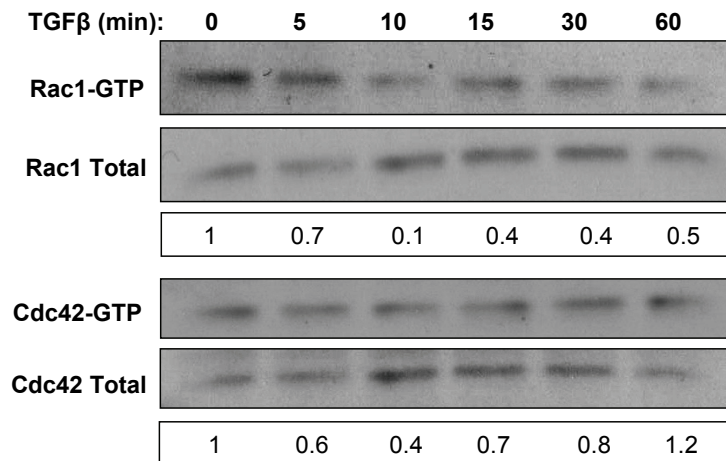
Εικόνα 3.1.5: Η ενεργοποίηση των *Src* και *Vav2* χρειάζεται για την ενεργοποίηση της *RhoA* από τον *TGF-β*.

A. Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της *RhoA* (*RhoA-GTP/RhoA total*) με χρήση των σφαιριδίων *GST-RBD Rhotectkin*, μετά από επίδραση με 5 ng/ml *TGF-β* για 5 λεπτά παρουσία ή απουσία του αναστολέα της οικογένειας των *Src* κινασών *PP2* (10 μM). **B.** Ανάλυση των mRNA επιπέδων της *Vav2* με qRT-PCR, όπου δείχνεται η αποτελεσματικότητα του siRNA για τη *Vav2* (*siVav2*) που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα που παρουσιάζεται στο πάνελ C. **C.** Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της *RhoA* (*RhoA-GTP/RhoA total*) με χρήση των σφαιριδίων *GST-RBD Rhotectkin*, στα JEG3 κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί παροδικά με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) ή το siRNA που στοχεύει τη *Vav2* (*siVav2*) και επωαστεί με 5 ng/ml *TGF-β* για 5 λεπτά. **D.** Γραφική αναπαράσταση των ποσοτικοποιημένων ενεργών επιπέδων της *RhoA* (*RhoA-GTP/RhoA total*) (% ποσοστό) που παρουσιάζονται στο πάνελ C, όπου η ενεργότητα της *RhoA* στα μη διεγερμένα κύτταρα (NC siRNA-, *siVav2*-) έχει τεθεί ως 1.

Η αύξηση των επιπέδων της ενεργού *RhoA* κατά την αποσιώπηση της *Vav2* απουσία διέγερσης με *TGF-β* θα μπορούσε να οφείλεται σε κάποιο ανταγωνιστικό μηχανισμό της *RhoA* με τη *Rac1* [2,214]. Η *Vav2* θα μπορούσε να ρυθμίζει τα βασικά επίπεδα ενεργοποίησης της *Rac1* ή/και της *Cdc42* στα κύτταρα JEG3, δεδομένης της ευρείας ειδικότητας της ως προς τις *RhoA*, *Rac1* και *Cdc42*, επομένως η αποσιώπηση της και μόνο θα μπορούσε να διεγείρει ανταγωνιστικά την αύξηση των ενεργών επιπέδων της *RhoA*, λόγω της μείωσης των ενεργών επιπέδων της *Rac1* ή/και της *Cdc42*.

3. Αποτελέσματα

Λόγω της ευρείας ειδικότητας της Vav2 για τις Rac1, Cdc42 και RhoA GTPάσες, η ενεργοποίηση της Vav2 από τον TGF-β θα μπορούσε επίσης να οδηγεί στην ενεργοποίηση και της Rac1 ή/και της Cdc42. Παρόλα αυτά ο TGF-β δεν επηρέασε τα ενεργά επίπεδα των Rac1 και Cdc42 μετά από σύντομη επίδραση στα JEG3 κύτταρα, ενώ μάλιστα οδήγησε σε μείωση τους σε Swiss 3T3 ινοβλάστες μόλις μετά από 5-10 λεπτά επίδρασης (**Εικόνα 3.1.6**), ενισχύοντας ακόμη περισσότερο το συμπέρασμα, ότι η ενεργοποίηση της Vav2 από τον TGF-β σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA.

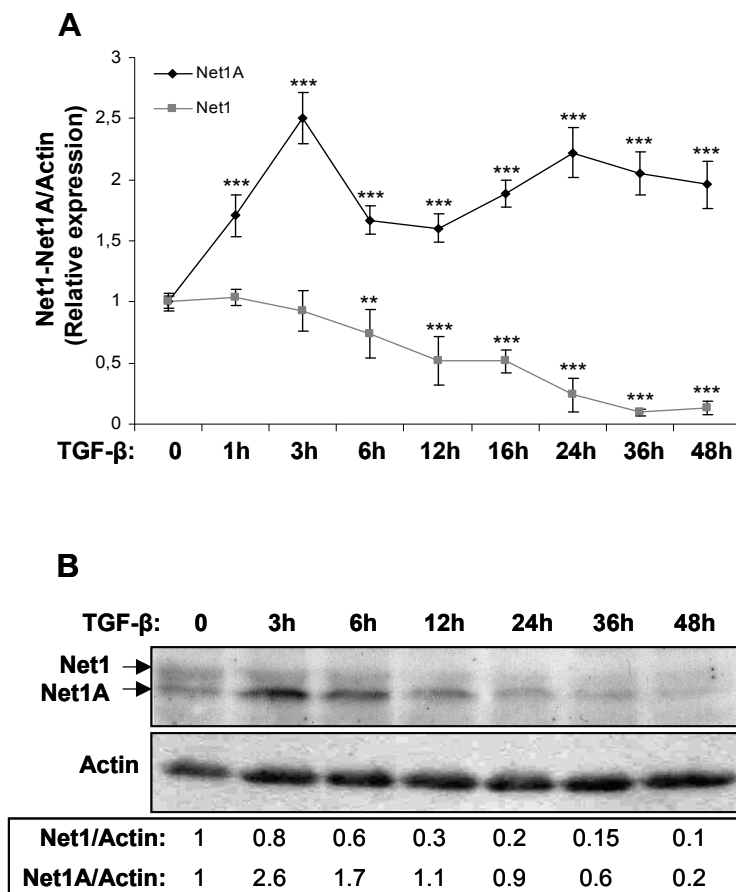


Εικόνα 3.1.6: Ο TGF-β μειώνει τα ενεργά επίπεδα των Rac1 και Cdc42 στους Swiss 3T3 ινοβλάστες. Ανάλυση των ενεργών επιπέδων των Rac1 και Cdc42 με χρήση των σφαιριδίων GST-PAK-PBD σε Swiss 3T3 ινοβλάστες που έχουν διεγερθεί με 5 ng/ml TGF-β για διάφορους χρόνους (5-60 λεπτά).

3.2 Μελέτη της ρύθμισης των ισομορφών της Net1 GEF, Net1 και Net1A, από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) στα HaCaT κερατινοκύτταρα

3.2.1 Η ισομορφή Net1A και όχι η Net1 επάγεται από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος του TGF-β στη ρύθμιση του γονιδίου της Net1 στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Η Net1 απαντάται σε δύο ισομορφές την ισομορφή 1 (Net1) και την ισομορφή 2 (Net1A) και όπως περιγράφεται αναλυτικά στην εισαγωγή (§1.11.1) η Net1A ισομορφή διαφέρει από τη Net1 μόνο στο αμινοτελικό άκρο, όπου αντί των 3 πρώτων εξωνίων περιέχει μία μοναδική περιοχή από το ιντρόνιο 3 του γονιδίου της Net1.

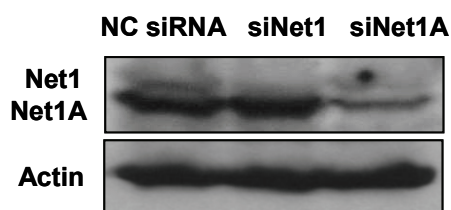


Εικόνα 3.2.1: Η ισομορφή 2 της Net1 (Net1A) και όχι η ισομορφή 1 (Net1) επάγεται από τον TGF-β. **A.** Ανάλυση των επιπέδων mRNA της ισομορφής 1 της Net1, Net1, και της ισομορφής 2 της Net1, Net1A με qRT-PCR και **(B)** ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Net1 και Net1A σε HaCaT κερατινοκύτταρα που επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για διάφορα χρονικά διαστήματα. Το γονίδιο της β-actin χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων στο πάνελ A και η β-ακτίνη ως πρωτεΐνη ελέγχου φορτώματος των δειγμάτων (loading control). ** p value<0.01, *** p value<0.001.

3. Αποτελέσματα

Αρχικά μελετήθηκε η μεταγραφική ρύθμιση των δύο ισομορφών από τον TGF-β με ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου (qRT-PCR). Για το σκοπό αυτό σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές οι οποίοι επιλεκτικά ενισχύουν την κάθε ισομορφή και για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων προσδιορίστηκε παράλληλα ως γονίδιο αναφοράς το mRNA του γονιδίου της β-actin. Συγκεκριμένα, ο πρόσθιος εκκινητής για κάθε ισομορφή αναγνωρίζει τη μοναδική περιοχή στο αμινοτελικό άκρο, ενώ ο ανάστροφος εκκινητής προσδένεται σε κοινή περιοχή των Net1 και Net1A. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1 – 48 ώρες). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.1A** ο TGF-β οδήγησε σε επιλεκτική αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A, η οποία κατέστη προφανής ήδη μετά από 1 ώρα επώασης με TGF-β, κορυφώθηκε στις 3 ώρες (2.50 ± 0.21) και διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλά επίπεδα μέχρι τις 48 ώρες (1.96 ± 0.19). Αντίθετα τα επίπεδα mRNA της Net1 ισομορφής παρέμειναν σταθερά στην αρχική φάση, αλλά μετά από 12 ώρες επίδρασης μειώθηκαν σημαντικά (0.52 ± 0.20) και σχεδόν εξαλείφθηκαν στις 48 ώρες (0.13 ± 0.05).

Για τη μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων των δύο ισομορφών χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα κατά της Net1 (goat anti-Net1 (N-17), Santa Cruz Biotechnology) το οποίο στοχεύει στην κοινή περιοχή των δύο ισομορφών, καθιστώντας έτσι εφικτή την ταυτόχρονη ανίχνευσή τους. Η Net1 ισομορφή είναι μεγαλύτερη κατά 54 αμινοξέα από τη Net1A, κατά συνέπεια εμφανίζεται ως μία ζώνη περίπου 65 kDa ενώ η Net1A ως μία ζώνη περίπου 60 kDa αντίστοιχα στα western blots. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.2** η κάτω ζώνη που αντιπροσωπεύει τη Net1A είναι πιο έντονη σε σχέση με την ανώτερη και ιδιαίτερα ασθενή ζώνη που αντιστοιχεί στη Net1.



Εικόνα 3.2.2: Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Net1 και Net1A στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από επιλεκτική αποσιώπηση των Net1 (ανώτερη ζώνη) και Net1A (κατώτερη ζώνη) με ειδικά σχεδιασμένα siRNA (siNet1 και siNet1A).

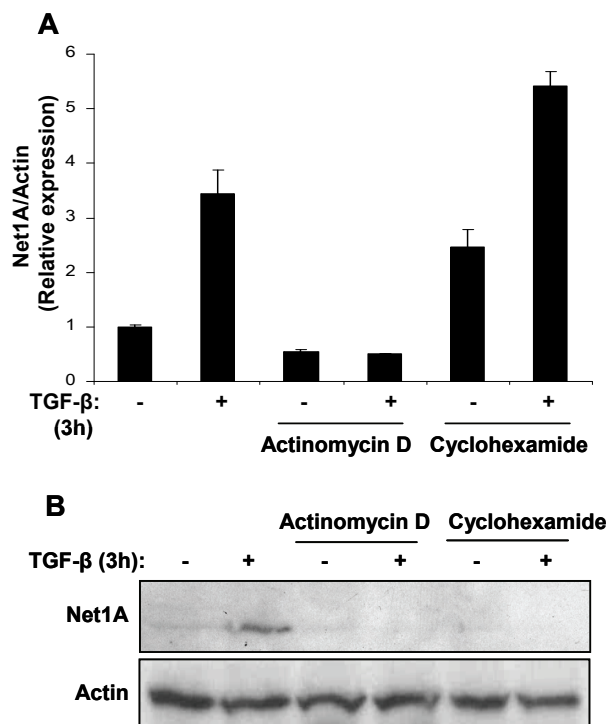
Στο παρόν πείραμα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 10% FBS και ακολούθως επιμολύνθηκαν με siRNA αρνητικού ελέγχου (negative control siRNA) ή siRNA που στοχεύουν ειδικά στη Net1 (siNet1) ή στη Net1A (siNet1A) ισομορφή. Παρουσία του siRNA για τη Net1 η πάνω ζώνη εξαφανίζεται ενώ η κάτω ζώνη παραμένει ανεπηρέαστη, επιβεβαιώνοντας ότι η ζώνη αυτή αντιστοιχεί στη Net1 ισομορφή. Αντιστοίχως τα επίπεδα της κάτω ζώνης μειώνονται αισθητά παρουσία του siRNA για τη Net1A. Πρέπει να σημειωθεί ότι η παρατήρηση της ανώτερης ζώνης (Net1) είναι ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτείται πολύ μεγάλη

ποσότητα ολικών πρωτεϊνών για να καταστεί εφικτή η ανίχνευσή της. Κατά συνέπεια σε πειράματα που εστιάζουν στη μελέτη της επαγωγής της Net1A από τον TGF- β στα western blots δεν φαίνεται πάντα η Net1 ισομορφή.

Η αύξηση των επιπέδων mRNA της ισομορφής Net1A συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση των πρωτεϊνικών της επιπέδων όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.1B** (κατώτερη ζώνη). Σε συμφωνία με την κινητική των mRNA επιπέδων η αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A κορυφώνεται μετά από 3 ώρες επίδρασης με TGF- β και διατηρείται μέχρι τις 12 ώρες. Αντίθετα όμως, ενώ τα επίπεδα mRNA παραμένουν υψηλά στις 24 και 48 ώρες, τα πρωτεϊνικά επίπεδα επιστρέφουν στα βασικά επίπεδα στις 24 ώρες και ελαττώνονται σημαντικά μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF- β . Παράλληλα, σε πλήρη αντιστοιχία με τα mRNA επίπεδα, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της ισομορφής Net1 (ανώτερη ζώνη) παραμένουν σταθερά στους μικρούς χρόνους επίδρασης και ελαττώνονται μετά από 12 ώρες, για να εξαφανιστούν πλήρως μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF- β .

3.2.2 Η αύξηση των επιπέδων της Net1A από τον TGF- β οφείλεται σε μεταγραφική ενεργοποίηση

Ακολούθως διερευνήθηκε αν η αύξηση των επιπέδων της Net1A ισομορφής οφείλεται σε μεταγραφική ενεργοποίηση ή σε σταθεροποίηση του mRNA από τον TGF- β .



Εικόνα 3.2.3: Επίδραση των αναστολέων ακτινομυκίνη και κυκλοεξαμίδιο στα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης της Net1A.

A. Ανάλυση των επιπέδων mRNA της Net1A με qRT-PCR και **(B)** των αντίστοιχων πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A στα HaCaT κερατινοκύτταρα που επώαστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες παρουσία ή απουσία των αναστολέων της μεταγραφής ακτινομυκίνη (actinomycin D, 2 μ g/ml) και της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξαμίδιο (cyclohexamide, 5 μ g/ml).

Για το λόγο αυτό, τα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από 24 ώρες καλλιέργειας απουσίας ορού, προεπώαστηκαν για 1 ώρα με τον γενικό αναστολέα της μεταγραφής ακτινομυκίνη (actinomycin D, 2 µg/ml) και με τον αναστολέα της πρωτεϊνσύνθεσης κυκλοεξαμίδιο (cyclohexamide, 5 µg/ml) και κατόπιν επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 3 ώρες (χρονική στιγμή όπου παρατηρείται κορύφωση της αύξησης των επιπέδων της Net1A). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.3A** η επαγόμενη από τον TGF-β αύξηση των mRNA επιπέδων της Net1A παρεμποδίστηκε πλήρως από την ακτινομυκίνη, ενώ η επώαση με το κυκλοεξαμίδιο συνέβαλλε στη συσσώρευση του mRNA της Net1A λόγω αναστολής της πρωτεϊνσύνθεσης.

Σε πρωτεϊνικό επίπεδο, η επαγόμενη από τον TGF-β αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A ανεστάλη πλήρως τόσο από την ακτινομυκίνη όσο και από το κυκλοεξαμίδιο (**Εικόνα 3.2.3B**). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αύξηση των mRNA επιπέδων της Net1A από τον TGF-β πραγματοποιείται σε μεταγραφικό επίπεδο.

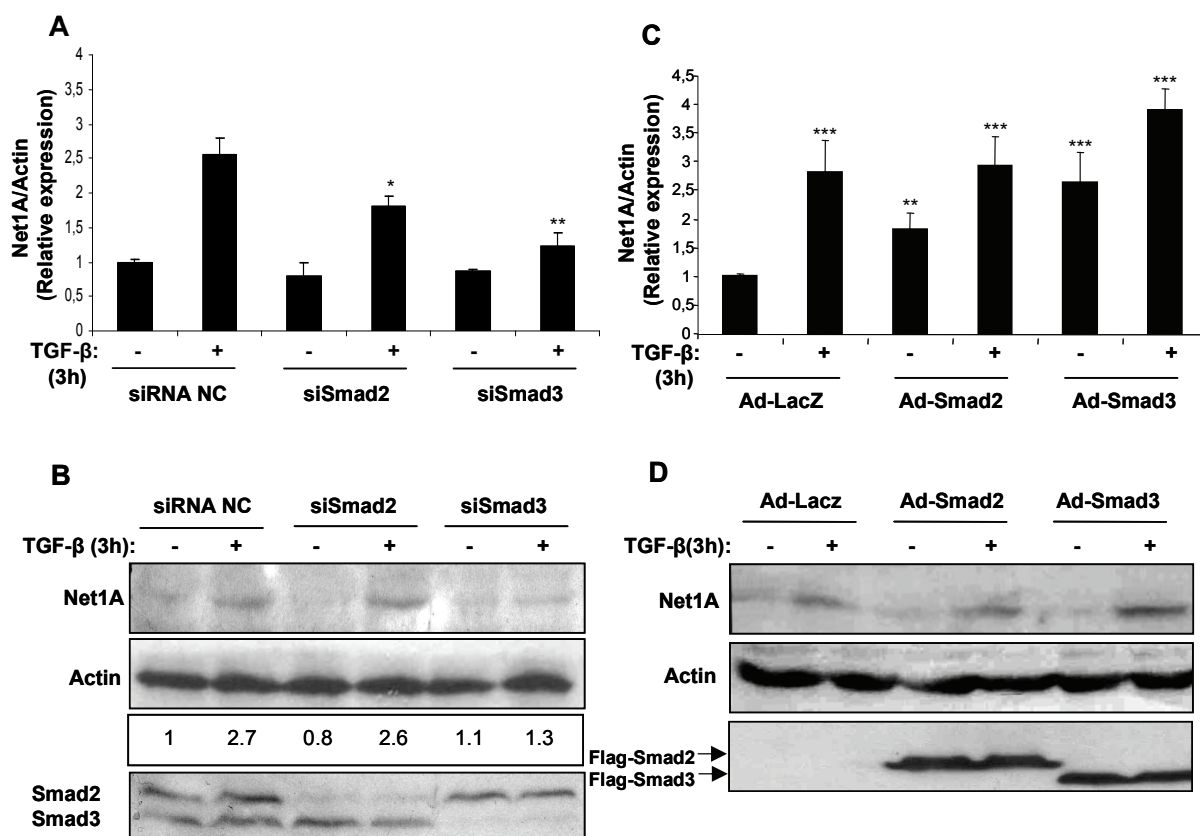
3.2.3 Το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών συμμετέχει στην επαγωγή της Net1A από τον TGF-β

Ακολούθως διερευνήθηκε ο ρόλος των κύριων τελεστών του Smad μονοπατιού (Smad2 και Smad3) που ενεργοποιείται από τον TGF-β στην επαγωγή της Net1A ισομορφής. Για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 αποσιωπήθηκαν επιλεκτικά χρησιμοποιώντας siRNA που στοχεύουν ειδικά σε κάθε πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα τα κύτταρα επιμολύνθηκαν σε δύο γύρους επιμόλυνσης με το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC) και με το siRNA για τη Smad2 (siSmad2) ή τη Smad3 (siSmad3), καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και μετά επώαστηκαν με TGF-β για 3 ώρες. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.4A** ανάλυση των mRNA επιπέδων της Net1A με qRT-PCR έδειξε ότι η αποσιώπηση της Smad2 είχε σαν αποτέλεσμα τη μερική μείωση των επιπέδων της Net1A (από 2.55 ± 0.25 σε 1.81 ± 0.15 , p value < 0.05), ενώ η αποσιώπηση της Smad3 οδήγησε σε σχεδόν πλήρη αναστολή της επαγωγής της Net1A από τον TGF-β (1.24 ± 0.18 , p value < 0.01).

Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η αποσιώπηση της Smad3 είχε σαν συνέπεια την πλήρη μείωση των επαγόμενων από τον TGF-β πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A (**Εικόνα 3.2.4B**). Η αποτελεσματικότητα και ειδικότητα της αποσιώπησης των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3 ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που ανιχνεύει ταυτόχρονα τις Smad2 και Smad3 (rabbit anti-Smad2/3 FL-425, Santa Cruz Biotechnology, USA).

Κατά τη διερεύνηση του ρόλου των Smad πρωτεϊνών στην αύξηση των επιπέδων της Net1A από τον TGF-β πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα υπερέκφρασης των Smad2 και Smad3 μέσω διαμόλυνσης των κυττάρων με ανασυνδιασμένους αδενοϊούς. Συγκεκριμένα, τα HaCaT κερατινοκύτταρα διαμολύνθηκαν με έναν αδενοϊό ελέγχου που εκφράζει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (ad-LacZ), καθώς και με τους αδενοϊούς που εκφράζουν τις αγρίου τύπου μορφές των Smad2 (ad-Smad2) και Smad3 (ad-Smad3), ακολούθως καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες και επώαστηκαν με TGF-β για 3 ώρες και το mRNA

της Net1A προσδιορίστηκε με qRT-PCR, ενώ τα πρωτεϊνικά της επίπεδα καθορίστηκαν με western blot. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.4C** η υπερέκφραση της Smad2 οδήγησε σε μέτρια αύξηση των mRNA επιπέδων της Net1A απουσία διέγερσης των κυττάρων με TGF- β (1.84 ± 0.27 , p value < 0.01), ενώ η υπερέκφραση της Smad3 απουσία TGF- β είχε σαν αποτέλεσμα μία υψηλότερη αύξηση (2.65 ± 0.50 , p value < 0.001), η οποία ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο παρουσία TGF- β (3.92 ± 0.34 , p value < 0.001).



Εικόνα 3.2.4: Το μονοπάτι των Smad χρειάζεται για την επαγωγή της Net1A από τον TGF- β .

A. Ανάλυση των επιπέδων mRNA της Net1A με qRT-PCR και **(B)** των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A σε HaCaT κύτταρα που επιμολύνθηκαν παροδικά με το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC) και με τα siRNA που στοχεύουν επιλεκτικά στη Smad2 (siSmad2) και τη Smad3 (siSmad3) και επώαστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες. Η ανοσοαποτύπωση για τις ενδογενείς Smad2 και Smad3 παρουσιάζει την αποτελεσματικότητα και ειδικότητα της αποσιώπησης της κάθε πρωτεΐνης. **C.** Ανάλυση των επιπέδων mRNA της Net1A με qRT-PCR και **(D)** των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A σε HaCaT κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τους αδενοϊούς ad-Lacz (αδενοϊός ελέγχου), ad-Smad2 και ad-Smad3 και επώαστηκαν ή όχι με TGF- β για 3 ώρες. Η ανοσοαποτύπωση με το anti-flag M5 αντίσωμα παρουσιάζει το βαθμό υπερέκφρασης των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών. * p value < 0.05, ** p value < 0.01, *** p value < 0.001.

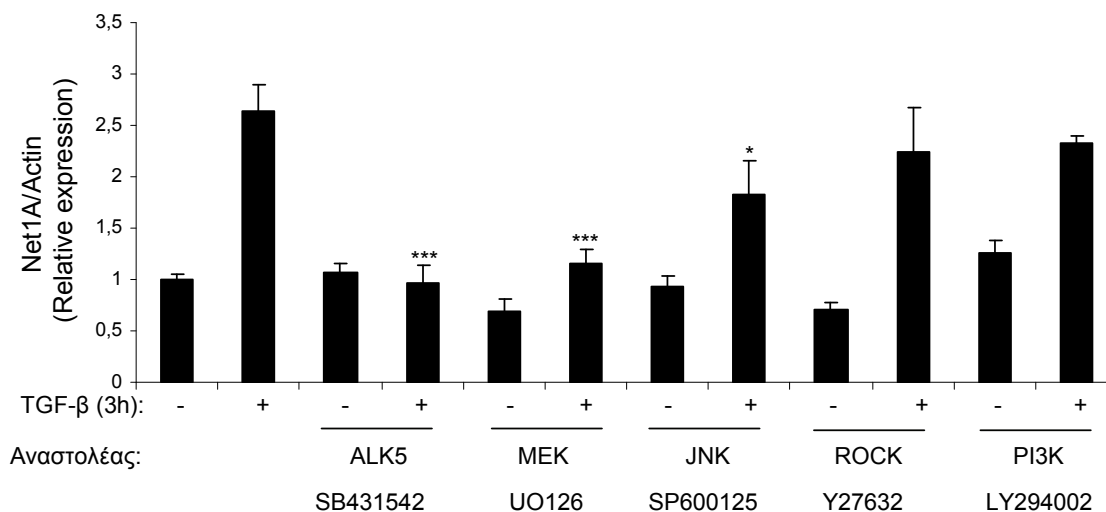
Ενδιαφέρον αποτελεί, ότι, η υπερέκφραση είτε της Smad2 είτε της Smad3 – παρά την τροποποίηση των mRNA επιπέδων – δεν ήταν αρκετή για να οδηγήσει σε αύξηση των αντίστοιχων πρωτεϊνικών επιπέδων απουσία TGF- β (**Εικόνα 3.2.4D**), υποδεικνύοντας ότι και

3. Αποτελέσματα

άλλα μόρια τελεστές του μονοπατιού του TGF- β εκτός από τις Smad2 και Smad3 είναι απαραίτητα για την αποτελεσματική μετάφραση ή σταθεροποίηση της Net1A πρωτεΐνης.

3.2.4 Το MEK/ERK μονοπάτι των MAPK κινασών συμμετέχει στη ρύθμιση της επαγωγής της Net1A από τον TGF- β

Είναι καθιερωμένο πλέον ότι ο TGF- β ενεργοποιεί εκτός από το κλασσικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία δεν εξαρτώνται από τις Smad πρωτεΐνες (non Smad-dependent signaling pathways), όπως είναι τα μονοπάτια των MAPK κινασών, ERK, JNK, p38 και τα μονοπάτια των PI3K και ROCK κινασών [113,114]. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε το ενδεχόμενο η επαγωγή της Net1A από τον TGF- β να ρυθμίζεται πέραν των Smad και από επιπρόσθετα σηματοδοτικά μονοπάτια. Για το σκοπό αυτό τα HaCaT κερατινοκύτταρα προεπώαστηκαν με διάφορους αναστολείς 1 ώρα πριν από την επώασή τους με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες και ακολούθως αναλύθηκαν τα mRNA επίπεδα της Net1A με qRT-PCR. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ο αναστολέας της MEK κινάσης UO126 (10 μ M), ο αναστολέας της JNK κινάσης SP600125 (20 μ M), ο αναστολέας της ROCK κινάσης Y27632 (10 μ M), ο αναστολέας της PI3K κινάσης LY294002 (20 μ M) και ο αναστολέας του υποδοχέα τύπου I του TGF- β (ALK5) SB431542 (10 μ M).



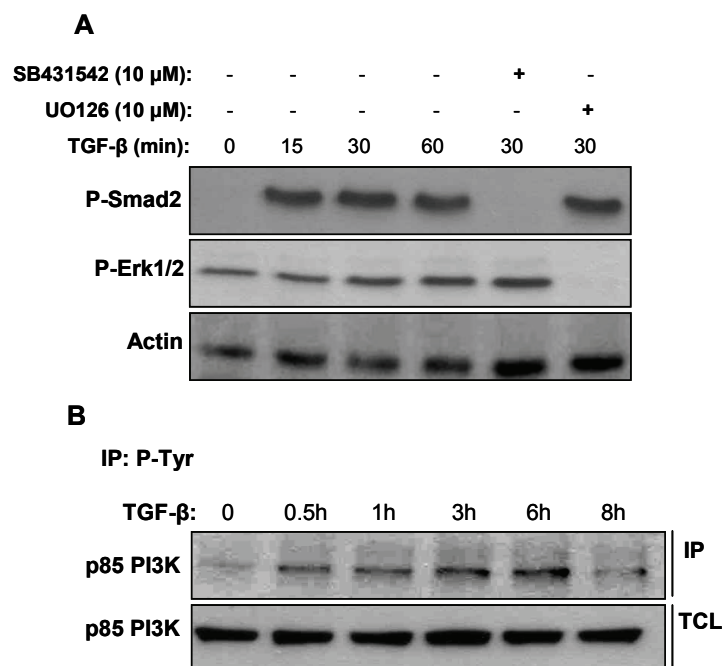
Εικόνα 3.2.5: Μελέτη της επίδρασης των αναστολέων διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών στην επαγωγή της Net1A από τον TGF- β .

Ανάλυση των επιπέδων mRNA της Net1A με qRT-PCR μετά από προεπώαση των κυττάρων με τους αναστολείς του υποδοχέα ALK5, SB431542 (10 μ M), της MEK κινάσης, UO126 (10 μ M), της JNK κινάσης (20 μ M), της ROCK κινάσης (10 μ M) και της PI3K κινάσης (20 μ M) και επίδραση ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες. Το γονίδιο της β -actin χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. * p value < 0.05, *** p value < 0.001.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.5** εκτός από τον αναστολέα του ALK5, SB431542 (0.97 ± 0.17 από 2.63 ± 0.26), ο αναστολέας της MEK κινάσης UO126 (1.15 ± 0.15) προκάλεσε την πλέον σαφή μείωση στα επίπεδα mRNA της Net1A που επάγεται από τον TGF- β , ενώ οι αναστολείς

της JNK κινάσης SP600125 (1.82 ± 0.32), της ROCK κινάσης Y27632 (2.33 ± 0.07) και της PI3K κινάσης LY294002 (2.24 ± 0.44) προκάλεσαν μικρό έως αμελητέο ανασταλτικό αποτέλεσμα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι στην επαγωγή της Net1A από τον TGF- β εκτός από το μονοπάτι των Smad συμμετέχει και το μονοπάτι των MAPK κινασών MEK/ERK.

Παράλληλα μελετήθηκε και η ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών των Smad, Erk, και PI3K στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από επίδραση με TGF- β για διάφορους χρόνους, καθώς και η αποτελεσματικότητα και ειδικότητα των αναστολέων του υποδοχέα ALK5, SB431542 ($10 \mu\text{M}$) και της MEK, UO126 ($10 \mu\text{M}$). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.6A** ο TGF- β εκτός από τη Smad2 ενεργοποίησε κυρίως την Erk2 κινάση (κατώτερη ζώνη) σε σχέση με την Erk1 μετά από 30–60 λεπτά. Ο αναστολέας του υποδοχέα ALK5, SB431542 ανέστειλε αποτελεσματικά την φωσφορυλίωση της Smad2 χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της P-Erk1/2, ενώ ο αναστολέας της MEK κινάσης, UO126, ανέστειλε πλήρως την φωσφορυλίωση της Erk1/2 κινάσης χωρίς να επηρεάσει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της P-Smad2.



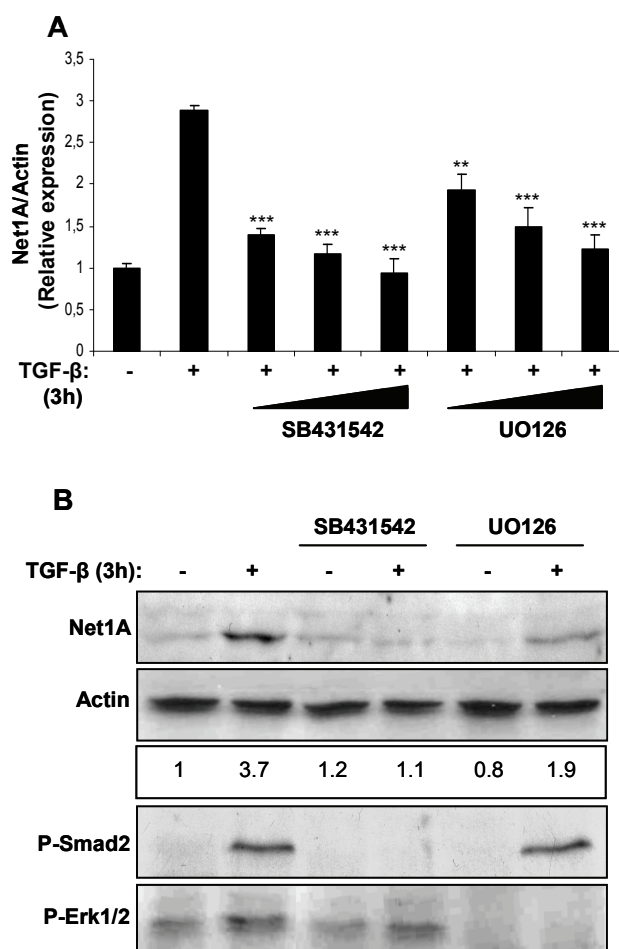
Εικόνα 3.2.6: Τα μονοπάτια των Smad, Erk και PI3K ενεργοποιούνται στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από επίδραση με TGF- β .

A. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των P-Smad2 και P-Erk1/2 στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF- β για 15 – 60 λεπτά και μετά από επίδραση με τους αναστολείς του υποδοχέα ALK5, SB431542 ($10 \mu\text{M}$) και της MEK κινάσης, UO126 ($10 \mu\text{M}$) και επίδραση με 5 ng/ml TGF- β για 30 λεπτά. **B.** Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της p85 υπομονάδας της PI3K (P-PI3K) μετά από ανοσοκατακρήμνιση (immunoprecipitation, IP) των φωσφορυλιωμένων τυροσινών (P-Tyr), παράλληλα με τα ολικά επίπεδα της p85 της PI3K (TCL, total cell lysate) μετά από επώαση με 5 ng/ml TGF- β για διάφορους χρόνους (από 30 λεπτά – 8 ώρες).

3. Αποτελέσματα

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.6B** η ενεργοποίηση της PI3K κινάσης παρατηρήθηκε μετά από 30 λεπτά και κορυφώθηκε στις 3-6 ώρες επίδρασης με TGF- β και παρότι το μονοπάτι της PI3K κινάσης ενεργοποιείται ξεκάθαρα στα HaCaT κερατινοκύτταρα, δεν εμπλέκεται στην επαγωγή της Net1A από τον TGF- β .

Ακολούθως χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις των αναστολέων SB431542 και UO126 (από 1 μ M έως 10 μ M) για να διερευνηθεί η ανασταλτική τους δράση ως προς τα επίπεδα mRNA της Net1A σε μικρότερες συγκεντρώσεις από 10 μ M (**Εικόνα 3.2.7A**), όπου παρατηρείται μία σταδιακά αυξανόμενη αναστολή των επαγόμενων από τον TGF- β επιπέδων mRNA της Net1A σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση των αναστολέων ακόμη και με υποδεκαπλάσια συγκέντρωση.

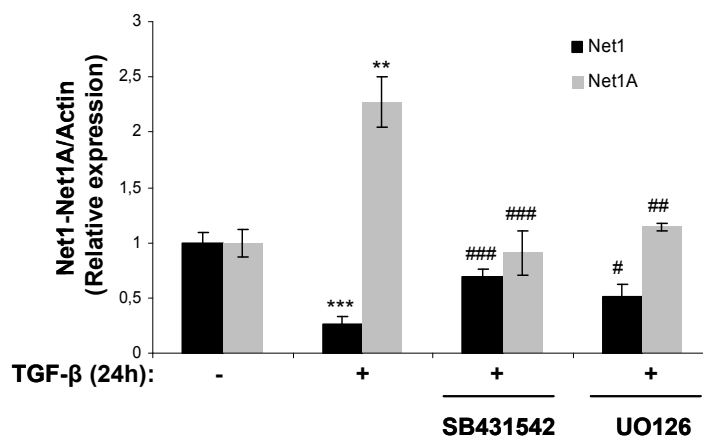


Εικόνα 3.2.7: Το MEK/ERK μονοπάτι των MAPK κινασών εμπλέκεται στη ρύθμιση της επαγωγής της Net1A από τον TGF- β .

A. Ανάλυση των επιπέδων mRNA της Net1A στα HaCaT κύτταρα που επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων (1, 5 και 10 μ M) των αναστολέων του υποδοχέα τύπου I του TGF- β ALK5, SB431542 και της MEK κινάσης, UO126. **B.** Μελέτη των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A στα HaCaT κύτταρα που επωάστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες παρουσία ή όχι των αναστολέων του υποδοχέα ALK5, SB431542 (10 μ M) και της MEK κινάσης, UO126 (10 μ M). Η ανοσοαποτύπωση για τις P-Smad2 και P-Erk1/2 δείχνει την ειδικότητα και αποτελεσματικότητα των αναστολέων SB431542 και UO126 αντίστοιχα. **p value<0.01, ***p value<0.001.

Για τη συμμετοχή του MEK/ERK μονοπατιού στην επαγωγή της Net1A από τον TGF- β προκύπτουν αντίστοιχα συμπεράσματα και από την μελέτη της επίδρασης των αναστολέων SB431542 και UO126 στα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1A μετά από επώαση με TGF- β για 3 ώρες (**Εικόνα 3.2.7B**). Η ειδικότητα και αποτελεσματικότητα των αναστολέων SB431542 και UO126 επιβεβαιώθηκε με την ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των φωσφορυλιωμένων μορφών των Smad2 (P-Smad2) και Erk1/2 (P-Erk1/2) αντίστοιχα.

Τα δύο αυτά μονοπάτια φαίνεται να ρυθμίζουν και τη μακρόχρονη αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A μετά από επίδραση με TGF- β για 24 ώρες, καθώς όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.8** και οι δύο αναστολείς μπλόκαραν την επαγωγή της Net1A από τον TGF- β , ενώ παράλληλα περιόρισαν τη μείωση των επιπέδων της Net1 από τον TGF- β .



Εικόνα 3.2.8: Τα μονοπάτια των Smad και MEK/ERK παίζουν ρόλο στη μακρόχρονη ρύθμιση των επιπέδων mRNA των Net1 και Net1A από τον TGF- β .

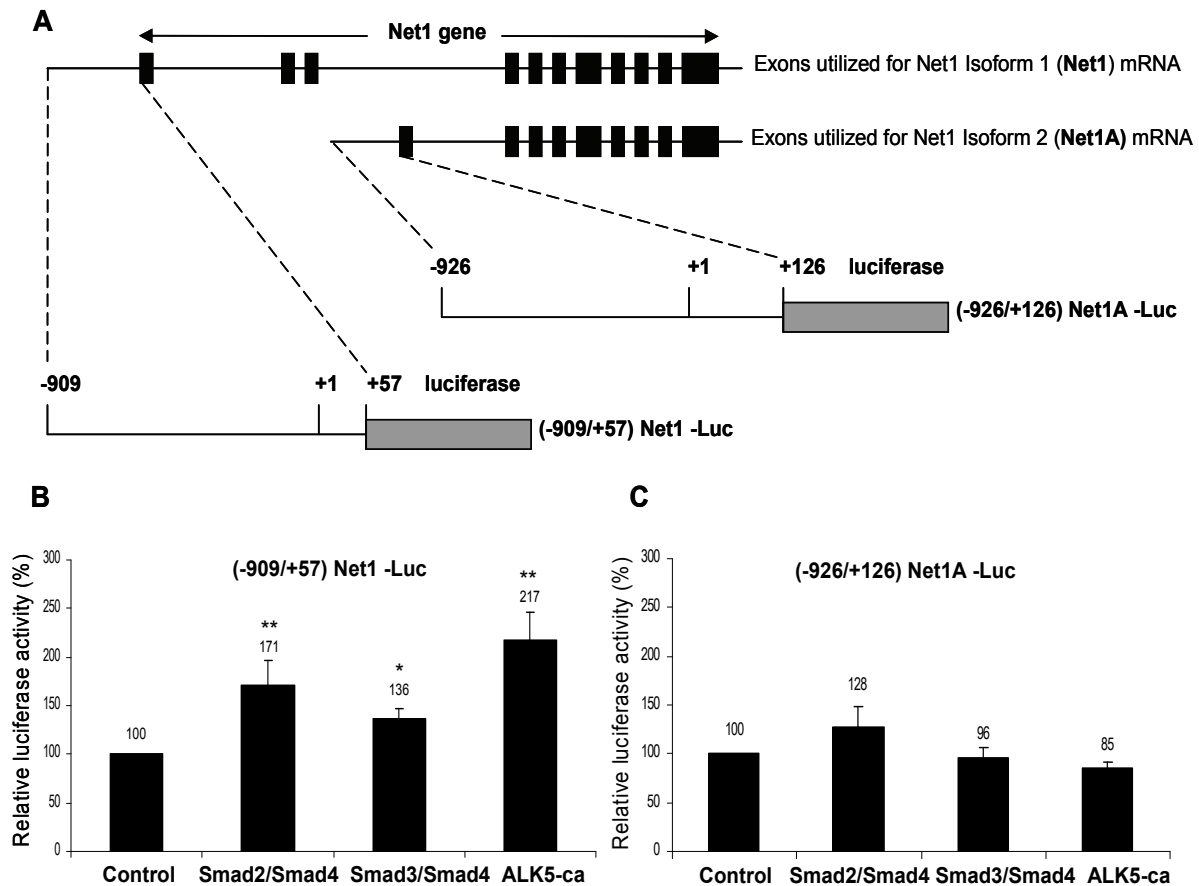
Ανάλυση των επιπέδων mRNA των Net1 και Net1A με qRT-PCR στα HaCaT κερατινοκύτταρα που επωάστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 24 ώρες παρουσία ή όχι του αναστολέα του υποδοχέα ALK5, SB431542 (10 μ M) και του αναστολέα της MEK κινάσης, UO126 (10 μ M). Το γονίδιο της β -actin χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. **p value<0.01, ***p value<0.001 ως προς το δείγμα ελέγχου, #p value<0.05, ##p value<0.01, ###p value<0.001 ως προς τις 24 ώρες TGF- β .

3.2.5 Ο TGF- β ενεργοποιεί τον υποκινητή του γονιδίου της Net1

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η υπόθεση αν η επιλεκτική αύξηση των επιπέδων της ισομορφής Net1A από τον TGF- β οφείλεται σε ενεργοποίηση κάποιου μοναδικού υποκινητή ή σε κάποιο μετα-μεταγραφικό γεγονός που ρυθμίζεται από τον TGF- β . Όπως έχει ήδη ειπωθεί, το mRNA της Net1A ισομορφής περιέχει μία μοναδική περιοχή που είναι τμήμα του ιντρονίου 3 του γονιδίου της Net1 αντί των 3 πρώτων εξωνίων που βρίσκονται στο mRNA της ισομορφής Net1. Υποθέσαμε ότι ένας ενεργός υποκινητής μπορεί να βρίσκεται σε αυτή την ιντρονική περιοχή 5' ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1) του mRNA της Net1A. Για το λόγο αυτό κλωνοποιήθηκε τμήμα του υποκινητή του γονιδίου της Net1 (-909/+57) καθώς και ένα τμήμα της ιντρονικής περιοχής 5' ως προς το (+1) του mRNA της Net1A (-926/+126) σε

3. Αποτελέσματα

σύζευξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης (**Εικόνα 3.2.9A**) με σκοπό να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα μέτρησης της δραστικότητας της λουσιφεράσης προκειμένου να καθοριστεί η απόκρισή τους στο TGF- β /Smad σηματοδοτικό μονοπάτι.



Εικόνα 3.2.9: Ο TGF- β ενεργοποιεί τον υποκινητή της Net1 και όχι τον υποθετικό υποκινητή της Net1A.

Σχηματική απεικόνιση των εξωνίων του γονιδίου της Net1 που χρησιμοποιούνται για το mRNA των ισομορφών Net1 και Net1A. Παρουσιάζονται τα τμήματα του υποκινητή της Net1 και του ιντρονίου 3 που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του υποκινητή της Net1 (-909/+57)Net1-Luc και του υποθετικού υποκινητή της Net1A (-926/+126)Net1A-Luc σε σύζευξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης (Luc) (**A**). Τα HaCaT κερατινοκύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς (-909/+57)Net1-Luc (**B**) και (-926/+126)Net1A-Luc (**C**) μαζί με τα πλασμίδια έκφρασης των αγρίου τύπου μορφών των πρωτεϊνών Smad2, Smad3 και Smad4, καθώς και με τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα τύπου I του TGF- β , ALK5-ca και 48 ώρες μετά την επιμόλυνση προσδιορίστηκε η ενεργότητα της λουσιφεράσης. Το CMV β -gal πλασμίδιο που εκφράζει τη β -γαλακτοσιδάση συμπεριλήφθηκε σε κάθε δείγμα για την κανονικοποίηση της μεταβλητότητας κατά την επιμόλυνση. * p value<0.05, ** p value<0.01.

Οι δύο αυτές κατασκευές των υποκινητών (-909/+57) Net1-Luc και (-926/+126) Net1A-Luc υπερεκφράστηκαν στα HaCaT κερατινοκύτταρα μαζί με τα πλασμίδια έκφρασης των αγρίου τύπου μορφών των πρωτεϊνών Smad2, Smad3 και Smad4, καθώς και με τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα τύπου I του TGF- β , ALK5-ca. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.2.9B** η υπερέκφραση

της συνεχώς ενεργής μορφής του υποδοχέα, ALK5-ca, ενίσχυσε την ενεργότητα της περιοχής -909/+57 του υποκινητή του γονιδίου της Net1 κατά 2.17 ± 0.28 φορές (p value < 0.01), ενώ δεν επηρέασε την ενεργότητα της περιοχής -926/+126 του υποθετικού υποκινητή της Net1A (**Εικόνα 3.2.9C**).

Η υπερέκφραση των Smad2/Smad4 και Smad3/Smad4 ενίσχυσε την περιοχή -909/+57 του υποκινητή του γονιδίου της Net1 σε μικρότερο βαθμό (1.71 ± 0.24 και 1.35 ± 0.11 αντίστοιχα) σε σχέση με τον ALK5-ca, υποδεικνύοντας ότι και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες επιστρατεύονται από το μονοπάτι του TGF- β για την πλήρη ενεργοποίηση του υποκινητή. Αντίθετα η υπερέκφραση των Smad2/Smad4 και Smad3/Smad4 δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργότητα της περιοχής -926/+126 του υποθετικού υποκινητή της Net1A. Τα παραπάνω αποτελέσματα από τη μέτρηση της δραστηριότητας του υποκινητή του γονιδίου της Net1 και του υποθετικού υποκινητή της Net1A δείχνουν ότι ο TGF- β χρησιμοποιεί τον κανονικό υποκινητή του γονιδίου της Net1 για την επαγωγή της Net1A ισομορφής, η οποία φαίνεται ότι είναι προϊόν εναλλακτικού ματίσματος.

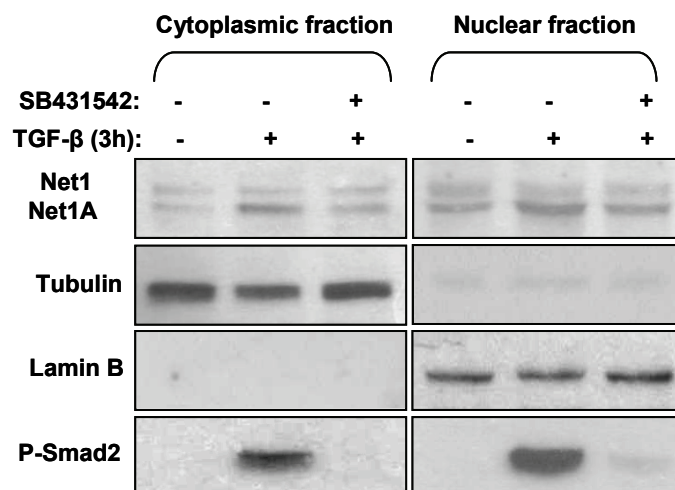
3.3 Η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF- β

3.3.1 Η επαγωγή της Net1A από τον TGF- β οδηγεί στην αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι πρωτεΐνες Net1 και Net1A απαντώνται κυρίως στον πυρήνα, ενώ απαιτείται να μεταφερθούν στον κυτταρόπλασμα για να λειτουργήσουν ως GEFs ως προς τη RhoA. Για το λόγο αυτό αναλύθηκε περαιτέρω ο εντοπισμός της Net1A, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της οποίας, όπως δείχθηκε, αυξάνονται από τον TGF- β . Συγκεκριμένα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες παρουσία ή απουσία του αναστολέα του υποδοχέα ALK5, SB431542 και ακολούθως απομονώθηκαν κυτταροπλασματικά και πυρηνικά κλάσματα.

Η καθαρότητα των κυτταρικών εκχυλισμάτων προσδιορίστηκε με το αντίσωμα anti-tubulin (κυτταροπλασματικός δείκτης) και το αντίσωμα anti-lamin B (πυρηνικός δείκτης), ενώ η αποτελεσματικότητα του αναστολέα SB431542 επιβεβαιώθηκε με προσδιορισμό της φωσφορυλιωμένης μορφής της Smad2 (P-Smad2).

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.3.1** η επίδραση με TGF- β για 3 ώρες οδήγησε σε αυξημένα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1A τόσο στο κυτταροπλασματικό όσο και στο πυρηνικό κλάσμα, τα οποία μειώθηκαν σημαντικά και στα δύο κλάσματα παρουσία του ALK5 αναστολέα, SB431542. Αντίθετα τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1 ισομορφής παρέμειναν σταθερά και στα δύο κλάσματα. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η επίδραση με TGF- β έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A και όχι της Net1.



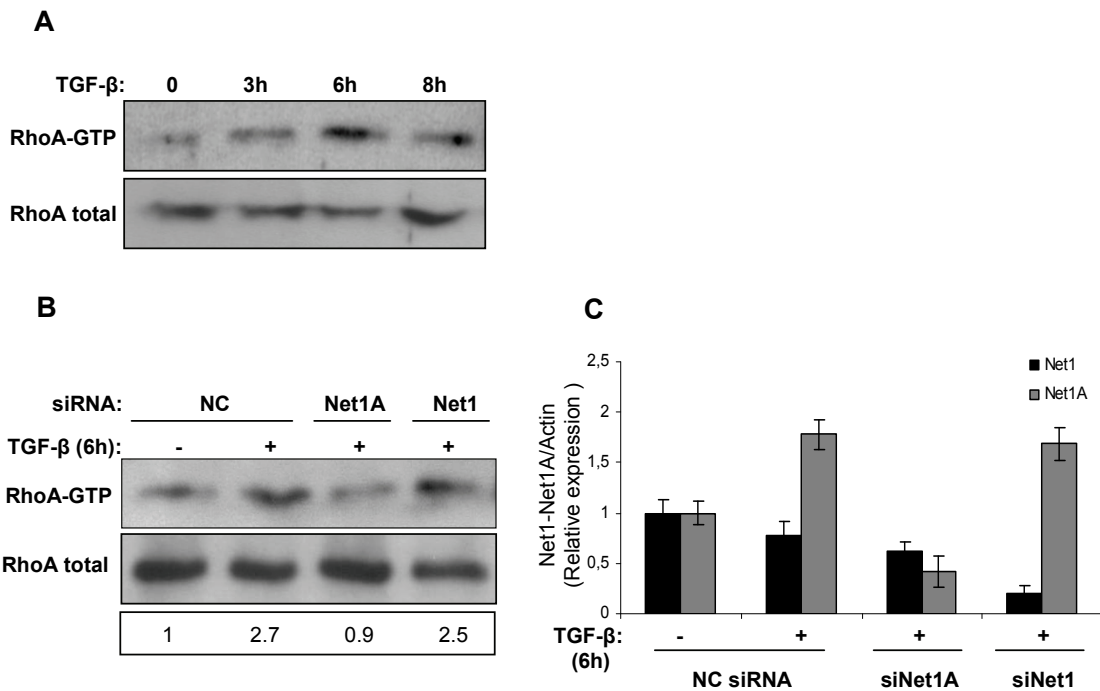
Εικόνα 3.3.1: Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Net1 και Net1A σε κυτταροπλασματικά και πυρηνικά κλάσματα των HaCaT κυττάρων που επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες παρουσία ή όχι του αναστολέα του υποδοχέα τύπου I του TGF- β ALK5, SB431542 (10 μ M). Η Tubulin χρησιμοποιήθηκε ως κυτταροπλασματικός δείκτης και η Lamin B ως πυρηνικός δείκτης για τον έλεγχο της καθαρότητας του κάθε κλάσματος και του φορτώματος των δειγμάτων (loading control). Η ανοσοαποτύπωση για την P-Smad2 δείχνει την αποτελεσματικότητα του αναστολέα SB431542.

3.3.2 Η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF- β

Παράλληλα μελετήθηκε η ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης από τον TGF- β στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 3, 6 και 8 ώρες. Τα επίπεδα της ενεργού RhoA (RhoA-GTP) καθορίστηκαν με κατακρήμνιση συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.3.2A** η ενεργοποίηση της RhoA αυξάνεται στις 3 ώρες και κορυφώνεται μετά από 6 ώρες επίδρασης με TGF- β .

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν η ενεργοποίηση της RhoA που παρατηρείται μετά από 6 ώρες επίδρασης με TGF- β οφείλεται στην αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με ένα siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) και με ειδικά σχεδιασμένα siRNA μόρια τα οποία στοχεύουν επιλεκτικά σε κάθε ισομορφή της Net1, siNet1 και siNet1A, επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 6 ώρες και ακολούθως προσδιορίστηκε η ενεργοποίηση της RhoA με κατακρήμνιση συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.3.3B** η αποσιώπηση της Net1A ισομορφής οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενεργοποίησης της RhoA (0.9 από 2.7), υποδεικνύοντας ξεκάθαρα ότι η ενεργοποίηση της RhoA οφείλεται στην αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A από τον TGF- β . Αντίθετα, η επιλεκτική αποσιώπηση της Net1 δεν είχε ουσιαστική επίπτωση στην ενεργοποίηση της RhoA (2.5 από 2.7). Η ειδικότητα και αποτελεσματικότητα της επιλεκτικής αποσιώπησης των ισομορφών Net1

και Net1A με χρήση των siNet1 και siNet1A προσδιορίστηκε σε επίπεδο mRNA με qRT-PCR (Εικόνα 3.3.3C).



Εικόνα 3.3.2: Η Net1A ισομορφή και όχι η Net1 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β.

A. Ανάλυση των επιπέδων της ενεργού RhoA (RhoA-GTP) μέσω κατακρήμνιση συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin στα HaCaT κύτταρα που επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 3 – 8 ώρες. **B.** Ανάλυση των ενεργών επιπέδων της RhoA (RhoA-GTP) μέσω κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin στα HaCaT κύτταρα που επιμολύνθηκαν παροδικά με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) και με siRNA που στοχεύουν επιλεκτικά σε κάθε ισομορφή, siNet1A και siNet1, και ακολούθως επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 6 ώρες. **C.** Ανάλυση των επιπέδων mRNA των Net1 και Net1A με qRT-PCR για τον έλεγχο της ειδικότητας και αποτελεσματικότητας των siNet1A και siNet1 στο πείραμα του πάνελ B. Το γονίδιο της β-actin χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

3.4 Μελέτη της ρύθμισης της ισομορφής Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β

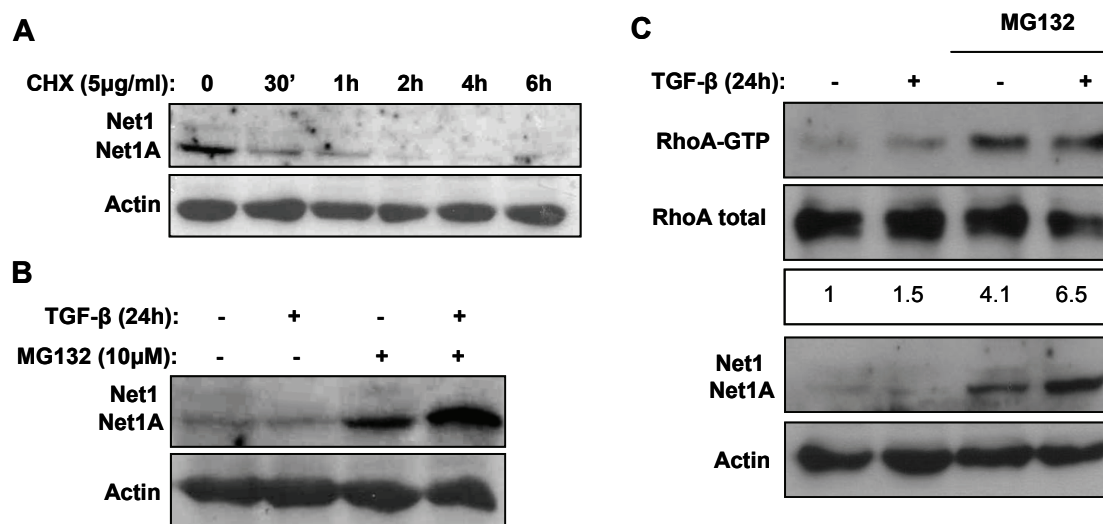
3.4.1 Η Net1A στοχεύεται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β

Όπως συζητήθηκε στην §3.2.1 τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1A μετά από μία αρχική αύξηση (μετά από 3-12 ώρες) επέστρεψαν στα βασικά επίπεδα στις 24 ώρες ενώ ελαττώθηκαν σημαντικά μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF-β, σε αντίθεση με τα mRNA επίπεδα που εξακολούθησαν να είναι υψηλά (**Εικόνα 3.2.1A**). Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτού του ευρήματος μελετήθηκε η πιθανή εμπλοκή του μηχανισμού του πρωτεοσώματος στην στόχευση της Net1A για αποικοδόμηση μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β. Αρχικά, μελετήθηκε η σταθερότητα των ισομορφών Net1 και Net1A σε ένα πείραμα ελέγχου με τη χρήση του αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξαμίδιο (cyclohexamide, CHX). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 10% FBS και ακολούθως επωάστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά–6 ώρες) με 5 μg/ml CHX. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.4.1A** ο χρόνος ημίσειας ζωής και των δύο ισομορφών είναι λιγότερο από 30 λεπτά, υποδεικνύοντας ότι είναι ιδιαίτερα ασταθείς πρωτεΐνες.

Ακολούθως μελετήθηκε η εμπλοκή του πρωτεοσώματος στη μείωση των επιπέδων της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β με τη χρήση του αναστολέα του πρωτεοσώματος MG-132. Συγκεκριμένα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό απουσία ορού για 24 ώρες, επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 24 ώρες και 8 ώρες πριν τη συλλογή τους πραγματοποιήθηκε επίδραση με τον αναστολέα MG-132 (10 μM). Η επώαση των κυττάρων με τον MG-132 αναστολέα είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A τόσο απουσία όσο και παρουσία TGF-β (**Εικόνα 3.4.1B**). Μάλιστα η επώαση με TGF-β για 24 ώρες οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A, εύρημα το οποίο συνάδει με τα αυξημένα mRNA επίπεδα της Net1A μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGF-β. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι ο TGF-β απέτυχε να σταθεροποιήσει τα ιδιαίτερα ασθενή πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1 ισομορφής παρουσία του αναστολέα του πρωτεοσώματος (**Εικόνα 3.4.1B και C κατώτερα blots**), τα οποία όμως φαίνεται να σταθεροποιούνται παρουσία του αναστολέα στο δείγμα ελέγχου. Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτή την παρατήρηση είναι ότι, ο TGF-β ρυθμίζει τα επίπεδα της Net1 σε mRNA επίπεδο (**Εικόνα 3.2.1**) όπου μετά από 24 ώρες επίδρασης έχει προκαλέσει πολύ μεγάλη μείωση στο mRNA της Net1 ισομορφής.

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν η αύξηση των επιπέδων της Net1A που παρατηρήθηκε μετά από αναστολή του πρωτεοσώματος οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση των ενεργών επιπέδων της RhoA (RhoA-GTP). Συγκεκριμένα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, επωάστηκαν με TGF-β για 24 ώρες και 8 ώρες πριν τη συλλογή των δειγμάτων επωάστηκαν με τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG-132 (10 μM). Η

ενεργοποίηση της RhoA προσδιορίστηκε με τη μέθοδο κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια σεφαρόζης GST-RBD Rhotekin. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.4.1C** η αύξηση των επιπέδων της Net1A που προκαλείται από την αναστολή του πρωτεοσώματος συνοδεύτηκε από αντίστοιχη αύξηση της ενεργοποίησης της RhoA.



Εικόνα 3.4.1: Η Net1A στοχεύεται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β.

A. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Net1 και Net1A στα HaCaT κύτταρα που επωάστηκαν με τον αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξαμίδιο (cyclohexamide, CHX, 5 µg/ml) για διάφορους χρόνους (από 30 λεπτά – 6 ώρες) σε θρεπτικό μέσο με 10% FBS. **B.** Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Net1 και Net1A στα HaCaT κύτταρα που επωάστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF-β για 24 ώρες και 8 ώρες πριν τη συλλογή επωάστηκαν ή όχι με τον αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης MG-132 (10 µM). **C.** Ανάλυση των επιπέδων της ενεργού RhoA (RhoA-GTP) μέσω κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια GST-RBD Rhotekin στα HaCaT κύτταρα που επωάστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF-β για 24 ώρες και 8 ώρες πριν τη συλλογή επωάστηκαν ή όχι με τον αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης MG-132 (10 µM). Στο ίδιο πείραμα παρουσιάζονται τα πρωτεϊνικά επίπεδα των Net1 και Net1A μετά από την επίδραση του αναστολέα MG-132.

3.4.2 Τα microRNA miR-24 και miR-155 στοχεύουν άμεσα στην 3'UTR της Net1A

Έχει αναφερθεί πρόσφατα στη βιβλιογραφία ότι η RhoA στοχεύεται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα κατά το φαινόμενο της επιθηλιομεσεγγυματικής μετατροπής (EMT) που προκαλείται από τον TGF-β στα επιθηλιακά κύτταρα μαστού NMuMG [65]. Μία δεύτερη μελέτη προσέθεσε ένα δεύτερο μηχανισμό ρύθμισης της RhoA για τη μείωση των επιπέδων της που πραγματοποιείται κατά την επαγόμενη από τον TGF-β EMT στα NMuMG κύτταρα, ο οποίος περιλαμβάνει τη στόχευση της RhoA από το micro RNA miR-155 [183]. Δεδομένου ότι η μείωση των επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A που προκαλείται από τον TGF-β μετά από μακρόχρονη επίδραση σχετίζεται με την επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή που προκαλείται από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα (βλ. §3.5.1) και με βάση το εύρημα

ότι η Net1A ρυθμίζεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο αποτελώντας στόχο για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα – ενώ η Net1 ρυθμίζεται σε επίπεδο mRNA – διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή μορίων microRNA στο μηχανισμό ρύθμισης της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β. Η αρχική προσέγγιση αφορούσε τη διερεύνηση της πιθανότητας το ίδιο microRNA (miR-155) να στοχεύει στη Net1A στα πλαίσια ενός ρυθμιστικού μηχανισμού που ελέγχει δύο λειτουργικά σχετιζόμενα μόρια (RhoA και Net1A, ενεργοποιητής της RhoA) μέσω του ίδιου microRNA.

Για τον εντοπισμό πιθανών microRNA μορίων τα οποία έχουν περιοχές πρόσδεσης στην 3'UTR περιοχή (untranslated region) του mRNA της Net1A, που είναι κοινή και για τη Net1, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική ανάλυση με χρήση του προγράμματος **RNA22** (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>). Συγκεκριμένα, η 3'UTR περιοχή του mRNA της Net1A συγκρίθηκε με όλες τις γνωστές, ώριμες αλληλουχίες microRNAs και αυτά που είχαν τουλάχιστον 7/8 νουκλεοτίδια της seed αλληλουχίας τους συμπληρωματικά με την 3'UTR περιοχή του mRNA της Net1A θεωρήθηκαν θετικά αποτελέσματα. Στη συνέχεια οι προβλέψεις αξιολογήθηκαν με το πρόγραμμα **TargetScan v.5.1** (<http://www.targetscan.org/>). Από την παραπάνω ανάλυση προέκυψαν 6 microRNA, τα οποία πιθανά στοχεύουν την 3'UTR περιοχή του mRNA της Net1A (miR-24, miR-155, miR-22, miR-200b, miR-145 and miR-206). Αποτελεί εξαιρετικά ενδιαφέρον γεγονός, ότι ανάμεσα σε αυτά τα microRNA βρέθηκε και το miR-155 που στοχεύει στη RhoA.

Ακολούθως επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση τα microRNA miR-24, miR-155 και miR-200b, με κριτήρια τον αριθμό των περιοχών αλληλεπίδρασης με την 3'UTR περιοχή της Net1A και την ενέργεια της κάθε αλληλεπίδρασης (**Εικόνα 3.4.2**), αλλά και με βάση ήδη υπάρχοντα δεδομένα στη βιβλιογραφία.

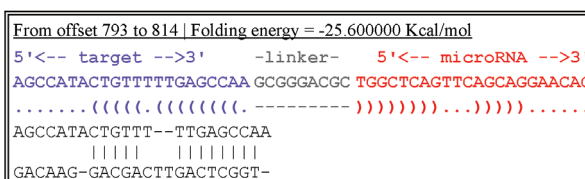
Αρχικά διερευνήθηκε η επίδραση των επιλεγμένων microRNA μετά από υπερέκφρασή τους στα mRNA και πρωτεϊνικά επίπεδα και των δύο ισομορφών Net1 και Net1A. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με 50 και 100 nM από τις πρόδρομες μορφές των επιλεγμένων microRNA (precursor miRNA), pre-miR-155, pre-miR-24 και pre-miR-200b και ακολούθως προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα mRNA επίπεδα των Net1 και Net1A με qRT-PCR, καθώς και τα πρωτεϊνικά επίπεδα με western blot. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.4.3A** η υπερέκφραση και των 3 pre-microRNA προκάλεσε μείωση των mRNA επιπέδων της Net1A, με το pre-miR-24 να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση (0.39 ± 0.10) σε σχέση με τα pre-miR-155 (0.56 ± 0.14) και pre-miR-200b (0.65 ± 0.14) (100 nM). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η υπερέκφραση και των τριών microRNA προκάλεσε μείωση στα επίπεδα της Net1A, παρότι λόγω των πολύ χαμηλών ενδογενών επιπέδων της Net1A είναι δύσκολη η εκτίμηση του μεγέθους της ελάττωσης που προκαλεί το κάθε microRNA. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.4.3B και D** το pre-miR-24 οδήγησε στη μεγαλύτερη ελάττωση των επιπέδων της Net1A σε σχέση με τα pre-miR-155 και pre-miR-200b. Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της επίδρασης των pre-miRNAs στα

επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης της Net1A (και της Net1) η περαιτέρω μελέτη εστιάσθηκε στα miR-24 και miR-155.

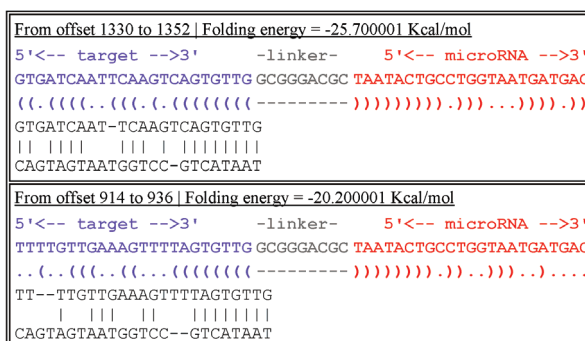
miR-155



miR-24



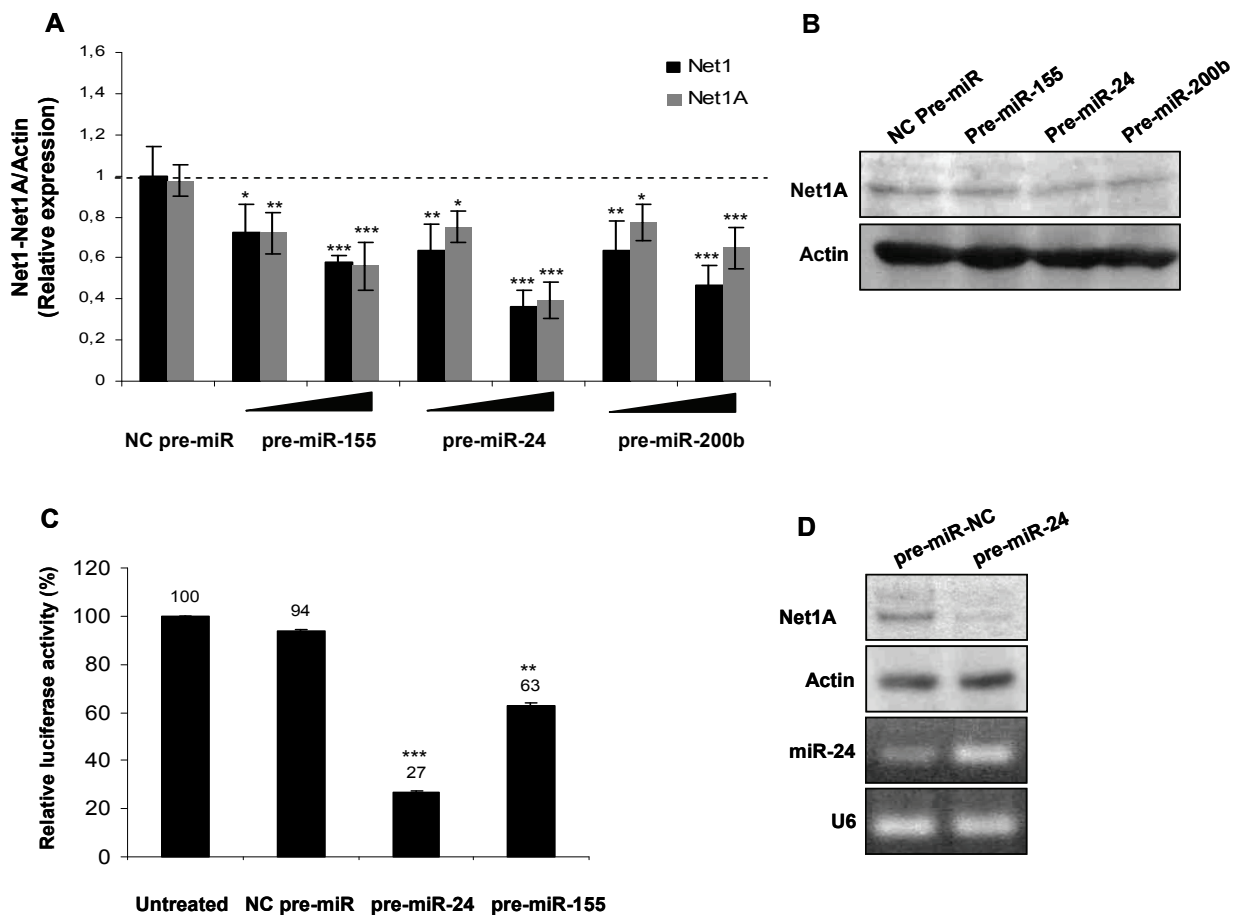
miR-200b



Εικόνα 3.4.2: Παρουσίαση των περιοχών αλληλεπίδρασης των *microRNAs* miR-155 (5), miR-24 (1) και miR-200b (2) (κόκκινο χρώμα) με τμήματα της 3'UTR περιοχής του mRNA της Net1A (που είναι κοινή και για τη Net1) (μπλε χρώμα) μαζί με την ενέργεια της κάθε αλληλεπίδρασης (folding energy).

Ακολουθως διερευνήθηκε αν η 3' UTR περιοχή του mRNA της Net1A αποτελεί άμεσο στόχο των miR-24 και miR-155. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν με το πλασμίδιο αναφοράς pEZX-MT01, το οποίο περιέχει την 3'UTR του mRNA της Net1A (που είναι κοινή για και για τη Net1) 3' ως προς το γονίδιο της λουσιφεράσης και με το pre-miRNA αρνητικού ελέγχου ή τα pre-miR-24 και pre-miR-155 και μετά από 48 ώρες πραγματοποιήθηκε η μέτρηση της δραστηριότητας της λουσιφεράσης (luciferase assay). Η υπερέκφραση του pre-miR-24 οδήγησε σε σημαντική μείωση της ενεργότητας της λουσιφεράσης (0.265±0.006) (**Εικόνα 3.4.3C**), ενώ η υπερέκφραση του pre-miR-155 προκάλεσε μία μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική μείωση (0.630±0.008), υποδεικνύοντας ότι το miR-24, αλλά και το miR-155 στοχεύουν άμεσα στην 3' UTR περιοχή της Net1A (εμποδίζοντας έτσι τη μετάφραση των μετάγραφων της λουσιφεράσης).

3. Αποτελέσματα



Εικόνα 3.4.3: Τα *microRNAs* *miR-155* και *miR-24* στοχεύουν άμεσα στην 3'UTR περιοχή του mRNA των *Net1* και *Net1A*.

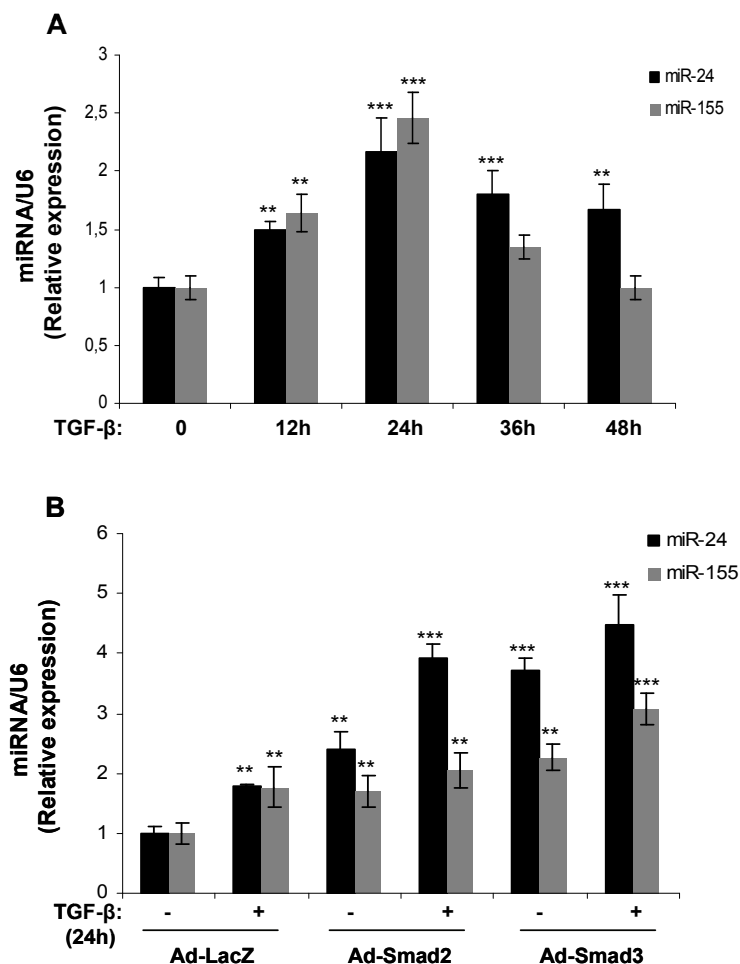
A. Ανάλυση των mRNA επιπέδων των *Net1* και *Net1A* με qRT-PCR στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από παροδική επιμόλυνση με το *pre-miRNA* αρνητικού ελέγχου (NC *pre-miR*) και με 50 και 100 nM από τις πρόδρομες μορφές των *microRNA* *miR-155*, (*pre-miR-155*), *miR-24* (*pre-miR-24*) και *miR-200b* (*pre-miR-200b*). **B.** Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της *Net1A* στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από παροδική επιμόλυνση με το NC *pre-miR* και τα *pre-miR-155*, *pre-miR-24* και *pre-miR-200b* (100 nM). **C.** Τα HaCaT συνεπιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pEZX-MT01, το οποίο περιέχει την 3'UTR του mRNA της *Net1A* (που είναι κοινή και για τη *Net1*) και με το NC *pre-miR* ή τα *pre-miR-24* και *pre-miR-155* και 48 ώρες μετά προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της λουσιφεράσης. Η συνθήκη ελέγχου επιμόλυνσης των κυττάρων μόνο με το πλασμίδιο αναφοράς pEZX-MT01 κανονικοποιείται στο 100%. **D.** Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της *Net1A* μετά από επιμόλυνση με το NC *pre-miR* και το *pre-miR-24* (100 nM). Τα επίπεδα της υπερέκφρασης του *miR-24* προσδιορίστηκαν στα ίδια δείγματα με RT-PCR. Το U6 RNA χρησιμοποιείται ως RNA αναφοράς. * p value < 0.05, ** p value < 0.01, *** p value < 0.001.

3.4.3 Τα *microRNA* *miR-24* και *miR-155* επάγονται από τον TGF- β στα HaCaT κερατινοκύτταρα

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν τα *miR-24* και *miR-155* αποτελούν στόχους του TGF- β /Smad σηματοδοτικού μηχανισμού. Συγκεκριμένα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού και στη συνέχεια επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για διάφορα χρονικά διαστήματα από 12-48 ώρες, ενώ ο προσδιορισμός των επιπέδων του *miR-24* και του

miR-155 πραγματοποιήθηκε με ποσοτική RT-PCR πραγματικού χρόνου. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.4.4A** η επίδραση με TGF- β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του miR-24 και του miR-155, η οποία άρχισε από τις 12 ώρες, κορυφώθηκε στις 24 ώρες (2.17 ± 0.29 και 2.46 ± 0.22 , αντιστοίχως) και διατηρήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα για το miR-24 (1.67 ± 0.22), ενώ επέστρεψε στα βασικά επίπεδα για το miR-155 μέχρι τις 48 ώρες επώασης με TGF- β .

Ο ρόλος του μονοπατιού των Smad αναλύθηκε περαιτέρω και για το λόγο αυτό τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τον αδενιοϊό ελέγχου ad-LacZ ή τους αδενιοϊούς που εκφράζουν τις αγρίου τύπου μορφές των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών (ad-Smad2, ad-Smad3) και επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 24 ώρες. Η υπερέκφραση της Smad3 – και σε μικρότερο βαθμό της Smad2 – απουσία TGF- β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του miR-24 (3.71 ± 0.21 και 2.40 ± 0.31 , αντίστοιχα), ενώ η παρουσία του TGF- β ενίσχυσε ακόμη περισσότερο αυτό το αποτέλεσμα (4.47 ± 0.50 και 3.92 ± 0.22 αντίστοιχα) (**Εικόνα 3.4.4B**).



Εικόνα 3.4.4: Τα microRNA miR-24 και miR-155 αποτελούν στόχο του TGF- β /Smad μονοπατιού.

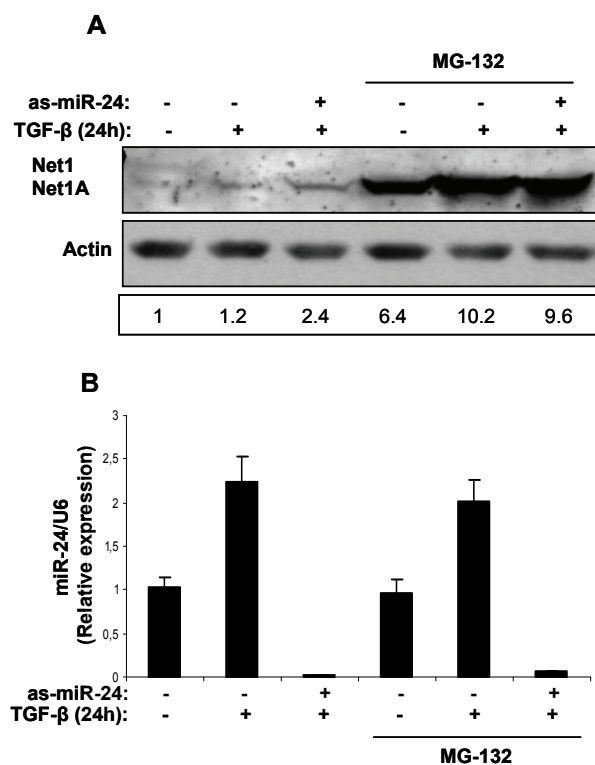
A. Ανάλυση των επιπέδων των miR-24 και miR-155 με qRT-PCR στα HaCaT κύτταρα μετά από επώαση με 5 ng/ml TGF- β για διάφορους χρόνους από 12–48 ώρες. **B.** Ανάλυση των επιπέδων των miR-24 και miR-155 με qRT-PCR στα HaCaT κύτταρα που διαμολύνθηκαν με τους αδενιοϊούς ad-LacZ (αδενιοϊός ελέγχου), ad-Smad2 και ad-Smad3 και στη συνέχεια επωάστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 24 ώρες. Το U6 RNA χρησιμοποιήθηκε ως RNA αναφοράς στην qRT-PCR. ** p value < 0.01, *** p value < 0.001.

3. Αποτελέσματα

Παρομοίως, η υπερέκφραση της Smad3 και σε μικρότερο βαθμό της Smad2 απουσία TGF- β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του miR-155 (2.26 ± 0.22 και 1.70 ± 0.27 , αντίστοιχα), ενώ η παρουσία του TGF- β ενίσχυσε ακόμη περισσότερο αυτό το αποτέλεσμα (3.08 ± 0.26 και 2.05 ± 0.30 , αντίστοιχα), το οποίο όμως διατηρήθηκε σε πιο χαμηλά επίπεδα σε σχέση με την αντίστοιχη αύξηση των επιπέδων του miR-24.

3.4.4 Το microRNA miR-24 αποτελεί άλλο ένα επίπεδο ρύθμισης της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β

Η αύξηση των επιπέδων του miR-24 από τον TGF- β αποτελεί πιθανώς έναν επιπρόσθετο μηχανισμό που ρυθμίζει τη μείωση των επιπέδων της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β πέραν της συμμετοχής του πρωτεοσώματος, όπως συζητήθηκε στην §3.4.1. Για να διερευνηθεί αυτή η υπόθεση τα HaCaT κερατινοκύτταρα επιμολύνθηκαν με το pre-miRNA αρνητικού ελέγχου ή το antisense ολιγονουκλεοτίδιο του miR-24, as-miR-24, επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 24 ώρες και 8 ώρες πριν τη συλλογή των δειγμάτων επώαστηκαν με τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG-132.



Εικόνα 3.4.5: Το miR-24 στοχεύει σε ένα μικρό κλάσμα της Net1A σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο.

A. Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A σε HaCaT κύτταρα που επιμολύνθηκαν παροδικά με το pre-miRNA αρνητικού ελέγχου (NC pre-miR) και με 120 nM από το antisense ολιγονουκλεοτίδιο του miR-24 (as-miR-24), ακολούθως επώαστηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 24 ώρες και 8 ώρες πριν τη συλλογή τους επώαστηκαν ή όχι με τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG-132 (10 μ M). **B.** Ανάλυση των αντίστοιχων επιπέδων του miR-24 με qRT-PCR που δείχνει την αποτελεσματικότητα της αναστολής του miR-24 με τη χρήση του ASO miR-24 στο πείραμα του πάνελ A. Το U6 RNA χρησιμοποιήθηκε ως RNA αναφοράς στην qRT-PCR.

Η αναστολή του miR-24 παρουσία TGF-β οδήγησε σε μία μικρή αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A σε σχέση με τα επίπεδα της μετά από διέγερση μόνο με TGF-β, ενώ η αναστολή του πρωτεοσώματος προκάλεσε μία συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη αύξηση της Net1A πρωτεΐνης, η οποία όμως δεν ενισχύθηκε περαιτέρω όταν συνδυάστηκε το as-miR-24 με τον MG-132 (**Εικόνα 3.4.5A**).

Τα παραπάνω αποτελέσματα συνδυαστικά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το miR-24 στοχεύει σε ένα μικρό κλάσμα της Net1A κατά τη μείωση των πρωτεϊνικών της επιπέδων δρώντας μετα-μεταγραφικά, στο επίπεδο της μετάφρασης του mRNA της, ενώ η αποικοδόμηση της Net1A από το πρωτεόσωμα σχετίζεται με τη μείωση των επιπέδων της ήδη μεταφρασμένης Net1A πρωτεΐνης. Επιπλέον δεν παρατηρήθηκε ένα συσσωρευτικό αποτέλεσμα στα επίπεδα της Net1A κατά το συνδυασμό του as-miR-24 με τον MG-132 αναστολέα, υποδεικνύοντας ότι η πολύ μεγάλη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A μετά από αναστολή του πρωτεοσώματος πιθανώς “καλύπτει” το ιδιαίτερα ασθενές αποτέλεσμα που επιφέρει ο αναστολέας του miR-24.

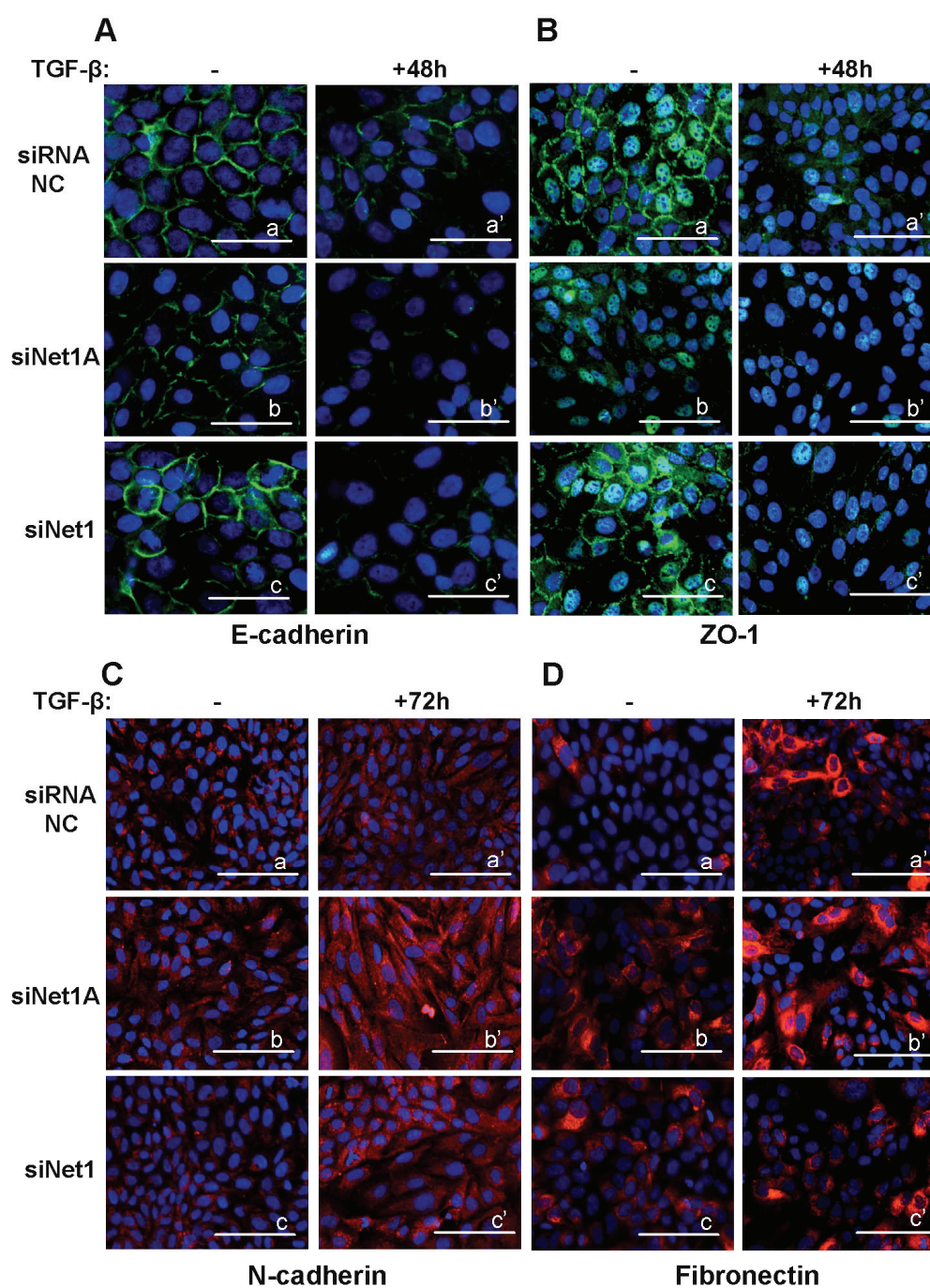
3.5 Ο ρόλος της μείωσης των επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β στο φαινόμενο της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT)

3.5.1 Η μείωση της Net1A και σε μικρότερο βαθμό της Net1 παίζει ρόλο στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF-β EMT

Είναι γνωστό ότι μακρόχρονη επίδραση με TGF-β προκαλεί μετατροπή του επιθηλιακού φαινοτύπου των HaCaT κερατινοκυττάρων σε ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT). Με βάση πρόσφατες μελέτες, οι οποίες εμπλέκουν τη μείωση των επιπέδων της Net1 στο φαινόμενο της EMT σε MCF-7 και NMuMG καρκινικά και φυσιολογικά κύτταρα μαστού αντίστοιχα [198,205] διερευνήθηκε ο ρόλος της μείωσης των επιπέδων των Net1 και Net1A από τον TGF-β στην επαγόμενη από τον TGF-β EMT στα HaCaT κερατινοκύτταρα.

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η μορφολογία των επιθηλιακών συνδέσεων που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1, καθώς και η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin και N-cadherin με μικροσκοπία φθορισμού μετά από επιλεκτική αποσιώπηση των Net1 και Net1A. Επίσης μελετήθηκε ο κυτταροσκελετός της ακτίνης μετά από χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη και μικροσκοπία φθορισμού, καθώς και η μορφολογία των κυττάρων με phase-contrast μικροσκοπία. Για το λόγο αυτό τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC), ή τα siRNA που αποσιωπούν επιλεκτικά την κάθε ισομορφή, siNet1 και siNet1A και επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 48 ή 72 ώρες. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.5.1A** η αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF-β είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της χρώσης της E-cadherin, γεγονός που σχετίζεται με την αποδόμηση των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης ακόμη και απουσία TGF-β (**Εικόνα 3.5.1Ab**), ενώ η αποσιώπηση της Net1 ισομορφής είχε μικρή επίπτωση (**Εικόνα 3.5.1Ac**). Επιπλέον η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF-β οδήγησε σε πιο έντονη μείωση της χρώσης της E-cadherin (**Εικόνα 3.5.1Ab'**) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.1Aa'**) και την αποσιώπηση της Net1 ισομορφής (**Εικόνα 3.5.1Ac'**). Παρόμοια συμπεράσματα προκύπτουν και για τη ZO-1 που εντοπίζεται στους στενοσύνδεσμους (**Εικόνα 3.5.1B**). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μείωση της Net1A και όχι της Net1 ισομορφής επηρεάζει τη σταθερότητα των διακυτταρικών συνδέσεων.

Παράλληλα η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF-β για 72 ώρες οδήγησε σε εντονότερη έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin (**Εικόνα 3.5.1C,b'**) και fibronectin (**Εικόνα 3.5.1D,b'**) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και την αποσιώπηση της Net1. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF-β προκάλεσε μία μικρή αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση των επιπέδων των N-cadherin (**Εικόνα 3.5.1C,b**) και Fibronectin (**Εικόνα 3.5.1D,b**).



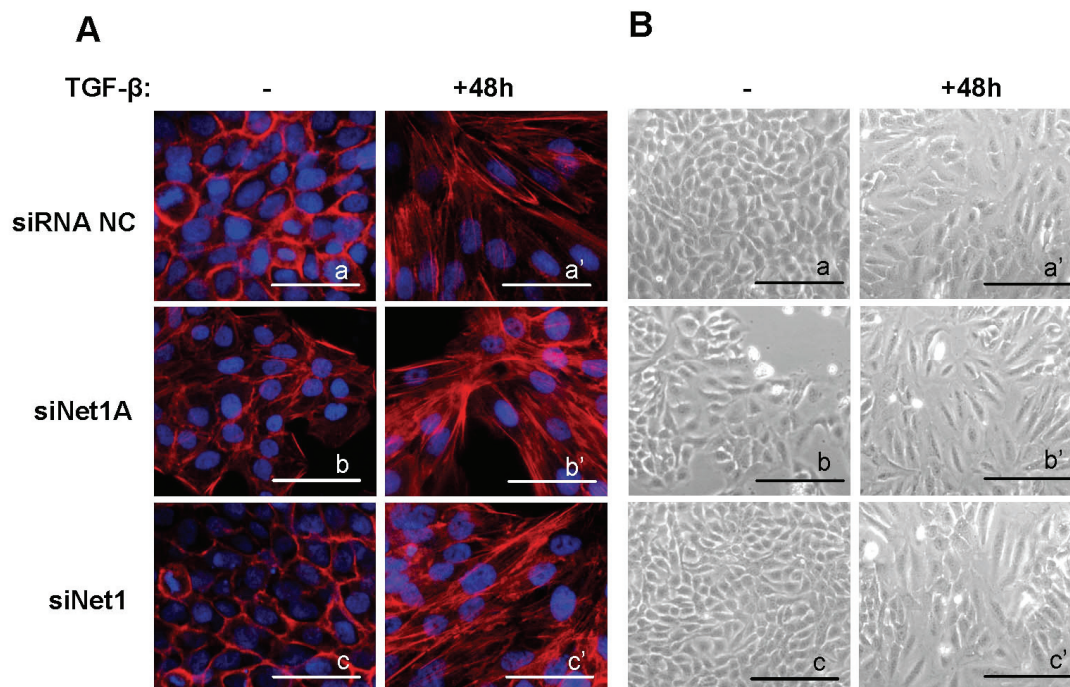
Εικόνα 3.5.1: Μελέτη της επίδρασης της επιλεκτικής αποσιώπησης των *Net1* και *Net1A* στην *EMT* που επάγεται από τον *TGF- β* .

Ανάλυση του εντοπισμού των επιθηλιακών δεικτών *E-cadherin* (**A**) και *ZO-1* (**B**), καθώς και της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών *N-cadherin* (**C**) και *Fibronectin* (**D**), μετά από επιμόλυνση των *HaCaT* με το *siRNA* αρνητικού ελέγχου (*siRNA NC*), ή τα *siRNA* που στοχεύουν ειδικά στη *Net1* (*siNet1*) ή τη *Net1A* (*siNet1A*) ισομορφή και επίδραση με *TGF- β* για 48 (**A και B**) ή 72 (**C και D**) ώρες. Οι μπάρες υποδηλώνουν 20 μm (**A**) και 50 μm (**B-D**).

Από τη μελέτη του κυτταροσκελετού της ακτίνης προέκυψε ότι η αποσιώπηση της *Net1A* και μόνο (**Εικόνα 3.5.2A,b**) και όχι της *Net1* (**Εικόνα 3.5.2A,c**), προκάλεσε απώλεια της χαρακτηριστικής για τα επιθηλιακά κύτταρα περιφερειακής χρώσης της ακτίνης και οδήγησε τα

3. Αποτελέσματα

κύτταρα σε μία πιο επίπεδη μορφολογία, ενώ μόνο μετά από επίδραση με TGF- β για 48 ώρες απέκτησαν την ινοβλαστοειδή μορφολογία, σχηματίζοντας πιο έντονα ινίδια του στρες (**Εικόνα 3.5.2A,b'**) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.2A,a'**) και την αποσιώπηση της Net1 (**Εικόνα 3.5.2A,c'**).



Εικόνα 3.5.2 Επίδραση της επιλεκτικής αποσιώπησης των Net1 και Net1A στον κυτταροσκελετού της ακτίνης και τη μορφολογία των HaCaT κατά την EMT που επάγεται από τον TGF- β .

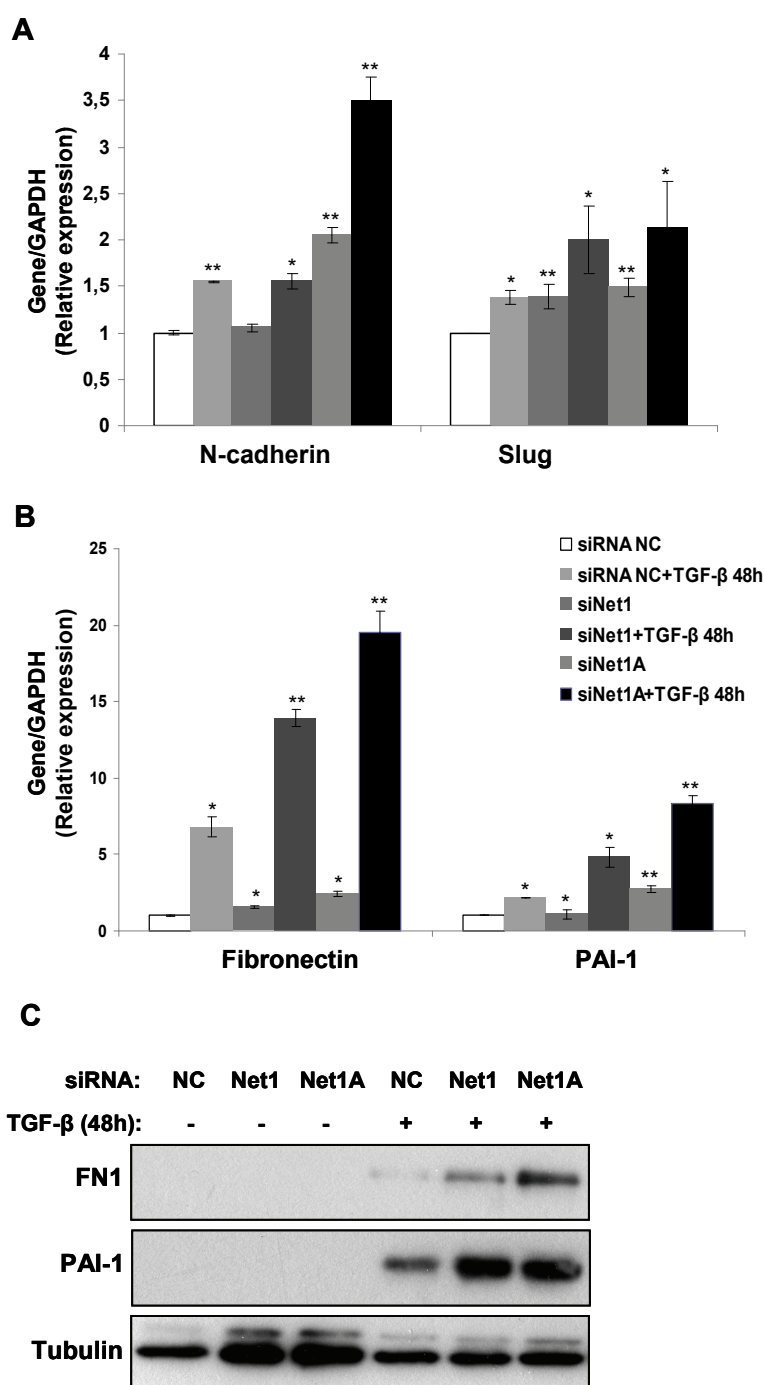
Ανάλυση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη (**A**) και της μορφολογίας των HaCaT με phase-contrast μικροσκοπία (**B**) μετά από επιμόλυνση των HaCaT με το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC), ή τα siRNA που στοχεύουν ειδικά στη Net1 (siNet1) ή τη Net1A (siNet1A) ισομορφή και επίδραση με TGF- β για 48 ώρες. Οι μπάρες υποδηλώνουν 20 μ m (**A**) και 100 μ m (**B**).

Ενδιαφέρον αποτελεί, ότι ούτε η αποσιώπηση της Net1A ούτε της Net1 δεν εμπόδισε το σχηματισμό των ινιδίων του στρες από τον TGF- β , επισημαίνοντας το ρόλο άλλων Rho GEF στη δημιουργία ινιδίων του στρες κατά την επαγόμενη από τον TGF- β EMT στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Αυτό το εύρημα συνάδει με την κεντρική παρατήρηση αυτής της μελέτης, ότι τα επίπεδα των Net1 και Net1A ελαττώνονται μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β .

Τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και από τη μελέτη της κυτταρικής μορφολογίας με phase contrast μικροσκοπία (**Εικόνα 3.5.2B**), όπου παρατηρείται ότι η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β οδηγεί τα κύτταρα σε ένα πιο έντονο ινοβλαστοειδή φαινότυπο μετά από επίδραση με TGF- β για 48 ώρες (**Εικόνα 3.5.2Bb'**) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.2Ba'**) και την αποσιώπηση της Net1 (**Εικόνα 3.5.2Bc'**).

Παράλληλα, σε μία προσπάθεια ποσοτικοποίησης των παραπάνω παρατηρήσεων προσδιορίστηκαν με qRT-PCR τα επίπεδα mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin,

N-cadherin και PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), καθώς και του μεταγραφικού καταστολέα της E-cadherin, Slug, μετά από επιλεκτική αποσιώπηση των Net1 και Net1A και επίδραση με TGF- β για 48 ώρες.



Εικόνα 3.5.3: Επίδραση της αποσιώπησης των Net1 και Net1A στα επίπεδα των EMT δεικτών N-cadherin, Slug, Fibronectin και PAI-1. Ανάλυση με qRT-PCR των επιπέδων mRNA του μεσεγχυματικού δείκτη N-cadherin και του μεταγραφικού καταστολέα της E-cadherin, Slug (A) καθώς και των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin και PAI-1 (B) και ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων των Fibronectin και PAI-1 (C) μετά από επιμόλυνση των HaCaT με το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC), ή τα siRNA που στοχεύουν ειδικά στη Net1 (siNet1) ή τη Net1A (siNet1A) ισομορφή και επίδραση με TGF- β για 48 ώρες. * p value < 0,05, ** p value < 0,01 και *** p value < 0,001.

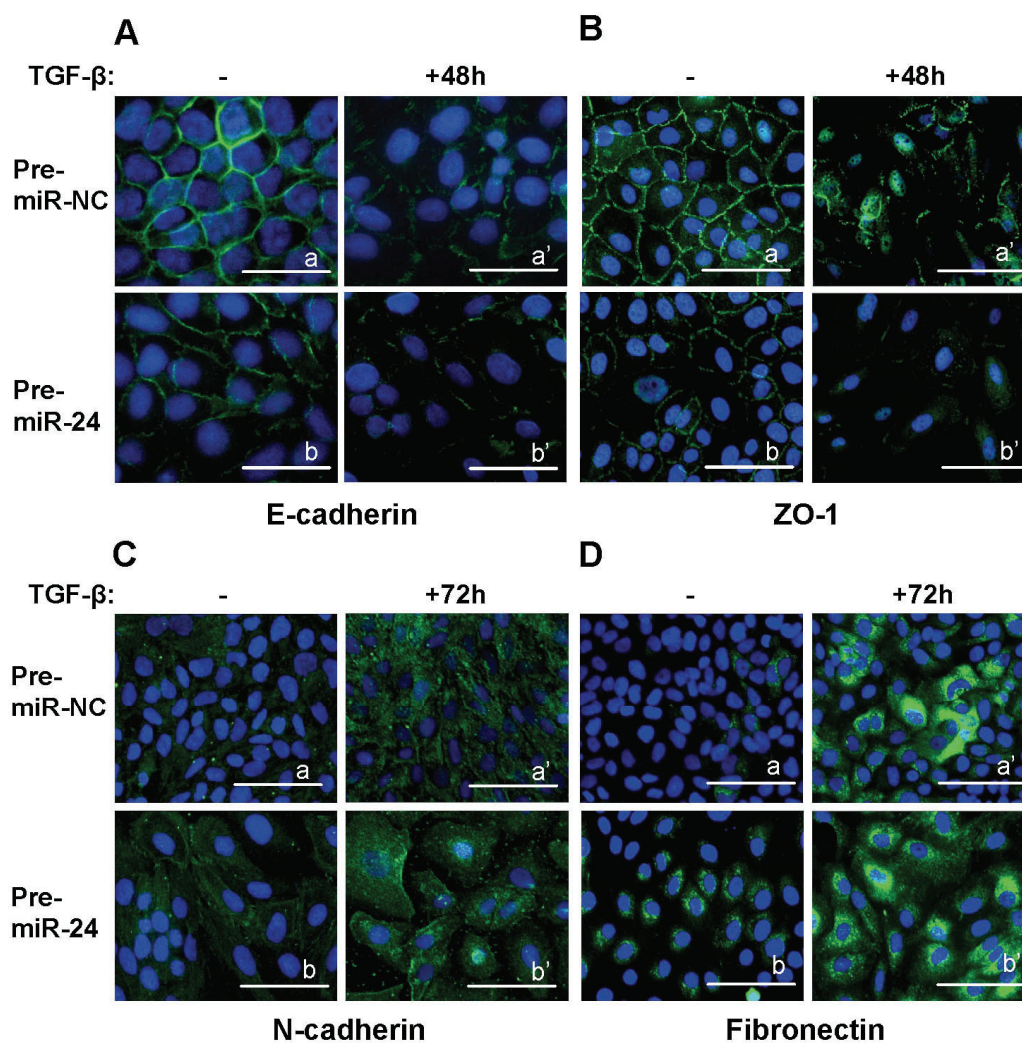
Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μικροσκοπία φθορισμού, η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β οδήγησε σε ισχυρότερη αύξηση όλων των δεικτών σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και την αποσιώπηση της Net1 (**Εικόνα 3.5.3 A και B**). Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η αποσιώπηση και μόνο της Net1A οδήγησε σε σημαντική αύξηση των mRNA επιπέδων της N-cadherin παραπάνω από την αντίστοιχη αύξηση που προκάλεσε ο TGF- β από μόνος του και σε μικρότερο βαθμό της Fibronectin, ευρήματα που συμφωνούν με τα συμπεράσματα της μικροσκοπίας φθορισμού. Παρόμοια αύξηση των επιπέδων mRNA μετά από την αποσιώπηση της Net1A παρατηρήθηκε επίσης και για τις PAI-1 και Slug, η οποία κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα αύξησης που οφείλονται στην επίδραση μόνο με TGF- β για 48 ώρες.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης των Net1 και Net1A στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Fibronectin και PAI-1, όπου παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β οδήγησε στη μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων και των δύο πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.5.3C**), όμως σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις από τη μικροσκοπία φθορισμού και qRT-PCR, η αποσιώπηση της Net1A και μόνο δεν προκάλεσε αύξηση σε καμία από τις δύο πρωτεΐνες, πιθανών λόγω διαφορετικής ευαισθησίας της τεχνικής του western blot.

3.5.2 Το microRNA miR-24 εμπλέκεται στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF- β EMT

Δεδομένου ότι η μείωση των επιπέδων της Net1A από τον TGF- β σχετίζεται με την επαγόμενη από τον TGF- β EMT και με βάση το εύρημα ότι το mRNA της Net1A αποτελεί στόχο του miRNA miR-24, διερευνήθηκε στη συνέχεια ο ρόλος του miR-24 στην EMT που επάγεται από τον TGF- β . Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με το pre-miRNA αρνητικού ελέγχου (pre-miR-NC) και το pre-miR-24, επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 48 ή 72 ώρες και στη συνέχεια μελετήθηκε η μορφολογία των διακυτταρικών συνδέσεων που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1, καθώς και η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin και Fibronectin με μικροσκοπία φθορισμού καθώς και η κυτταρική μορφολογία με phase contrast μικροσκοπία. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.5.4A** η υπερέκφραση του miR-24 και μόνο έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της E-cadherin, που σχετίζεται με την αποδιάταξη των συνδέσεων προσκόλλησης ακόμη και απουσία TGF- β (**Εικόνα 3.5.4A,b**), ενώ παρουσία TGF- β η μείωση της χρώσης της E-cadherin ήταν ακόμη εντονότερη (**Εικόνα 3.5.4A,b'**) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.4A,a'**). Παρομοίως η υπερέκφραση του miR-24 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της χρώσης της ZO-1 ακόμη και απουσία διέγερσης με TGF- β , υποδεικνύοντας τη διάσπαση των στενοσυνδέσμων (tight junctions) στους οποίους εντοπίζεται η ZO-1, ενώ – όπως και για την E-cadherin – παρουσία TGF- β η μείωση της χρώσης της ZO-1 ήταν ισχυρότερη (**Εικόνα 3.5.4B,b**) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.4B,a'**).

Παράλληλα η υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF- β για 72 ώρες οδήγησε σε εντονότερη έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin (**Εικόνα 3.5.4C,b'**) και Fibronectin (**Εικόνα 3.5.4D,b'**) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Η υπερέκφραση και μόνο του miR-24 απουσία διέγερσης με TGF- β προκάλεσε μία μικρή αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση των επιπέδων της Fibronectin (**Εικόνα 3.5.4D,b**), η οποία ήταν πιο ξεκάθαρη για τη N-cadherin (**Εικόνα 3.5.4C,b**).

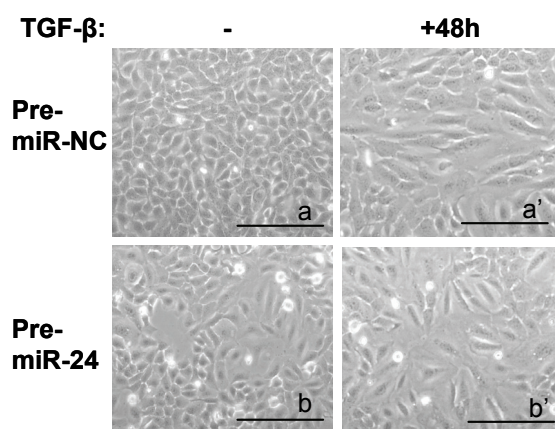


Εικόνα 3.5.4: Επίδραση της υπερέκφρασης του miR-24 στην EMT που επάγεται από τον TGF- β . Ανάλυση του εντοπισμού των επιθηλιακών δεικτών E-cadherin (A) και ZO-1 (B), καθώς και της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin (C) και Fibronectin (D), μετά από επιμόλυνση των HaCaT με το pre-miR αρνητικού ελέγχου (pre-miR-NC) ή το pre-miR-24 και επίδραση με TGF- β για 48 (A και B) ή 72 (C και D) ώρες. Οι μπάρες υποδηλώνουν 20 μ m (A) και 50 μ m (B-D).

Η μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του miR-24 στην κυτταρική μορφολογία με phase contrast μικροσκοπία έδειξε, ότι η υπερέκφραση του miR-24 και μόνο οδήγησε τα κύτταρα σε μια επίπεδη μορφολογία (**Εικόνα 3.5.5b**), που υποδηλώνει την απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας τους, ενώ παρουσία TGF- β τα κύτταρα απέκτησαν πιο έντονη ινοβλαστοειδή μορφολογία (**Εικόνα 3.5.5b'**) σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.5a'**). Τα

3. Αποτελέσματα

παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν, ότι το miR-24 επηρεάζει τη σταθερότητα των επιθηλιακών διακυτταρικών συνδέσεων και πιθανώς εμπλέκεται στο πρόγραμμα της EMT που προκαλείται από τον TGF-β.



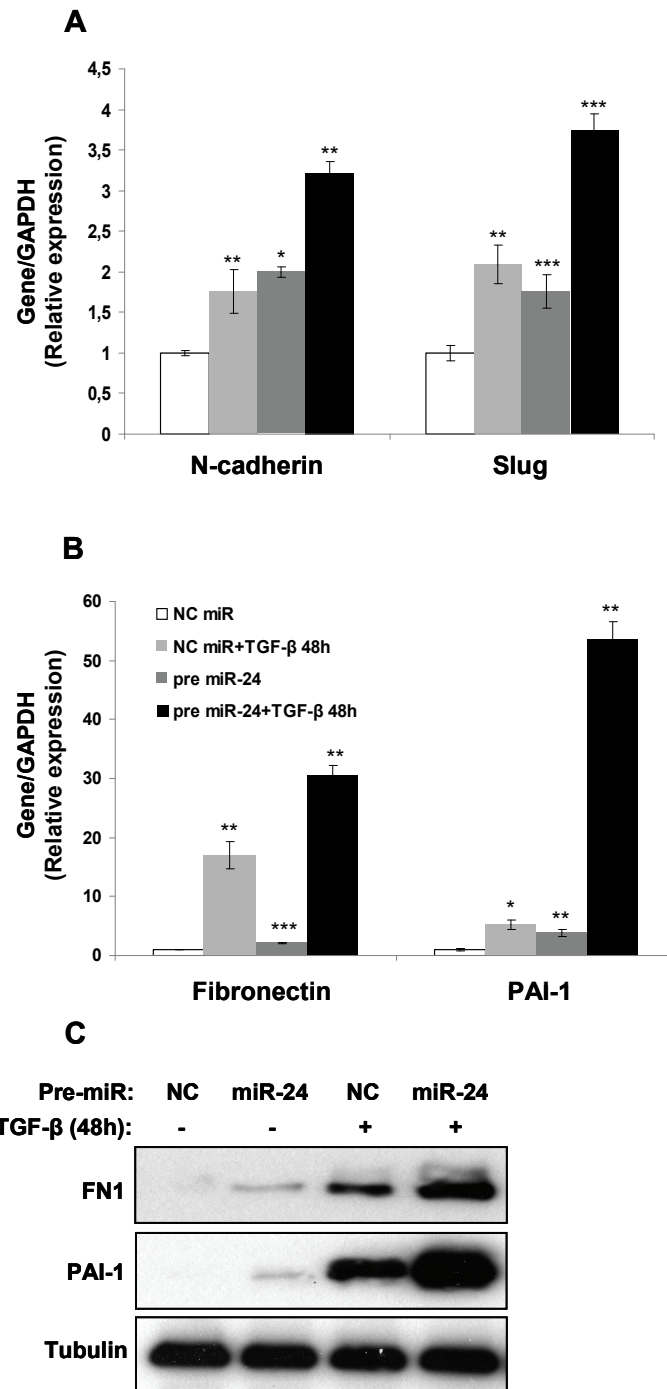
Εικόνα 3.5.5: Επίδραση της υπερέκφρασης του miR-24 στη μορφολογία των HaCaT κατά την EMT που επάγεται από τον TGF-β.

Ανάλυση της μορφολογίας των HaCaT με phase-contrast μικροσκοπία μετά από επιμόλυνση των HaCaT με το pre-miR αρνητικού ελέγχου (pre-miR-NC) ή το pre-miR-24 και επίδραση με TGF-β για 48 ώρες. Οι μπάρες υποδηλώνουν 100 μm.

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν με qRT-PCR τα επίπεδα mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin, N-cadherin και PAI-1, καθώς και του μεταγραφικού καταστολέα της E-cadherin, Slug, μετά από υπερέκφραση του miR-24 και επίδραση με TGF-β για 48 ώρες. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μικροσκοπία φθορισμού, η υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF-β προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων όλων των δεικτών σε σχέση με την αύξηση που προκάλεσε ο TGF-β από μόνος του (**Εικόνα 3.5.6 A και B**). Επίσης, η υπερέκφραση του miR-24 απουσία TGF-β οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της N-cadherin, που κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την αύξηση που προκάλεσε ο TGF-β από μόνος του. Επιπλέον, η υπερέκφραση και μόνο του miR-24 οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των Slug και PAI-1 και σε μικρότερο βαθμό της Fibronectin (**Εικόνα 3.5.6A και B**).

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του miR-24 στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Fibronectin και PAI-1 και παρατηρήθηκε ότι υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF-β οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων και των δύο πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.5.6C**), καθώς και ότι υπερέκφραση του miR-24 απουσία TGF-β – σε πλήρη συμφωνία με τις παρατηρήσεις από τη μικροσκοπία φθορισμού και την qRT-PCR – προκάλεσε μικρή αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση και στις δύο πρωτεΐνες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την υπόθεση ότι το miR-24 εμπλέκεται στο μηχανισμό μέσω του οποίου ο TGF-β προκαλεί EMT στα HaCaT κερατινοκύτταρα, όπου μεταξύ άλλων άγνωστων μέχρι στιγμής στόχων του, στοχεύει στη μείωση της Net1A.



Εικόνα 3.5.6: Επίδραση της υπερέκφρασης του miR-24 στα επίπεδα των EMT δεικτών N-cadherin, Slug, Fibronectin και PAI-1.

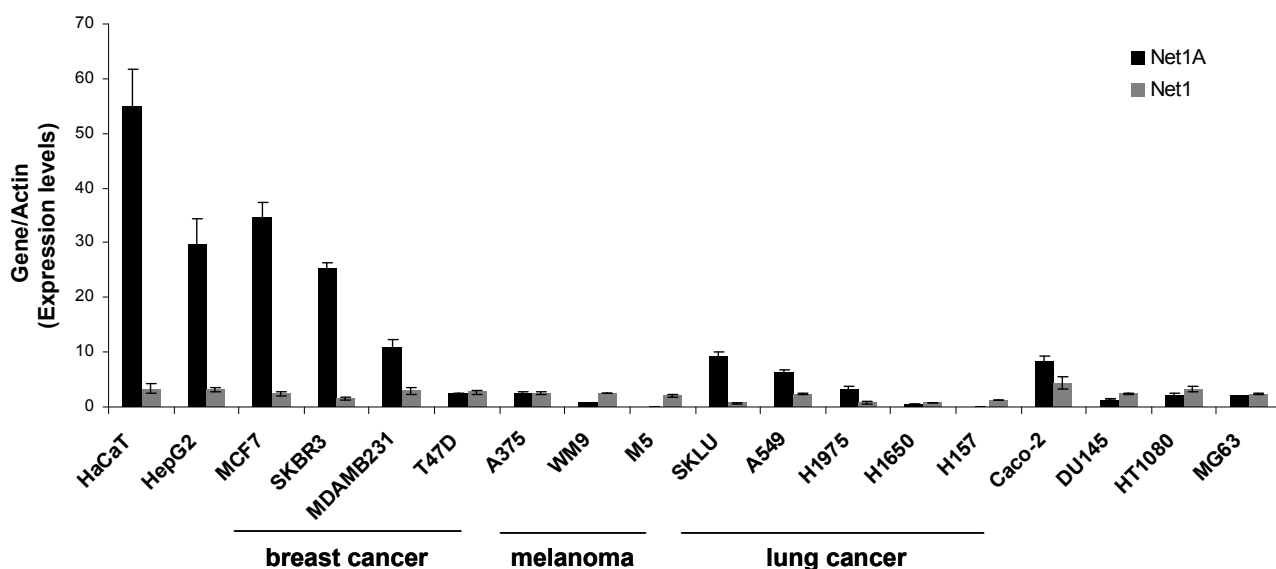
Ανάλυση με qRT-PCR των επιπέδων mRNA του μεσεγχυματικού δείκτη N-cadherin και του μεταγραφικού καταστολέα της E-cadherin, Slug (A) καθώς και των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin και PAI-1 (B) και των πρωτεϊνικών επιπέδων των Fibronectin και PAI-1 (C) μετά από επιμόλυνση των HaCaT με το pre-miR αρνητικού ελέγχου (pre-miR-NC) ή το pre-miR-24 και επίδραση με TGF-β για 48 ώρες. * p value < 0,05, ** p value < 0,01 και *** p value < 0,001.

3.6 Μελέτη της ρύθμισης των Net1A, Net1, miR-24 και miR-155 από τον TGF-β σε καρκινικά κύτταρα

Η μελέτη της ρύθμισης των δύο ισομορφών της Net1, Net1 και Net1A, από τον TGF-β που πραγματοποιήθηκε στη φυσιολογική κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων HaCaT επεκτάθηκε και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές.

3.6.1 Μελέτη των βασικών επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές

Αρχικά μελετήθηκαν τα βασικά επίπεδα mRNA των Net1 και Net1A με qRT-PCR στις ακόλουθες κυτταρικές σειρές: HaCaT (κερατινοκύτταρα), HepG2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), MCF7, T47D, MDAMB231, SKBR3 (καρκινικά κύτταρα μαστού), A375, WM9, M5 (μελάνωμα), SKLU, A549, H1975, H1650, H157 (καρκινικά κύτταρα πνεύμονα), CaCo-2 (καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου), DU145 (καρκινικά κύτταρα προστάτη), HT1080 (ινοσάρκωμα) και MG63 (οστεοσάρκωμα). Η σύγκριση των επιπέδων των δύο ισομορφών κατέστη εφικτή, καθώς τα ζεύγη των εκκινητών για την ενίσχυση των mRNA των Net1 και Net1A βρέθηκε ότι έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα (efficiency) κατά την qPCR, ενώ με τη βοήθεια πρότυπων καμπύλων πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.6.1** τα επίπεδα mRNA της Net1A ισομορφής εμφανίζουν πολύ μεγάλη διακύμανση μεταξύ των διαφόρων κυτταρικών σειρών, ενώ τα επίπεδα mRNA της Net1 ισομορφής έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν.



Εικόνα 3.6.1: Σχετικός ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων mRNA των ισομορφών Net1 και Net1A σε διάφορες κυτταρικές σειρές με qRT-PCR.

Το γονίδιο της β-actin χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Ενδιαφέρον αποτελεί ότι πιο επιθετικές, μεταστατικές ή μεσεγχυματικές καρκινικές σειρές (T47D, WM9, M5, H1650, H157, DU145, HT1080, MG63) χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα mRNA για τη Net1A ισομορφή. Στην περίπτωση των καρκινικών κυττάρων μαστού παρατηρείται ότι η λιγότερο επιθετική καρκινική σειρά MCF7 εκφράζει ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα της Net1A, ενώ οι πιο επιθετικές σειρές MDAMB231, T47D έχουν αρκετά χαμηλότερα επίπεδα. Επίσης τα HaCaT κερατινοκύτταρα – τα οποία είναι τα μόνα φυσιολογικά κύτταρα από αυτά που μελετήθηκαν – και τα μη ογκογόνα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος HepG2 παρουσιάζουν μαζί με τα MCF7 τα υψηλότερα επίπεδα Net1A

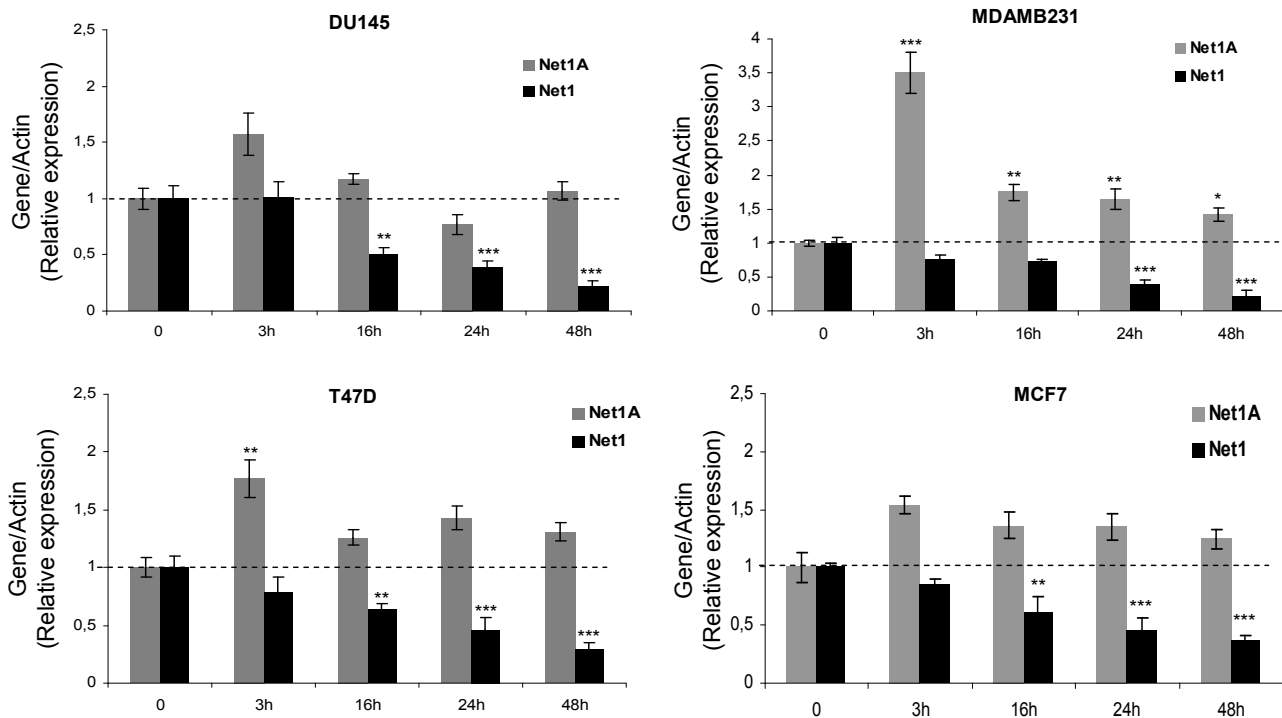
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά και σε μη ογκογόνα ή μειωμένης επιθετικότητας καρκινικά κύτταρα τα επίπεδα της Net1A είναι ιδιαίτερα υψηλά, ενώ σε πιο επιθετικές καρκινικές σειρές τα επίπεδα αυτά μειώνονται σημαντικά. Μία τέτοια ενδιαφέρουσα παρατήρηση απαιτεί μία ευρύτερη μελέτη για να επιβεβαιωθεί και να διερευνηθεί η κλινική της σημασία.

3.6.2 Επίδραση του TGF-β στα mRNA επίπεδα των ισομορφών Net1 και Net1A στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7

Ακολούθως διερευνήθηκε η επίδραση του TGF-β στα mRNA επίπεδα των Net1 και Net1A στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, ακολούθως επωάστηκαν με TGF-β για 3 ώρες (σύντομη επίδραση) καθώς και για μεγαλύτερους χρόνους 16, 24 και 48 ώρες και τα επίπεδα mRNA των Net1 και Net1A προσδιορίστηκαν με qRT-PCR. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.6.2**, στην καρκινική σειρά MDAMB231 και σε μικρότερο βαθμό στα T47D κύτταρα, ο TGF-β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A μετά από 3 ώρες επίδρασης ($3,51 \pm 0,29$) και ($1,77 \pm 0,16$) αντιστοίχως, η οποία στα MDAMB231 κύτταρα διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλά επίπεδα μέχρι τις 16 ώρες ($1,74 \pm 0,12$) και τις 24 ώρες ($1,64 \pm 0,15$).

Αντίθετα το mRNA της Net1 ισομορφής μειώθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF-β. Παρατηρούμε ότι η αύξηση των mRNA επιπέδων της Net1A μετά από σύντομη επίδραση με TGF-β είναι ένα φαινόμενο που δεν περιορίζεται στα HaCaT κερατινοκύτταρα, αλλά ταυτοχρόνως δεν αφορά όλα τα κυτταρικά συστήματα που μελετήθηκαν. Η ρύθμιση της Net1 ισομορφής από τον TGF-β όμως φαίνεται να διέπεται από την ίδια λογική σε όλες τις κυτταρικές σειρές με κύριο γνώρισμα τη μείωση των επιπέδων της κατά 65-80% μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF-β.

3. Αποτελέσματα



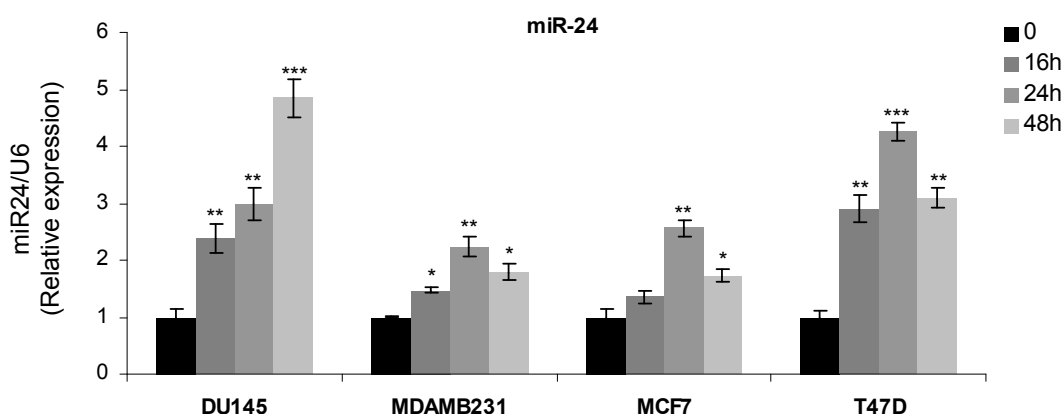
Εικόνα 3.6.2: Ρύθμιση των mRNA επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A από τον TGF-β στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7.

Ανάλυση των επιπέδων mRNA των ισομορφών Net1 και Net1A με qRT-PCR στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7 μετά από επώαση με 5 ng/ml TGF-β για 3, 16, 24 και 48 ώρες. Το γονίδιο της β-actin χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. * p value < 0.01, ** p value < 0.01, *** p value < 0.001.

3.6.3 Επίδραση του TGF-β στα επίπεδα των microRNA miR-24 και miR-155 στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7

Ακολούθως διερευνήθηκε η επίδραση του TGF-β στα επίπεδα των microRNA miR-24 και miR-155 στις καρκινικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 16, 24 και 48 ώρες και ακολούθως προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των miR-24 και miR-155 με qRT-PCR. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.6.3** ο TGF-β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του miR-24 σε όλες τις καρκινικές σειρές που δοκιμάστηκαν.

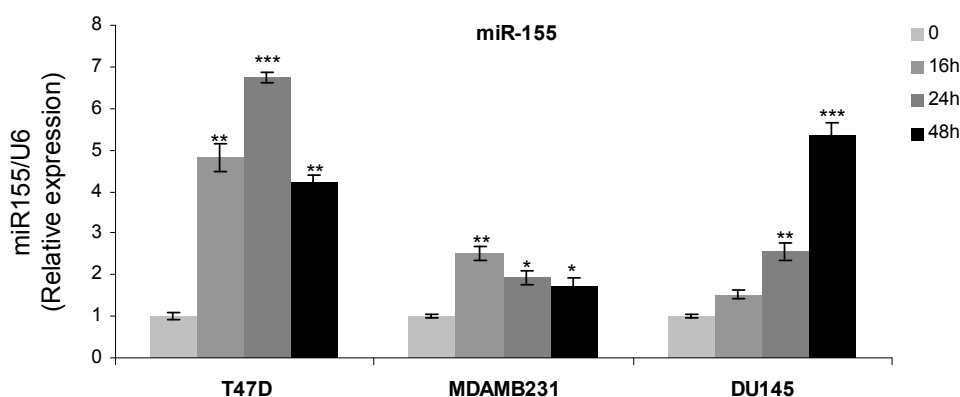
Στα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του miR-24 ήδη μετά από 16 ώρες ($2,39 \pm 0,25$), η οποία κορυφώθηκε μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF-β ($4,85 \pm 0,33$). Παρομοίως στα καρκινικά κύτταρα μαστού T47D η αύξηση του miR-24 παρατηρήθηκε ήδη μετά από 16 ώρες ($2,90 \pm 0,24$), κορυφώθηκε στις 24 ώρες επίδρασης με TGF-β ($4,25 \pm 0,16$) και διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 48 ώρες ($3,09 \pm 0,17$). Στην καρκινική σειρά MDAMB231 και στη λιγότερο επιθετική καρκινική σειρά μαστού MCF7 παρατηρήθηκε μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του miR-24 μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGF-β ($2,23 \pm 0,18$, για τα MDAMB231 και $2,55 \pm 0,14$, για τα MCF7).



Εικόνα 3.6.3: Ρύθμιση των επιπέδων του *miR-24* από τον TGF-β στις καρκινικές σειρές DU145, MDAMB231, MCF7, T47D.

Ανάλυση των επιπέδων του *miR-24* με qRT-PCR στις καρκινικές σειρές DU145, MDAMB231, MCF7 και T47D μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για 16, 24 και 48 ώρες. Το U6 RNA χρησιμοποιήθηκε ως RNA αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. * p value<0.01, ** p value<0.01, *** p value<0.001.

Παρομοίως ο TGF-β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων και του *miR-155* στα καρκινικά κύτταρα T47D, MDAMB231 και DU145. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.6.4** στα T47D παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του *miR-155* μετά από επίδραση με TGF-β για 24 ώρες ($6,75 \pm 0,13$), η οποία διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 48 ώρες ($4,24 \pm 0,17$), ενώ στα DU145 η αύξηση του *miR-155* σημειώθηκε μετά από 24 ώρες ($2,54 \pm 0,20$) και κορυφώθηκε μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF-β ($5,38 \pm 0,29$).



Εικόνα 3.6.4: Ρύθμιση των επιπέδων του *miR-155* από τον TGF-β στις καρκινικές σειρές T47D, MDAMB231 και DU145.

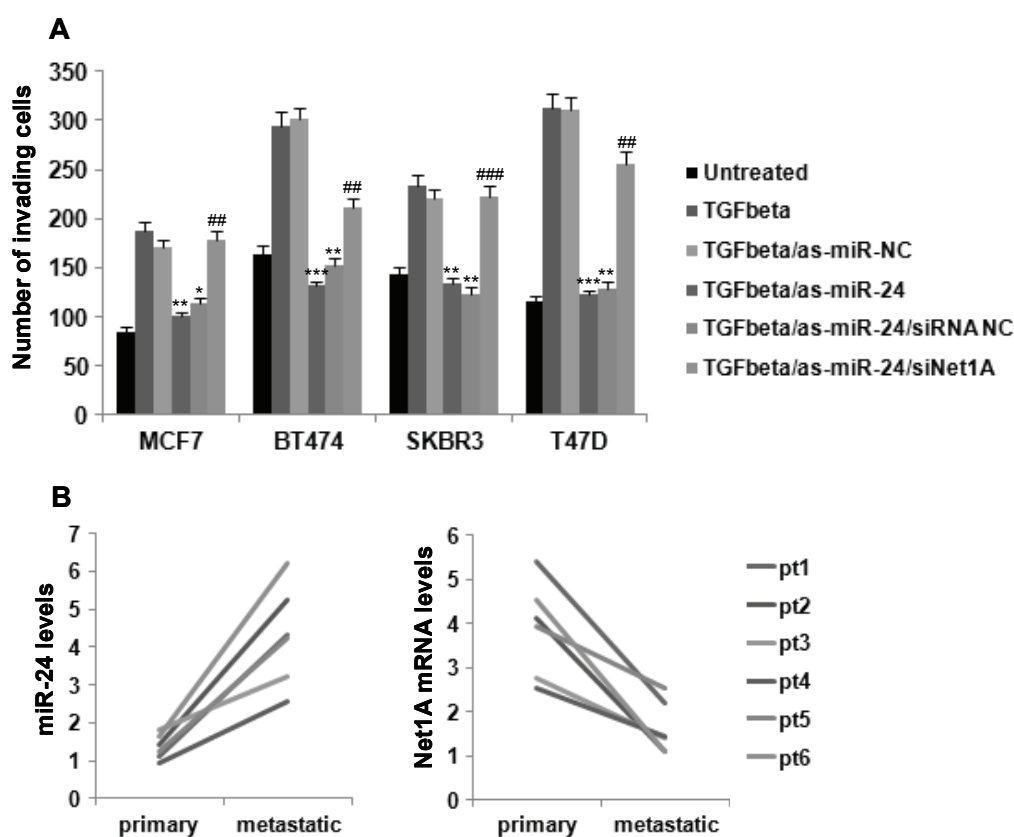
Ανάλυση των επιπέδων του *miR-155* με qRT-PCR στις καρκινικές σειρές, T47D, MDAMB231 και DU145 μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF-β για 16, 24 και 48 ώρες. Το U6 RNA χρησιμοποιήθηκε ως RNA αναφοράς για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. * p value<0.01, ** p value<0.01, *** p value<0.001.

3. Αποτελέσματα

Τέλος στα MDAMB23 παρατηρήθηκε μια μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του miR-155 μετά από 16 ώρες επίδρασης με TGF-β (2,50±0,16), η οποία διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλά επίπεδα μέχρι τις 24 (1,94±0,17) και τις 48 ώρες (1,73±0,19).

3.6.4 Το miR-24 εμπλέκεται στη διεισδυτικότητα και τη μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων μαστού

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος του miR-24 στη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF7, BT474, SKBR3 και T47D που επάγεται από τον TGF-β εφαρμόζοντας τη δοκιμασία Matrigel. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επιμολύνθηκαν παροδικά με το antisense miRNA αρνητικού ελέγχου (as-miR-NC) ή το antisense ολιγονουκλεοτίδιο για το miR-24 (as-miR-24) ή συνεπιμολύνθηκαν με το as-miR-24 και το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC) ή το siRNA για τη Net1A (siNet1A) και διεγέρθηκαν με 5 ng/ml TGF-β για 24 ώρες.



Εικόνα 3.6.5: Το miR-24 παίζει ρόλο στη διεισδυτικότητα και μεταστατικότητα καρκινικών κυττάρων μαστού.

A. Ανάλυση της διεισδυτικότητας σε Matrigel που επάγεται από τον TGF-β σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF7, BT474, SKBR3 και T47D μετά από επιμόλυνση των κυττάρων με το antisense miRNA αρνητικού ελέγχου (as-miR-NC) ή το antisense ολιγονουκλεοτίδιο για το miR-24 (as-miR-24) ή μετά από συνεπιμόλυνση με το as-miR-24 και το siRNA αρνητικού ελέγχου (siRNA NC) ή το siRNA για τη Net1A (siNet1A) και ακόλουθη διέγερση με 5 ng/ml TGF-β για 24 ώρες. **B.** Ανάλυση των επιπέδων mRNA της Net1A και του miR-24 με qRT-PCR σε 6 ζεύγη πρωτογενούς και μεταστατικού καρκίνου του μαστού.

Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.6.5A** η καταστολή του miR-24 είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της διεισδυτικότητας στο matrigel που επάγεται από τον TGF-β σε όλες τις κυτταρικές σειρές, ενώ η επιλεκτική αποσιώπηση της Net1A επανέφερε σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα αυτή στα BT474 και T47D, ενώ την αποκατέστησε πλήρως στα MCF7 και SKBR3. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το miR-24 παίζει σημαντικό ρόλο στη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού που επάγεται από τον TGF-β μέσω ρύθμισης της Net1A.

Τέλος, σε μία προσπάθεια ανάλυσης της κλινικής σημασίας αυτών των ευρημάτων, μελετήθηκαν τα επίπεδα mRNA της Net1A και τα επίπεδα του miR-24 με qRT-PCR σε 6 ζεύγη πρωτογενούς και μεταστατικού καρκίνου του μαστού που προέρχονται από την εταιρεία Origene Inc (Rockville, MD, USA). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.6.5B** τα επίπεδα του miR-24 αυξήθηκαν, ενώ τα mRNA επίπεδα της Net1A μειώθηκαν στους μεταστατικούς σε σχέση με τους πρωτογενείς όγκους. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι miR-24/Net1A ενεργοποιείται κατά τη μεταστατική εξέλιξη στον καρκίνου του μαστού.

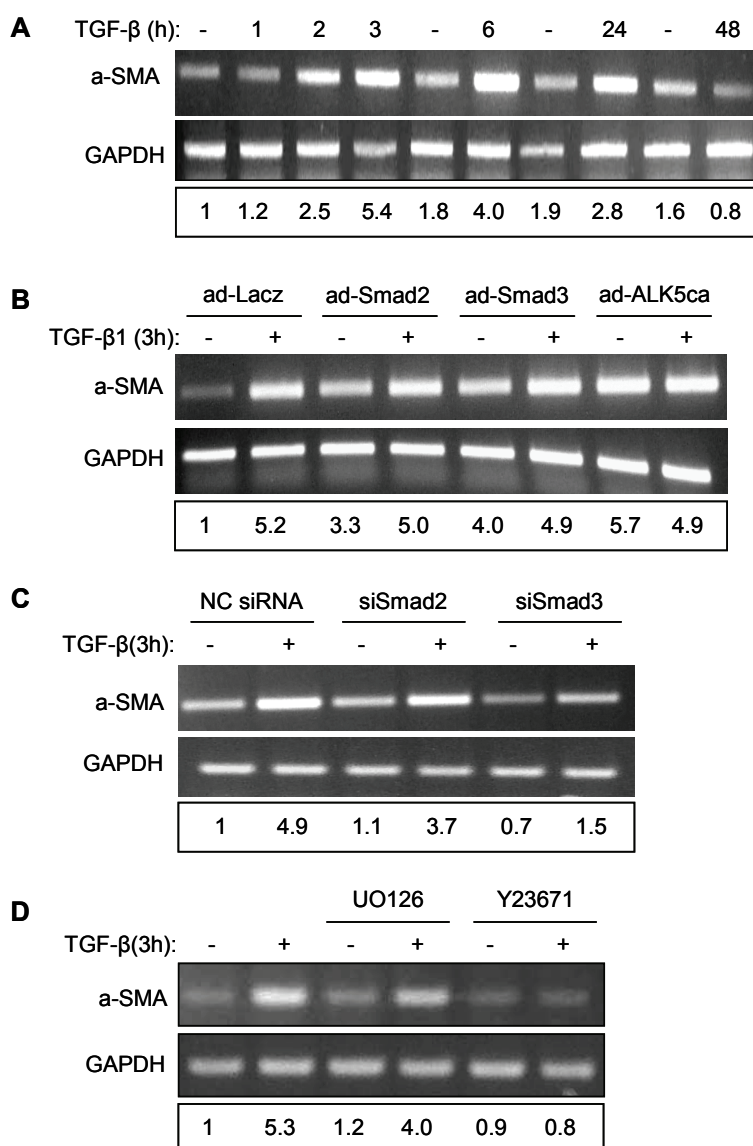
3.7 Ο ρόλος της α -SMA στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τον TGF- β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες

3.7.1 Μελέτη της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες

Παράλληλα με τη μελέτη γονιδίων στόχων του TGF- β , τα οποία σχετίζονται με την ενεργοποίηση της RhoA, όπως είναι η Net1 GEF, διερευνήθηκε και η ρύθμιση γονιδίων στόχων του TGF- β , τα οποία σχετίζονται άμεσα με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως είναι η α -λεία μυϊκή ακτίνη (α -SMA). Η α -SMA είναι γνωστό ότι επάγεται κατά τη διαφοροποίηση λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες [138,192]. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η ρύθμιση του γονιδίου της α -SMA από τον TGF- β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες με RT-PCR.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (1–48 ώρες). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.7.1A** ο TGF- β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων mRNA της α -SMA, ήδη μετά από 2 ώρες επίδρασης, η οποία διατηρήθηκε μέχρι και τις 24 ώρες. Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος του Smad μονοπατιού στη ρύθμιση της α -SMA από τον TGF- β , τόσο με πειράματα υπερέκφρασης όσο και αποσιώπησης των Smad2 και Smad3. Συγκεκριμένα, οι Swiss 3T3 ινοβλάστες διαμολύνθηκαν με τον αδενοϊό ελέγχου ad-LacZ, καθώς και με τους αδενοϊούς που εκφράζουν τις αγρίου τύπου μορφές των Smad2 (ad-Smad2) και Smad3 (ad-Smad3) και τη συνεχώς ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου I του TGF- β , ALK5 (ad-ALK5ca) και ακολούθως επωάστηκαν με TGF- β για 3 ώρες, χρόνος στον οποίο παρατηρήθηκε η μέγιστη έκφραση της α -SMA. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 3.7.1B** η υπερέκφραση της Smad3 και σε μικρότερο βαθμό της Smad2, αρκεί για να επάγει την έκφραση της α -SMA απουσία του TGF- β , χωρίς όμως να φτάνει στα επίπεδα έκφρασης που παρατηρούνται μετά από υπερέκφραση του συνεχώς ενεργού υποδοχέα του TGF- β , ALK5ca, υποδηλώνοντας ότι και άλλα μονοπάτια μπορεί να εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα επιλεκτικής αποσιώπησης των Smad2 και Smad3 με χρήση siRNA μορίων τα οποία στοχεύουν ειδικά σε κάθε πρωτεΐνη. Για το λόγο αυτό, τα κύτταρα επιμολύνθηκαν σε δύο γύρους επιμόλυνσης με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) και με τα siRNA για τη Smad2 (siSmad2) ή τη Smad3 (siSmad3), καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και μετά επωάστηκαν με TGF- β για 3 ώρες. Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.7.1C** η αποσιώπηση της Smad3 οδήγησε σε σχεδόν πλήρη αναστολή της επαγωγής της α -SMA από τον TGF- β (από 4.9 σε 1.5), ενώ η αποσιώπηση της Smad2 είχε ως αποτέλεσμα μία πολύ μικρή μείωση των επιπέδων της α -SMA (από 4.9 σε 3.7).

Επίσης με τη χρήση των αναστολέων της MEK κινάσης UO126 και της ROCK κινάσης Y23671 διερευνήθηκε η εμπλοκή και άλλων μονοπατιών στην επαγωγή της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β .



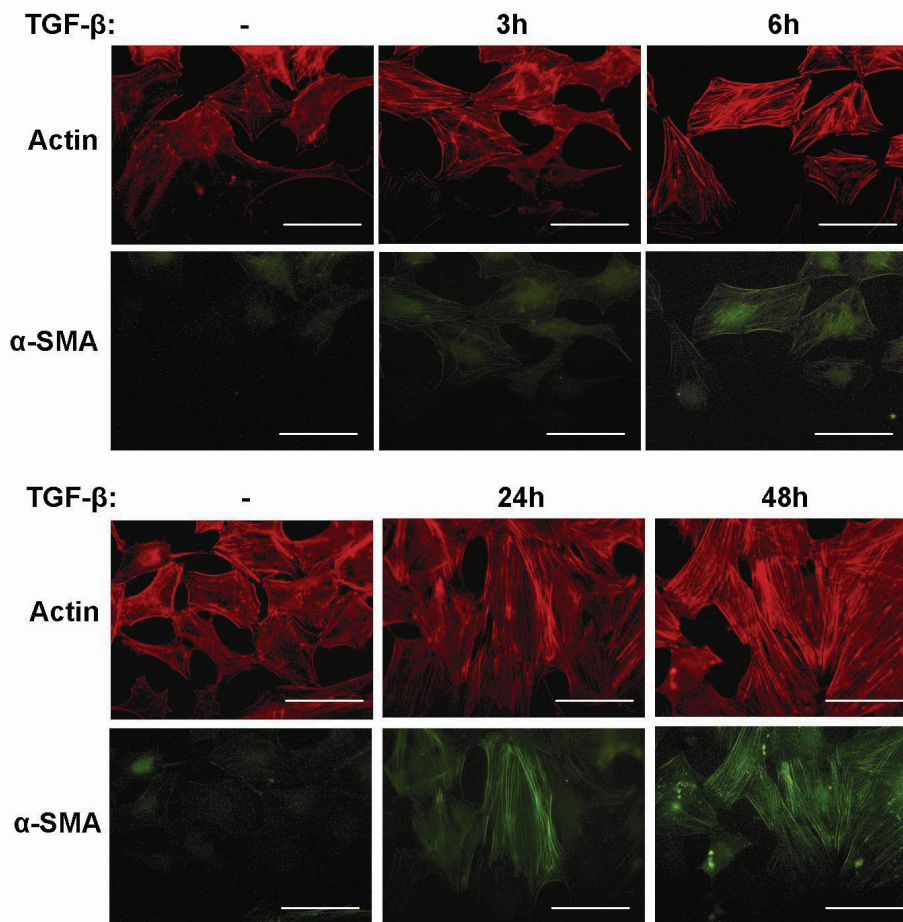
Εικόνα 3.7.1: Μελέτη της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β στους Swiss 3T3 ινοβλάστες.

Ανάλυση των επιπέδων mRNA της α -SMA με RT-PCR: **A.** μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF- β για διάφορους χρόνους (1-48 ώρες) **B.** μετά από διαμόλυνση των Swiss 3T3 ινοβλαστών με τους αδενοϊούς *ad-Lacz* (αδενοϊός ελέγχου), *ad-Smad2*, *ad-Smad3* και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα τύπου I του TGF- β , *ad-ALK5ca* και επώαση ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες, **C.** μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με το siRNA αρνητικού ελέγχου (NC siRNA) και με τα siRNA που στοχεύουν επιλεκτικά στη *Smad2* (siSmad2) και τη *Smad3* (siSmad3) και επώαση ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες και **D.** μετά από προεπώαση των κυττάρων με τον αναστολέα της MEK κινάσης, UO126 (10 μ M) και της ROCK κινάσης, Y23671 (10 μ M) και επίδραση ή όχι με 5 ng/ml TGF- β για 3 ώρες.

Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι ο αναστολέας της ROCK κινάσης ανέστειλε πλήρως την έκφραση της α -SMA μετά από 3 ώρες επίδρασης με TGF- β , ενώ ο αναστολέας της MEK κινάσης επέφερε μικρό αποτέλεσμα. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι στην επαγωγή της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β , εκτός από το μονοπάτι των Smad εμπλέκεται και το μονοπάτι της ROCK κινάσης.

3.7.2 Μελέτη της ενσωμάτωσης της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοφθορισμού για τη μελέτη της ενσωμάτωσης της α -SMA στα ινίδια ακτίνης μετά από σύντομη επίδραση με TGF- β για 3 και 6 ώρες, καθώς και μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β για 24 και 48 ώρες.

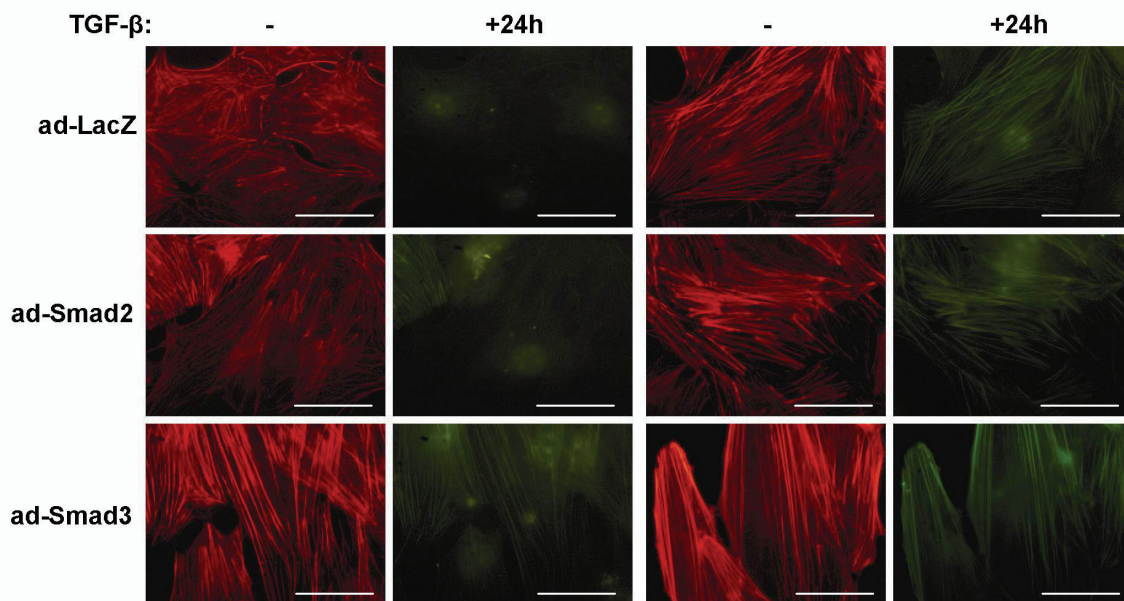


Εικόνα 3.7.2: Μελέτη της ενσωμάτωσης της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης μετά από επίδραση με TGF- β .

Οι Swiss 3T3 ινοβλάστες επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 3, 6, 24 και 48 ώρες και ακολούθησε χρώση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη (κόκκινο) και παράλληλη χρώση για την α -SMA (πράσινο, FITC). Οι μπάρες υποδηλώνουν 50 μ m.

Παράλληλα με την επιλεκτική χρώση της α -SMA (πράσινο, FITC), πραγματοποιήθηκε και χρώση του συνολικού κυτταροσκελετού της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη (κόκκινο). Όπως φαίνεται στην **εικόνα 3.7.2** η ενσωμάτωση της α -SMA πραγματοποιείται σταδιακά μετά από 3-6 ώρες επίδρασης με TGF- β , ενώ γίνεται ιδιαίτερα αισθητή στις 24 και 48 ώρες. Επίσης μελετήθηκε και ο ρόλος των Smad2 και Smad3 στην ενσωμάτωση της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα υπερέκφρασης των wt μορφών των Smad2 και Smad3 με χρήση αδενοϊών και ακολούθησε επίδραση με TGF- β για 24 ώρες και χρώση των κυττάρων για την α -SMA (πράσινο, FITC) και την ακτίνη με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη

(κόκκινο) (**Εικόνα 3.7.3**). Η υπερέκφραση της Smad3 και μόνο οδήγησε στη δημιουργία έντονων ινιδίων του στρες, τα οποία ήταν εμπλουτισμένα σε αρκετό βαθμό με την α -SMA, ενώ μετά από επίδραση με TGF- β η παρουσία της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης ήταν πολύ εντονότερη ακόμη και σε σχέση με το αποτέλεσμα που προκάλεσε τόσο ο TGF- β από μόνος του, όσο και η υπερέκφραση της Smad2 παρουσία TGF- β . Η υπερέκφραση της Smad2 απουσία TGF- β από την άλλη μεριά οδήγησε σε μία ασθενέστερη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με πολύ μικρή ενσωμάτωση της α -SMA, επιβεβαιώνοντας τα συμπεράσματά μας από τα RT-PCR πειράματα, ότι δηλαδή η Smad3 είναι κατά κύριο λόγο απαραίτητη για την επαγωγή της α -SMA από τον TGF- β .

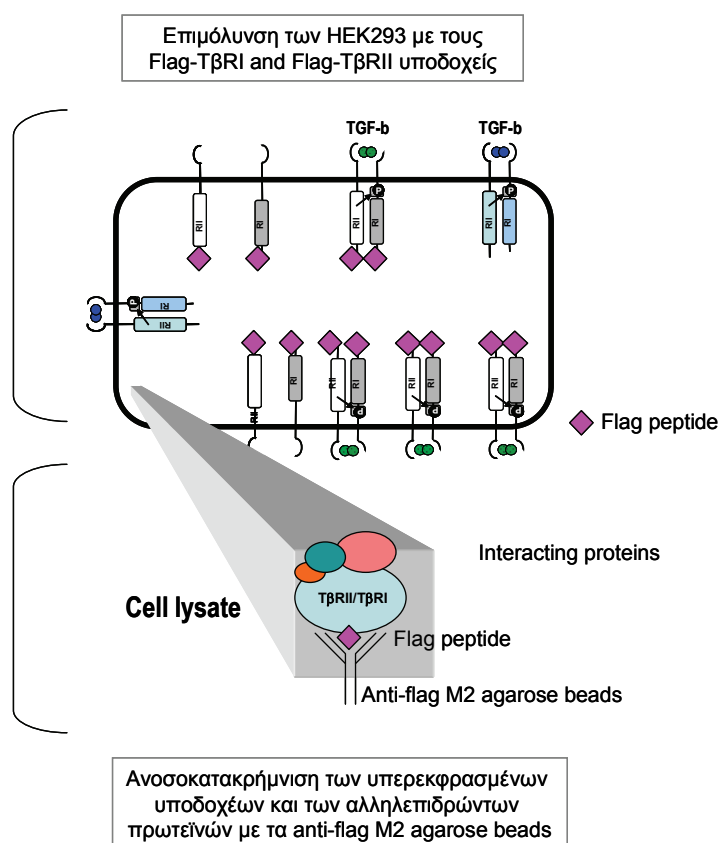


Εικόνα 3.7.3: Η εμπλοκή του Smad μονοπατιού στην ενσωμάτωση της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης.

Οι Swiss 3T3 ινοβλάστες διαμολύνθηκαν με τους αδενοϊούς ad-LacZ (αδενοϊός ελέγχου), ad-Smad2 και ad-Smad3, επωάστηκαν ή όχι με TGF- β για 24 ώρες και ακολούθησε χρώση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη (κόκκινο) και παράλληλη χρώση για την α -SMA (πράσινο, FITC). Οι μπάρες υποδηλώνουν 25 μ m.

3.8 Αναζήτηση μορίων που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF- β , T β RI και T β RII με φασματομετρία μάζας

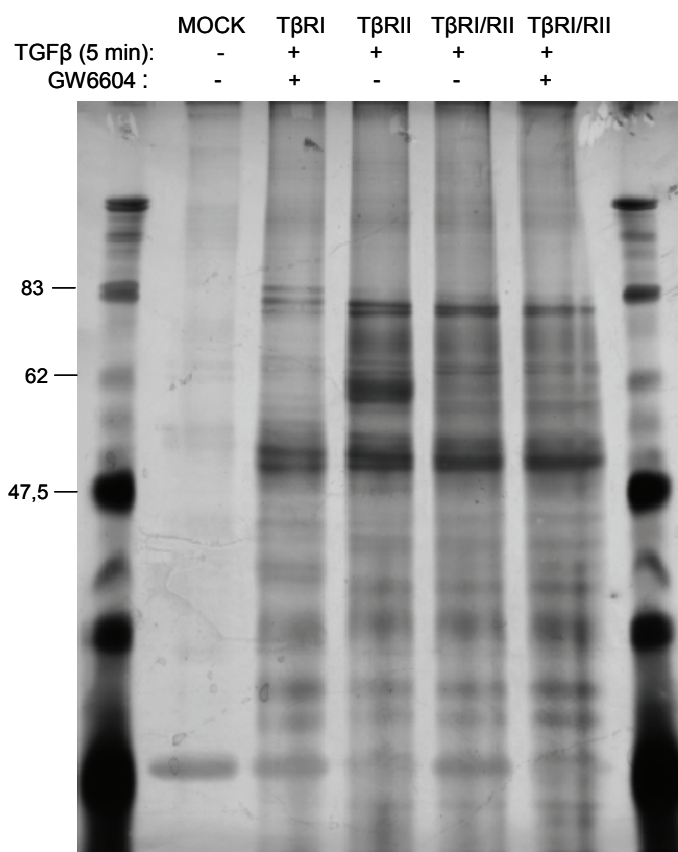
Στα πλαίσια της συστηματικής αναζήτησης των μορίων τα οποία δρουν ανοδικά της RhoA οδηγώντας στη γρήγορη ενεργοποίησή της από τον TGF- β χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της φασματομετρίας μάζας, η οποία παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης άγνωστων πρωτεϊνών, που δεν έχουν προηγουμένως συσχετισθεί με ένα μονοπάτι ή έναν παράγοντα. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε αφορούσε στην υπερέκφραση των υποδοχέων του TGF- β , T β RI και T β RII, την κατακρήμνισή τους και την ανάλυση με φασματομετρία μάζας των πρωτεϊνών που συνκατακρήμνίζονται με τους υποδοχείς (Εικόνα 3.8.1). Το ζητούμενο ήταν να βρεθεί κάποια πρωτεΐνη GEF με ειδικότητα για τη RhoA (ή ακόμη και κάποια πρωτεΐνη που σχετίζεται στη βιβλιογραφία με κάποια GEF), η οποία θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με κάποιον από τους υποδοχείς κατά τη στρατολόγησή της από τον TGF- β , ώστε να ενεργοποιήσει τη RhoA. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση της RhoA είναι ένα γρήγορο φαινόμενο θεωρήσαμε ότι λαμβάνει χώρα κοντά στη μεμβράνη και κοντά στο σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF- β .



Εικόνα 3.8.1: Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την αναγνώριση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF- β .

Στα πρώτα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3, διότι σε αυτά πραγματοποιήθηκαν όλα τα πειράματα σχετικά με τη μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης

της RhoA από τον TGF- β . Καθότι η αποτελεσματικότητα της επιμόλυνσης των κυττάρων αυτών με τα πλασμίδια που εκφράζουν τους υποδοχείς flag-T β RI και flag-T β RII δεν ήταν πολύ καλή και άρα οι συνκατακρημνιζόμενες πρωτεΐνες ήταν λίγες, δεν κατέστη εφικτός ο εντοπισμός νέων πρωτεϊνών με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας. Έτσι επιλέχθηκαν τα HEK 293 κύτταρα, τα οποία έχουν πολύ καλύτερη απόδοση κατά την επιμόλυνση τους με πλασμιδιακό DNA.

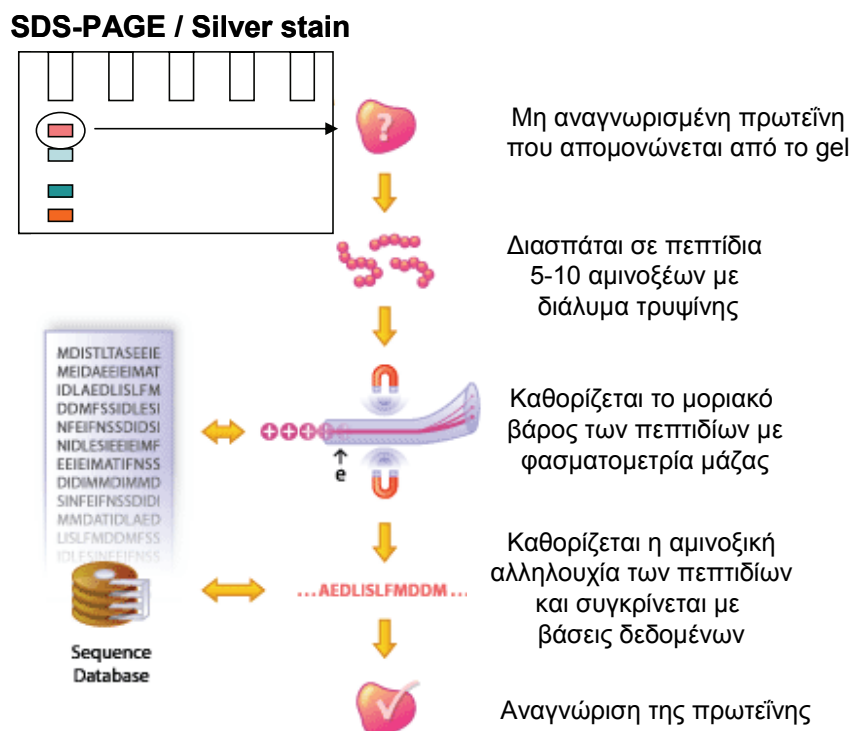


Εικόνα 3.8.2: Ανάλυση των πρωτεϊνών που συγκατακρημνίστηκαν με τους υποδοχείς του TGF- β , flag-T β RI, flag-T β RII και flag-T β RI/T β RII μετά από επίδραση με 5 ng/ml TGF- β για 5 λεπτά, παρουσία ή όχι του αναστολέα του T β RI υποδοχέα, GW6604 (10 μ M) σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% μετά από χρώση αργύρου.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη: Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με τον άδειο πλασμιδιακό φορέα pcDNA3 ως συνθήκη ελέγχου, με το πλασμίδιο που εκφράζει τον υποδοχέα τύπου I, flag-T β RI ή το πλασμίδιο που εκφράζει τον υποδοχέα τύπου II, flag-T β RII μόνα τους ή σε συνδυασμό, 48 ώρες μετά την επιμόλυνση καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού για 24 ώρες, ακολούθως προεπώαστηκαν ή όχι με τον αναστολέα του υποδοχέα τύπου I του TGF- β , T β RI, GW6604 (10 μ M) για 1 ώρα και τέλος επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF- β για 5 λεπτά. Τα κύτταρα στη συνέχεια συλλέχθηκαν, απομονώθηκαν τα κυτταροπλασματικά τους εκχυλίσματα, τα οποία και αναλύθηκαν σε 10% πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Επιλέχθηκε η απομόνωση των κυτταροπλασματικών εκχυλισμάτων με

3. Αποτελέσματα

σκοπό την απαλλαγή από πυρηνικές πρωτεΐνες, οι οποίες “επιμολύνουν” τα κατακρημνιζόμενα σύμπλοκα των υποδοχέων και δυσκολεύουν την αναγνώριση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς. Ακολούθησε χρώση αργύρου της πηκτής και απομόνωση των ζωνών που δεν εμφανίζονταν στο δείγμα ελέγχου (**Εικόνα 3.8.2**). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε πέψη των επιλεγμένων πρωτεϊνικών ζωνών (in-gel digestion) με διάλυμα τρυψίνης, απομόνωση των τρυπτικών πεπτιδίων από την πηκτή και ανάλυση τους με φασματογράφο μάζας (**Εικόνα 3.8.3**).



Εικόνα 3.8.3: Η διαδικασία της αναγνώρισης μιας πρωτεΐνης που απομονώνεται από πηκτή πολυακρυλαμίδιου μετά από χρώση αργύρου με την τεχνική της φασματομετρία μάζας.

Τα μοριακά βάρη των τρυπτικών πεπτιδίων που προέκυψαν από την ανάλυση με το φασματογράφο μάζας για κάθε ζώνη αναλύθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος **ProFound** (<http://prowl.rockefeller.edu/prowl-cgi/ProFound.exe>) και τα αποτελέσματα των προβλεπόμενων πρωτεϊνών που προέκυψαν με σφάλμα μοριακού βάρους των πεπτιδίων 0.02 (Da) (mass tolerance) από κάθε ζώνη για κάθε συνθήκη παρουσιάζονται στους ακόλουθους πίνακες. Στους πίνακες παρουσιάζονται επίσης ο αριθμός των πεπτιδίων που ταιριάζουν στην αμινοξική αλληλουχία της κάθε πρωτεΐνης (matched peptides), η βιολογική δράση των πρωτεϊνών και η συσχέτιση τους με το TGF- β μονοπάτι, όπου είναι γνωστή (σημειώνεται με *). Δυστυχώς, δεν κατέστη δυνατή η αναγνώριση κάποιας GEF πρωτεΐνης με ειδικότητα για τη RhoA από το σύνολο των πρωτεϊνών που παρουσιάζονται παρακάτω, για αυτό το λόγο τα ευρήματα αυτά δε διερευνήθηκαν περαιτέρω.

Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν στο Ludwig Institute for Cancer Research στην Ουψάλα της Σουηδίας υπό την επίβλεψη του Δρ. Άρη Μουστάκα και με τη βοήθεια του ειδικού στη φασματομετρία μάζας Δρ. Ulf Helman.

Πίνακας 3.8.1: Παρουσίαση των πρωτεϊνών που προέκυψαν από την ανάλυση επιλεγμένων ζωνών του δείγματος TβRI + TGF-β για 5 λεπτά παρουσία του TβRI αναστολέα GW6604.

| TβRI +TGFβ 5min + GW6604 (TβRI inhibitor) | | | | |
|---|-------------|--|---|-------------------|
| Πρωτεΐνη | # πεπτιδίων | Βιολογική δράση | Σχετιζόμενο μονοπάτι/ Αλληλεπιδράσεις | Αναφορά |
| Hsp90* | 13 | Chaperone | TGF-β μονοπάτι Σταθεροποίηση των TβRI/TβRII υποδοχέων | [215,216] |
| Hsp70* | 12 | Chaperone | Συνεργάζεται με την Hsp90 TGF-β μονοπάτι | [215] |
| PRMT5* | 11 | Μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης Μεθυλίωση ιστονών Μίτωση Καταστολή της μεταγραφής | Αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό καταστολέα Ski και τις Smad2/3/4 Αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της TRAIL και ενεργοποιεί το NF-kB μονοπάτι Προ-επιβιωτικός παράγοντας – ελέγχει τη σύνθεση της p53 | [217-220] |
| CASP12 | 8 | Κασπάση | Σχετίζεται με την απόπτωση που επάγεται από στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο | [221] |
| Neuregulin 2 | 6 | Διαμεμβρανικός συνδέτης των ERBB3/4 υποδοχέων | EGF μονοπάτι Αλληλεπίδραση με τη LIMK1 | [222-224] |
| AKT* | 6 | Κινάση σερίνης | PI3K/AKT μονοπάτι Ενεργοποιείται από τον TGF-β Αλληλεπιδρά με τη Smad3 | [129,130,134,135] |
| MACF1 | 6 | Παράγοντας διακλάδωσης μικροσωληνίσκων με τα ινίδια της ακτίνης | Wnt μονοπάτι Αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο Axin/GSK3b/APC | [225] |
| GBP3 | 5 | Πρωτεΐνη που προσδένει GTP/GDP | IFN-γ, LPS | |
| Cdc7 kinase | 5 | Κινάση σερίνης-θρεονίνης Κυτταρικός κύκλος | Ενεργοποιείται από την CycE-Cdk2 και φωσφορυλιώνει την Mcm2 ελικάση- | [226] |
| RGS14 | 4 | Συστατικό της μιτωτικής ατράκτου Αλληλεπίδραση με μικροσωληνίσκους | Αλληλεπίδραση με τις Gi alpha 1/3 πρωτεΐνες Τελεστής της Rap GTPάσης | [227,228] |
| FZR1* (Cdh1) | 4 | Ρυθμιστής της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου Κυτταροσκελετός Μετανάστευση | Το σύμπλοκο Anaphase Promoting Complex/Cdh1 μεσολαβεί τη στόχευση για αποικοδόμηση της SCF λιγάσης, της SnoN και του μεταγραφικού παράγοντα KLF4 από τον TGF-β Αλληλεπιδρά με τη Smad3 Ρυθμίζει τη Rho GTPάση στοχεύοντας την p190RhoGAP για αποικοδόμηση | [229-234] |
| Calnexin* | 4 | Chaperone του ενδοπλασματικού δικτύου | Εμπλέκεται στην ενδοκυττάρωση υποδοχέων μέσω κλαθρίνης και στην αποικοδόμηση της MUC4 από τον TGF-β | [235,236] |

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.8.2: Παρουσίαση των πρωτεϊνών που προέκυψαν από την ανάλυση επιλεγμένων ζωνών του δείγματος TβRII + TGF-β για 5 λεπτά.

| TβRII +TGFβ 5min | | | | |
|----------------------|-------------|--|--|-----------|
| Πρωτεΐνη | # πεπτιδίων | Βιολογική δράση | Σχετιζόμενο μονοπάτι/ Αλληλεπιδράσεις | Αναφορά |
| Hsp90* | 14 | Chaperone | TGF-β μονοπάτι Σταθεροποίηση των TβRI/TβRII υποδοχέων | [215,216] |
| Hsp70* | 12 | Chaperone | Συνεργάζεται με την Hsp90 TGF-β μονοπάτι | [215] |
| TEL2 | 10 | Ρυθμιστής της σταθερότητας των PIKKs πρωτεϊνών (π.χ. mTOR, ATM) | PI3K/mTOR μονοπάτι Αλληλεπίδραση με την Hsp90 | [237,238] |
| VEGFR-1* | 8 | Αγγειογένεση | VEGF μονοπάτι Επάγεται από τον TGF-β στα ενδοθηλιακά κύτταρα | [239,240] |
| APC2* | 7 | Αλληλεπίδραση με μικροσωληνίσκους | Wnt μονοπάτι Μίτωση Ρυθμίζεται αρνητικά από τον TGF-β | [241,242] |
| DOCK 10/ Zizimin3 | 7 | GEF πρωτεΐνη ειδική για τη Cdc42 GTPάση | Μετανάστευση Η ομόλογη της Zizimin1 αλληλεπιδρά με τις Smad2/3 | [243,244] |
| CUX1* (CUTL1) | 6 | Μεταγραφικός παράγοντας | Κυτταρικός κύκλος Μετανάστευση Αντι-αποπτωτική δράση Γονίδιο στόχος του TGF-β | [245-248] |
| EMAP-4 | 6 | Σταθεροποιητής των μικροσωληνίσκων | Μίτωση | [249] |
| SHIP2* | 6 | 5' Φωσφατάση της 3,4,5 φωσφατιδύλο ινοσιτόλης, PI5P | Ανταγωνισμός του PI3K μονοπατιού Επάγεται από τον TGF-β κατά την απόπτωση σε αιμοποιητικά κύτταρα | [133] |
| IQGAP3 | 6 | Τελεστής των Ras, Rac και Cdc42 GTPασών | Ras/ERK μονοπάτι Πολλαπλασιασμός Κυτταροσκελετός | [250,251] |
| KIF5B | 6 | Κινεσίνη των λυσοσωμάτων | Αυτοφαγία | [252] |
| Neuregulin 1 | 5 | Διαμεμβρανικός συνδέτης των NEU/ERBB2/3/4 υποδοχέων | EGF μονοπάτι Αλληλεπίδραση με τη LIMK1 | [222-224] |
| Hsp40/ DNAJA3 | 5 | Chaperone | Αλληλεπιδρά με την Hsp70 | [253] |
| P-Rex2 | 5 | GEF πρωτεΐνη ειδική για τη Rac GTPάση | PI3K μονοπάτι | [254] |
| TRAF4* | 4 | Μέλος των TRAF πρωτεϊνών που συνδέονται στους υποδοχείς του TNF | TNF, TGF-β, BMP, Nodal, p53 μονοπάτια Εντοπίζεται στους στενοσύνδεσμους Προ- και αντι-αποπτωτική δράση | [255-258] |
| PI3K p85b* | 4 | Ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K | PI3K μονοπάτι Αλληλεπιδρά με τους TβRI/TβRII υποδοχείς | [132,259] |
| Dispatched 1 | 4 | Διαμεμβρανική πρωτεΐνη που προάγει την έκκριση και μεταφορά του Hedgehog συνδέτη | Hedgehog μονοπάτι | [260] |

Πίνακας 3.8.3: Παρουσίαση των πρωτεϊνών που προέκυψαν από την ανάλυση επιλεγμένων ζωνών του δείγματος ΤβRI/ΤβRII + TGF-β για 5 λεπτά απουσία του ΤβRI αναστολέα GW6604.

| ΤβRI/ΤβRII +TGFβ 5min | | | | |
|-----------------------|-------------|---|--|-----------|
| Πρωτεΐνη | # πεπτιδίων | Βιολογική δράση | Σχετιζόμενο μονοπάτι/ Αλληλεπιδράσεις | Αναφορά |
| Hsp70* | 16 | Chaperone | Συνεργάζεται με την Hsp90 TGF-β μονοπάτι | [215] |
| Hsp90* | 12 | Chaperone | TGF-β μονοπάτι Σταθεροποίηση των ΤβRI/ΤβRII υποδοχέων | [215,216] |
| MRCKβ*/ CDC42BPB | 7 | Κινάση σερίνης-θρεονίνης | Τελεστής της Cdc42 Αλληλεπίδραση με τη ZO-1 Μετανάστευση Γονίδιο στόχος των TGF-β2, BMP7 | [261,262] |
| SAMD9 | 7 | | INF-γ μονοπάτι | [263] |
| RhoGAP 11A | 6 | GAP για τη Rho GTPάση | Δεν έχει μελετηθεί | |
| EMAP-4 | 6 | Σταθεροποιητής των μικροσωληνίσκων | Μίτωση | [249] |
| Smad2* | 5 | Τελεστής του TGF-β μονοπατιού | TGF-β μονοπάτι | |
| P-Rex2 | 5 | GEF πρωτεΐνη ειδική για τη Rac GTPάση | PI3K μονοπάτι | [254] |
| PIP5K1A | 5 | 5' κινάση της 4' φωσφατιδύλο ινοσιτόλης 1A | Ρυθμιστής της Rac1 Μετανάστευση | [264] |
| ERC1 (ELKS) | 5 | Ουμπικουτινιώνεται από την XIAP λιγάση και αλληλεπιδρά με την TAK1 κινάση | NF-kB μονοπάτι | [265] |
| WDR77/p44 (MEP50) | 5 | Συμπαράγοντας του υποδοχέα των ανδρογόνων, AR | Μίτωση Υπόστρωμα της CDK4 – αλληλεπιδρά με την PRMT5 | [217,266] |
| ZNF675 | 4 | TRAF6-binding zing finger protein | Αναστολέας της TRAF6 | [267] |
| PRPF4B | 4 | Κινάση σερίνης-θρεονίνης | Pre mRNA splicing | [268] |

3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3.8.4: Παρουσίαση των πρωτεϊνών που προέκυψαν από την ανάλυση επιλεγμένων ζωνών του δείγματος ΤβRI/ΤβRII + TGF-β για 5 λεπτά παρουσία του ΤβRI αναστολέα GW6604.

| ΤβRI/ΤβRII +TGFβ 5min + GW6604 (ΤβRI inhibitor) | | | | |
|---|--------------|--|--|-----------|
| Πρωτεΐνη | # πεπτι δίων | Βιολογική δράση | Σχετιζόμενο μονοπάτι/ Αλληλεπιδράσεις | Αναφορά |
| Hsp70* | 14 | Chaperone | Συεργάζεται με την Hsp90 TGF-β μονοπάτι | [215] |
| Hsp90* | 12 | Chaperone | TGF-β μονοπάτι Σταθεροποίηση των ΤβRI/ΤβRII υποδοχέων | [215,216] |
| PRMT5* | 11 | Μεθυλοτρανσφεράση της αργινίνης Μεθυλίωση ιστονών Καταστολή της μεταγραφής Μίτωση | Αλληλεπιδρά με το μεταγραφικό καταστολέα Ski και τις Smad2/3/4 Αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα της TRAIL και ενεργοποιεί το NF-kB μονοπάτι Προ-επιβιωτικός παράγοντας – ελέγχει τη σύνθεση της p53 | [217-220] |
| Stonin-2 | 6 | Adaptor πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα ενδοσώματα | Ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης | [269] |
| EMAP-4 | 6 | Σταθεροποιητής των μικροσωληνίσκων | Μίτωση | [249] |
| SOS1* | 5 | GEF για τη Ras GTPάση | Εμπλέκεται στην ενεργοποίηση του Ras/ERK μονοπατιού από τον TGF-β | [118] |
| TRAF4* | 5 | Μέλος των TRAF πρωτεϊνών που συνδέονται στους υποδοχείς του TNF | TNF, TGF-β, BMP, Nodal, p53 μονοπάτια Εντοπίζεται στους στενοσύνδεσμους Προ- και αντι-αποπτωτική δράση Αλληλεπιδρά με την PRMT5 | [255-258] |
| Hsp40/ DNAJA3 | 5 | Chaperone | Αλληλεπιδρά με την Hsp70 | [253] |
| PPFIBP1/ SGT2 | 5 | Liprin b1 (LAR tyrosine phosphatase interacting protein | Αλληλεπιδρά με τη διαμεμβρανική φωσφατάση τυροσίνης LAR Αλληλεπιδρά με τη S100A4 Μετανάστευση | [270] |
| COL3A1 | 5 | Κολλαγόνο τύπου 3 | | |
| PI3K p110b* | 4 | Καταλυτική υπομονάδα της PI3K | PI3K μονοπάτι Ενεργοποιείται από τον TGF-β | [129,131] |
| PRPF4B | 4 | Κινάση σερίνης-θρεονίνης | Pre mRNA splicing | [268] |

4. Συζήτηση

4.1 Μελέτη της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF- β στα JEG3 κύτταρα χοριοκαρκινώματος

Ο TGF- β ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα πλαίσια της αλλαγής της μορφολογίας των κυττάρων που είναι απαραίτητη σε διεργασίες, όπως η κυτταρική μετανάστευση, η επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή και η διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες, οι οποίες είναι κρίσιμης σημασίας κατά την εμβρυογένεση, την εξέλιξη του καρκίνου και τη διαδικασία της επούλωσης πληγών [184,185].

Τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να αποσαφηνίζονται οι μηχανισμοί με τους οποίους ο TGF- β ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των Rho GTPασών, παρόλα αυτά οι μηχανισμοί αυτοί δεν είναι απόλυτα κατανοητοί. Η ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης από τον TGF- β είναι καλά στοιχειοθετημένη και έχει αναφερθεί σε αρκετά κυτταρικά συστήματα, όπως σε ινοβλάστες [136], σε λεία μυϊκά κύτταρα [137,138], καθώς και σε φυσιολογικά και καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα [81,139,206]. Οι καθοδικοί τελεστές που ενεργοποιούνται από τη RhoA μετά από διέγερση με TGF- β έχουν αναγνωριστεί σε αρκετές από αυτές τις μελέτες, όπως για παράδειγμα έχει βρεθεί ότι η ROCK κινάση είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ινιδίων του στρες από τον TGF- β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες [136] και σε PC3 καρκινικά κύτταρα προστάτη [139], επίσης είναι απαραίτητη κατά την EMT που προκαλείται από τον TGF- β σε NMuMG επιθηλιακά κύτταρα μαστού [81], ενώ η PKN/PRK2 [138] και η ROCK κινάση [137] έχουν εμπλακεί στη διαφοροποίηση των λείων μυϊκών κυττάρων από τον TGF- β καθοδικά της RhoA.

Η ενεργοποίηση της RhoA GTPάσης έχει βρεθεί ότι λαμβάνει χώρα πολύ γρήγορα, μόλις μετά από 2-5 λεπτά επίδρασης με TGF- β [81,136-139,144], παρόλα αυτά μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί καμία GEF πρωτεΐνη που να εμπλέκεται στη γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF- β και ο μηχανισμός αυτός παραμένει άγνωστος. Επίσης η εξάρτηση της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τις Smad πρωτεΐνες είναι σε μεγάλο βαθμό αντιφατική. Προηγούμενη δουλειά στο εργαστήριο μας έδειξε, ότι η ενεργοποίηση της RhoA και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF- β εξαρτάται από την L45 θηλεία του T β RI υποδοχέα, την περιοχή πρόσδεσης των R-Smad [136]. Στην ίδια περιοχή του T β RI υποδοχέα προσδένεται επίσης και η ανασταλτική Smad7, η οποία ανταγωνίζεται την πρόσδεση και ενεργοποίηση των R-Smads [89,103], επομένως δεν μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να εμπλέκεται η Smad7, αντί των R-Smad, στο μηχανισμό ενεργοποίησης της RhoA. Προς αυτή την κατεύθυνση δείχθηκε, ότι η Smad7 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της Cdc42 από τον TGF- β , δρώντας ως adaptor και όχι ως ανασταλτική πρωτεΐνη, κάτι τέτοιο όμως δε φάνηκε να ισχύει για την ενεργοποίηση της RhoA [144], ενώ επιπροσθέτως αναφέρθηκε ότι η υπερέκφραση της Smad7 μπλόκαρε την ενεργοποίηση της

RhoA [136]. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη πάντως έδειξε, ότι η ενεργοποίηση της RhoA δεν εξαρτάται από τις Smad2/3/4 [271].

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β και αναζητήθηκαν οι GEF πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μηχανισμό αυτό. Σε προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο μας βρέθηκε ότι οι RhoA και RhoB ενεργοποιούνται μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης με TGF-β στους Swiss 3T3 ινοβλάστες, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που καταλήγει στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω ενεργοποίησης της ROCK1 και της LIMK2 και αναστολής της cofilin [136]. Αναζητώντας τα μόρια που συνδέουν τους υποδοχείς του TGF-β (TβRI και TβRII) με την ενεργοποίηση των RhoA και RhoB διερευνήθηκε αρχικά ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά χοριοκαρκινώματος JEG3, η οποία δεν εκφράζει ενδογενώς την πρωτεΐνη Smad3 (Smad3^{-/-}) και έτσι με την αποσιώπηση μόνο της Smad2 καθίσταται εφικτή η μελέτη των εξαρτώμενων από τις Smad2/3 πρωτεΐνες μονοπατιών.

Αρχικά βρέθηκε ότι τόσο η RhoA όσο και η RhoB ενεργοποιούνται στα JEG3 κύτταρα μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης με TGF-β (**Εικόνα 3.1.1**), υποδηλώνοντας ότι αυτή η ενεργοποίηση δεν εξαρτάται από τη Smad3. Η αποσιώπηση της Smad2 ακολούθως απέτυχε να μπλοκάρει την ενεργοποίηση τόσο της RhoA όσο και της RhoB από τον TGF-β αποδεικνύοντας ότι οι Smad2 και Smad3 δε χρειάζονται για τη γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB (**Εικόνα 3.1.2A και B**). Παράλληλα η χρήση του αναστολέα του υποδοχέα τύπου I του TGF-β (ALK5), SB431542, επίσης δεν επηρέασε την επαγόμενη από τον TGF-β ενεργοποίηση των RhoA/B (**Εικόνα 3.1.2.D και E**) υποστηρίζοντας την υπόθεση, ότι η ενεργοποίηση των RhoA και RhoB δεν εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση της Smad2, αλλά ούτε και από την κινάση του ALK5 γενικότερα. Το τελευταίο εύρημα είναι σε ασυμφωνία με μία πολύ πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι η ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β σε ινοβλάστες εξαρτάται από τη δραστηριότητα της κινάσης του ALK5 υποδοχέα [271]. Η μελέτη αυτή όμως θεωρεί επιπροσθέτως ότι η ενεργοποίηση της RhoA είναι ανεξάρτητη από τις Smad2, Smad3 και Smad4 κάτι που είναι σε πλήρη συμφωνία με τα δικά μας συμπεράσματα σχετικά με τη μη αναγκαιότητα των Smad2 και Smad3 στη γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA/B από τον TGF-β στα JEG3 κύτταρα.

Στα πλαίσια της διερεύνησης των GEF πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β, μελετήθηκε η πιθανή εμπλοκή μονοπατιών κινασών τυροσίνης. Ένας αρκετά συνήθης μηχανισμός ρύθμισης των GEF πρωτεϊνών είναι η φωσφορυλίωση τους από κινάσες τυροσίνης, όπως οι Src και Syk, με αποτέλεσμα την άρση μιας αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους. Ένας τέτοιος μηχανισμός ενεργοποίησης έχει προταθεί για τις Vav, Sos1, Dbs, Vsm και Dbl GEFs [3,14,18,272]. Από την άλλη μεριά, οι υποδοχείς του TGF-β, TβRI και TβRII, είναι καλά χαρακτηρισμένες κινάσες σερίνης/θρεονίνης, όμως πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι έχουν μικρή

δραστικότητα κινάσης τυροσίνης με αποτέλεσμα ο TβRII να αυτο-φωσφορυλιώνεται και ο TβRI να αυτο- ή δια-φωσφορυλιώνεται από τον TβRII σε κατάλοιπα τυροσίνης ή να φωσφορυλιώνει πρωτεΐνες στόχους, όπως τα adaptor μόρια Grb2 και Shc σε κατάλοιπα τυροσίνης, εκκινώντας μονοπάτια που μέχρι πρόσφατα ήταν καθιερωμένα για τους υποδοχείς κινασών τυροσίνης, όπως ο EGFR [118,119].

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε κατ'αρχάς ο γενικός αναστολέας κινασών τυροσίνης Genistein, ο οποίος κατέστειλε πλήρως την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β (**Εικόνα 3.1.3**), επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η TGF-β επαγόμενη γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA εξαρτάται από τη σηματοδότηση κινασών τυροσίνης. Με βάση αυτό το εύρημα, διερευνήθηκε ο ρόλος της Src κινάσης στη γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β. Η Src κινάση αφενός έχει εμπλακεί στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση GEF πρωτεϊνών [3,14], αφετέρου έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζεται από το μονοπάτι του TGF-β θετικά ή αρνητικά. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι ο TGF-β οδηγεί σε μείωση της ενεργοποίησης και των πρωτεϊνικών επιπέδων της Src κινάσης σε PC3 καρκινικά κύτταρα προστάτη και σε μετασχηματισμένους ινοβλάστες [209,210], ενώ πιο πρόσφατα έχει βρεθεί ότι ο TGF-β ενεργοποιεί τη Src κινάση σε διάφορα κυτταρικά συστήματα [211,273,274]. Σε συμφωνία με τις τελευταίες μελέτες βρέθηκε, ότι ο TGF-β αύξησε τα επίπεδα αυτοφωσφορυλίωσης της Src κινάσης στο κατάλοιπο τυροσίνης Y⁴¹⁸, η οποία σχετίζεται με την καταλυτική της ενεργοποίηση, μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης, ενώ παράλληλα αύξησε τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Src στο κατάλοιπο τυροσίνης Y⁵²⁹ (αρνητική ρύθμιση) μετά από 15-30 λεπτά επίδρασης (**Εικόνα 3.1.4A**), γεγονός που σημαίνει ότι η Src κινάση ενεργοποιείται πολύ γρήγορα από τον TGF-β με ένα πολύ αυστηρά ρυθμιζόμενο τρόπο.

Ακολούθως δείχθηκε, ότι η ενεργοποίηση της Src κινάσης είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β, δεδομένου ότι η χρήση του αναστολέα της Src κινάσης, PP2 μπλόκαρε πλήρως την ενεργοποίηση της RhoA (**Εικόνα 3.1.5A**). Πρέπει να επισημανθεί, ότι ο αναστολέας της Src κινάσης PP2, αναστέλλει όχι μόνο τη Src κινάση, αλλά και άλλα μέλη της Src οικογένειας, τις Fyn, Lck, Hck σε παρόμοιο βαθμό. Δεδομένου, ότι δε πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης της Src κινάσης, δε μπορεί ως εκ τούτου να αποκλειστεί το ενδεχόμενο να εμπλέκεται και κάποιο άλλο από τα παραπάνω μέλη των Src κινασών στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β.

Μέλη της οικογένειας των Src κινασών έχουν συνδεθεί στη βιβλιογραφία με την ενεργοποίηση της Vav GEF. Η Vav αποτελείται από 3 ισομορφές που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια, τις Vav1, Vav2 και Vav3. Η Vav1 εκφράζεται αποκλειστικά σε κύτταρα του αιμοποιητικού συστήματος, ενώ η Vav2 έχει ευρεία έκφραση σε πολλούς ιστούς [18]. Η Vav3 είναι λιγότερο μελετημένη, ενώ δε φαίνεται να περιορίζεται στον αιμοποιητικό ιστό, καθώς έχει βρεθεί ότι εκφράζεται σε διαφορετικά επίπεδα σε αρκετούς ιστούς και κυτταρικές σειρές [275]. Δεδομένου ότι η Src κινάση έχει δειχθεί σε αρκετές μελέτες να ενεργοποιεί μέσω φωσφορυλίωσης τη Vav2 GEF, οδηγώντας σε άρση μιας αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης

και στην ακόλουθη ενεργοποίηση της [18,276-278], διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή της Vav2 στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β. Η Vav2 ως GEF έχει ειδικότητα και για τις τρεις κύριες μικρές Rho GTPάσες, RhoA, Rac1 και Cdc42 [212], επομένως θα μπορούσε να αποτελεί μία υποψήφια GEF για τη γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί επιλεκτική ενεργοποίηση από τη Vav2 τόσο των Rac1/Cdc42 [278-281] όσο και της RhoA GTPάσης [277,282,283].

Για να διερευνηθεί αυτό το ενδεχόμενο μελετήθηκε αρχικά η ενεργοποίηση της Vav2 μετά από επίδραση με TGF-β. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατακρήμνισης συγγένειας χρησιμοποιώντας μία μεταλλαγμένη μορφή της RhoA, GST-RhoA (G17A) (nucleotide-free), η οποία έχει πολύ μεγαλύτερη συγγένεια για τις ενεργές GEF πρωτεΐνες σε σχέση με την ανενεργή της (RhoA-GDP) και την ενεργή της μορφή (RhoA-GTP). Με το πείραμα αυτό μπορεί κανείς να προσδιορίσει τα ενεργά επίπεδα μιας GEF που έχει ειδικότητα για τη RhoA, δεδομένου ότι μόνο στην ενεργή της μορφή μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη RhoA και ακόμη πιο ισχυρά με τη RhoA (G17A) [213]. Μάλιστα η μέθοδος αυτή θεωρείται καταλληλότερη και αμεσότερη για τον προσδιορισμό της ενεργοποίησης της Vav2 σε σχέση με τον προσδιορισμό των επιπέδων φωσφορυλίωσης της, ο οποίος αποτελεί μία έμμεση εκτίμηση της ενεργοποίησης της [213]. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε, ότι ο TGF-β ενεργοποιεί τη Vav2 μόλις μετά από 5 λεπτά επίδρασης (**Εικόνα 3.1.4B**), με μία κινητική που είναι παρόμοια με την κινητική της αυτοφωσφορυλίωσης της Src κινάσης και της ενεργοποίησης της RhoA.

Στη συνέχεια δείχθηκε, ότι η αποσιώπηση της Vav2 με χρήση κατάλληλου siRNA, το οποίο στοχεύει και στις 2 ισομορφές της Vav2, περιόρισε σημαντικά την TGF-β εξαρτώμενη ενεργοποίηση της RhoA, υποδηλώνοντας ότι όντως η Vav2 εμπλέκεται στο μηχανισμό ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β (**Εικόνα 3.1.5C**).

Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε, ότι η αποσιώπηση της Vav2 προκάλεσε μία μικρή αλλά επαναλήψιμη αύξηση των ενεργών επιπέδων της RhoA (1,8 φορές) απουσία TGF-β, η οποία μετά την προσθήκη TGF-β αυξήθηκε ελάχιστα (2,1 φορές). Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να ερμηνευτεί μέσω ενός ανταγωνιστικού μηχανισμού μεταξύ των RhoA και Rac1 GTPασών. Αποτελεί βασικό κανόνα, ότι σε περιοχές όπου απαιτείται αυξημένη δραστηριότητα της RhoA (π.χ. στο πίσω μέρος ενός μεταναστεύοντος κυττάρου) η ενεργότητα της Rac1 διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα μέσω ανασταλτικών μηχανισμών και αντίστροφα σε περιοχές όπου απαιτείται αυξημένη Rac1 δραστηριότητα (π.χ. στο οδηγό άκρο ενός μεταναστεύοντος κυττάρου ή στην κορυφαία (apical) περιοχή ενός επιθηλιακού κυττάρου) τα ενεργά επίπεδα της RhoA διατηρούνται με αυστηρό έλεγχο σε χαμηλά επίπεδα π.χ. μέσω ενεργοποίησης κάποιας RhoGAP [2,66,214]. Η Vav2 θα μπορούσε να ρυθμίζει τα βασικά επίπεδα ενεργοποίησης της Rac1 ή/και της Cdc42 στα κύτταρα JEG3, δεδομένης της ευρείας ειδικότητας της ως προς τις RhoA, Rac1 και Cdc42. Επομένως η αποσιώπηση της και μόνο θα μπορούσε να διεγείρει ανταγωνιστικά την αύξηση των ενεργών επιπέδων της RhoA που

παρατηρήθηκε στα πειράματα μας, λόγω της μείωσης των ενεργών επιπέδων της Rac1 ή/και της Cdc42.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η Vav2 είναι μία GEF με ειδικότητα και για τις τρεις κύριες μικρές Rho GTPάσες, RhoA, Rac1 και Cdc42, επομένως η ενεργοποίηση της από τον TGF-β θα μπορούσε επίσης να οδηγεί στην ενεργοποίηση της Rac1 ή/και της Cdc42. Παρόλα αυτά ο TGF-β δεν τροποποίησε τα ενεργά επίπεδα των Rac1 και Cdc42 στα JEG3 κύτταρα, ενώ μάλιστα προκάλεσε τη μείωση τους σε Swiss 3T3 ινοβλάστες (**Εικόνα 3.1.6**) μετά από σύντομη επίδραση, ενισχύοντας περαιτέρω τα συμπεράσματα μας ότι η παρατηρούμενη ενεργοποίηση της Vav2 από τον TGF-β σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA.

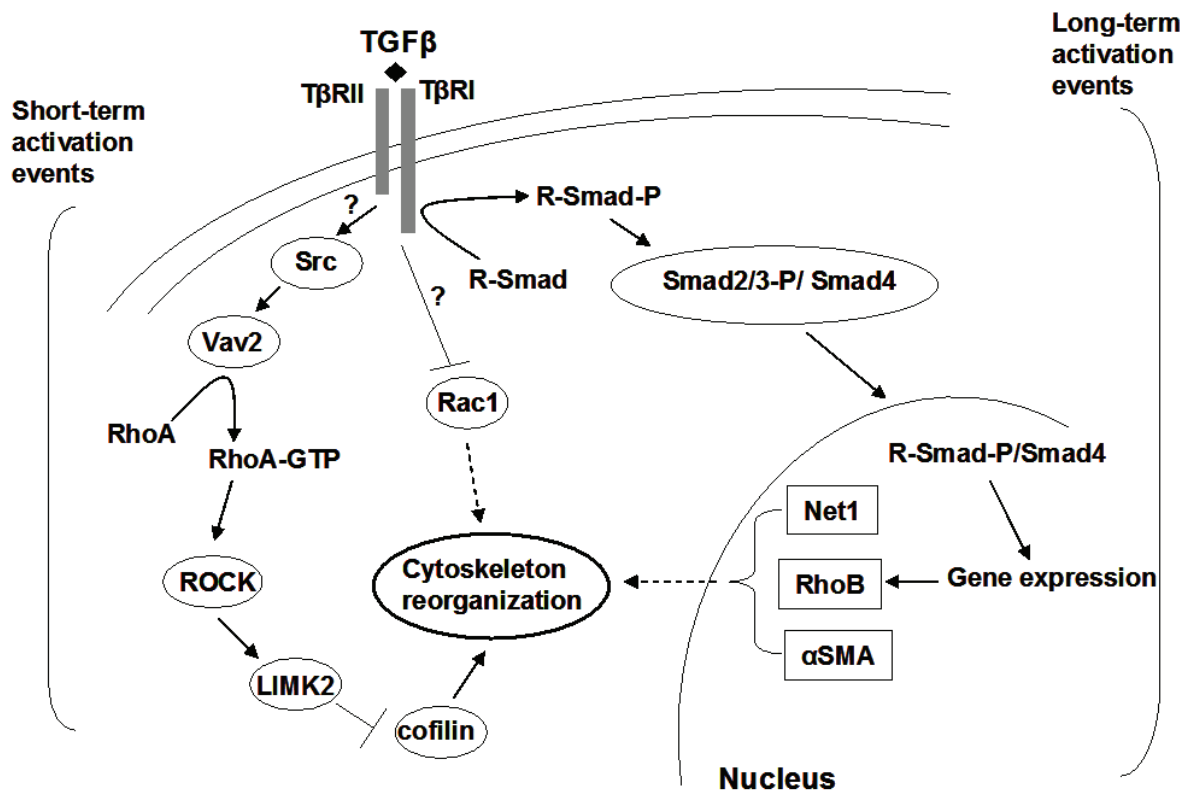
Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι ο TGF-β ενεργοποιεί τη RhoA μέσω της Vav2 GEF με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τη Src κινάση. Ενώ επιβεβαιώθηκε η εξάρτηση της TGF-β επαγόμενης ενεργοποίησης της RhoA από τη Src κινάση (ή κάποια από τις Fyn, Lck, Hck), η αναγκαιότητα της Src κινάσης για την ενεργοποίηση της Vav2 δεν έχει διερευνηθεί και παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα. Επίσης, ο μηχανισμός της ενεργοποίησης της Src κινάσης παραμένει ασαφής, καθότι δεν έχει διερευνηθεί ο ρόλος των TβRI και TβRII στην ενεργοποίηση αυτή. Παράλληλα, δεν έχει μελετηθεί αν η ενεργοποίηση της Vav2 πραγματοποιείται καθοδικά της Src κινάσης ή απευθείας από κάποιον από τους δύο υποδοχείς. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η Src κινάση στρατολογείται από τις β3 ιντεγκρίνες στην περιοχή του TβRII υποδοχέα, τον οποίο και φωσφορυλιώνει σε κατάλοιπο τυροσίνης, δημιουργώντας θέσεις αγκυροβόλησης για τις adaptor πρωτεΐνες Grb2 και Shc [120,284]. Η Vav2 GEF και οι συγγενείς πρωτεΐνες Vav1 και Vav3, είναι από τις λίγες GEF της Dbl οικογένειας που διαθέτουν SH2 και PTB ρυθμιστικές περιοχές και επομένως μπορούν να προσδεθούν σε κατάλοιπα φωσφορυλιωμένων τυροσινών [14,18]. Βάσει αυτού, η Vav2 θα μπορούσε να προσδένεται απευθείας στο κατάλοιπο τυροσίνης του TβRII που φωσφορυλιώνεται από τη Src ή σε άλλα κατάλοιπα τυροσίνης που προέρχονται από αυτοφωσφορυλίωση του TβRII και είτε να φωσφορυλιώνεται από τον ίδιο τον υποδοχέα (δεδομένου ότι έχει μικρή καταλυτική δραστικότητα κινάσης τυροσίνης), είτε από την ίδια τη Src κινάση. Η πιθανότητα η Vav2 να στρατολογείται σε κατάλοιπα φωσφοτυροσίνης στον TβRI δε μπορεί να αποκλειστεί καθότι ύπαρξη τέτοιων καταλοίπων έχει αναφερθεί και για τον TβRI [118], η φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση όμως της Vav2 μάλλον δε μπορεί να εξαρτάται από την κινάση του TβRI δεδομένου, ότι τα πειράματα με τον αναστολέα του TβRI, SB431542 έδειξαν, ότι η ταχεία ενεργοποίηση της RhoA δεν εξαρτάται από την κινάση του TβRI.

Τέλος, η Vav2 έχει παραδοσιακά εμπλακεί στο μονοπάτι του υποδοχέα κινάσης τυροσίνης EGFR, όπου ενεργοποιεί κατά κανόνα τη Rac1 [285-287]. Προς αυτήν την κατεύθυνση μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο TGF-β ενεργοποιεί τη Rac1 GTPάση σε καρκινικά κύτταρα μαστού που υπερεκφράζουν το ογκογονίδιο HER2 έμμεσα με ένα μηχανισμό που περιλαμβάνει τη στρατολόγηση των HER2 υποδοχέων και τη Vav2 GEF [259].

4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη δε διερευνήθηκε η εμπλοκή των υποδοχέων του EGF στην ενεργοποίηση της RhoA και η πιθανότητα η Vav2 GEF να ενεργοποιείται έμμεσα μέσω των EGFR υποδοχέων αποτελεί ένα ενδιαφέρον ερώτημα προς διερεύνηση.

Τα παραπάνω ευρήματα σχετικά με τη ρύθμιση της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF- β συνοψίζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Εικόνα 4.1: Μοντέλο που συνοψίζει τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τη ρύθμιση της γρήγορης ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF- β . Παρουσιάζεται επίσης η ρύθμιση των RhoA/RhoB και του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω της Smad εξαρτώμενης μεταγραφής μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β .

4.2 Μελέτη της ρύθμισης των ισομορφών της Net1 GEF, Net1 και Net1A, από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα

Ο TGF-β έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τόσο τη γρήγορη όσο και τη μακροχρόνια αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διάφορα κυτταρικά συστήματα [81,136,139,192]. Είναι πλέον αποδεκτό, ότι η μεταγραφική ρύθμιση από τον TGF-β εμπλέκεται στη μακροχρόνια αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και προς αυτή την κατεύθυνση έχει βρεθεί ότι ο TGF-β επάγει ένα σύνολο γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως η α-λεία μυϊκή ακτίνη (α-SMA), η RhoB, καθώς και μία ειδική GEF για τη RhoA, η Net1 [138,185,192-194].

Η Net1 (Neuroepithelioma transforming gene-1) είναι η μοναδική GEF με ειδικότητα για τη RhoA που έχει αναφερθεί ότι επάγεται από τον TGF-β και προκαλεί τη δημιουργία ινιδίων του στρες [193] και επομένως εμπλέκεται στην καθυστερημένη ενεργοποίηση της RhoA, η οποία εξαρτάται από τη μεταγραφή. Αρκετά πρόσφατα και αφότου ξεκίνησε η μελέτη της Net1 GEF, αναφέρθηκε και μία δεύτερη GEF με ειδικότητα για τη RhoA, η οποία επάγεται από τον TGF-β, η GEF-H1 [288]. Η Net1 GEF αναγνωρίστηκε ως ένας νέος μεταγραφικός στόχος του TGF-β σε μία μελέτη με μικροσυστοιχίες που είχε ως στόχο τον εντοπισμό νέων γονιδίων που σχετίζονται με την επαγόμενη από τον TGF-β αλλαγή της κυτταρικής μορφολογίας. Στη μελέτη αυτή δείχθηκε ότι ο TGF-β επάγει τη Net1 GEF σε κερατινοκύτταρα (HaCaT) και σε καρκινικά κύτταρα πνεύμονα (A549), καθώς και στους ινοβλάστες Swiss 3T3 και BJ μετά από 1-2 ώρες επίδρασης [193].

Η Net1 αποτελείται από δύο ισομορφές, τη Net1 και τη Net1A, η οποία δε διαθέτει τα 85 πρώτα αμινοξέα της Net1 και σε αντίθεση περιέχει ένα διαφορετικό τμήμα 31 αμινοξέων, αλλά διαθέτει την ίδια ικανότητα με τη Net1 ως προς την ενεργοποίηση της RhoA [28]. Οι περισσότερες μελέτες ασχολήθηκαν με το βιοχημικό χαρακτηρισμό των δομικών περιοχών της Net1 με πειράματα υπερέκφρασης της wt Net1 και κομμένων μορφών της [28,29]. Πολύ πρόσφατα αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία η μελέτη της ενδογενούς πρωτεΐνης σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7 και σε κύτταρα επιβλάστης από έμβρυο κοτόπουλου [198,205]. Παρόλα αυτά καμία από τις παραπάνω εργασίες δε διαχώρισε τη μελέτη των δύο ισομορφών σε ενδογενές επίπεδο. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η ρύθμιση και των δύο ισομορφών της Net1 από τον TGF-β σε HaCaT κερατινοκύτταρα. Η επιλογή του κυτταρικού συστήματος βασίστηκε στο ότι ήταν ήδη γνωστό από προηγούμενη εργασία ότι η Net1 επάγεται από τον TGF-β στα κύτταρα αυτά, αλλά και λόγω του ότι τα HaCaT κερατινοκύτταρα αποτελούν ένα καλό μοντέλο για τη μελέτη των TGF-β εξαρτώμενων κυτταρικών αποκρίσεων.

Αρχικά μελετήθηκε η επαγωγή της έκφρασης των ισομορφών Net1 και Net1A από τον TGF-β με ποσοτική RT-PCR (qRT-PCR) σε διάφορα χρονικά διαστήματα και βρέθηκε ότι η Net1A ισομορφή και όχι η Net1 επάγεται από τον TGF-β. Τα επίπεδα του mRNA της Net1A ισομορφής αυξήθηκαν μετά από 1 ώρα και κορυφώθηκαν μετά από 3 ώρες επίδρασης, ενώ

διατηρήθηκαν σε σχετικά υψηλά επίπεδα μέχρι και τις 48 ώρες (**Εικόνα 3.2.1A**). Αντίθετα τα επίπεδα mRNA της Net1 ισομορφής παρέμειναν σταθερά στην αρχική φάση, αλλά μετά από 12 ώρες επίδρασης μειώθηκαν σημαντικά και σχεδόν εξαλείφθηκαν στις 48 ώρες. Η επιλεκτική αύξηση των επιπέδων της Net1A έναντι της Net1 ισομορφής από τον TGF- β επιβεβαιώθηκε και σε πρωτεϊνικό επίπεδο χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και τις δύο ισομορφές (**Εικόνα 3.2.1B**). Επίσης επιβεβαιώθηκε η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1 ισομορφής μετά από 12 ώρες και η εξαφάνιση της μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF- β , γεγονός το οποίο ήταν σε πλήρη συμφωνία με τα mRNA επίπεδα της. Παρατηρήθηκε όμως ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1A ισομορφής μετά από 12 ώρες επίδρασης με TGF- β άρχισαν να μειώνονται και εξαφανίστηκαν πλήρως μέχρι τις 48 ώρες, κάτι το οποίο δεν συνάδει με τα αυξημένα επίπεδα mRNA που παρατηρούνται μετά από 12-48 ώρες επίδρασης με TGF- β .

Πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η Net1 έχει μικρό χρόνο ημίσειας ζωής [198] επομένως ο TGF- β θα μπορούσε να επάγει την αύξηση των mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A είτε μέσω σταθεροποίησης των mRNA και πρωτεϊνικών μορίων είτε μέσω μεταγραφικής ρύθμισης του γονιδίου. Για να διερευνηθεί το ερώτημα αν η αύξηση των επιπέδων της Net1A από τον TGF- β οφείλεται σε μεταγραφική ρύθμιση, χρησιμοποιήθηκε ο γενικός αναστολέας της μεταγραφής, ακτινομυκίνη. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν, ότι η επαγωγή της Net1A από τον TGF- β εξαρτάται από τη μεταγραφή (**Εικόνα 3.2.3A**). Παράλληλα διερευνήθηκε το ενδεχόμενο ο TGF- β να ρυθμίζει έμμεσα την επαγωγή της έκφρασης της Net1A μέσω της εκ νέου σύνθεσης πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια συμμετέχουν στη μεταγραφική της ενεργοποίηση και με τη χρήση του αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξαμίδιο δείχθηκε, ότι η επαγωγή της έκφρασης της Net1A από τον TGF- β είναι άμεση και δε χρειάζεται τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από παρόμοια πειράματα για τη ρύθμιση της RhoB από τον TGF- β , η οποία επίσης αποτελεί μία πρωτεΐνη με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής [194].

Στη συνέχεια μελετήθηκε ο ρόλος του Smad μονοπατιού στην επαγωγή της έκφρασης της Net1A ισομορφής από τον TGF- β και μετά από πειράματα αποσιώπησης με ειδικά siRNA που αναγνωρίζουν επιλεκτικά τη Smad2 ή τη Smad3 βρέθηκε ότι η Smad3 – και σε μικρότερο βαθμό η Smad2 – παίζει ρόλο στην έκφραση της Net1A από τον TGF- β (**Εικόνα 3.2.4A**). Σε παρόμοιο συμπέρασμα κατέληξαν και πειράματα υπερέκφρασης των Smad2 και Smad3 με χρήση αδενοϊών (**Εικόνα 3.2.4C**). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η αποσιώπηση της Smad3 προκάλεσε πλήρη αναστολή της αύξησης των επιπέδων της Net1A από τον TGF- β , ενώ η αποσιώπηση της Smad2 δεν είχε ουσιαστικό αποτέλεσμα (**Εικόνα 3.2.4B**). Επίσης, η υπερέκφραση των Smad2 και Smad3 απουσία διέγερσης με TGF- β δεν προκάλεσε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A (**Εικόνα 3.2.4D**), ενώ αύξησε σημαντικά τα mRNA επίπεδα της, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια εκτός από τις

Smad πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματική μετάφραση του mRNA της Net1A ή στη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης.

Ο TGF- β ενεργοποιεί εκτός από το κλασσικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία δεν εξαρτώνται από τις Smad πρωτεΐνες και πολλά από αυτά δρουν συνεργατικά με αυτές, όπως είναι τα μονοπάτια των MAPK κινασών, ERK, JNK, p38, το μονοπάτι της PI3K και τα μονοπάτια καθοδικά των Rho GTPασών, όπως των ROCK και PAK κινασών [113,114]. Για το λόγο αυτό, διερευνήθηκε με τη χρήση διαφόρων αναστολέων το ενδεχόμενο η επαγωγή της Net1A από τον TGF- β να ρυθμίζεται από επιπρόσθετα σηματοδοτικά μονοπάτια εκτός από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε, ότι εκτός από τον αναστολέα του ALK5, SB431542, ο οποίος μπλόκαρε πλήρως την επαγωγή της Net1A από τον TGF- β , ο αναστολέας της MEK κινάσης UO126 προκάλεσε την πιο έντονη μείωση στα επίπεδα mRNA της Net1A, ενώ η αναστολή των JNK, ROCK και PI3K κινασών προκάλεσε μικρό έως αμελητέο ανασταλτικό αποτέλεσμα (**Εικόνα 3.2.5**). Σε πρωτεϊνικό επίπεδο ο αναστολέας της MEK κινάσης ελάττωσε την αύξηση των επιπέδων της Net1A από τον TGF- β , ενώ ο αναστολέας του ALK5 οδήγησε σε πλήρη καταστολή της (**Εικόνα 3.2.7B**). Τα δύο αυτά μονοπάτια φαίνεται να ρυθμίζουν και τη μακρόχρονη αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A μετά από επίδραση με TGF- β για 24 ώρες, καθώς και οι δύο αναστολείς μπλόκαραν την επαγωγή της Net1A από τον TGF- β , ενώ παράλληλα αντέστρεψαν σε αρκετό βαθμό τη μείωση των επιπέδων της Net1 από τον TGF- β (**Εικόνα 3.2.8**).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι στην επαγωγή της Net1A από τον TGF- β εκτός από το μονοπάτι των Smad συμμετέχει το μονοπάτι της ERK MAPK κινάσης. Η σχέση των δύο αυτών μονοπατιών δεν διερευνήθηκε περαιτέρω και έτσι δεν είναι γνωστό εάν τα μονοπάτια αυτά είναι στον ίδιο βαθμό απαραίτητα για την επαγωγή της Net1A από τον TGF- β ή εάν το ένα ρυθμίζει το άλλο και με ποιο τρόπο, αν και το πιθανότερο είναι ότι πρόκειται για ανεξάρτητα μονοπάτια που συγκλίνουν στο επίπεδο της μεταγραφής. Το γεγονός, ότι πλήρης καταστολή της επαγωγής της Net1A παρατηρήθηκε μόνο με τη χρήση του αναστολέα της κινάσης του ALK5 ή την αποσιώπηση της Smad3, ενώ με τον αναστολέα της MEK παρατηρήθηκε σημαντικός περιορισμός της επαγωγής της Net1A, αλλά όχι πλήρης καταστολή του φαινομένου, υποδηλώνει ότι το μονοπάτι των Smad έχει ένα σημαντικό ρόλο, ενώ το μονοπάτι της ERK έχει μάλλον ένα βοηθητικό ή ενισχυτικό ρόλο.

Η εμπλοκή του μονοπατιού της ERK στη μεταγραφή που ρυθμίζεται από τον TGF- β έχει αναφερθεί για ένα σύνολο γονιδίων μεταξύ των οποίων το γονίδιο της *RhoB* [194] που σχετίζεται με τις Rho GTPάσες και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Επίσης, το μονοπάτι της ERK θεωρείται ότι συνεργάζεται με τις Smad κατά την επιθηλιομεσεγγυματική μετατροπή που προκαλείται από τον TGF- β . Η σηματοδότηση μέσω της ERK έχει δειχθεί ότι είναι απαραίτητη για τη διάλυση των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης καθώς και για την επαγωγή της

κινητικότητας των κυττάρων από τον TGF- β , μέσω ρύθμισης γονιδίων στόχων τα οποία σχετίζονται με την κινητικότητα και την προσκόλληση στην εξωκυττάρια [289,290].

Στη συνέχεια διερευνήθηκε η υπόθεση αν η επιλεκτική αύξηση των επιπέδων της ισομορφής Net1A έναντι της Net1 από τον TGF- β οφείλεται σε ενεργοποίηση κάποιου μοναδικού υποκινητή ή σε κάποιο μετα-μεταγραφικό γεγονός που ρυθμίζεται από τον TGF- β . Το mRNA της Net1A ισομορφής περιέχει μία μοναδική περιοχή που είναι τμήμα του ιντρονίου 3 του γονιδίου της Net1 αντί των 3 πρώτων εξωνίων που βρίσκονται στο mRNA της ισομορφής Net1. Υποθέσαμε ότι ένας ενεργός υποκινητής μπορεί να βρίσκεται σε αυτή την ιντρονική περιοχή 5' ως προς το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1) του mRNA της Net1A. Αφού κλωνοποιήθηκε ένα τμήμα του υποκινητή της Net1 και ένα τμήμα του ιντρονίου 3 που περιέχει τον υποθετικό υποκινητή της Net1A, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μέτρησης της ενεργότητας λουσιφεράσης στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε, ότι η υπερέκφραση της συνεχώς ενεργής μορφής του υποδοχέα τύπου I του TGF- β , ALK5-ca, ενίσχυσε την ενεργότητα της περιοχής -909/+57 του υποκινητή του γονιδίου της Net1, ενώ η υπερέκφραση των Smad2/Smad4 και Smad3/Smad4 την ενίσχυσε σε μικρότερο βαθμό (**Εικόνα 3.2.9B**), υποδεικνύοντας ότι και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες επιστρατεύονται από το μονοπάτι του TGF- β για την πλήρη ενεργοποίηση του υποκινητή. Αντίθετα, η υπερέκφραση των Smad2/Smad4, Smad3/Smad4 και ALK5-ca δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργότητα της περιοχής -926/+126 του υποθετικού υποκινητή της Net1A (**Εικόνα 3.2.9C**). Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν, ότι ο TGF- β χρησιμοποιεί τον κανονικό υποκινητή του γονιδίου της Net1 για την επαγωγή της Net1A ισομορφής και η επιλεκτική επαγωγή της από τον TGF- β φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος.

Από μία *in silico* ανάλυση του υποκινητή της Net1 (1000 βάσεις 5' ανοδικά από το σημείο έναρξης της μεταγραφής) και του ιντρονίου 3 (2000 βάσεις 5' ανοδικά του +1 του mRNA της Net1A) για πιθανές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων με τη βοήθεια του προγράμματος **MatInspector** της εταιρείας Genomatix, βρέθηκε, ότι ο υποκινητής της Net1 περιέχει μεταξύ άλλων μία θέση πρόσδεσης για τη Smad4, 2 θέσεις πρόσδεσης για τον παράγοντα LEF/TCF και 2 για τον NFY. Στην ιντρονική περιοχή εντοπίστηκαν αρκετές θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των οποίων 2 θέσεις πρόσδεσης για τον LEF/TCF, 2 για τον AP-1, αλλά καμία για τις Smad. Παρότι τα παραπάνω αποτελέσματα συνηγορούν στο ότι ο TGF- β ρυθμίζει την επιλεκτική επαγωγή της Net1A σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, ελέγχοντας πιθανώς το εναλλακτικό μάτισμα και όχι κάποιο άλλο υποκινητή, δε μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η περιοχή του ιντρονίου 3 που αποκρίνεται στον TGF- β να βρίσκεται στις 1000 βάσεις από τις 2000 που δεν κλωνοποιήθηκαν, αν και η πιθανότητα για κάτι τέτοιο είναι πολύ μικρή.

Η επιλεκτική ρύθμιση μίας ισομορφής έναντι μίας άλλης συνιστά μία δράση του TGF- β , η οποία δεν έχει μελετηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία. Ο TGF- β έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά την ισομορφή της Vav3, Vav3.1 και όχι τη Vav3 [275], ελέγχει το εναλλακτικό

μάτισμα της SZP πρωτεΐνης (Superficial Zone Protein) [291], προάγει την ισομορφή της Fibronectin που περιέχει το εξώνιο EDB (extra domain B) έναντι του εξωνίου EDA κατά την ωρίμανση χονδροκυττάρων [292], ενισχύει επιλεκτικά τις ισομορφές του AT1R υποδοχέα που περιέχουν το εξώνιο 2 [293], επάγει διαφορετικές ισομορφές του μεταγραφικού παράγοντα LEF/TCF με ένα Smad-ανεξάρτητο μηχανισμό στα Mv1Lu κύτταρα [294] και προάγει την ισομορφή IIA του προκολλαγόνου, σε αντίθεση με τον BMP-2 που επάγει την ισομορφή IIB [295]. Επίσης μία πολύ πρόσφατη μελέτη έκανε λόγο για την επιλεκτική αλλαγή των ισομορφών του FGFR κατά την EMT που επάγεται από τον TGF- β , προάγοντας την έκφραση της ισομορφής FGFR1IIIc έναντι της FGFR2IIIb, καθιστώντας τα κύτταρα ευαίσθητα στον FGF-2 και όχι στον FGF-7 [296]. Καμία από αυτές τις εργασίες δε μελέτησε το μοριακό μηχανισμό μέσω του οποίου ο TGF- β ρυθμίζει την επιλεκτική επαγωγή ή καταστολή των διαφόρων ισομορφών. Μία πρόσφατη μελέτη αναγνώρισε τις πρωτεΐνες που προσδένουν RNA, ESRP1 και ESRP2, ως ρυθμιστές του εναλλακτικού ματίσματος του FGFR2 στα επιθηλιακά κύτταρα [297], αλλά κατά πόσο αυτές οι πρωτεΐνες εμπλέκονται στην TGF- β επαγόμενη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος παραμένει άγνωστο. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο TGF- β επάγει την έκφραση του παράγοντα εναλλακτικού ματίσματος SRp40 σε χονδροκύτταρα, ο οποίος πιθανώς να σχετίζεται με τη ρύθμιση των ισομορφών της Fibronectin από τον TGF- β κατά τη χονδρογένεση [292].

Έχει αναφερθεί ότι ο NGF ρυθμίζεται στο ποντίκι από τουλάχιστον δύο διαφορετικούς υποκινητές, οι οποίοι βρίσκονται ανοδικά των εξωνίων 1 και 3 αντίστοιχα και ελέγχουν τη σύνθεση τεσσάρων ισομορφών, A-D. Ο TGF- β επάγει την επιλεκτική έκφραση των ισομορφών A, B και D σε γλοία ποντικού, ενώ επάγει την ισομορφή C σε γλοία αρουραίου, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν διαφορετικές περιοχές στους υποκινητές του NGF που αποκρίνονται στον TGF- β μεταξύ του ποντικού και του αρουραίου [298]. Η μελέτη αυτή αποτελεί μία ίσως μοναδική αναφορά ότι ο TGF- β ρυθμίζει τις διαφορετικές ισομορφές ενός γονιδίου χρησιμοποιώντας διαφορετικούς υποκινητές.

4.3 Η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF- β

Η Net1 GEF ανήκει σε μία ιδιαίτερη κατηγορία GEF πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζονται με υποκυτταρικό εντοπισμό [29]. Σε αντίθεση με τις περισσότερες GEF πρωτεΐνες της Dbp οικογένειας, οι οποίες ρυθμίζονται με φωσφορυλίωση ή αλληλεπίδραση με ρυθμιστικές πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την άρση μιας αυτοκατασταλτικής διαμόρφωσης, η Net1 GEF εντοπίζεται στον πυρήνα, όπου μετά από κάποιο κατάλληλο σήμα μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα για να συναντήσει το υπόστρωμα της, τη RhoA [28,29]. Η μετατόπιση έστω και μικρής ποσότητας της Net1 στο κυτταρόπλασμα θεωρείται αρκετή για να ενεργοποιήσει τη RhoA, καθότι μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί για τη Net1 η ανάγκη για κάποια μετα-

μεταφραστική τροποποίηση ώστε να ενεργοποιηθεί η δράση της ως GEF [28]. Για το λόγο αυτό διερευνήθηκε ο εντοπισμός των Net1 και Net1A ισομορφών μετά από επίδραση με TGF-β για 3 ώρες και παρατηρήθηκε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα, ενώ τα επίπεδα της Net1 δε μεταβλήθηκαν και στα δύο κλάσματα (**Εικόνα 3.3.1**). Αυτή η αύξηση των επιπέδων της Net1A στο κυτταρόπλασμα συσχετίστηκε ακολούθως με την αύξηση των ενεργών επιπέδων της RhoA μετά από 6 ώρες επίδρασης με TGF-β, καθότι η αποσιώπηση της Net1A, αλλά όχι της Net1, με ειδικά για κάθε ισομορφή siRNA μπλόκαρε την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β (**Εικόνα 3.3.3B**). Επομένως συμπεραίνουμε από τα παραπάνω, ότι η αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της Net1A οδηγεί στην ενεργοποίηση της RhoA που επάγεται από τον TGF-β. Το αποτέλεσμα αυτό βρίσκεται σε πλήρη συμφωνία με μία πολύ πρόσφατη μελέτη, η οποία επίσης έδειξε ότι η ενεργοποίηση της RhoA που παρατηρείται από τα 30 λεπτά μέχρι και μετά από 6 ώρες επίδρασης με TGF-β σε επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς ARPE-19 εξαρτάται από την αύξηση των επιπέδων της Net1 [206].

4.4 Μελέτη της ρύθμισης της ισομορφής Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β

Τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1A μετά από μία αρχική αύξηση (μετά από 3-12 ώρες) επέστρεψαν στα βασικά επίπεδα στις 24 ώρες, ενώ ελαττώθηκαν σημαντικά μετά από 48 ώρες επίδρασης με TGF-β, σε αντίθεση με τα mRNA επίπεδα που εξακολούθησαν να είναι υψηλά (**Εικόνα 3.2.1A**). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν την ύπαρξη ενός μηχανισμού αρνητικής ρύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A μετά από 24 ώρες επίδρασης με TGF-β, για το λόγο αυτό διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή του μηχανισμού του πρωτεοσώματος στην στόχευση της Net1A για αποικοδόμηση μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β. Προηγούμενη μελέτη σε MCF7 καρκινικά κύτταρα μαστού έδειξε, ότι η Net1 πρωτεΐνη είναι μία ιδιαίτερα ασταθής πρωτεΐνη με μικρό χρόνο ημίσειας ζωής και επιρρεπής στην αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα [198]. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι τόσο η Net1, όσο και η Net1A έχουν επίσης μικρό χρόνο ημίσειας ζωής (λιγότερο από 30 λεπτά) στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τον αναστολέα του πρωτεοσώματος MG132 με σκοπό να μελετηθεί η εμπλοκή του πρωτεοσώματος στη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β. Η επώαση των κυττάρων με τον MG132 είχε σαν αποτέλεσμα την αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A τόσο απουσία όσο και παρουσία TGF-β (**Εικόνα 3.4.1B**). Η αύξηση των επιπέδων της Net1A από τον MG132 αναστολέα απουσία TGF-β, επισημαίνει το γεγονός ότι τα βασικά επίπεδα της Net1A στοχεύονται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα. Μάλιστα η επώαση με TGF-β για 24 ώρες οδήγησε σε ακόμη μεγαλύτερη αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A, εύρημα το οποίο συνάδει με τα αυξημένα επίπεδα mRNA της Net1A μετά από 24 ώρες

επίδρασης με TGF-β. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός, ότι ο TGF-β απέτυχε να σταθεροποιήσει τα ιδιαίτερα ασθενή πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1 ισομορφής παρουσία του αναστολέα του πρωτεοσώματος (**Εικόνα 3.4.1B και C κατώτερα blots**), τα οποία όμως φαίνεται να σταθεροποιούνται παρουσία του αναστολέα στο δείγμα ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι τα βασικά επίπεδα της Net1 – όπως και της Net1A – στοχεύονται για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα. Το συμπέρασμα που προκύπτει από αυτήν την παρατήρηση υποστηρίζει το προηγούμενο εύρημα, ότι ο TGF-β ρυθμίζει τα επίπεδα της Net1 σε mRNA επίπεδο (**Εικόνα 3.2.1**) όπου μετά από 24 ώρες επίδρασης έχει προκαλέσει πολύ μεγάλη μείωση στο mRNA της Net1 ισομορφής.

Η αποικοδόμηση πρωτεϊνών από τα 26S πρωτεοσώματα μέσω των E3 λιγασών ουμπικουτίνης είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο φαινόμενο στο μονοπάτι του TGF-β και αφορά σε ένα μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης, τόσο χρονικά όσο και τοπικά, πρωτεϊνών που μεσολαβούν δράσεις του TGF-β. Για παράδειγμα οι ίδιοι βασικοί τελεστές του TGF-β μονοπατιού, Smad2, Smad3 και Smad4, καθώς και οι υποδοχείς του TGFβ, TβRI/TβRII και η ανασταλτική Smad7, στοχεύονται από E3 λιγάσες ουμπικουτίνης, όπως οι Smurf1/2, SCF/Roc1, Arcadia, Nedd4-2 και WWP1 [101-104,299]. Επίσης, η αποικοδόμηση των μεταγραφικών καταστολέων c-Ski και SnoN θεωρείται απαραίτητη για την ενεργοποίηση του TGF-β μονοπατιού και επιτελείται από τις E3 λιγάσες Arcadia, APC (Anaphase Promoting Complex) και Smurf2 [299-302]. Εκτός από την αποικοδόμηση των ίδιων των βασικών συστατικών του TGF-β μονοπατιού στα πλαίσια ενός αρνητικού μηχανισμού αυτορύθμισης ή των μεταγραφικών καταστολέων που ανταγωνίζονται τη δράση των Smad πρωτεϊνών, έχει αναφερθεί η τοπικά περιορισμένη στόχευση της RhoA για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα μέσω της Smurf1 στα πλαίσια της αποσταθεροποίησης των στενοσυνδέσμων (tight junctions) που προκαλείται από τον TGF-β κατά την EMT [65]. Η στόχευση της Net1A από το πρωτεόσωμα μετά από παρατεταμένη επίδραση με TGF-β θα μπορούσε να εξυπηρετεί μία παρόμοια δράση με αυτή της στόχευσης της RhoA από τη Smurf1, δεδομένου ότι η Net1 είναι ένας ενεργοποιητής της RhoA, όμως οι E3 λιγάσες που εμπλέκονται στη στόχευση για αποικοδόμηση της Net1A δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστές και η αναγνώρισή τους είναι ένα ανοιχτό ζήτημα.

Εκτός από τη στόχευση της RhoA για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα κατά την επαγόμενη από τον TGF-β EMT στα επιθηλιακά κύτταρα μαστού NMuMG [65], πρόσφατα μία δεύτερη μελέτη παρουσίασε ένα δεύτερο μηχανισμό αρνητικής ρύθμισης της RhoA κατά την EMT που προκαλείται από τον TGF-β στα NMuMG κύτταρα, ο οποίος περιλαμβάνει τη στόχευση της από το microRNA, miR-155 [183]. Με βάση το εύρημα ότι η Net1A ρυθμίζεται αρνητικά σε πρωτεϊνικό επίπεδο αποτελώντας στόχο για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα – ενώ η Net1 ρυθμίζεται σε επίπεδο mRNA – διερευνήθηκε η πιθανή εμπλοκή μορίων microRNA στο μηχανισμό της αρνητικής ρύθμισης της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β. Η αρχική προσέγγιση αφορούσε τη διερεύνηση της πιθανότητας το ίδιο microRNA

(miR-155) να στοχεύει στη Net1A στα πλαίσια ενός ρυθμιστικού μηχανισμού που ελέγχει δύο λειτουργικά σχετιζόμενα μόρια τη RhoA και τον ενεργοποιητή της, Net1A, μέσω του ίδιου microRNA. Όπως θα συζητηθεί στη συνέχεια η μείωση των επιπέδων της Net1 έχει επίσης συσχετιστεί με την EMT στη βιβλιογραφία.

Για τον εντοπισμό πιθανών microRNA μορίων τα οποία έχουν περιοχές πρόσδεσης στην 3'UTR περιοχή (3' untranslated region) του mRNA της Net1A – που είναι κοινή και για τη Net1 – πραγματοποιήθηκε υπολογιστική ανάλυση με χρήση των προγραμμάτων **RNA22** και **TargetScan v.5.1**, με αποτέλεσμα να προκύψουν 6 microRNA, τα οποία πιθανά στοχεύουν την 3'UTR περιοχή του mRNA της Net1A (miR-24, miR-155, miR-22, miR-200b, miR-145 and miR-206). Αποτελεί εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός, ότι ανάμεσα σε αυτά τα microRNA βρέθηκε και αυτό που στοχεύει στη RhoA, το miR-155. Τα microRNA miR-24, miR-155 και miR-200b επιλέχθηκαν για περαιτέρω διερεύνηση, με κριτήρια τον αριθμό των περιοχών αλληλεπίδρασης με την 3'UTR περιοχή της Net1A και την ενέργεια της κάθε αλληλεπίδρασης (**Εικόνα 3.4.2**), αλλά και με βάση ήδη υπάρχοντα δεδομένα στη βιβλιογραφία.

Η επίδραση της υπερέκφρασης των επιλεγμένων microRNA ως pre-miRNA στα mRNA και πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1A (και της Net1) έδειξε, ότι το pre-miR-24 (**Εικόνα 3.4.3A και B**) προκάλεσε τη μεγαλύτερη μείωση των mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A σε σχέση με το pre-miR-155 και κυρίως με το pre-miR-200b. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, η περαιτέρω μελέτη εστιάσθηκε στα miR-24 και miR-155. Πειράματα μέτρησης της δραστηριότητας λουσιφεράσης με χρήση ενός πλασμιδίου αναφοράς, το οποίο περιέχει την 3'UTR του mRNA της Net1A 3' ως προς το γονίδιο της λουσιφεράσης, έδειξαν, ότι η υπερέκφραση του pre-miR-24 προκάλεσε σημαντική μείωση της ενεργότητας της λουσιφεράσης, ενώ η υπερέκφραση του pre-miR-155 προκάλεσε μία μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική μείωση (**Εικόνα 3.4.3C**), υποδηλώνοντας ότι η 3' UTR περιοχή του mRNA της Net1A αποτελεί άμεσο στόχο των miR-24 και miR-155. Στη συνέχεια δείχθηκε, ότι το miR-24 και το miR-155 αποτελούν στόχο του TGF-β/Smad σηματοδοτικού μηχανισμού καθότι βρέθηκε ότι και τα δύο microRNA επάγονται από τον TGF-β μετά από 12-24 ώρες επίδρασης (**Εικόνα 3.4.4A**). Μία λεπτομερέστερη μελέτη του ρόλου των Smad2 και Smad3 στην επαγωγή των miR-24 και miR-155 από τον TGF-β, μετά από πειράματα υπερέκφρασης των Smad2 και Smad3 με χρήση αδενοϊών, έδειξε, ότι η Smad3 – και σε μικρότερο βαθμό η Smad2 – παίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή των miR-24 και miR-155 από τον TGF-β (**Εικόνα 3.4.4B**).

Ο μηχανισμός της επαγωγής των miR-24 και miR-155 από τον TGF-β στα HaCaT κερατινοκύτταρα παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα. Αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρον να αποσαφηνιστεί αν η αύξηση των επιπέδων των miR-24 και miR-155 από τον TGF-β οφείλεται σε μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή των γονιδίων τους ή αν πρόκειται για ένα μετα-μεταγραφικό γεγονός. Για παράδειγμα, ο TGF-β έχει αναφερθεί ότι επάγει το miR-21 ρυθμίζοντας όχι τη μεταγραφή του pri-miR-21, αλλά την ωρίμανση του pri-miR-21 σε pre-miR-

21. Στο μηχανισμό αυτό εμπλέκονται οι R-Smads – ενώ είναι ανεξάρτητος της Smad4 – οι οποίες αλληλεπιδρούν με την p68 RNA ελικάση του συμπλόκου επεξεργασίας των pri-miRNAs (microprocessing complex) DROSHA, με αποτέλεσμα να προωθούν την επεξεργασία και ωρίμανση συγκεκριμένων pri-miRNA σε pre-miRNA, τα οποία στη συνέχεια θα μεταφερθούν από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, όπου θα μετατραπούν σε δίκλινα ~22 νουκλεοτιδίων ώριμα microRNA από το σύμπλοκο DICER [303]. Η επαγωγή του miR-155 όμως από τον TGF-β στα NMuMG κύτταρα ποντικού έχει αναφερθεί ότι εξαρτάται από τη Smad4 και οφείλεται σε μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου του pri-miR-155, όπου έχουν εντοπιστεί και δύο περιοχές πρόσδεσης των Smad [183]. Επομένως μέχρι σήμερα στην επαγωγή ενός miRNA από τον TGF-β έχουν αναφερθεί μηχανισμοί ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου του pri-miRNA, αλλά και μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί ελέγχου της ωρίμανσης του pri-miRNA σε pre-miRNA.

Τα microRNA ρυθμίζουν αρνητικά τα mRNA στόχους τους μέσω αλληλεπιδράσεων ζευγαρώματος βάσεων, οι οποίες οδηγούν είτε στην αποικοδόμηση του mRNA είτε στην καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του, ανάλογα με το βαθμό ταιριάσματος (matching) μεταξύ της seed αλληλουχίας του miRNA (θέσεις 2 έως 7 από το 5' άκρο) και της 3' UTR του mRNA στόχου. Για παράδειγμα ένα miRNA προκαλεί αποικοδόμηση του mRNA όταν η seed αλληλουχία του ταιριάζει τέλεια με το στόχο της στην 3'UTR, ενώ προκαλεί αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης όταν οι αλληλουχίες είναι μερικώς ταυτόσημες [183,304,305]. Κατά συνέπεια, η ρύθμιση από τα miRNA παρέχει ένα μέσο για τα κύτταρα ώστε να αποτρέψουν γρήγορα τη συσσώρευση πρωτεϊνών μέσω αναστολής της μετάφρασης του mRNA τους. Η αύξηση επομένως των επιπέδων του miR-24 από τον TGF-β (και του miR-155, το οποίο δε μελετήθηκε περαιτέρω) αποτελεί έναν πιθανό επιπρόσθετο μηχανισμό μείωσης των επιπέδων της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β πέραν της συμμετοχής του πρωτεοσώματος. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα που δείχνουν, ότι αναστολή του miR-24 παρουσία TGF-β για 24 ώρες οδήγησε σε μία μικρή αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A σε σχέση με τα επίπεδα της μετά από διέγερση μόνο με TGF-β, ενώ η αναστολή του πρωτεοσώματος προκάλεσε μία συγκριτικά πολύ μεγαλύτερη αύξηση της Net1A πρωτεΐνης, η οποία όμως δεν ενισχύθηκε περαιτέρω όταν συνδυάστηκε ο αναστολέας του miR-24, as-miR-24, με τον αναστολέα του πρωτεοσώματος, MG132 (**Εικόνα 3.4.5A**).

Οι δύο αυτοί μηχανισμοί αποδείχθηκε πολύ δύσκολο να διαχωριστούν μεταξύ τους, διότι για παράδειγμα, όταν αποσιωπείται το miR-24 και ενδεχομένως αποκαθίσταται ένα μέρος του μεταφραζόμενου mRNA της Net1A στο οποίο στοχεύει το miR-24, το πρωτεόσωμα είναι ενεργό και πιθανώς οδηγεί αυτό το πρόσφατα μεταφρασμένο κλάσμα για αποικοδόμηση εμποδίζοντας να φανεί το καθαρό αποτέλεσμα της αύξησης των πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A λόγω αναστολής του miR-24. Επίσης η αναστολή του miR-24 αφήνει ανέπαφο το miR-155 το οποίο επίσης φαίνεται να ρυθμίζεται θετικά από τον TGF-β εμποδίζοντας και αυτό ένα

μέρος του mRNA της Net1A να μεταφραστεί. Από την άλλη, η αναστολή του πρωτεοσώματος οδηγεί σε τόσο μεγάλη αύξηση των επιπέδων της Net1A που καθιστά αδύνατη την ανίχνευση της συνεισφοράς της αποσιώπησης του miR-24 στα επίπεδα της Net1A, όταν συνδυάζεται το as-miR-24 με τον MG132 αναστολέα.

Παρόλα αυτά, τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι δύο αυτοί μηχανισμοί δρουν σε διαφορετικά επίπεδα, με το miR-24 να στοχεύει πιθανώς σε ένα μικρό κλάσμα της Net1A εμποδίζοντας τη μετάφραση του mRNA της, ενώ η ουμπικουτινίωση της Net1A οδηγεί σε αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα την ήδη μεταφρασμένη Net1A πρωτεΐνη. Παραμένει αδιευκρίνιστο, αν οι δύο αυτοί μηχανισμοί δρουν ανεξάρτητα σε διαφορετικές περιοχές του κυττάρου ή στην ίδια περιοχή συνεργατικά στοχεύοντας ταυτόχρονα την πρωτεΐνη και το mRNA της. Για παράδειγμα, η Smurf1 E3 λιγάση έχει αναφερθεί ότι οδηγείται στους στενοσύνδεσμους επιθηλιακών κυττάρων ή στο προεκβάλλον άκρο κυττάρων που μεταναστεύουν με σκοπό την τοπικά περιορισμένη στόχευση της RhoA για αποικοδόμηση [65]. Το miR-155 που βρέθηκε επίσης να στοχεύει τη RhoA στα ίδια επιθηλιακά κύτταρα [183] δε διερευνήθηκε αν εντοπίζεται στην ίδια περιοχή των στενοσυνδέσμων ή αν στοχεύει σε ένα άλλο κλάσμα της RhoA σε κάποια άλλη περιοχή του κυττάρου. Παράλληλα, η παρουσία μορίων mRNA και η τοπική τους μετάφραση σε συγκεκριμένες περιοχές στο κύτταρο έχει αναφερθεί κατά κύριο λόγο στα νευρικά κύτταρα [306] και έχει επίσης δειχθεί για τη Net1 στη βασική (basal) περιοχή επιθηλιακών κυττάρων [205], για τη RhoA [307], καθώς και για τη RhoGEF64C στην κορυφαία (apical) περιοχή επιθηλιακών κυττάρων [308], ενώ η εμπλοκή miRNA μορίων στην τοπική ρύθμιση της μετάφρασης μορίων mRNA έχει επίσης βρεθεί, για παράδειγμα στις νευρικές συνάψεις [309].

4.5 Ο ρόλος της μείωσης των επιπέδων των ισομορφών Net1 και Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β στο φαινόμενο της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT)

Είναι γνωστό ότι μακρόχρονη επίδραση με TGF-β προκαλεί μετατροπή του επιθηλιακού φαινοτύπου των HaCaT κερατινοκυττάρων σε ένα μεσεγχυματικό φαινότυπο (EMT). Πρόσφατα, δείχθηκε σε καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-7, ότι η Net1 αλληλεπιδρά με την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη του συμπλόκου πολικότητας LGL/DLG/Scrib, Dlg1, η οποία τη σταθεροποιεί, την προστατεύει από την αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα και ενισχύει τη δράση της ως προς τη RhoA. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η αλληλεπίδραση αυτή προάγεται υπό συνθήκες που ευνοούν την καθιέρωση των διακυτταρικών συνδέσεων προσκόλλησης που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη δημιουργία της κορυφαίας-βασικής (apical-basal) πολικότητας των επιθηλιακών κυττάρων, ενώ η καταστροφή των συνδέσεων αυτών οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της Net1 από το σύμπλοκο με τη Dlg1 και στην ακόλουθη ουμπικουτινίωση της [198]. Η μελέτη αυτή καταλήγει με την υπόθεση, ότι η Dlg1 οδηγεί τη

Net1 στην πλασματική μεμβράνη όταν τα κύτταρα δημιουργούν επαφές μεταξύ τους, όπου η ενεργοποίηση της RhoA είναι απαραίτητη, καταδεικνύοντας έτσι ένα ρόλο για τη Net1 στην καθιέρωση ή διατήρηση της κορυφαίας-βασικής (apical-basal) επιθηλιακής πολικότητας [198]. Πράγματι σε μία μελέτη σε έμβρυα κοτόπουλου, δείχθηκε ότι η Net1 ελέγχει τη βασική (basal) δραστηριότητα της RhoA μέσω του εντοπισμού της αυστηρά στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων της επιβλάστης (epiblast). Η ενεργός βασική (basal) RhoA ρυθμίζει τη σταθερότητα ενός δικτύου μικροσωληνίσκων που εντοπίζεται στη βασική (basal) περιοχή και συμβάλει στη διατήρηση της επαφής του επιθηλιακού κυττάρου με τη βασική μεμβράνη και στη σταθερότητά της. Η μελέτη αυτή για πρώτη φορά έδειξε ότι το πιο πρώιμο γεγονός κατά την EMT που συντελείται κατά τη γαστριδίωση (gastrulation) είναι η αποσταθεροποίηση της επαφής του επιθηλιακού κυττάρου με τη βασική μεμβράνη και η διάλυση της, η οποία προκαλείται από τη μείωση της ενεργότητας της RhoA λόγω της μείωσης των επιπέδων της Net1 GEF – από έναν άγνωστο παράγοντα – στη βασική περιοχή με αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση του δικτύου των μικροσωληνίσκων [205].

Οι δύο αυτές μελέτες ανέδειξαν το ρόλο της Net1 GEF στην πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων και την EMT και οδήγησαν στη διερεύνηση του ρόλου της μείωσης των επιπέδων των Net1 και Net1A από τον TGF- β στην επαγόμενη από τον TGF- β EMT στα HaCaT κερατινοκύτταρα.

Αρχικά μελετήθηκε η μορφολογία των επιθηλιακών διακυτταρικών συνδέσεων που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1, καθώς και η έκφραση των μεσεγγυματικών δεικτών Fibronectin και N-cadherin με μικροσκοπία φθορισμού μετά από επιλεκτική αποσιώπηση των Net1 και Net1A. Επίσης μελετήθηκε ο κυτταροσκελετός της ακτίνης μετά από χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη και μικροσκοπία φθορισμού. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε, ότι η αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF- β οδήγησε σε αποσταθεροποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1 (**Εικόνα 3.5.1A και B**). Αντίθετα η αποσιώπηση της Net1 δεν οδήγησε σε αξιοσημείωτη αλλαγή του εντοπισμού και της έντασης της χρώσης τόσο της E-cadherin, όσο και της ZO-1. Τα ευρήματα αυτά επισημαίνουν ότι η μείωση της Net1A και όχι της Net1 ισομορφής επηρεάζει τη σταθερότητα των επιθηλιακών διακυτταρικών συνδέσεων. Παράλληλα η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β για 72 ώρες οδήγησε σε εντονότερη έκφραση των μεσεγγυματικών δεικτών N-cadherin και Fibronectin σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και την αποσιώπηση της Net1, ενώ ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι η αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF- β προκάλεσε μία μικρή αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση των επιπέδων των N-cadherin και Fibronectin (**Εικόνα 3.5.1C και D**).

Σε μία προσπάθεια ποσοτικοποίησης των παραπάνω παρατηρήσεων προσδιορίστηκαν με qRT-PCR τα επίπεδα mRNA των μεσεγγυματικών δεικτών Fibronectin, N-cadherin και PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), καθώς και του μεταγραφικού καταστολέα της E-cadherin, Slug, μετά από επιλεκτική αποσιώπηση των Net1 και Net1A και επίδραση με TGF- β για 48

ώρες. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μικροσκοπία φθορισμού, η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β οδήγησε σε ισχυρότερη αύξηση όλων των δεικτών σε σχέση με το δείγμα ελέγχου και την αποσιώπηση της Net1 (**Εικόνα 3.5.3 A και B**). Παρατηρήθηκε επίσης, ότι η αποσιώπηση και μόνο της Net1A οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της N-cadherin παραπάνω από την αντίστοιχη αύξηση που προκάλεσε ο TGF- β από μόνος του και σε μικρότερο βαθμό της Fibronectin, το οποίο είναι σε συμφωνία με τα συμπεράσματα από τα πειράματα με μικροσκοπία φθορισμού. Παρόμοια αύξηση των επιπέδων mRNA μετά από την αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF- β επίσης παρατηρήθηκε και για τις PAI-1 και Slug, η οποία κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα αύξησης που οφείλονται στην επίδραση μόνο με TGF- β για 48 ώρες.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της αποσιώπησης των Net1 και Net1A στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Fibronectin και PAI-1 και παρατηρήθηκε ότι η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β οδήγησε στη μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων και των δύο πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.5.3C**), όμως σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις από τη μικροσκοπία φθορισμού και την qRT-PCR, η αποσιώπηση της Net1A και μόνο δεν προκάλεσε αύξηση σε καμία από τις δύο πρωτεΐνες, πιθανώς λόγω διαφορετικής ευαισθησίας της τεχνικής του western blot.

Η εντονότερη αύξηση των επιπέδων των μεσεγχυματικών δεικτών N-Cadherin, Fibronectin, PAI-1 και του καταστολέα της E-cadherin, Slug, αλλά και η εντονότερη μείωση της χρώσης των επιθηλιακών δεικτών E-cadherin και ZO-1 μετά από την αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF- β σε σχέση μόνο με την επίδραση με TGF- β ή την αποσιώπηση της Net1 παρουσία TGF- β , υποδηλώνει ότι η εκ των προτέρων ελάττωση της Net1A καθιστά πιο επιρρεπή τα κύτταρα στην EMT που προκαλείται από τον TGF- β πιθανώς μέσω της αποσταθεροποίησης των επιθηλιακών διακυτταρικών συνδέσεων. Επίσης η αύξηση της N-cadherin μετά από την αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF- β θα μπορούσε να ερμηνευτεί μέσα από κάποιο ανταγωνιστικό μηχανισμό που εκκινείται λόγω της αποσταθεροποίησης και του απεντοπισμού της E-cadherin από τις συνδέσεις προσκόλλησης, αν και αυτό μένει να αποδειχθεί, παρότι μία πρόσφατη μελέτη θεωρεί πως η αύξηση της N-cadherin είναι ανεξάρτητη της μείωσης της E-cadherin και λαμβάνει χώρα πολύ πιο γρήγορα από την πτώση της E-cadherin [160]. Η αύξηση όμως των PAI-1, Slug και Fibronectin απουσία TGF- β είναι δύσκολο να εξηγηθεί. Μία πιθανή θεωρητική εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η αποσταθεροποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων και η ακόλουθη απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας ενδέχεται να ενεργοποιούν σε κάποιο βαθμό ανεξάρτητους από τον TGF- β μηχανισμούς διαφοροποίησης των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, οι οποίοι ενισχύονται με την προσθήκη TGF- β και την έναρξη του EMT προγράμματός του. Πάντως το γεγονός, ότι η αποσιώπηση και μόνο της Net1A οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των διακυτταρικών συνδέσεων και σε ένα πιο πεπλατυσμένο (flattened) φαινότυπο (που πιθανώς υποδηλώνει την απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας) δε συνεπάγεται απαραίτητα το ρόλο της Net1A στις συνδέσεις αυτές. Λαμβάνοντας υπ'όψιν τη μελέτη των *Nakaya et al* [205], ότι η

Net1 εντοπίζεται αυστηρά στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων επιβλάστης και ότι η μείωση της προκαλεί αποσταθεροποίηση της επαφής του επιθηλιακού κυττάρου με τη βασική μεμβράνη (basal lamina) κατά την EMT πριν ακόμη αποσταθεροποιηθούν οι διακυτταρικές συνδέσεις και χαθεί η επιθηλιακή πολικότητα, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε, ότι η Net1A εντοπίζεται σε μία τέτοια περιοχή στα HaCaT κερατινοκύτταρα και η μείωση των επιπέδων της από τον TGF- β να προκαλεί έμμεσα την απορύθμιση των συνδέσεων προσκόλλησης και την απώλεια της πολικότητας.

Η αποσαφήνιση του ρόλου της Net1A στην επαγόμενη από τον TGF- β EMT είναι περίπλοκη, καθότι πρόκειται για μία πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζεται αρνητικά από τον TGF- β και όχι θετικά (ώστε η αποσιώπησή της να αναστείλει την EMT αν εμπλέκεται σε αυτή τη διαδικασία). Στην προκειμένη περίπτωση η υπερέκφραση της Net1A θα μπορούσε να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για την αναστολή της EMT εφόσον αποδεικνυόταν ότι παίζει ρόλο, όμως μία τέτοια προσέγγιση κρίθηκε ως μη επιλέξιμη, διότι η υπερέκφραση της Net1 γενικότερα οδηγεί σε ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση της RhoA με αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα λανθασμένων παρατηρήσεων. Για το λόγο αυτό η αποσιώπηση της Net1A χρησιμοποιήθηκε ως ένα μέσο για τη μελέτη του ρόλου της στη μορφολογία των κυττάρων και των διακυτταρικών συνδέσεων, αλλά και για την πιθανότητα η εκ των προτέρων αποσιώπηση της να ενισχύει την επαγόμενη από τον TGF- β EMT (καθότι η επίδραση με TGF- β για 48 ώρες μειώνει ούτως ή άλλως τα επίπεδα της Net1A), όπως και τελικά δείχθηκε.

Από τη μελέτη του κυτταροσκελετού της ακτίνης προέκυψε επίσης, ότι η αποσιώπηση της Net1A και μόνο (και όχι της Net1), προκάλεσε απώλεια της χαρακτηριστικής για τα επιθηλιακά κύτταρα περιφερειακής χρώσης της ακτίνης και οδήγησε τα κύτταρα σε μία πιο επίπεδη μορφολογία, ενώ μόνο μετά από επίδραση με TGF- β για 48 ώρες απέκτησαν τα κύτταρα την ινοβλαστοειδή μορφολογία, σχηματίζοντας όμως πιο έντονα ινίδια του στρες σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου και την αποσιώπηση της Net1 (**Εικόνα 3.5.2A**), συμβαδίζοντας με τα συμπεράσματα από τα πειράματα που περιγράφηκαν παραπάνω.

Ενδιαφέρον αποτελεί, ότι η αποσιώπηση ούτε της Net1A ούτε της Net1 δεν εμπόδισε το σχηματισμό των ινιδίων του στρες από τον TGF- β , γεγονός το οποίο συνάδει με την κεντρική παρατήρηση αυτής της μελέτης, ότι τα επίπεδα των Net1 και Net1A ελαττώνονται μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β . Η παρατήρηση αυτή επισημαίνει το ρόλο άλλων Rho GEF στη δημιουργία ινιδίων του στρες κατά την επαγόμενη από τον TGF- β EMT στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί σε πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς, RPE, ότι η ειδική για τη RhoA GEF-H1 επάγεται παρατεταμένα από τον TGF- β και είναι απαραίτητη για την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την ίνωση και τη διαφοροποίηση αυτών των κυττάρων σε μυοϊνοβλάστες, όπως η α -SMA, καθώς και για τη μεταναστευτική τους ικανότητα [288]. Επίσης έχει αναφερθεί ότι η p114 RhoGEF επάγεται από τον TGF- β σε μία μελέτη με μικροσυστοιχίες για την εξάρτηση από τη Smad4 των γονιδίων

που επάγονται από τον TGF-β σε HaCaT κερατινοκύτταρα, όμως η GEF αυτή δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω [310].

Το εύρημα ότι οι Net1 και Net1A δεν εμπλέκονται στο μηχανισμό δημιουργίας ινιδίων του στρες από τον TGF-β, έρχεται σε πλήρη αντίθεση με δύο μελέτες που θέλουν τη Net1 να είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ινιδίων του στρες από τον TGF-β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες [193] και σε ARPE-19 επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς [206]. Η πρώτη μελέτη έδειξε την αναγκαιότητα της Net1 για τη δημιουργία ινιδίων του στρες από τον TGF-β μετά από υπερέκφραση της Net1 στους Swiss 3T3 ινοβλάστες. Η υπερέκφραση της Net1 θεωρείται, ότι μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα, διότι έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί τη RhoA με έναν ανεξέλεγκτο τρόπο, καθότι δεν απαιτείται κάποια περαιτέρω ρύθμιση της Net1 ώστε να δράσει ως GEF και επομένως είναι αναμενόμενο να δημιουργήσει ινίδια του στρες. Η δεύτερη μελέτη απέδειξε ότι απουσία της Net1 ο TGF-β δε μπόρεσε να δημιουργήσει ινίδια του στρες μετά από 48 ώρες επίδρασης. Παράλληλα όμως δείχθηκε, ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1 εξαφανίστηκαν μετά από 12 ώρες επίδρασης με TGF-β, ενώ η συσχέτιση της Net1 με την ενεργοποίηση της RhoA πραγματοποιήθηκε μέχρι τις 6 ώρες, ευρήματα τα οποία είναι σε απόλυτη συμφωνία με τα συμπεράσματα μας. Οι συγγραφείς αυτής της εργασίας δε σχολίασαν την ασυμφωνία σχετικά με την εξάρτηση από τη Net1 για τη δημιουργία ινιδίων του στρες από τον TGF-β μετά από 24-48 ώρες, τη στιγμή που τα πρωτεϊνικά επίπεδα της Net1 μειώνονται ήδη μετά από 12 ώρες επίδρασης με TGF-β.

Είναι πλέον ξεκάθαρο, ότι ο TGF-β ρυθμίζει αρνητικά τη Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση, με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την αποικοδόμηση της από το πρωτεόσωμα, καθώς και τη συμμετοχή miRNA μορίων, όπως τα miR-24 και miR-155. Η μείωση των επιπέδων της Net1A από τον TGF-β δείχθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στο φαινόμενο της EMT, καθότι η αποσιώπηση της παρουσία TGF-β ενίσχυσε τον μεσεγχυματικό φαινότυπο, ενώ απουσία TGF-β αποσταθεροποίησε τις διακυτταρικές συνδέσεις και αλλοίωσε τη χαρακτηριστική επιθηλιακή μορφολογία. Ο ρόλος όμως της αύξησης των επιπέδων της Net1A από τον TGF-β μετά από 1-3 ώρες επίδρασης, η οποία διατηρείται μέχρι τις 12 ώρες, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η αύξηση των επιπέδων της Net1A δείχθηκε ότι είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της RhoA μετά από 6 ώρες επίδρασης με TGF-β, ο ρόλος όμως αυτής της ενεργοποίησης δε διερευνήθηκε περαιτέρω. Επίσης, οι Lee *et al* [206] συσχέτισαν την ενεργοποίηση της RhoA με τη Net1 ήδη από τα πρώτα 30 λεπτά μέχρι και τις 6 ώρες, ενώ έδειξαν ότι η Net1 είναι απαραίτητη για τη δημιουργία ινιδίων του στρες μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF-β.

Θεωρώντας ότι η απώλεια της Net1 έχει συσχετισθεί με την EMT [205] και προάγεται σε συνθήκες αποσταθεροποίησης των συνδέσεων προσκόλλησης από τον TGF-β [198] και δεδομένου αντιστρόφως, ότι η αποσιώπηση της αποσταθεροποιεί τις διακυτταρικές συνδέσεις και χαλαρώνει την επιθηλιακή μορφολογία, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αύξηση των

επιπέδων της προστατεύει τον επιθηλιακό φαινότυπο κάτι που είναι σύμφωνο και με τις παρατηρήσεις των *Nakaya et al* [205]. Υπό αυτό το πρίσμα μπορούμε να θεωρήσουμε ότι ο TGF-β επάγει την έκφραση της Net1A μέχρι τις 6-12 ώρες με σκοπό να διατηρήσει τη RhoA ενεργό σε συγκεκριμένες περιοχές του επιθηλιακού κυττάρου, όπου χρειάζεται για την ομοίωσή του. Για παράδειγμα, η RhoA έχει δείξει ότι έχει αυξημένη ενεργότητα στη βασικοπλευρική (basolateral) περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων, όπου συμμετέχει στη διατήρηση των δομών ακτομυοσίνης, στη σταθερότητα των συνδέσεων προσκόλλησης, [53,68,201], αλλά και στη σταθερότητα του δικτύου μικροσωληνίσκων που εντοπίζεται στη βασική περιοχή των επιθηλιακών κυττάρων [205].

Άλλωστε τα HaCaT κερατινοκύτταρα είναι φυσιολογικά αθανатоποιημένα κύτταρα, τα οποία αποκρίνονται στην κυτταροστατική δράση του TGF-β, διατηρώντας τη φυσιολογική απόκριση στον TGF-β. Οι δράσεις του TGF-β στην ομοίωσή των επιθηλιακών κυττάρων εκτός από την αναστολή του πολλαπλασιασμού δεν είναι απόλυτα κατανοητές, ενώ οι περισσότερες μελέτες σε επιθηλιακά κύτταρα εστιάζουν στο φαινόμενο της EMT που προκαλείται από τον TGF-β, στα πλαίσια της καρκινογένεσης και όχι της ομοίωσής τους. Όμως η EMT είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF-β (24-48 ώρες ή και περισσότερο), επομένως παραμένει ανοιχτό το ερώτημα κατά πόσο η πρώιμη σηματοδότηση από τον TGF-β “προετοιμάζει” τα κύτταρα για φαινόμενα όπως η EMT ή εναλλακτικά συμβάλλει στην ομοίωσή τους. Άλλωστε, η αυξημένη και παρατεταμένη έκκριση TGF-β έχει συνδεθεί με παθολογικές καταστάσεις, όπως ο προχωρημένος καρκίνος και η ίνωση που συνδέονται με την EMT, καθώς και η φλεγμονή.

Από την άλλη μεριά η Net1A θα μπορούσε να ενεργοποιεί τη RhoA αποσταθεροποιώντας τις διακυτταρικές συνδέσεις, προκαλώντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, προσβάλλοντας την ομοίωσή του επιθηλιακού κυττάρου, δεδομένου, ότι η RhoA έχει αναφερθεί πως είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF-β και τον HGF (Hepatocyte Growth Factor) καταστροφή των συνδέσεων προσκόλλησης κατά την EMT [81,82]. Αν η Net1A έπαιζε ένα τέτοιο ρόλο ευνοώντας επομένως τη διαδικασία της EMT από τον TGF-β, τότε δε θα είχε νόημα η αρνητική της ρύθμιση ήδη από τις 24 ώρες επίδρασης με TGF-β, πριν ακόμη δηλαδή γίνουν αισθητές οι αλλαγές στην επιθηλιακή μορφολογία στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Παρόλα αυτά μία τέτοια υπόθεση παραμένει ανοιχτή.

Επιπλέον στην παρούσα μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε αναλυτική κινητική της ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β καθώς η ανίχνευση της ενεργού RhoA αποδείχθηκε ιδιαίτερα δύσκολη στα HaCaT κερατινοκύτταρα και έτσι δεν είναι γνωστό εάν η RhoA εξακολουθεί να είναι ενεργός αφότου τα επίπεδα της Net1A έχουν μειωθεί. Παρομοίως, η μελέτη των *Lee et al* [206] επίσης δε διερεύνησε την ενεργοποίηση της RhoA μετά τις 6 ώρες επίδρασης με TGF-β. Η ενεργοποίηση της RhoA έχει αναφερθεί ότι μειώνεται κατά την εξέλιξη

της EMT σε καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου με παράλληλη αύξηση των επιπέδων και της ενεργότητας της RhoC [55].

Ο ρόλος επομένως της αύξησης των επιπέδων της Net1A μόλις μετά από 1-3 ώρες επίδρασης με TGF- β και της συνακόλουθης ενεργοποίησης της RhoA παραμένει ένα ανοιχτό ερώτημα.

4.6 Το microRNA miR-24 εμπλέκεται στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF- β EMT

Δεδομένου ότι η μείωση των επιπέδων της Net1A από τον TGF- β σχετίζεται με την επαγόμενη από τον TGF- β EMT και με βάση το εύρημα ότι το mRNA της Net1A αποτελεί στόχο του miRNA, miR-24, διερευνήθηκε στη συνέχεια ο ρόλος του miR-24 στην EMT που επάγεται από τον TGF- β στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η μορφολογία των διακυτταρικών συνδέσεων που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1, καθώς και η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin και Fibronectin με μικροσκοπία φθορισμού καθώς επίσης και η κυτταρική μορφολογία με phase contrast μικροσκοπία μετά από υπερέκφραση του pre-miR-24. Η υπερέκφραση του miR-24 και μόνο είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της χρώσης της E-cadherin και της ZO-1 στην περιφέρεια του κυττάρου, υποδεικνύοντας την αποσταθεροποίηση των συνδέσεων προσκόλλησης και των στενοσυνδέσμων αντίστοιχα (**Εικόνα 3.5.4A**). Παράλληλα η υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF- β για 72 ώρες οδήγησε σε εντονότερη έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin και Fibronectin σε σχέση μόνο με την επίδραση με TGF- β . Η υπερέκφραση και μόνο του miR-24 απουσία διέγερσης με TGF- β προκάλεσε μία μικρή αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση των επιπέδων της Fibronectin, η οποία ήταν πιο ξεκάθαρη για τη N-cadherin (**Εικόνα 3.5.4B**).

Επίσης, προσδιορίστηκαν με qRT-PCR τα επίπεδα mRNA των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin, N-cadherin και PAI-1, καθώς και του μεταγραφικού καταστολέα της E-cadherin, Slug, μετά από υπερέκφραση του miR-24 και επίδραση με TGF- β για 48 ώρες. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μικροσκοπία φθορισμού, η υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF- β προκάλεσε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων όλων των δεικτών σε σχέση με την αύξηση που προκάλεσε ο TGF- β από μόνος του. Επίσης, η υπερέκφραση του miR-24 απουσία TGF- β οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA της N-cadherin, που κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με την αύξηση που προκάλεσε μόνος του ο TGF- β , ενώ επίσης οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των Slug και PAI-1 και σε μικρότερο βαθμό της Fibronectin (**Εικόνα 3.5.6A και B**). Παράλληλα, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης του miR-24 στα πρωτεϊνικά επίπεδα των Fibronectin και PAI-1 και παρατηρήθηκε ότι υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF- β οδήγησε σε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων και των δύο πρωτεϊνών (**Εικόνα 3.5.6C**), καθώς και ότι υπερέκφραση του miR-24 απουσία TGF- β

- σε πλήρη συμφωνία με τις παρατηρήσεις από τη μικροσκοπία φθορισμού και την qRT-PCR
- προκάλεσε μικρή αλλά ανιχνεύσιμη αύξηση και στις δύο πρωτεΐνες.

Η μελέτη της επίδρασης της υπερέκφρασης του miR-24 στην κυτταρική μορφολογία με phase contrast μικροσκοπία έδειξε, ότι η υπερέκφραση του miR-24 και μόνο οδήγησε τα κύτταρα σε μια επίπεδη και χαλαρή μορφολογία, που υποδηλώνει την απώλεια της επιθηλιακής πολικότητας τους, ενώ παρουσία TGF-β τα κύτταρα απέκτησαν πιο έντονη ινοβλαστοειδή μορφολογία σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (**Εικόνα 3.5.5**).

Η εικόνα της αποσταθεροποίησης των διακυτταρικών συνδέσεων με την υπερέκφραση και μόνο του miR-24 ταιριάζει με την αντίστοιχη εικόνα από την αποσιώπηση της Net1A. Επίσης η εντονότερη αύξηση της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών Fibronectin, N-cadherin, PAI-1 και Slug μετά από υπερέκφραση του miR-24 παρουσία TGF-β σε σχέση με την αύξηση που προκάλεσε ο ίδιος ο TGF-β, επίσης συνάδει με τα αποτελέσματα που προκάλεσε η αποσιώπηση της Net1A παρουσία TGF-β σε αυτούς τους δείκτες, αν και η αύξηση των Fibronectin και PAI-1 είναι ακόμη μεγαλύτερη και ειδικά για την PAI-1 εντυπωσιακότερη στην περίπτωση του miR-24 (**Εικόνα 3.5.6B**). Από τις παραπάνω παρατηρήσεις μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι το miR-24 προκαλεί την απορύθμιση των διακυτταρικών συνδέσεων ακόμη και απουσία TGF-β, αλλά και ενισχύει τον EMT φαινότυπο που προκαλείται από τον TGF-β, σε μεγάλο βαθμό μέσω στόχευσης της Net1A. Η υπερέκφραση του miR-24 – όπως και στην περίπτωση της αποσιώπησης της Net1A – φαίνεται ότι ενισχύει την απόκριση των κυττάρων στην EMT που προκαλείται από τον TGF-β. Ενώ η αύξηση των επιπέδων των N-cadherin, Fibronectin, PAI-1 και Slug μετά από την αποσιώπηση της Net1A απουσία TGF-β είναι δύσκολο να εξηγηθεί, η αντίστοιχη αύξηση που παρατηρείται στους δείκτες αυτούς μετά από την υπερέκφραση του miR-24 απουσία TGF-β μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το miR-24 θεωρητικά έχει ένα πολύ μεγάλο σύνολο mRNA στα οποία στοχεύει και έτσι δύναται να εκκινήσει ένα σύνολο αποκρίσεων στο κύτταρο κατά τη στόχευσή τους. Με βάση τις προβλέψεις από υπολογιστικά προγράμματα ένα miRNA μπορεί να ρυθμίσει αρνητικά εκατοντάδες mRNA που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, ενώ ανάλυση με μικροσυστοιχίες έδειξε ότι το miR-155 ρυθμίζει αρνητικά πάνω από 180 mRNA, ενώ το miR-24 έχει αναφερθεί ότι έχει 248 mRNA στόχους [304,305,311,312].

Επομένως το miR-24 μέσω της στόχευσης της Net1A και άλλων πιθανών στόχων συμβάλει στην επαγωγή της EMT από τον TGF-β. Στη βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί παρόμοια δράση του miR-24 μέχρι σήμερα. Το miR-24 έχει αναφερθεί, ότι προκαλεί αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στοχεύοντας στα mRNA των E2F2, MYC, CDC2, CDK4 και αρκετών άλλων πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο [312], ρυθμίζει την απόπτωση στοχεύοντας στην FAF1 (Fas Associated Factor 1) σε καρκινικά κύτταρα προστάτη [313], επάγεται από τον BMP-2 σε μεσεγχυματικά αρχέγονα κύτταρα και εμπλέκεται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της λιπογένεσης [314], αναστέλλει την ερυθροποίηση στοχεύοντας στον υποδοχέα της ακτιβίνης ALK4 [315], ενώ σε σχέση με το μονοπάτι του

TGF- β έχει βρεθεί ότι η έκφραση του miR-24 καταστέλλεται από τον TGF- β κατά την TGF- β εξαρτώμενη αναστολή της μυογένεσης [316].

Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι ένα από τα miRNA που βρέθηκε ότι στοχεύουν τη Net1A είναι το miR-200b, το οποίο όπως προαναφέρθηκε, μελετήθηκε σε μικρό βαθμό και βρέθηκε ότι προκαλεί μείωση των mRNA και πρωτεϊνικών επιπέδων της Net1A, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα miR-24 και miR-155. Ο λόγος που επιλέχθηκε η μελέτη του είναι διότι έχει συσχετισθεί στη βιβλιογραφία με την επαγόμενη από τον TGF- β EMT [181]. Στην πορεία διαπιστώθηκε ότι τα miRNA της οικογένειας miR-200 καταστέλλονται από τον TGF- β επιτρέποντας έτσι την αύξηση των επιπέδων των μεταγραφικών καταστολέων της E-cadherin, ZEB1 και ZEB2, προάγοντας την EMT [180]. Στη δική μας μελέτη ο TGF- β ελαττώνει τα επίπεδα της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση και επομένως αναζητήσαμε miRNA τα οποία ρυθμίζονται θετικά από τον TGF- β , ώστε η αύξηση των επιπέδων τους να στοχεύσει το mRNA της Net1A. Δεδομένου, ότι το miR-200b καταστέλλεται και δεν επάγεται από τον TGF- β κατά την EMT, δεν συνεχίστηκε η μελέτη αυτού του miRNA.

Επίσης, το miR-155 αποδείχθηκε σχετικά καθυστερημένα ότι επίσης επάγεται από τον TGF- β στα HaCaT κερατινοκύτταρα και έτσι η μελέτη του δεν προχώρησε σε σχέση με τη μελέτη του miR-24. Η αποσαφήνιση του ρόλου του miR-155 ως προς τη στόχευση της Net1A και την EMT που επάγεται από τον TGF- β είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθότι το miR-155 έχει ήδη αναφερθεί ότι εμπλέκεται στην EMT που προκαλεί ο TGF- β στα NMuMG κύτταρα μαστού μέσω στόχευσης της RhoA [183]. Άλλωστε, η αρχική υπόθεση που μας ώθησε ώστε να μελετήσουμε την εμπλοκή των miRNA στο μηχανισμό της μείωσης της Net1A από τον TGF- β , ήταν το ενδεχόμενο το ίδιο miRNA που στοχεύει στη RhoA να στοχεύει παράλληλα και τη Net1A, δεδομένου ότι η Net1A σχετίζεται λειτουργικά με τη RhoA ως ενεργοποιητής της. Επομένως, η απόδειξη της διπλής αυτής στόχευσης από το miR-155 και του ρόλου της στην EMT που προκαλείται από τον TGF- β είναι ένα μεγάλο ζητούμενο.

4.7 Μελέτη της ρύθμισης των Net1A, Net1, miR-24 και miR-155 από τον TGF- β σε καρκινικά κύτταρα

Η μελέτη της ρύθμισης των δύο ισομορφών της Net1, Net1 και Net1A, από τον TGF- β που πραγματοποιήθηκε αναλυτικά στη φυσιολογική κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων HaCaT επεκτάθηκε στη συνέχεια και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Αρχικά μελετήθηκαν τα βασικά επίπεδα mRNA των Net1 και Net1A με qRT-PCR στις ακόλουθες κυτταρικές σειρές: HaCaT (κερατινοκύτταρα), HepG2 (ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα), MCF7, T47D, MDAMB231, SKBR3 (καρκινικά κύτταρα μαστού), A375, WM9, M5 (μελάνωμα), SKLU, A549, H1975, H1650, H157 (καρκινικά κύτταρα πνεύμονα), CaCO-2 (καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου), DU145 (καρκινικά κύτταρα προστάτη), HT1080 (ινোসάρκωμα) και MG63 (οστεοσάρκωμα).

Παρατηρήθηκε, ότι ενώ τα επίπεδα mRNA της Net1 ισομορφής έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν, τα επίπεδα mRNA της Net1A

ισομορφής εμφανίζουν πολύ μεγάλη διακύμανση (**Εικόνα 3.6.1**). Οι πιο επιθετικές, μεταστατικές ή μεσεγγυματικές καρκινικές σειρές (T47D, WM9, M5, H157, HT1650, DU145, HT1080 και MG63) φαίνεται ότι χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα mRNA για τη Net1A ισομορφή. Στην περίπτωση μάλιστα των καρκινικών κυττάρων μαστού παρατηρείται ότι η λιγότερο επιθετική καρκινική σειρά MCF7 έχει ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα για τη Net1A, ενώ οι πιο επιθετικές σειρές MDAMB231, T47D παρουσιάζουν αρκετά χαμηλότερα επίπεδα. Επίσης τα HaCaT κερατινοκύτταρα –τα μόνα φυσιολογικά κύτταρα που μελετήθηκαν – μαζί με τα μη ογκογόνα HepG2 κύτταρα αλλά και τα MCF7 εμφανίζουν τα υψηλότερα επίπεδα για τη Net1A. Παράλληλα, τα κύτταρα πρωτογενούς μελανώματος A375 έχουν πολύ χαμηλά Net1A επίπεδα, τα οποία μειώνονται ακόμη περισσότερο στα WM9 (μελάνωμα – μετάσταση σε λεμφαδένες) και καθίστανται μη ανιχνεύσιμα στα M5 (μελάνωμα – απομακρυσμένη μετάσταση στον εγκέφαλο). Θεωρώντας ότι τα κερατινοκύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα μελανώματος προέρχονται όλα από τον ίδιο ιστό (δέρμα) μπορούμε να υποθέσουμε ότι στα φυσιολογικά κύτταρα του ιστού αυτού η Net1A ισομορφή παρουσιάζει υψηλά επίπεδα, τα οποία μειώνονται περισσότερο όσο πιο επιθετικά είναι τα καρκινικά κύτταρα. Μία τέτοια υπόθεση όμως χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση για να επιβεβαιωθεί. Ενδιαφέρον αποτελεί επίσης, ότι όλες οι καρκινικές σειρές πνεύμονα που μελετήθηκαν χαρακτηρίζονται από πολύ χαμηλά επίπεδα τόσο για τη Net1A όσο και για τη Net1. Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να σημαίνει, είτε ότι από πλευρά ιστοειδικότητας η Net1A και η Net1 δεν εκφράζονται σε σημαντικό βαθμό στον πνεύμονα, είτε ότι τα επίπεδα τους μειώνονται σημαντικά κατά την καρκινογένεση. Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι σε φυσιολογικά κύτταρα, αλλά και σε μη ογκογόνα ή μειωμένης επιθετικότητας καρκινικά κύτταρα τα επίπεδα της Net1A είναι ιδιαίτερα υψηλά, ενώ σε πιο επιθετικές καρκινικές σειρές τα επίπεδα αυτά μειώνονται σημαντικά. Μία τέτοια ενδιαφέρουσα παρατήρηση απαιτεί μία διεξοδικότερη μελέτη για να επιβεβαιωθεί.

Ακολούθως διερευνήθηκε η επίδραση του TGF- β στα επίπεδα mRNA των Net1 και Net1A στις καρκινικές κυτταρικές σειρές DU145, MDAMB231, T47D και MCF7 και βρέθηκε, ότι στην καρκινική σειρά MDAMB231 και σε μικρότερο βαθμό στα T47D κύτταρα, ο TGF- β επάγει την αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A μετά από 3 ώρες επίδρασης, η οποία στα MDAMB231 κύτταρα διατηρήθηκε σε σχετικά υψηλά επίπεδα μέχρι τις 16-24 ώρες (**Εικόνα 3.6.2**). Αντίθετα το mRNA της Net1 ισομορφής μειώθηκε σε όλες τις κυτταρικές σειρές που δοκιμάστηκαν μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF- β . Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα, ότι η αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A μετά από σύντομη επίδραση με TGF- β είναι ένα φαινόμενο που ναι μεν δεν περιορίζεται μόνο στα HaCaT κερατινοκύτταρα, αλλά ταυτοχρόνως δεν αφορά όλα τα κυτταρικά συστήματα που μελετήθηκαν. Η ρύθμιση της Net1 ισομορφής από τον TGF- β , όμως φαίνεται να διέπεται από την ίδια λογική σε όλες τις κυτταρικές σειρές με κύριο γνώρισμα τη μείωση των επιπέδων της κατά 65-80% μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF- β .

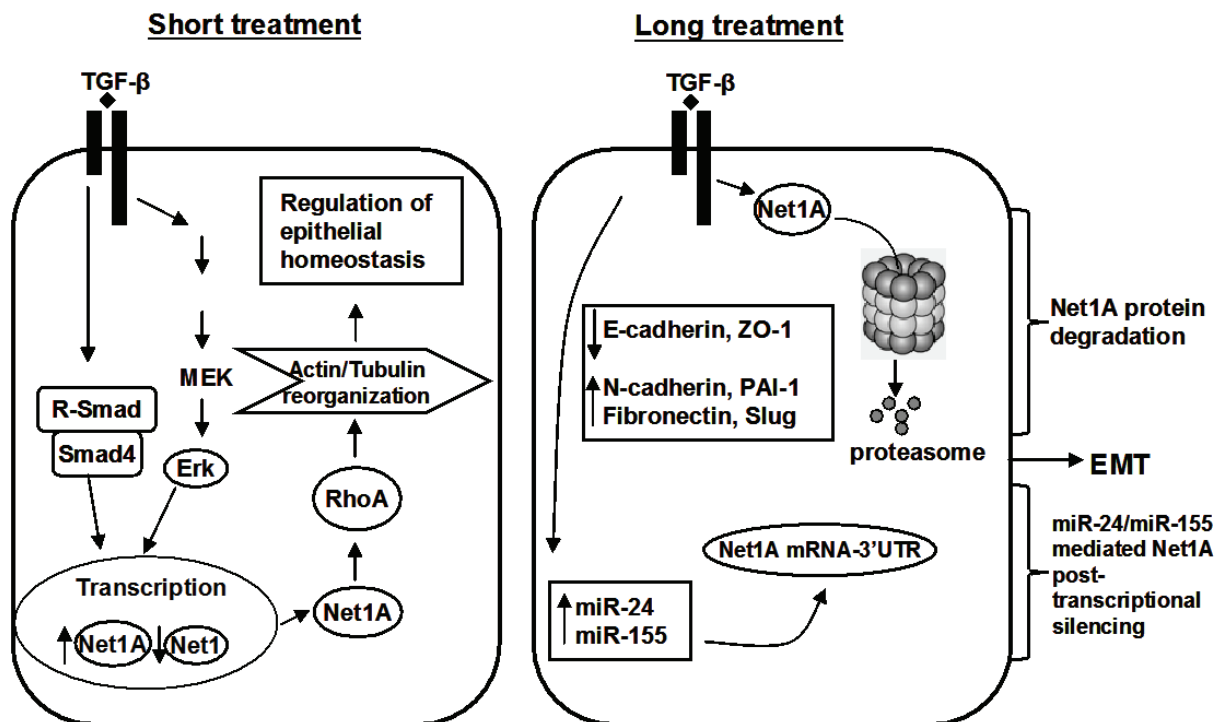
Παράλληλα βρέθηκε, ότι ο TGF- β επάγει την αύξηση των επιπέδων του miR-24 στις καρκινικές σειρές μαστού, MDAMB231, T47D και MCF7 και στην καρκινική σειρά προστάτη, DU145 (**Εικόνα 3.6.3**). Στα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145, όπως και στα καρκινικά κύτταρα μαστού αυξημένης επιθετικότητας T47D, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων του miR-24 μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF- β , ενώ στην καρκινική σειρά MDAMB231 και στη λιγότερο επιθετική καρκινική σειρά μαστού MCF7 παρατηρήθηκε μία μικρότερη, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση. Παρομοίως, ο TGF- β οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων και του miR-155 στα καρκινικά κύτταρα T47D, MDAMB231 και DU145 (**Εικόνα 3.6.4**). Η μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του miR-155 – όμοια με το miR-24 – παρατηρήθηκε στα T47D και τα DU145, ενώ στα MDAMB231 παρατηρήθηκε μια μικρότερη αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση. Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η ταυτόχρονη αύξηση των miR-24 και miR-155 από τον TGF- β δεν περιορίζεται μόνο στα HaCaT κερατινοκύτταρα, αλλά εκδηλώνεται και σε καρκινικές σειρές. Στις ιδιαίτερα επιθετικές καρκινικές σειρές μαστού, T47D και προστάτη, DU145, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων τόσο του miR-24, όσο και του miR-155, σε σχέση με τα MDAMB231 και τα λιγότερο επιθετικά MCF7 και ακόμη περισσότερο σε σχέση με τα HaCaT κερατινοκύτταρα. Παρατηρούμε δηλαδή, ότι οι πιο επιθετικές καρκινικές σειρές αποκρίνονται εντονότερα στην αύξηση των επιπέδων των miR-24 και miR-155 μετά από επίδραση με TGF- β σε σχέση με τα φυσιολογικά HaCaT, αν και μία τέτοια επισήμανση απαιτεί ευρύτερη μελέτη για να αποδειχθεί.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε ο ρόλος του miR-24 στη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού MCF7, BT474, SKBR3 και T47D που επάγεται από τον TGF- β σε matrigel με πειράματα αποσιώπησης του miR-24 ή ταυτόχρονης αποσιώπησης του miR-24 και της Net1A. Η καταστολή του miR-24 είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της διεισδυτικότητας που προκαλείται από τον TGF- β σε όλες τις κυτταρικές σειρές, υποδηλώνοντας ότι το miR-24 παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή (**Εικόνα 3.6.5A**). Ουσιαστικά, η καταστολή του miR-24 αφήνει ανεπηρέαστους όλους του πιθανούς στόχους του μέσω της μείωσης των οποίων συμμετέχει στην επαγωγή της διεισδυτικότητας από τον TGF- β . Η επιλεκτική αποσιώπηση της Net1A, όμως επανέφερε σε σημαντικό βαθμό την ικανότητα αυτή στα BT474 και T47D κύτταρα, ενώ την αποκατέστησε σχεδόν πλήρως στα MCF7 και SKBR3, επισημαίνοντας ότι από τους πιθανούς στόχους του miR-24, η επιλεκτική μείωση της Net1A παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή της διεισδυτικότητας από τον TGF- β . Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το miR-24 παίζει σημαντικό ρόλο στη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού που επάγεται από τον TGF- β μέσω ρύθμισης της Net1A.

Σε μία προσπάθεια διερεύνησης της κλινικής σημασίας των ανωτέρω αποτελεσμάτων, αναλύθηκαν τα επίπεδα mRNA της Net1A και τα επίπεδα του miR-24 σε 6 ζεύγη πρωτογενούς και μεταστατικού καρκίνου του μαστού με qRT-PCR (**Εικόνα 3.6.5B**). Από αυτή την ανάλυση τα επίπεδα του miR-24 βρέθηκαν αυξημένα, ενώ τα επίπεδα mRNA της Net1A μειωμένα

στους μεταστατικούς σε σχέση με τους πρωτογενείς όγκους. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν, ότι το μονοπάτι miR-24/Net1A ενεργοποιείται κατά τη μεταστατική διαδικασία στον καρκίνο του μαστού.

Η μελέτη της ρύθμισης των ισομορφών της Net1 GEF, Net1 και Net1A, από τον TGF-β, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της διπλής συμπεριφοράς του TGF-β στην καρκινογένεση. Παρατηρήσαμε ότι ο TGF-β μετά από σύντομη επίδραση 3-6 ωρών επάγει την αύξηση της Net1A και όχι της Net1 ισομορφής, με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από το Smad και το ERK MAPK μονοπάτι, ενώ δείχθηκε ότι η αυτή η αύξηση είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της RhoA και την περαιτέρω αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, πιθανότατα συμμετέχοντας στη ρύθμιση της ομοιόστασης του επιθηλιακού κυττάρου (**Εικόνα 4.2, αριστερό πάνελ**). Μετά από παρατεταμένη επίδραση όμως με TGF-β για 24-48 ώρες η δράση του TGF-β αντιστρέφεται και από ογκοκτασταλτική μετατρέπεται σε ογκογόνο, όπου βρέθηκε, ότι τα επίπεδα της Net1A ρυθμίζονται αρνητικά με μηχανισμούς που περιλαμβάνουν το πρωτεόσωμα και τα microRNAs, miR-24 και miR-155. Αυτή η αρνητική ρύθμιση δείχθηκε ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στην επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EMT), μία βιολογική δράση που προάγει τη μεταστατική διαδικασία (**Εικόνα 4.2, δεξί πάνελ**).



Εικόνα 4.2: Μοντέλο που συνοψίζει τα ευρήματα της παρούσας μελέτης σχετικά με τη ρύθμιση των Net1/Net1A ισομορφών μετά από σύντομη ή μακρόχρονη επίδραση με TGF-β, δίνοντας έμφαση στο ρόλο της μακρόχρονης ρύθμισης της Net1A από τον TGF-β στην EMT.

4.8 Μελέτη της ρύθμισης της α -SMA από τον TGF- β σε Swiss 3T3 ινοβλάστες

Παράλληλα με τη μελέτη του γονιδίου της Net1 GEF που σχετίζεται με την ενεργοποίηση της RhoA, διερευνήθηκε και η ρύθμιση του γονιδίου της α -λείας μυϊκής ακτίνης (α -SMA) από τον TGF- β , το οποίο σχετίζεται άμεσα με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η α -SMA είναι γνωστό ότι επάγεται κατά τη διαφοροποίηση λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες από τον TGF- β [138,192].

Πειράματα αποσιώπησης και υπερέκφρασης των Smad2 και Smad3 σε Swiss 3T3 ινοβλάστες έδειξαν, ότι η επαγωγή της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη Smad3 και δευτερευόντως από τη Smad2. Με τη χρήση διαφόρων αναστολέων δείχθηκε ότι στο μηχανισμό της επαγωγής της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β εμπλέκεται πέραν από το μονοπάτι των Smad και το μονοπάτι της ROCK κινάσης. Ο ρόλος του μονοπατιού της ROCK κινάσης στην επαγωγή της έκφρασης της α -SMA από τον TGF- β δε διερευνήθηκε περαιτέρω, αλλά μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ειδική GEF για τη RhoA, GEF-H1, η οποία αποτελεί επίσης γονίδιο στόχο του TGF- β , είναι απαραίτητη για την επαγωγή του γονιδίου της α -SMA από τον TGF- β σε πρωτογενή επιθηλιακά κύτταρα αμφιβληστροειδούς RPE [288]. Η εμπλοκή της GEF-H1 και του τελεστή της RhoA, ROCK, στην επαγωγή του γονιδίου της α -SMA από τον TGF- β , αποτελεί ένα ωραίο παράδειγμα του τρόπου με τον οποίο η σηματοδότηση των Rho ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Μελέτη του εντοπισμού της α -SMA με μικροσκοπία φθορισμού, έδειξε, ότι η ενσωμάτωση της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης πραγματοποιείται σταδιακά μετά από 3-6 ώρες επίδρασης με TGF- β , ενώ γίνεται ιδιαίτερα αισθητή μετά από 24-48 ώρες. Επίσης, η υπερέκφραση της Smad3 και μόνο οδήγησε σε έντονη δημιουργία ινιδίων του στρες και σε σημαντική παρουσία της α -SMA στα ινίδια της ακτίνης, γεγονός που ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο μετά από επίδραση με TGF- β , υποδηλώνοντας ότι η Smad3 παίζει κεντρικό ρόλο στην ενσωμάτωση της α -SMA στα ινίδια του στρες που δημιουργούνται από τον TGF- β στους Swiss 3T3 ινοβλάστες.

4.9 Αναζήτηση μορίων που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF- β , T β RI και T β RII με φασματομετρία μάζας

Στα πλαίσια της συστηματικής αναζήτησης των μορίων τα οποία δρουν ανοδικά της RhoA οδηγώντας στη γρήγορη ενεργοποίηση της από τον TGF- β χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της φασματομετρίας μάζας, η οποία παρέχει τη δυνατότητα εύρεσης άγνωστων πρωτεϊνών, που δεν έχουν προηγουμένως συσχετισθεί με ένα μονοπάτι ή έναν παράγοντα. Η στρατηγική που ακολουθήθηκε αφορούσε στην υπερέκφραση των υποδοχέων του TGF- β , T β RI και T β RII, στα HEK293 κύτταρα, την κατακρήμνιση τους και την ανάλυση με φασματομετρία μάζας των

πρωτεϊνών που συνκατακρημνίζονται με τους υποδοχείς. Το ζητούμενο ήταν να βρεθεί κάποια πρωτεΐνη GEF με ειδικότητα για τη RhoA, η οποία θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με κάποιον από τους υποδοχείς κατά τη στρατολόγησή της από τον TGF- β , ώστε να ενεργοποιήσει τη RhoA. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση της RhoA είναι ένα γρήγορο φαινόμενο θεωρήσαμε ότι λαμβάνει χώρα κοντά στη μεμβράνη και κοντά στο σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF- β . Άλλωστε σχετικά με την ενεργοποίηση της Cdc42 από τον TGF- β , βρέθηκε ότι η Cdc42 συμμετέχει σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο με τους υποδοχείς του TGF- β μαζί με τις GEF που την ενεργοποιούν α - και β -Pix [145], οπότε υποθέσαμε ότι ένας παρόμοιος μηχανισμός μπορεί να ισχύει και για την ενεργοποίηση της RhoA.

Η ανάλυση των συγκατακρημνιζόμενων πρωτεϊνών με τη βοήθεια του προγράμματος **ProFound** μετά από χρώση αργύρου και πέψη με διάλυμα τρυψίνης των επιλεγμένων πρωτεϊνικών ζωνών από κάθε δείγμα, οδήγησε σε ένα σύνολο πρωτεϊνών που παρουσιάζονται αναλυτικά στους **Πίνακες 3.8.1-3.8.4**. Δυστυχώς δεν κατέστη δυνατή η εύρεση κάποιας GEF πρωτεΐνης με ειδικότητα για τη RhoA από το σύνολο των πρωτεϊνών που αναγνωρίστηκαν. Παρόλα αυτά αρκετές από τις πρωτεΐνες που εντοπίστηκαν από την ανάλυση αυτή παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και θα μπορούσαν να αποτελέσουν αντικείμενο κάποιας μελλοντικής μελέτης που δεν περιορίζεται στις Rho GTPάσες και τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Αξίζει να επισημανθεί, ότι βρέθηκαν αρκετές πρωτεΐνες που έχουν ήδη συσχετιστεί με τον TGF- β στη βιβλιογραφία, για παράδειγμα:

- 1) πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με τον TβRI ή τον TβRII, όπως η chaperone Hsp90 [216], η p85 ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K [132], η Smad2 και η GEF SOS1 [118],
- 2) πρωτεΐνες που αποτελούν μεταγραφικούς στόχους του TGF- β , όπως ο υποδοχέας του VEGF, VEGFR1 [240], ο μεταγραφικός παράγοντας CUX1 (CUTL1) [247], η φωσφατάση SHIP2 [133] και ο τελεστής της Cdc42, MRCK β (CDC42BPB) (επάγεται από τον TGF- β 2) [261],
- 3) πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται από τον TGF- β , όπως η p110 καταλυτική υπομονάδα της PI3K [129,131] και η AKT κινάση [129],
- 4) γενικότερα πρωτεΐνες που μεσολαβούν δράσεις του TGF- β , όπως η chaperone Calnexin [235,236], η FZR1 (Cdh1) μέλος του APC/Cdh1 συμπλόκου που στοχεύει για αποικοδόμηση τις SnbN, KLF4 και Skp2 μέσω του TGF- β [229,230,232,234] και η TRAF4 [256],
- 5) πρωτεΐνες που ρυθμίζονται αρνητικά από τον TGF- β , όπως η πρωτεΐνη APC2 [241] και
- 6) πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις Smad2/3, όπως η PRMT5 [219], η AKT [134,135], η FZR1 (Cdh1) [232] και η DOCK 10 (Zizimin 3) (η ομόλογη της Zizimin 1 έχει αναφερθεί ότι αλληλεπιδρά με τη Smad3) [243].

Επίσης οι πρωτεΐνες, PRMT5 μεθυλοτρανσφεράση αργινίνης των ιστονών, η πρωτεΐνη που εμπλέκεται στο μάτισμα του pre-mRNA PRPF4B, η TRAF4 και η TEL2, η οποία ρυθμίζει τη

4. Συζήτηση

σταθερότητα των PIKKs (PI3K related kinases), όπως οι ATM και mTOR, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθότι εντοπίστηκαν σε περισσότερες από μία συνθήκες ή αναγνωρίστηκαν με μεγάλο αριθμό πεπτιδίων.

Τέλος, βρέθηκαν αρκετές πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις Rho GTPάσες, όπως οι GEF πρωτεΐνες DOCK 10 (με ειδικότητα για τη Cdc42) [244], P-Rex2 (με ειδικότητα για τη Rac) [254] και SOS1 (με ειδικότητα για τη Ras) [118], οι πρωτεΐνες τελεστές IQGAP3 (στόχος των Ras, Rac και Cdc42) [250,251] και MRCKβ (στόχος της Cdc42) [262] καθώς και μία GAP πρωτεΐνη για τη Rho GTPάση, η RhoGAP11A, της οποίας η δράση δεν έχει μελετηθεί. Δυστυχώς, όπως προαναφέρθηκε, δε βρέθηκε καμία GEF με ειδικότητα για τη RhoA που ουσιαστικά ήταν και το ζητούμενο αυτής της μελέτης.

5. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά στην παρούσα μελέτη βρέθηκε ότι:

- Ο TGF- β ρυθμίζει τη γρήγορη ενεργοποίηση της RhoA και της RhoB με ένα μηχανισμό, ο οποίος δεν εξαρτάται από τις Smad2/3, ούτε από την κινάση του υποδοχέα τύπου I στα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG3.
- Στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF- β εμπλέκεται η Vav2 GEF με ένα μηχανισμό που εξαρτάται από τη Src κινάση.
- Ο TGF- β επάγει την έκφραση της ισομορφής 2 (Net1A) και όχι την ισομορφή 1 (Net1) της Net1 GEF στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από 1-3 ώρες.
- Η Net1A αποτελεί άμεσο μεταγραφικό στόχο του TGF- β και η επιλεκτική έκφραση της έναντι της Net1 δεν οφείλεται στην ενεργοποίηση κάποιου ειδικού υποκινητή, αλλά στη ρύθμιση του εναλλακτικού ματίσματος από τον TGF- β .
- Στο μηχανισμό ενεργοποίησης της έκφρασης της Net1A από τον TGF- β εμπλέκεται το Smad καθώς και το ERK MAPK μονοπάτι. Η Smad3 είναι απαραίτητη για την επαγωγή της έκφρασης της Net1A από τον TGF- β .
- Η επαγωγή της Net1A από τον TGF- β οδηγεί στην αύξηση των κυτταροπλασματικών επιπέδων της και είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF- β .
- Μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β η Net1A ισομορφή αποτελεί στόχο για αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα, ενώ η Net1 ισομορφή ρυθμίζεται αρνητικά σε επίπεδο mRNA. Η Net1A ρυθμίζεται αρνητικά και σε επίπεδο μετάφρασης από το microRNA, miR-24.
- Τα microRNA, miR-24 και miR-155 στοχεύουν άμεσα την 3'UTR της Net1A και επάγονται από τον TGF- β μετά από 12-24 ώρες.
- Η μείωση των επιπέδων της Net1A μετά από μακρόχρονη επίδραση με TGF- β σχετίζεται με το φαινόμενο της επιθηλιομεσεγχυματικής μετατροπής (EMT), καθώς η αποσιώπηση της Net1A ενίσχυσε τον μεσεγχυματικό φαινότυπο κατά την EMT που επάγεται από τον TGF- β , οδηγώντας σε μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων των μεσεγχυματικών δεικτών N-cadherin, Fibronectin, PAI-1 και του καταστολέα της E-cadherin, Slug, ενώ παράλληλα απορύθμισε τις διακυτταρικές συνδέσεις που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1 και οδήγησε σε αλλοίωση της επιθηλιακής μορφολογίας ακόμη και απουσία TGF- β .
- Το miR-24 εμπλέκεται στο μηχανισμό της επαγόμενης από τον TGF- β EMT, καθώς η υπερέκφραση του επίσης οδήγησε σε ενίσχυση του μεσεγχυματικού φαινοτύπου κατά την EMT που επάγεται από τον TGF- β , μέσω της αυξημένης έκφρασης των N-cadherin, Fibronectin, PAI-1 και Slug, αλλά και μέσω αποσταθεροποίησης των διακυτταρικών συνδέσεων που μεσολαβούνται από την E-cadherin και τη ZO-1 ακόμη και απουσία TGF- β .

- Τα επίπεδα mRNA της Net1A ισομορφής εμφανίζουν πολύ μεγάλη διακύμανση μεταξύ διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών, ενώ τα επίπεδα mRNA της Net1 ισομορφής έχουν πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλες τις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν. Οι πιο επιθετικές, μεταστατικές ή μεσεγχυματικές καρκινικές σειρές (T47D, WM9, M5, H1650, H157, DU145, HT1080, MG63) χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα mRNA για τη Net1A ισομορφή.
- Η αύξηση των επιπέδων mRNA της Net1A μετά από σύντομη επίδραση με TGF- β είναι ένα φαινόμενο που δεν περιορίζεται στα HaCaT κερατινοκύτταρα, καθώς παρατηρήθηκε επίσης στα MDAMB231 και T47D καρκινικά κύτταρα μαστού, αλλά δεν αφορά όλα τα κυτταρικά συστήματα που μελετήθηκαν. Η Net1 ισομορφή όμως μειώνεται μετά από 24-48 ώρες επίδρασης με TGF- β σε όλες τις καρκινικές σειρές που μελετήθηκαν.
- Τα miR-24 και miR-155 επάγονται επίσης στα καρκινικά κύτταρα μαστού T47D, MDAMB231, καθώς και στα καρκινικά κύτταρα προστάτη DU145 σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα φυσιολογικά HaCaT κερατινοκύτταρα.
- Το miR-24 παίζει σημαντικό ρόλο στη διεισδυτικότητα των καρκινικών κυττάρων μαστού T47D, BT474, MCF7 και SKBR3 που επάγεται από τον TGF- β μέσω ρύθμισης της Net1A.
- Το μονοπάτι miR-24/Net1A φαίνεται να ενεργοποιείται κατά τη μεταστατική διαδικασία στον καρκίνο του μαστού, καθότι τα επίπεδα του miR-24 βρέθηκαν αυξημένα, ενώ τα επίπεδα της Net1A βρέθηκαν ελαττωμένα σε μεταστατικούς καρκίνους του μαστού σε σχέση με τους πρωτογενείς όγκους.
- Το γονίδιο της α -SMA επάγεται από τον TGF- β με ένα μηχανισμό που εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τη Smad3 και λιγότερο από τη Smad2, καθώς και από το μονοπάτι της ROCK κινάσης.
- Η Smad3 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενσωμάτωση της α -SMA στα ινίδια του στρες που δημιουργούνται σε Swiss 3T3 ινοβλάστες κατά τη διαφοροποίησή τους σε μύοινοβλάστες από τον TGF- β .

Βιβλιογραφία

1. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **1998**; 279:509-14.
2. Burridge K and Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* **2004**; 116:167-79.
3. Schmidt A and Hall A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **2002**; 16:1587-609.
4. Wennerberg K and Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **2004**; 117:1301-12.
5. Vega FM and Ridley AJ. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* **2008**; 582:2093-101.
6. Aspenstrom P, Ruusala A and Pacholsky D. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res* **2007**; 313:3673-9.
7. Riento K, Totty N, Villalonga P, Garg R, Guasch R and Ridley AJ. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *EMBO J* **2005**; 24:1170-80.
8. Rolli-Derkinderen M, Sauzeau V, Boyer L, Lemichez E, Baron C, Henrion D, *et al.* Phosphorylation of serine 188 protects RhoA from ubiquitin/proteasome-mediated degradation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **2005**; 96:1152-60.
9. Bishop AL and Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **2000**; 348 Pt 2:241-55.
10. Takahashi K, Sasaki T, Mammoto A, Takaishi K, Kameyama T, Tsukita S, *et al.* Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem* **1997**; 272:23371-5.
11. Yamashita T and Tohyama M. The p75 receptor acts as a displacement factor that releases Rho from Rho-GDI. *Nat Neurosci* **2003**; 6:461-7.
12. Del Pozo MA, Kiosses WB, Alderson NB, Meller N, Hahn KM and Schwartz MA. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* **2002**; 4:232-9.
13. Symons M and Settleman J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends Cell Biol* **2000**; 10:415-9.
14. Rossman KL, Der CJ and Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**; 6:167-80.
15. Garcia-Mata R and Burridge K. Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol* **2007**; 17:36-43.
16. Meller N, Merlot S and Guda C. CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* **2005**; 118:4937-46.
17. Vanni C, Parodi A, Mancini P, Visco V, Ottaviano C, Torrisi MR, *et al.* Phosphorylation-independent membrane relocalization of ezrin following association with Dbl in vivo. *Oncogene* **2004**; 23:4098-106.
18. Hornstein I, Alcover A and Katzav S. Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* **2004**; 16:1-11.
19. Bustelo XR. Regulatory and signaling properties of the Vav family. *Mol Cell Biol* **2000**; 20:1461-77.
20. Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, *et al.* Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* **1998**; 279:558-60.
21. Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, *et al.* Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galphai3. *Science* **1998**; 280:2112-4.
22. Wells CD, Liu MY, Jackson M, Gutowski S, Sternweis PM, Rothstein JD, *et al.* Mechanisms for reversible regulation between G13 and Rho exchange factors. *J Biol Chem* **2002**; 277:1174-81.
23. Hoffman GR and Cerione RA. Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS Lett* **2002**; 513:85-91.
24. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L and Chen YW. Ankyrin-Tiam1 interaction promotes Rac1 signaling and metastatic breast tumor cell invasion and migration. *J Cell Biol* **2000**; 150:177-91.
25. Bourguignon LY, Zhu H, Shao L and Chen YW. CD44 interaction with tiam1 promotes Rac1 signaling and hyaluronic acid-mediated breast tumor cell migration. *J Biol Chem* **2000**; 275:1829-38.
26. Krendel M, Zenke FT and Bokoch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* **2002**; 4:294-301.
27. Buday L and Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* **1993**; 73:611-20.

28. Qin H, Carr HS, Wu X, Muallem D, Tran NH and Frost JA. Characterization of the biochemical and transforming properties of the neuroepithelial transforming protein 1. *J Biol Chem* **2005**; 280:7603-13.
29. Schmidt A and Hall A. The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem* **2002**; 277:14581-8.
30. Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto I and Miki T. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* **1999**; 147:921-8.
31. Moon SY and Zheng Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **2003**; 13:13-22.
32. Tcherkezian J and Lamarche-Vane N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* **2007**; 99:67-86.
33. Roof RW, Haskell MD, Dukes BD, Sherman N, Kinter M and Parsons SJ. Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol Cell Biol* **1998**; 18:7052-63.
34. Ohta Y, Hartwig JH and Stossel TP. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol* **2006**; 8:803-14.
35. Ridley AJ, Self AJ, Kasmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, *et al.* rho family GTPase activating proteins p190, bcr and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* **1993**; 12:5151-60.
36. Jaffe AB and Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2005**; 21:247-69.
37. Ho HY, Rohatgi R, Lebensohn AM, Le M, Li J, Gygi SP, *et al.* Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell* **2004**; 118:203-16.
38. Eden S, Rohatgi R, Podtelejnikov AV, Mann M and Kirschner MW. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* **2002**; 418:790-3.
39. Stossel TP, Condeelis J, Cooley L, Hartwig JH, Noegel A, Schleicher M, *et al.* Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**; 2:138-45.
40. Heasman SJ and Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2008**; 9:690-701.
41. Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM and Gill GN. Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* **1999**; 1:253-9.
42. Sanders LC, Matsumura F, Bokoch GM and de Lanerolle P. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **1999**; 283:2083-5.
43. van Leeuwen FN, van Delft S, Kain HE, van der Kammen RA and Collard JG. Rac regulates phosphorylation of the myosin-II heavy chain, actinomyosin disassembly and cell spreading. *Nat Cell Biol* **1999**; 1:242-8.
44. Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **1996**; 273:245-8.
45. Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, *et al.* Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **1996**; 271:20246-9.
46. Riento K and Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**; 4:446-56.
47. Zigmond SH. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol* **2004**; 16:99-105.
48. Wheeler AP and Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* **2004**; 301:43-9.
49. Adamson P, Paterson HF and Hall A. Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol* **1992**; 119:617-27.
50. Prendergast GC. Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2001**; 1:162-8.
51. Zalzman G, Closson V, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honore N, Tavitian A, *et al.* Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* **1995**; 10:1935-45.
52. Arthur WT, Ellerbroek SM, Der CJ, Burridge K and Wennerberg K. XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J Biol Chem* **2002**; 277:42964-72.
53. Sahai E and Marshall CJ. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* **2002**; 4:408-15.
54. Ridley AJ. Rho proteins and cancer. *Breast Cancer Res Treat* **2004**; 84:13-9.
55. Wu M, Wu ZF, Kumar-Sinha C, Chinnaiyan A and Merajver SD. RhoC induces differential expression of genes involved in invasion and metastasis in MCF10A breast cells. *Breast Cancer Res Treat* **2004**; 84:3-12.
56. Ma L, Teruya-Feldstein J and Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* **2007**; 449:682-8.

57. Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oettgen P, *et al.* Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene* **2006**; 25:6959-67.
58. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S and Sebti S. Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol* **2004**; 24:5565-76.
59. Allal C, Pradines A, Hamilton AD, Sebti SM and Favre G. Farnesylated RhoB prevents cell cycle arrest and actin cytoskeleton disruption caused by the geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-298. *Cell Cycle* **2002**; 1:430-7.
60. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **2003**; 302:1704-9.
61. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N and Matsuda M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* **2002**; 22:6582-91.
62. Merlot S and Firtel RA. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* **2003**; 116:3471-8.
63. Raftopoulou M and Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **2004**; 265:23-32.
64. Worthylake RA and Burridge K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* **2003**; 278:13578-84.
65. Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomsen GH, *et al.* Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **2003**; 302:1775-9.
66. Tomar A and Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr Opin Cell Biol* **2009**; 21:676-83.
67. Sahai E and Marshall CJ. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **2003**; 5:711-9.
68. Baum B and Georgiou M. Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* **2011**; 192:907-17.
69. Georgiou M, Marinari E, Burden J and Baum B. Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr Biol* **2008**; 18:1631-8.
70. Braga VM. Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* **2002**; 14:546-56.
71. Ehrlich JS, Hansen MD and Nelson WJ. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **2002**; 3:259-70.
72. Wallace SW, Durgan J, Jin D and Hall A. Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B. *Mol Biol Cell* **2010**; 21:2996-3006.
73. Yamanaka T, Horikoshi Y, Suzuki A, Sugiyama Y, Kitamura K, Maniwa R, *et al.* PAR-6 regulates aPKC activity in a novel way and mediates cell-cell contact-induced formation of the epithelial junctional complex. *Genes Cells* **2001**; 6:721-31.
74. Izumi G, Sakisaka T, Baba T, Tanaka S, Morimoto K and Takai Y. Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J Cell Biol* **2004**; 166:237-48.
75. Chen X and Macara IG. Par-3 controls tight junction assembly through the Rac exchange factor Tiam1. *Nat Cell Biol* **2005**; 7:262-9.
76. Mertens AE, Rygiel TP, Olivo C, van der Kammen R and Collard JG. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol* **2005**; 170:1029-37.
77. Otani T, Ichii T, Aono S and Takeichi M. Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *J Cell Biol* **2006**; 175:135-46.
78. Kawasaki Y, Sato R and Akiyama T. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol* **2003**; 5:211-5.
79. Shewan AM, Maddugoda M, Kraemer A, Stehbins SJ, Verma S, Kovacs EM, *et al.* Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* **2005**; 16:4531-42.
80. Smutny M, Cox HL, Leerberg JM, Kovacs EM, Conti MA, Ferguson C, *et al.* Myosin II isoforms identify distinct functional modules that support integrity of the epithelial zonula adherens. *Nat Cell Biol* **2010**; 12:696-702.
81. Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, *et al.* Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **2001**; 12:27-36.
82. Takaishi K, Sasaki T, Kato M, Yamochi W, Kuroda S, Nakamura T, *et al.* Involvement of Rho p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. *Oncogene* **1994**; 9:273-9.

83. Warner SJ and Longmore GD. Cdc42 antagonizes Rho1 activity at adherens junctions to limit epithelial cell apical tension. *J Cell Biol* **2009**; 187:119-33.
84. Warner SJ and Longmore GD. Distinct functions for Rho1 in maintaining adherens junctions and apical tension in remodeling epithelia. *J Cell Biol* **2009**; 185:1111-25.
85. Bierie B and Moses HL. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**; 6:506-20.
86. Piek E, Heldin CH and Ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* **1999**; 13:2105-24.
87. Schmierer B and Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**; 8:970-82.
88. Siegel PM and Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **2003**; 3:807-21.
89. Shi Y and Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **2003**; 113:685-700.
90. Massague J, Seoane J and Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* **2005**; 19:2783-810.
91. Moustakas A, Souchelnytskyi S and Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* **2001**; 114:4359-69.
92. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I and Massague J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **1999**; 13:804-16.
93. Wicks SJ, Lui S, Abdel-Wahab N, Mason RM and Chantry A. Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II. *Mol Cell Biol* **2000**; 20:8103-11.
94. Yakymovych I, Ten Dijke P, Heldin CH and Souchelnytskyi S. Regulation of Smad signaling by protein kinase C. *FASEB J* **2001**; 15:553-5.
95. Liu F. Smad3 phosphorylation by cyclin-dependent kinases. *Cytokine Growth Factor Rev* **2006**; 17:9-17.
96. Massague J and Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* **2000**; 19:1745-54.
97. Itoh S, Ericsson J, Nishikawa J, Heldin CH and ten Dijke P. The transcriptional co-activator P/CAF potentiates TGF-beta/Smad signaling. *Nucleic Acids Res* **2000**; 28:4291-8.
98. Derynck R, Zhang Y and Feng XH. Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* **1998**; 95:737-40.
99. Liu X, Sun Y, Weinberg RA and Lodish HF. Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **2001**; 12:1-8.
100. de Caestecker MP, Yahata T, Wang D, Parks WT, Huang S, Hill CS, *et al.* The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem* **2000**; 275:2115-22.
101. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A and Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98:974-9.
102. Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, *et al.* Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell* **2001**; 12:1431-43.
103. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, *et al.* Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* **2001**; 276:12477-80.
104. Suzuki C, Murakami G, Fukuchi M, Shimanuki T, Shikauchi Y, Imamura T, *et al.* Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* **2002**; 277:39919-25.
105. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L and Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **1998**; 95:779-91.
106. Miura S, Takeshita T, Asao H, Kimura Y, Murata K, Sasaki Y, *et al.* Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Mol Cell Biol* **2000**; 20:9346-55.
107. Murphy C. Endo-fin-ally a SARA for BMP receptors. *J Cell Sci* **2007**; 120:1153-5.
108. Shi W, Chang C, Nie S, Xie S, Wan M and Cao X. Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* **2007**; 120:1216-24.
109. Xu L, Chen YG and Massague J. The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* **2000**; 2:559-62.
110. Stenmark H and Aasland R. FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid. *J Cell Sci* **1999**; 112 (Pt 23):4175-83.

111. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF and Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* **2003**; 5:410-21.
112. Le Roy C and Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2005**; 6:112-26.
113. Moustakas A and Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **2005**; 118:3573-84.
114. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **2009**; 19:128-39.
115. Frey RS and Mulder KM. TGFbeta regulation of mitogen-activated protein kinases in human breast cancer cells. *Cancer Lett* **1997**; 117:41-50.
116. Hartsough MT and Mulder KM. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* **1995**; 270:7117-24.
117. Mucsi I, Skorecki KL and Goldberg HJ. Extracellular signal-regulated kinase and the small GTP-binding protein, Rac, contribute to the effects of transforming growth factor-beta1 on gene expression. *J Biol Chem* **1996**; 271:16567-72.
118. Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* **2007**; 26:3957-67.
119. Lawler S, Feng XH, Chen RH, Maruoka EM, Turck CW, Griswold-Prenner I, *et al.* The type II transforming growth factor-beta receptor autophosphorylates not only on serine and threonine but also on tyrosine residues. *J Biol Chem* **1997**; 272:14850-9.
120. Galliher AJ and Schiemann WP. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* **2007**; 67:3752-8.
121. Engel ME, McDonnell MA, Law BK and Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* **1999**; 274:37413-20.
122. Hocevar BA, Brown TL and Howe PH. TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* **1999**; 18:1345-56.
123. Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, *et al.* Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* **1999**; 274:27161-7.
124. Yu L, Hebert MC and Zhang YE. TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. *EMBO J* **2002**; 21:3749-59.
125. Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, *et al.* Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **1995**; 270:2008-11.
126. Watkins SJ, Jonker L and Arthur HM. A direct interaction between TGFbeta activated kinase 1 and the TGFbeta type II receptor: implications for TGFbeta signalling and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* **2006**; 69:432-9.
127. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N, *et al.* The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* **2008**; 10:1199-207.
128. Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z and Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* **2008**; 31:918-24.
129. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL and Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* **2000**; 275:36803-10.
130. Shin I, Bakin AV, Rodeck U, Brunet A and Arteaga CL. Transforming growth factor beta enhances epithelial cell survival via Akt-dependent regulation of FKHL1. *Mol Biol Cell* **2001**; 12:3328-39.
131. Wilkes MC, Mitchell H, Penheiter SG, Dore JJ, Suzuki K, Edens M, *et al.* Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* **2005**; 65:10431-40.
132. Yi JY, Shin I and Arteaga CL. Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **2005**; 280:10870-6.
133. Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, Lee EH, Krystal G, Ali S, *et al.* Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol* **2002**; 4:963-9.
134. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr., Ko TC and Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* **2004**; 6:366-72.
135. Remy I, Montmarquette A and Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* **2004**; 6:358-65.
136. Vardoulis L, Moustakas A and Stournaras C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **2005**; 280:11448-57.

137. Chen S, Crawford M, Day RM, Briones VR, Leader JE, Jose PA, *et al.* RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *J Biol Chem* **2006**; 281:1765-70.
138. Deaton RA, Su C, Valencia TG and Grant SR. Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK. *J Biol Chem* **2005**; 280:31172-81.
139. Edlund S, Landstrom M, Heldin CH and Aspenstrom P. Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* **2002**; 13:902-14.
140. Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, *et al.* Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* **2003**; 162:1089-98.
141. Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkowa M, Zhao X, Wrana JL and Attisano L. Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J* **2004**; 23:4792-801.
142. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y and Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **2005**; 307:1603-9.
143. Wilkes MC, Murphy SJ, Garamszegi N and Leof EB. Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol Cell Biol* **2003**; 23:8878-89.
144. Edlund S, Landstrom M, Heldin CH and Aspenstrom P. Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42. *J Cell Sci* **2004**; 117:1835-47.
145. Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, *et al.* High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science* **2005**; 307:1621-5.
146. Ueda Y, Wang S, Dumont N, Yi JY, Koh Y and Arteaga CL. Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility. *J Biol Chem* **2004**; 279:24505-13.
147. Yingling JM, Blanchard KL and Sawyer JS. Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2004**; 3:1011-22.
148. Ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F and Itoh S. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* **2002**; 191:1-16.
149. Alexandrow MG and Moses HL. Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer Res* **1995**; 55:1452-7.
150. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **2004**; 432:298-306.
151. Pardali K and Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* **2007**; 1775:21-62.
152. Chen CR, Kang Y, Siegel PM and Massague J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. *Cell* **2002**; 110:19-32.
153. Derynck R and Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* **2007**; 9:1000-4.
154. Thiery JP and Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**; 7:131-42.
155. Zavadil J and Bottlinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* **2005**; 24:5764-74.
156. Levayer R and Lecuit T. Breaking down EMT. *Nat Cell Biol* **2008**; 10:757-9.
157. Perez-Moreno M, Jamora C and Fuchs E. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell* **2003**; 112:535-48.
158. Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarnar S, Nagy V, *et al.* A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *EMBO J* **2002**; 21:1948-56.
159. Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N and Bottlinger EP. Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* **2004**; 23:1155-65.
160. Maeda M, Johnson KR and Wheelock MJ. Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J Cell Sci* **2005**; 118:873-87.
161. Guaita S, Puig I, Franci C, Garrido M, Dominguez D, Batlle E, *et al.* Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression. *J Biol Chem* **2002**; 277:39209-16.
162. Maschler S, Wirl G, Spring H, Bredow DV, Sordat I, Beug H, *et al.* Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* **2005**; 24:2032-41.
163. Li Y, Yang J, Dai C, Wu C and Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest* **2003**; 112:503-16.

164. Prunier C and Howe PH. Disabled-2 (Dab2) is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT). *J Biol Chem* **2005**; 280:17540-8.
165. Kowanetz M, Valcourt U, Bergstrom R, Heldin CH and Moustakas A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol* **2004**; 24:4241-54.
166. Peinado H, Portillo F and Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol* **2004**; 48:365-75.
167. Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, *et al.* The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* **2001**; 7:1267-78.
168. Vandewalle C, Comijn J, De Craene B, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, *et al.* SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* **2005**; 33:6566-78.
169. Moustakas A and Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* **2007**; 98:1512-20.
170. Peinado H, Quintanilla M and Cano A. Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* **2003**; 278:21113-23.
171. Romano LA and Runyan RB. Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Dev Biol* **2000**; 223:91-102.
172. Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH and Moustakas A. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **2006**; 174:175-83.
173. Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, *et al.* A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene* **2006**; 25:3170-85.
174. Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, *et al.* Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **2006**; 116:1561-70.
175. Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S and Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **1998**; 17:3091-100.
176. Hua X, Liu X, Ansari DO and Lodish HF. Synergistic cooperation of TFE3 and smad proteins in TGF-beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Genes Dev* **1998**; 12:3084-95.
177. Kutz SM, Hordines J, McKeown-Longo PJ and Higgins PJ. TGF-beta1-induced PAI-1 gene expression requires MEK activity and cell-to-substrate adhesion. *J Cell Sci* **2001**; 114:3905-14.
178. Itoh S, Thorikay M, Kowanetz M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, *et al.* Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* **2003**; 278:3751-61.
179. Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, Bert AG, Wang J, Shannon MF, *et al.* A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* **2008**; 68:7846-54.
180. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* **2008**; 10:593-601.
181. Gregory PA, Bracken CP, Smith E, Bert AG, Wright JA, Roslan S, *et al.* An autocrine TGF-beta/ZEB/miR-200 signaling network regulates establishment and maintenance of epithelial-mesenchymal transition. *Mol Biol Cell* **2011**; 22:1686-98.
182. Korpala M, Lee ES, Hu G and Kang Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J Biol Chem* **2008**; 283:14910-4.
183. Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, *et al.* MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* **2008**; 28:6773-84.
184. Moustakas A and Heldin CH. Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett* **2008**; 582:2051-65.
185. Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A and Stournaras C. Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J* **2009**; 276:2947-65.
186. Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X and Zehner ZE. TGFbeta1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochim Biophys Acta* **2007**; 1773:427-39.
187. Tavares AL, Mercado-Pimentel ME, Runyan RB and Kitten GT. TGF beta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart. *Dev Dyn* **2006**; 235:1589-98.

188. Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, *et al.* Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* **2003**; 284:F911-24.
189. Lee J, Ko M and Joo CK. Rho plays a key role in TGF-beta1-induced cytoskeletal rearrangement in human retinal pigment epithelium. *J Cell Physiol* **2008**; 216:520-6.
190. Moustakas A and Stournaras C. Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci* **1999**; 112 (Pt 8):1169-79.
191. Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Szucs G, Spriewald BM, Zwerina J, *et al.* Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **2008**; 58:2553-64.
192. Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D and Stournaras C. A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* **2008**; 275:4074-87.
193. Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J and Wang XF. The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* **2001**; 276:15362-8.
194. Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C and Kardassis D. Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *FASEB J* **2010**; 24:891-905.
195. Alberts AS and Treisman R. Activation of RhoA and SAPK/JNK signalling pathways by the RhoA-specific exchange factor mNET1. *EMBO J* **1998**; 17:4075-85.
196. Chan AM, Takai S, Yamada K and Miki T. Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning. *Oncogene* **1996**; 12:1259-66.
197. Garcia-Mata R, Dubash AD, Sharek L, Carr HS, Frost JA and Burrridge K. The nuclear RhoA exchange factor Net1 interacts with proteins of the Dlg family, affects their localization, and influences their tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* **2007**; 27:8683-97.
198. Carr HS, Cai C, Keinanen K and Frost JA. Interaction of the RhoA exchange factor Net1 with discs large homolog 1 protects it from proteasome-mediated degradation and potentiates Net1 activity. *J Biol Chem* **2009**; 284:24269-80.
199. Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **2004**; 18:1909-25.
200. Humbert P, Russell S and Richardson H. Dlg, Scribble and Lgl in cell polarity, cell proliferation and cancer. *Bioessays* **2003**; 25:542-53.
201. Braga VM, Del Maschio A, Machesky L and Dejana E. Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell* **1999**; 10:9-22.
202. Braga VM, Machesky LM, Hall A and Hotchin NA. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* **1997**; 137:1421-31.
203. Dubash AD, Guilluy C, Srougi MC, Boulter E, Burrridge K and Garcia-Mata R. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS One* **2011**; 6:e17380.
204. Srougi MC and Burrridge K. The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS One* **2011**; 6:e17108.
205. Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y and Sheng G. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* **2008**; 10:765-75.
206. Lee J, Moon HJ, Lee JM and Joo CK. Smad3 regulates Rho signaling via NET1 in the transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* **2010**; 285:26618-27.
207. Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, *et al.* Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* **1999**; 10:3801-13.
208. Bernard PS and Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem* **2002**; 48:1178-85.
209. Atfi A, Drobetsky E, Boissonneault M, Chapdelaine A and Chevalier S. Transforming growth factor beta down-regulates Src family protein tyrosine kinase signaling pathways. *J Biol Chem* **1994**; 269:30688-93.
210. Fukuda K, Kawata S, Tamura S, Matsuda Y, Inui Y, Igura T, *et al.* Transforming growth factor-beta1-induced degradation of activated Src tyrosine kinase in rat fibroblasts. *Oncogene* **1998**; 16:3349-56.
211. Mishra R, Zhu L, Eckert RL and Simonson MS. TGF-beta-regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals. *Am J Physiol Cell Physiol* **2007**; 292:C1361-9.
212. Abe K, Rossman KL, Liu B, Ritola KD, Chiang D, Campbell SL, *et al.* Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem* **2000**; 275:10141-9.

213. Garcia-Mata R, Wennerberg K, Arthur WT, Noren NK, Ellerbroek SM and Burridge K. Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol* **2006**; 406:425-37.
214. Burridge K and Doughman R. Front and back by Rho and Rac. *Nat Cell Biol* **2006**; 8:781-2.
215. Banh A, Deschamps PA, Vijayan MM, Sivak JG and West-Mays JA. The role of Hsp70 and Hsp90 in TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in rat lens epithelial explants. *Mol Vis* **2007**; 13:2248-62.
216. Wrighton KH, Lin X and Feng XH. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**; 105:9244-9.
217. Aggarwal P, Vaites LP, Kim JK, Mellert H, Gurung B, Nakagawa H, *et al.* Nuclear cyclin D1/CDK4 kinase regulates CUL4 expression and triggers neoplastic growth via activation of the PRMT5 methyltransferase. *Cancer Cell* **2010**; 18:329-40.
218. Scoumanne A, Zhang J and Chen X. PRMT5 is required for cell-cycle progression and p53 tumor suppressor function. *Nucleic Acids Res* **2009**; 37:4965-76.
219. Tabata T, Kokura K, Ten Dijke P and Ishii S. Ski co-repressor complexes maintain the basal repressed state of the TGF-beta target gene, SMAD7, via HDAC3 and PRMT5. *Genes Cells* **2009**; 14:17-28.
220. Tanaka H, Hoshikawa Y, Oh-hara T, Koike S, Naito M, Noda T, *et al.* PRMT5, a novel TRAIL receptor-binding protein, inhibits TRAIL-induced apoptosis via nuclear factor-kappaB activation. *Mol Cancer Res* **2009**; 7:557-69.
221. Lee HJ, Lee SH, Park SH, Sharoar MG, Shin SY, Lee JS, *et al.* Purification of catalytically active caspase-12 and its biochemical characterization. *Arch Biochem Biophys* **2010**; 502:68-73.
222. Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P and Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* **2002**; 22:270-85.
223. Montero JC, Rodriguez-Barrueco R, Ocana A, Diaz-Rodriguez E, Esparis-Ogando A and Pandiella A. Neuregulins and cancer. *Clin Cancer Res* **2008**; 14:3237-41.
224. Wang JY, Frenzel KE, Wen D and Falls DL. Transmembrane neuregulins interact with LIM kinase 1, a cytoplasmic protein kinase implicated in development of visuospatial cognition. *J Biol Chem* **1998**; 273:20525-34.
225. Chen HJ, Lin CM, Lin CS, Perez-Olle R, Leung CL and Liem RK. The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes Dev* **2006**; 20:1933-45.
226. Mukherjee P, Winter SL and Alexandrow MG. Cell cycle arrest by transforming growth factor beta1 near G1/S is mediated by acute abrogation of prereplication complex activation involving an Rb-MCM interaction. *Mol Cell Biol* **2010**; 30:845-56.
227. Shu FJ, Ramineni S, Amyot W and Hepler JR. Selective interactions between Gi alpha1 and Gi alpha3 and the GoLoco/GPR domain of RGS14 influence its dynamic subcellular localization. *Cell Signal* **2007**; 19:163-76.
228. Traver S, Bidot C, Spassky N, Baltauss T, De Tand MF, Thomas JL, *et al.* RGS14 is a novel Rap effector that preferentially regulates the GTPase activity of galphao. *Biochem J* **2000**; 350 Pt 1:19-29.
229. Hu D and Wan Y. Regulation of Kruppel-like factor 4 by the anaphase promoting complex pathway is involved in TGF-beta signaling. *J Biol Chem* **2011**; 286:6890-901.
230. Liu W, Wu G, Li W, Lobur D and Wan Y. Cdh1-anaphase-promoting complex targets Skp2 for destruction in transforming growth factor beta-induced growth inhibition. *Mol Cell Biol* **2007**; 27:2967-79.
231. Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, *et al.* The anaphase-promoting complex/cyclosome activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol Cell Biol* **2010**; 30:3994-4005.
232. Nourry C, Maksumova L, Pang M, Liu X and Wang T. Direct interaction between Smad3, APC10, CDH1 and HEF1 in proteasomal degradation of HEF1. *BMC Cell Biol* **2004**; 5:20.
233. Sigl R, Wandke C, Rauch V, Kirk J, Hunt T and Geley S. Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *J Cell Sci* **2009**; 122:4208-17.
234. Wan Y, Liu X and Kirschner MW. The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* **2001**; 8:1027-39.
235. Li HD, Liu WX and Michalak M. Enhanced clathrin-dependent endocytosis in the absence of calnexin. *PLoS One* **2011**; 6:e21678.
236. Lomako J, Lomako WM, Carothers Carraway CA and Carraway KL. Regulation of the membrane mucin Muc4 in corneal epithelial cells by proteosomal degradation and TGF-beta. *J Cell Physiol* **2010**; 223:209-14.
237. Takai H, Wang RC, Takai KK, Yang H and de Lange T. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell* **2007**; 131:1248-59.

238. Takai H, Xie Y, de Lange T and Pavletich NP. Tel2 structure and function in the Hsp90-dependent maturation of mTOR and ATR complexes. *Genes Dev* **2010**; 24:2019-30.
239. Cook BD, Ferrari G, Pintucci G and Mignatti P. TGF-beta1 induces rearrangement of FLK-1-VE-cadherin-beta-catenin complex at the adherens junction through VEGF-mediated signaling. *J Cell Biochem* **2008**; 105:1367-73.
240. Shih SC, Ju M, Liu N, Mo JR, Ney JJ and Smith LE. Transforming growth factor beta1 induction of vascular endothelial growth factor receptor 1: mechanism of pericyte-induced vascular survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**; 100:15859-64.
241. Satterwhite DJ and Neufeld KL. TGF-beta targets the Wnt pathway components, APC and beta-catenin, as Mv1Lu cells undergo cell cycle arrest. *Cell Cycle* **2004**; 3:1069-73.
242. Senda T, Shimomura A and Iizuka-Kogo A. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int* **2005**; 80:121-31.
243. Brown KA, Ham AJ, Clark CN, Meller N, Law BK, Chytil A, et al. Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF-beta1. *J Cell Biochem* **2008**; 105:596-611.
244. Gadea G, Sanz-Moreno V, Self A, Godi A and Marshall CJ. DOCK10-mediated Cdc42 activation is necessary for amoeboid invasion of melanoma cells. *Curr Biol* **2008**; 18:1456-65.
245. Kedinger V and Nepveu A. The roles of CUX1 homeodomain proteins in the establishment of a transcriptional program required for cell migration and invasion. *Cell Adh Migr* **2010**; 4:348-52.
246. Michl P and Downward J. CUTL1: a key mediator of TGFbeta-induced tumor invasion. *Cell Cycle* **2006**; 5:132-4.
247. Michl P, Ramjaun AR, Pardo OE, Warne PH, Wagner M, Poulsom R, et al. CUTL1 is a target of TGF(beta) signaling that enhances cancer cell motility and invasiveness. *Cancer Cell* **2005**; 7:521-32.
248. Ripka S, Neesse A, Riedel J, Bug E, Aigner A, Poulsom R, et al. CUX1: target of Akt signalling and mediator of resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Gut* **2010**; 59:1101-10.
249. Pollmann M, Parwaresch R, Adam-Klages S, Kruse ML, Buck F and Heidebrecht HJ. Human EML4, a novel member of the EMAP family, is essential for microtubule formation. *Exp Cell Res* **2006**; 312:3241-51.
250. Nojima H, Adachi M, Matsui T, Okawa K and Tsukita S. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **2008**; 10:971-8.
251. Wang S, Watanabe T, Noritake J, Fukata M, Yoshimura T, Itoh N, et al. IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci* **2007**; 120:567-77.
252. Cardoso CM, Groth-Pedersen L, Hoyer-Hansen M, Kirkegaard T, Corcelle E, Andersen JS, et al. Depletion of kinesin 5B affects lysosomal distribution and stability and induces peri-nuclear accumulation of autophagosomes in cancer cells. *PLoS One* **2009**; 4:e4424.
253. Vembar SS, Jin Y, Brodsky JL and Hendershot LM. The mammalian Hsp40 ERdj3 requires its Hsp70 interaction and substrate-binding properties to complement various yeast Hsp40-dependent functions. *J Biol Chem* **2009**; 284:32462-71.
254. Donald S, Hill K, Lecureuil C, Barnouin R, Krugmann S, John Coadwell W, et al. P-Rex2, a new guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *FEBS Lett* **2004**; 572:172-6.
255. Fleckenstein DS, Dirks WG, Drexler HG and Quentmeier H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 4 is a new binding partner for the p70S6 serine/threonine kinase. *Leuk Res* **2003**; 27:687-94.
256. Kalkan T, Iwasaki Y, Park CY and Thomsen GH. Tumor necrosis factor-receptor-associated factor-4 is a positive regulator of transforming growth factor-beta signaling that affects neural crest formation. *Mol Biol Cell* **2009**; 20:3436-50.
257. Kedinger V, Alpy F, Baguet A, Polette M, Stoll I, Chenard MP, et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 4 is a dynamic tight junction-related shuttle protein involved in epithelium homeostasis. *PLoS One* **2008**; 3:e3518.
258. Rozan LM and El-Deiry WS. Identification and characterization of proteins interacting with Traf4, an enigmatic p53 target. *Cancer Biol Ther* **2006**; 5:1228-35.
259. Wang SE, Shin I, Wu FY, Friedman DB and Arteaga CL. HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* **2006**; 66:9591-600.
260. Etheridge LA, Crawford TQ, Zhang S and Roelink H. Evidence for a role of vertebrate Disp1 in long-range Shh signaling. *Development* **2010**; 137:133-40.
261. Fuchshofer R, Stephan DA, Russell P and Tamm ER. Gene expression profiling of TGFbeta2-and/or BMP7-treated trabecular meshwork cells: Identification of Smad7 as a critical inhibitor of TGF-beta2 signaling. *Exp Eye Res* **2009**; 88:1020-32.
262. Huo L, Wen W, Wang R, Kam C, Xia J, Feng W, et al. Cdc42-dependent formation of the ZO-1/MRCKbeta complex at the leading edge controls cell migration. *EMBO J* **2011**; 30:665-78.

263. Hershkovitz D, Gross Y, Nahum S, Yehezkel S, Sarig O, Uitto J, *et al.* Functional characterization of SAMD9, a protein deficient in normophosphatemic familial tumoral calcinosis. *J Invest Dermatol* **2011**; 131:662-9.
264. Chao WT, Daquinag AC, Ashcroft F and Kunz J. Type I PIPK-alpha regulates directed cell migration by modulating Rac1 plasma membrane targeting and activation. *J Cell Biol* **2010**; 190:247-62.
265. Wu ZH, Wong ET, Shi Y, Niu J, Chen Z, Miyamoto S, *et al.* ATM- and NEMO-dependent ELKS ubiquitination coordinates TAK1-mediated IKK activation in response to genotoxic stress. *Mol Cell* **2010**; 40:75-86.
266. Gu Z, Zhou L, Gao S and Wang Z. Nuclear transport signals control cellular localization and function of androgen receptor cofactor p44/WDR77. *PLoS One* **2011**; 6:e22395.
267. Shin JN, Kim I, Lee JS, Koh GY, Lee ZH and Kim HH. A novel zinc finger protein that inhibits osteoclastogenesis and the function of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *J Biol Chem* **2002**; 277:8346-53.
268. Schneider M, Hsiao HH, Will CL, Giet R, Urlaub H and Luhrmann R. Human PRP4 kinase is required for stable tri-snRNP association during spliceosomal B complex formation. *Nat Struct Mol Biol* **2010**; 17:216-21.
269. Maritzen T, Podufall J and Haucke V. Stonins--specialized adaptors for synaptic vesicle recycling and beyond? *Traffic* **2010**; 11:8-15.
270. Kriajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, *et al.* Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem* **2002**; 277:5229-35.
271. Fleming YM, Ferguson GJ, Spender LC, Larsson J, Karlsson S, Ozanne BW, *et al.* TGF-beta-mediated activation of RhoA signalling is required for efficient (V12)HaRas and (V600E)BRAF transformation. *Oncogene* **2009**; 28:983-93.
272. Schiller MR. Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases--GEFs what's the link. *Cell Signal* **2006**; 18:1834-43.
273. Maeda M, Shintani Y, Wheelock MJ and Johnson KR. Src activation is not necessary for transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial to mesenchymal transitions (EMT) in mammary epithelial cells. PP1 directly inhibits TGF-beta receptors I and II. *J Biol Chem* **2006**; 281:59-68.
274. Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N and Terao T. Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* **2004**; 279:8567-76.
275. Trenkle T, McClelland M, Adlkofer K and Welsh J. Major transcript variants of VAV3, a new member of the VAV family of guanine nucleotide exchange factors. *Gene* **2000**; 245:139-49.
276. Gianni D, Bohl B, Courtneidge SA and Bokoch GM. The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by NADPH oxidase-1. *Mol Biol Cell* **2008**; 19:2984-94.
277. Kim M, Nozu F, Kusama K and Imawari M. Cholecystokinin stimulates the recruitment of the Src-RhoA-phosphoinositide 3-kinase pathway by Vav-2 downstream of G(alpha13) in pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**; 339:271-6.
278. Murata T, Ohnishi H, Okazawa H, Murata Y, Kusakari S, Hayashi Y, *et al.* CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and Cdc42. *J Neurosci* **2006**; 26:12397-407.
279. Garrett TA, Van Buul JD and Burrige K. VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res* **2007**; 313:3285-97.
280. Lai SY, Ziober AF, Lee MN, Cohen NA, Falls EM and Ziober BL. Activated Vav2 modulates cellular invasion through Rac1 and Cdc42 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **2008**; 44:683-8.
281. Yi F, Chen QZ, Jin S and Li PL. Mechanism of homocysteine-induced Rac1/NADPH oxidase activation in mesangial cells: role of guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* **2007**; 20:909-18.
282. Boettcher JP, Kirchner M, Churin Y, Kaushansky A, Pompaiah M, Thorn H, *et al.* Tyrosine-phosphorylated caveolin-1 blocks bacterial uptake by inducing Vav2-RhoA-mediated cytoskeletal rearrangements. *PLoS Biol* **2010**; 8.
283. Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Gao B, Zhang Y and Krepinsky JC. Mechanical stretch-induced RhoA activation is mediated by the RhoGEF Vav2 in mesangial cells. *Cell Signal* **2010**; 22:34-40.
284. Galliher-Beckley AJ and Schiemann WP. Grb2 binding to Tyr284 in TbetaR-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF-beta. *Carcinogenesis* **2008**; 29:244-51.

285. Marcoux N and Vuori K. EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2. *Oncogene* **2003**; 22:6100-6.
286. Meng W, Numazaki M, Takeuchi K, Uchibori Y, Ando-Akatsuka Y, Tominaga M, *et al.* DIP (mDia interacting protein) is a key molecule regulating Rho and Rac in a Src-dependent manner. *EMBO J* **2004**; 23:760-71.
287. Tamas P, Solti Z, Bauer P, Illes A, Sipeki S, Bauer A, *et al.* Mechanism of epidermal growth factor regulation of Vav2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac. *J Biol Chem* **2003**; 278:5163-71.
288. Tsapara A, Luthert P, Greenwood J, Hill CS, Matter K and Balda MS. The RhoA activator GEF-H1/Lfc is a transforming growth factor-beta target gene and effector that regulates alpha-smooth muscle actin expression and cell migration. *Mol Biol Cell* **2010**; 21:860-70.
289. Davies M, Robinson M, Smith E, Huntley S, Prime S and Paterson I. Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *J Cell Biochem* **2005**; 95:918-31.
290. Zavadil J, Bitzer M, Liang D, Yang YC, Massimi A, Kneitz S, *et al.* Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**; 98:6686-91.
291. DuRaine GD, Chan SM and Reddi AH. Effects of TGF-beta1 on alternative splicing of Superficial Zone Protein in articular cartilage cultures. *Osteoarthritis Cartilage* **2011**; 19:103-10.
292. Han F, Gilbert JR, Harrison G, Adams CS, Freeman T, Tao Z, *et al.* Transforming growth factor-beta1 regulates fibronectin isoform expression and splicing factor SRp40 expression during ATDC5 chondrogenic maturation. *Exp Cell Res* **2007**; 313:1518-32.
293. Martin MM, Buckenberger JA, Knoell DL, Strauch AR and Elton TS. TGF-beta(1) regulation of human AT(1) receptor mRNA splice variants harboring exon 2. *Mol Cell Endocrinol* **2006**; 249:21-31.
294. Cordray P and Satterwhite DJ. TGF-beta induces novel Lef-1 splice variants through a Smad-independent signaling pathway. *Dev Dyn* **2005**; 232:969-78.
295. Valcourt U, Gouttenoire J, Aubert-Foucher E, Herbage D and Mallein-Gerin F. Alternative splicing of type II procollagen pre-mRNA in chondrocytes is oppositely regulated by BMP-2 and TGF-beta1. *FEBS Lett* **2003**; 545:115-9.
296. Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I, *et al.* TGF-beta regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J* **2011**; 30:783-95.
297. Warzecha CC, Sato TK, Nabet B, Hogenesch JB and Carstens RP. ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Mol Cell* **2009**; 33:591-601.
298. Yu G and Fahnstock M. Differential expression of nerve growth factor transcripts in glia and neurons and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Brain Res Mol Brain Res* **2002**; 105:115-25.
299. Inoue Y and Imamura T. Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* **2008**; 99:2107-12.
300. Levy L, Howell M, Das D, Harkin S, Episkopou V and Hill CS. Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol Cell Biol* **2007**; 27:6068-83.
301. Nagano Y, Mavrakis KJ, Lee KL, Fujii T, Koinuma D, Sase H, *et al.* Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **2007**; 282:20492-501.
302. Stroschein SL, Wang W, Zhou S, Zhou Q and Luo K. Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **1999**; 286:771-4.
303. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G and Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **2008**; 454:56-61.
304. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP and Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **2003**; 115:787-98.
305. Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB and Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* **2005**; 123:1133-46.
306. Sinnamon JR and Czaplinski K. mRNA trafficking and local translation: the Yin and Yang of regulating mRNA localization in neurons. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2011**; 43:663-70.
307. Wu KY, Hengst U, Cox LJ, Macosko EZ, Jeromin A, Urquhart ER, *et al.* Local translation of RhoA regulates growth cone collapse. *Nature* **2005**; 436:1020-4.
308. Simoes S, Denholm B, Azevedo D, Sotillos S, Martin P, Skaer H, *et al.* Compartmentalisation of Rho regulators directs cell invagination during tissue morphogenesis. *Development* **2006**; 133:4257-67.

309. Schratt G. microRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2009**; 10:842-9.
310. Levy L and Hill CS. Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF- β) target genes and distinguishes TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Mol Cell Biol* **2005**; 25:8108-25.
311. Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, *et al.* A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* **2007**; 450:1096-9.
312. Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, *et al.* miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* **2009**; 35:610-25.
313. Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J, *et al.* miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* **2010**; 5:e9429.
314. Sun F, Wang J, Pan Q, Yu Y, Zhang Y, Wan Y, *et al.* Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31. *Biochem Biophys Res Commun* **2009**; 380:660-5.
315. Wang Q, Huang Z, Xue H, Jin C, Ju XL, Han JD, *et al.* MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* **2008**; 111:588-95.
316. Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Cao G, Wang J, *et al.* Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res* **2008**; 36:2690-9.

Δημοσιεύσεις

Papadimitriou E, Vasilaki E, Vorvis C, Iliopoulos D, Moustakas A, Kardassis D and Stournaras C. Differential regulation of the two RhoA specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF- β and miR-24: role in epithelial to mesenchymal transition *Oncogene* **2011** In press

Papadimitriou E, Kardassis D, Moustakas A, Stournaras C. TGF β -induced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem*. **2011**;28(2):229-38.

Vasilaki E, **Papadimitriou E**, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D
Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF β -induced signaling pathways. *FASEB J*. **2010** Mar;24(3):891-905.

Vardouli L, Vasilaki E, **Papadimitriou E**, Kardassis D, Stournaras C. A novel mechanism of TGF β -induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J*. **2008** Aug;275(16):4074-87.

ORIGINAL ARTICLE

Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF- β and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transitionE Papadimitriou¹, E Vasilaki^{1,3}, C Vorvis², D Iliopoulos², A Moustakas^{3,4}, D Kardassis¹ and C Stournaras¹¹Department of Biochemistry, University of Crete Medical School, Heraklion, Crete, Greece; ²Department of Cancer Immunology and AIDS, Dana–Farber Cancer Institute and Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA; ³Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala University, Uppsala, Sweden and ⁴Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Science for Life Laboratory, Uppsala University, Uppsala, Sweden

In the present study we analyzed the regulation of the two isoforms of the RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor Net1 by transforming growth factor- β (TGF- β) in keratinocytes. We report that short-term TGF- β treatment selectively induced Net1 isoform2 (Net1A) but not Net1 isoform1. This led to upregulation of cytoplasmic Net1A protein levels that were necessary for TGF- β -mediated RhoA activation. Smad signaling and the MAPK/ERK kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway were involved in Net1A upregulation by TGF- β . Interestingly, long-term TGF- β treatment resulted in Net1 mRNA downregulation and Net1A protein degradation by the proteasome. Furthermore, we identified the microRNA miR-24 as a novel post-transcriptional regulator of Net1A expression. Silencing of Net1A resulted in disruption of E-cadherin- and zonula occludens-1 (ZO-1)-mediated junctions, as well as expression of the transcriptional repressor of E-cadherin, Slug and the mesenchymal markers N-cadherin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and fibronectin, indicating that late TGF- β -induced downregulation of Net1A is involved in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Finally, miR-24 was found to be implicated in the regulation of the EMT program in response to TGF- β and was shown to be directly involved in the TGF- β -induced breast cancer cell invasiveness through Net1A regulation. Our results emphasize the importance of Net1 isoform2 in the short- and long-term TGF- β -mediated regulation of EMT. *Oncogene* advance online publication, 10 October 2011; doi:10.1038/onc.2011.457

Keywords: TGF- β ; Net1A; RhoA; EMT; miR-24**Introduction**

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a pleiotropic cytokine that controls many fundamental aspects of

cellular behavior, including growth, differentiation, migration, modification of the microenvironment and apoptosis (Moustakas and Heldin, 2009). Although TGF- β acts as a tumor suppressor in normal epithelia and even in early-stage adenomas through its ability to inhibit cell growth, it is also an important promoter of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) during embryonic development and at late stages of cancer progression, promoting tumor cell invasiveness and metastasis (Derynck and Akhurst, 2007; Pardali and Moustakas, 2007; Massague, 2008; Ikushima and Miyazono, 2010).

TGF- β signals via two distinct receptor serine/threonine kinases, the type I and type II receptors. After ligand binding, the type II receptor transphosphorylates and activates the type I receptor, leading to phosphorylation of the receptor-regulated Smad proteins (R-Smads) Smad2 and Smad3, which in turn oligomerize with the common partner Smad4 and rapidly translocate to the nucleus (Shi and Massague, 2003). Several non-Smad signaling pathways have been described operating in parallel or in direct coordination with the Smad proteins. These include the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ERK, c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38, the phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K) and Ras- and Rho-GTPases (Javelaud and Mauviel, 2005; Moustakas and Heldin, 2005; Zhang, 2009). We have previously shown that TGF- β induces rapid actin reorganization and stress fiber formation via a nongenomic pathway that involves the small GTPases RhoA and RhoB and the downstream effectors ROCK/LimK2/cofilin (Vardouli *et al.*, 2005). The requirement of the Smad pathway in the long-term actin cytoskeleton reorganization and RhoA/RhoB activation has been recently demonstrated and implicates the transcriptional regulation of the *RhoB* gene (Moustakas and Heldin, 2008; Vardouli *et al.*, 2008; Kardassis *et al.*, 2009; Vasilaki *et al.*, 2010). However, the mechanism of the TGF- β -mediated Rho activation and long-term actin reorganization remains still unclear.

It has been previously reported that TGF- β upregulates the guanine nucleotide exchange factor (GEF) Net1 in HaCaT keratinocytes and that this GEF is essential for TGF- β -mediated stress fiber formation in Swiss 3T3 fibroblasts (Shen *et al.*, 2001). More recently,

Correspondence: Professor C Stournaras, Department of Biochemistry, University of Crete Medical School, PO Box 2208, Heraklion 71003, Crete, Greece.

E-mail: cstourn@med.uoc.gr

Received 21 February 2011; revised 25 July 2011; accepted 2 September 2011

Net1 was reported to regulate the Smad3-induced RhoA signaling in TGF- β -treated human retinal pigment epithelial cells (Lee *et al.*, 2010). Net1 exists in two isoforms, isoform1 (Net1) and isoform2 (Net1A), which share the same Dbl-homology (DH) and Pleckstrin-homology (PH) domains for acting as GEFs towards RhoA and differ only in their N-terminus. Both isoforms are mainly localized in the nucleus and their presence in the cytoplasm is tightly controlled. Once in the cytoplasm both isoforms have been reported to activate RhoA and thus stimulate actin stress fiber formation (Schmidt and Hall, 2002; Qin *et al.*, 2005). However, it remains elusive as to whether there is any specificity in the regulation of the Net1 and Net1A isoforms by TGF- β .

In the present study we focused on the mechanism by which TGF- β regulates Net1 and Net1A GEF isoforms and addressed the biological relevance of this regulation. We report that TGF- β transcriptionally upregulated Net1A—but not Net1—which was necessary for the TGF- β -induced RhoA activation. TGF- β -induced Net1A upregulation implicated both the Smad and the ERK/MAPK pathways. We also provide evidence that both isoforms were differentially downregulated upon long-term TGF- β treatment and emphasized the role of Net1A downregulation on TGF- β -induced EMT. Finally, we report that Net1A downregulation can be molecularly explained by two complementary mechanisms: degradation by the proteasome and translational silencing by the microRNA miR-24.

Results

Net1A but not Net1 isoform is induced by TGF- β in HaCaT keratinocytes

As shown in the scheme presented in Figure 1a, Net1A does not contain the first 3 exons of the *Net1* gene; instead, it consists of an extra region that is part of intron 3 of the *Net1* gene. We first analyzed the Net1/Net1A transcriptional regulation by TGF- β in HaCaT keratinocytes by using quantitative RT-PCR (qRT-PCR; Figure 1b). When HaCaT keratinocytes were serum starved for 24 h and then stimulated with TGF- β for various time periods (1–48 h), a rapid increase (initiated at 1 h) of the steady-state mRNA levels of Net1A became evident, which peaked at 3 h and persisted up to 48 h post induction (Figure 1b). Interestingly, the mRNA levels of the Net1 isoform remained stable in the initial phase, but were significantly downregulated at 12 h and almost entirely lost at 48 h post treatment (Figure 1b). Upregulation of Net1A mRNA by TGF- β was followed by a relevant increase in Net1A total protein levels that peaked at 3 h and sustained for up to 12 h of TGF- β treatment (Figure 1c, lower band). Despite the enhanced mRNA levels observed at 24 and 48 h, the Net1A protein levels were strongly diminished after 24 h and were completely abolished after 48 h of TGF- β treatment (Figure 1c, lower band). Instead, Net1 protein levels (upper band) did not change at early time points and were

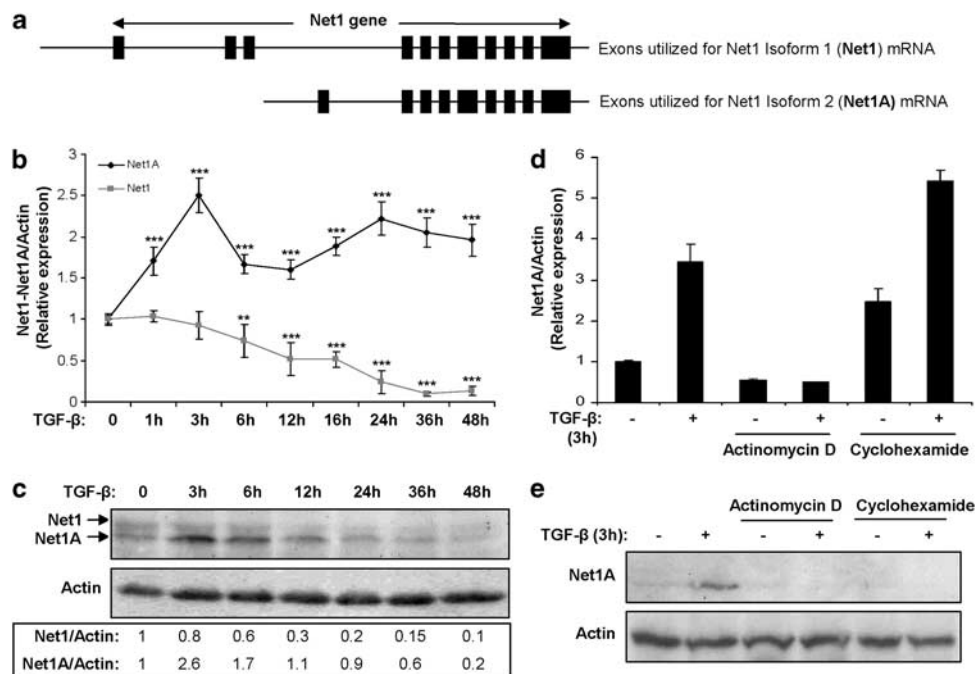


Figure 1 Net1 isoform2 (Net1A) but not Net1 isoform1 is induced by TGF- β . (a) Schematic representation of the exons of the *Net1* gene that are utilized for the generation of the Net1 isoform1 and Net1 isoform2 (Net1A) mRNAs. (b) Analysis of Net1 isoform1 and Net1 isoform2 (Net1A) mRNA levels by qRT-PCR ($n = 4$) and (c) Net1 and Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β at various time points. (d) Analysis of Net1A mRNA levels by qRT-PCR ($n = 3$) and (e) corresponding Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes treated or not with 5 ng/ml TGF- β for 3 h in the presence or absence of the general inhibitor of transcription actinomycin D (2 μ g/ml) and the inhibitor of protein synthesis cycloheximide (5 μ g/ml). The β -actin housekeeping gene mRNA serves as normalization control in (b) and (d) and β -actin as protein loading control in (c) and (e). Error bars indicate s.d. in (b) and (d). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

downregulated after 12 h of treatment in accordance with the mRNA levels.

HaCaT keratinocytes were further treated with the inhibitor of transcription actinomycin D or the protein synthesis inhibitor cycloheximide and then incubated with 5 ng/ml TGF- β for 3 h. qRT-PCR analysis revealed that the TGF- β -mediated upregulation of Net1A mRNA was completely abolished by actinomycin D, whereas cycloheximide resulted in the accumulation of Net1A mRNA (Figure 1d). At the protein level, the TGF- β -induced Net1A upregulation was completely abolished by both actinomycin D and cycloheximide (Figure 1e). These results suggest that Net1A mRNA upregulation is because of transcriptional activation.

Smad signaling is required for Net1A induction by TGF- β
Quantitative RT-PCR analysis revealed that downregulation of Smad2 by small interfering RNA (siRNA) moderately reduced the TGF- β -induced (3 h) Net1A expression, whereas silencing of Smad3 resulted in almost complete downregulation of Net1A expression (Figure 2a). In line with these findings, downregulation of Smad3 effectively blocked the TGF- β -induced Net1A protein upregulation (Figure 2b). HaCaT keratinocytes were also infected with a control adenovirus expressing β -galactosidase (ad-LacZ) or with recombinant adenoviruses expressing Smad2 (ad-Smad2) and Smad3 (ad-Smad3). As shown in Supplementary Figure S1A, overexpression of Smad2 caused a moderate increase in Net1A expression in the absence of TGF- β

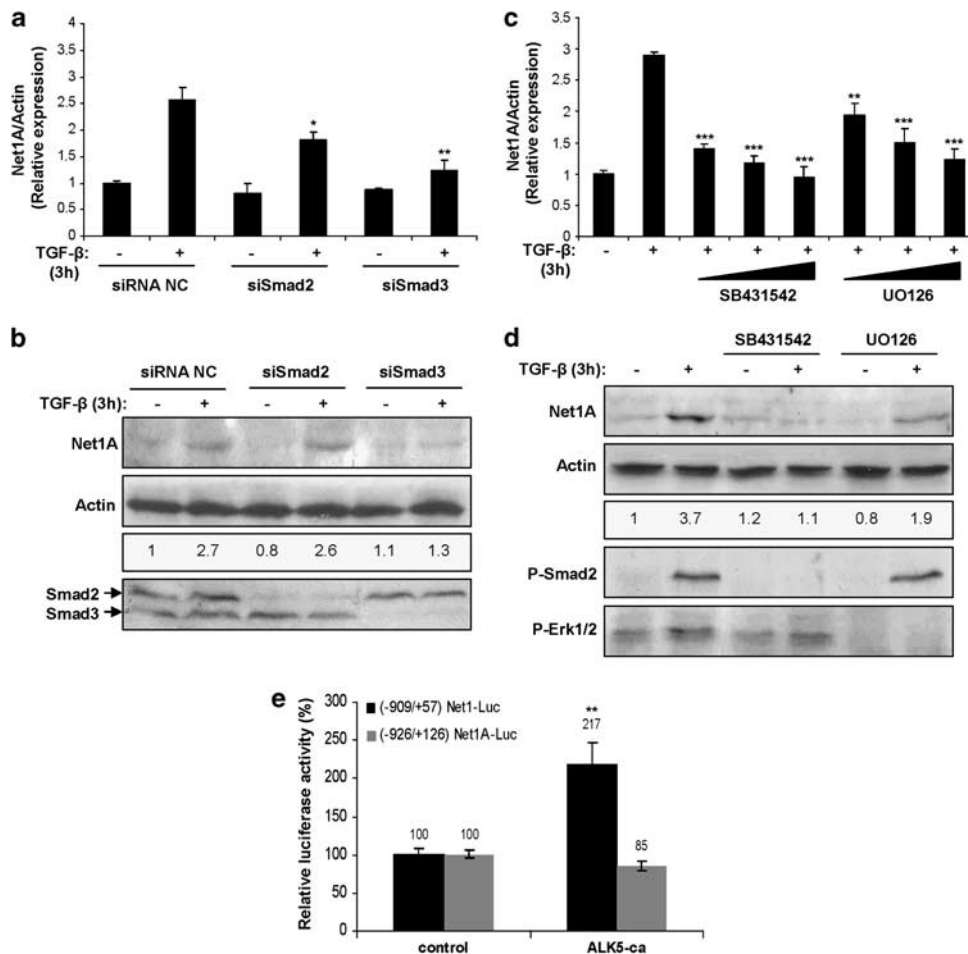


Figure 2 Both Smad and MEK/ERK pathways are required for the TGF- β -induced transcriptional activation of the *Net1* gene. (a) Analysis of Net1A mRNA levels by qRT-PCR ($n = 3$), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus NC siRNA + 3 h TGF- β , and (b) Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes transiently transfected with negative control, Smad2 and Smad3 siRNAs in the presence or not of 5 ng/ml TGF- β for 3 h. Immunoblotting for endogenous Smad2 and Smad3 indicates the degree of silencing of each protein by the specific siRNAs. (c) Analysis of Net1A expression by qRT-PCR ($n = 3$), ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus 3 h TGF- β , and (d) Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β for 3 h in the presence of increasing concentrations of the ALK5 inhibitor SB431542 (1–10 μ M) and the MEK1 inhibitor UO126 (1–10 μ M). Anti-P-Smad2 and anti-P-Erk1/2 immunoblotting shows specificity controls for each inhibitor. (e) HaCaT keratinocytes were transiently transfected with the reporter plasmids -909/+57 Net1-Luc and -926/+126 Net1A-Luc along with the expression vector for the constitutively active form of the TGF- β type I receptor ALK5 (ALK5-ca). The CMV β -gal plasmid expressing β -galactosidase was included in each sample for normalization of transfection variability. Luciferase activity was determined in cell lysates 48 h after transfection. The mean values of three independent experiments performed in duplicate are shown as percentage of relative luciferase activity. The control condition of vector alone transfection is normalized to 100%. ** $P < 0.01$. Error bars indicate s.d. in (a), (c) and (e).

stimulation, whereas overexpression of Smad3 resulted in a higher increase, and TGF- β further enhanced this effect. Surprisingly, despite the modulation of mRNA levels, the overexpression of either Smad2 or Smad3 was not sufficient to increase Net1A protein levels in the absence of TGF- β (Supplementary Figure S1B). This observation indicates that besides Smad2/3, non-Smad signaling may be essential for efficient translation or stabilization of Net1A protein. We conclude that Smad3 plays the major role in mediating the TGF- β signal toward Net1A mRNA and protein induction.

The MEK/ERK MAPK pathway regulates the TGF- β -mediated Net1A gene expression

To investigate further the involvement of non-Smad signaling pathways in Net1A regulation by TGF- β , HaCaT keratinocytes were treated with a variety of inhibitors such as UO126 (MEK1 inhibitor), LY294002 (PI3K inhibitor), Y27632 (ROCK inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor) and the TGF- β type I receptor (referred here as ALK5) inhibitor SB431542, followed by stimulation with 5 ng/ml TGF- β for 3 h. qRT-PCR analysis indicated that besides the ALK5 inhibitor SB431542 (1–10 μ M), the MEK1 inhibitor UO126 (1–10 μ M) exhibited the most prominent inhibitory effect on Net1A expression upon TGF- β treatment (Figure 2c). These results were further supported by experiments showing inhibition of Net1A protein levels in TGF- β -stimulated cells pretreated with UO126 and SB431542 (Figure 2d). Very similar effects were also obtained after long-term (24 h) TGF- β treatment (Supplementary Figure S1C), implying that both pathways evenly regulate the early and late TGF- β -induced Net1A expression. All additional kinase inhibitors had either limited or no effect on Net1A mRNA expression (data not shown). Thus, ERK together with Smad signaling are important mediators of TGF- β in regulating Net1A expression.

TGF- β activates the Net1 gene promoter

We further analyzed whether the selective Net1A upregulation by TGF- β , was because of the activation of a unique promoter or the result of a TGF- β -regulated post-transcriptional event. We hypothesized that an active promoter may exist in the intronic region upstream to the transcriptional start site (+1) of Net1A mRNA (Figure 1a). Accordingly, we cloned the promoter of the human *Net1* gene and part of the intronic region upstream of the transcriptional start site of Net1A mRNA in fusion with the firefly luciferase gene to determine their responsiveness to TGF- β . HaCaT keratinocytes were transiently transfected with the reporter plasmids (–909/+57) Net1-Luc and (–926/+126) Net1A-Luc in the presence of the expression vector for the constitutively active form of the ALK5 receptor (ALK5-ca). As shown in Figure 2e, ALK5-ca enhanced the activity of the (–909/+57) Net1 promoter by 2.2-fold. On the contrary, ALK5-ca had no effect on the activity of the hypothetical promoter (–926/+126) Net1A (Figure 2e), implying that TGF- β upregulates the

Net1A isoform by utilizing sequences upstream of exon 1 of the *Net1* gene.

Cytoplasmic Net1A is required for TGF- β -mediated RhoA activation

We further analyzed the localization of Net1A isoform that was shown to be upregulated after TGF- β treatment. For this, HaCaT keratinocytes were serum starved for 24 h and stimulated with 5 ng/ml TGF- β for 3 h in the presence or absence of the ALK5 inhibitor SB431542, followed by analysis of nuclear and cytoplasmic extracts by western blot. Increased Net1A protein levels became evident both in the cytoplasmic and the nuclear extracts after TGF- β stimulation for 3 h and were effectively blocked by SB431542 (Figure 3a), whereas Net1 protein levels did not change in both fractions. These findings imply that TGF- β treatment up to 3 h resulted in an increase of Net1A, but not of Net1 isoform, in the cytoplasm.

In parallel, we studied the RhoA activation upon TGF- β stimulation at various time points (3 to 8 h). As shown in Figure 3b, RhoA activation increased at 3 h and peaked 6 h after TGF- β stimulation. We further investigated the requirement of Net1A in TGF- β -induced RhoA activation, by using siRNAs targeting selectively Net1A or Net1 isoforms. Silencing of Net1A isoform resulted in a strong decrease in RhoA activation (Figure 3c), whereas silencing of Net1 had no significant effect, clearly indicating that RhoA activation is dependent on Net1A induction by TGF- β . The efficiency of Net1 and Net1A silencing is presented in Figure 3d.

Net1A is targeted for degradation by the proteasome after long-term TGF- β treatment

Net1A protein levels, after initial increase, declined 24–48 h post TGF- β treatment (Figure 1c), although Net1A mRNA levels remained still upregulated (Figure 1b). To further analyze this finding, we studied the potential implication of the proteasome in targeting Net1A for degradation after long-term TGF- β treatment. First, in a control experiment we provide evidence that Net1A is an unstable protein having a short half-life of <30 min. This was shown in HaCaT keratinocytes treated for various times (30 min to 6 h) with the protein-synthesis inhibitor cycloheximide (5 μ g/ml; Figure 4a). Furthermore, HaCaT cells were serum starved for 24 h, stimulated or not with TGF- β for 24 h and 8 h before collection (which translates to 16 h after TGF- β treatment) they were treated or not with the proteasome inhibitor MG-132 (10 μ M). MG-132 treatment led to a strong increase in Net1A protein levels in the absence of TGF- β (Figure 4b), whereas in the presence of TGF- β , the MG-132 inhibitor led to an even more robust increase in Net1A protein levels, a finding that matches well to the upregulated mRNA levels of Net1A after 24 h of treatment with TGF- β (Figure 1b). However, proteasomal inhibition failed to stabilize the very weak protein expression levels of the Net1 isoform (Figure 4b). These findings confirm that Net1A is specifically targeted for degradation by the proteasome.

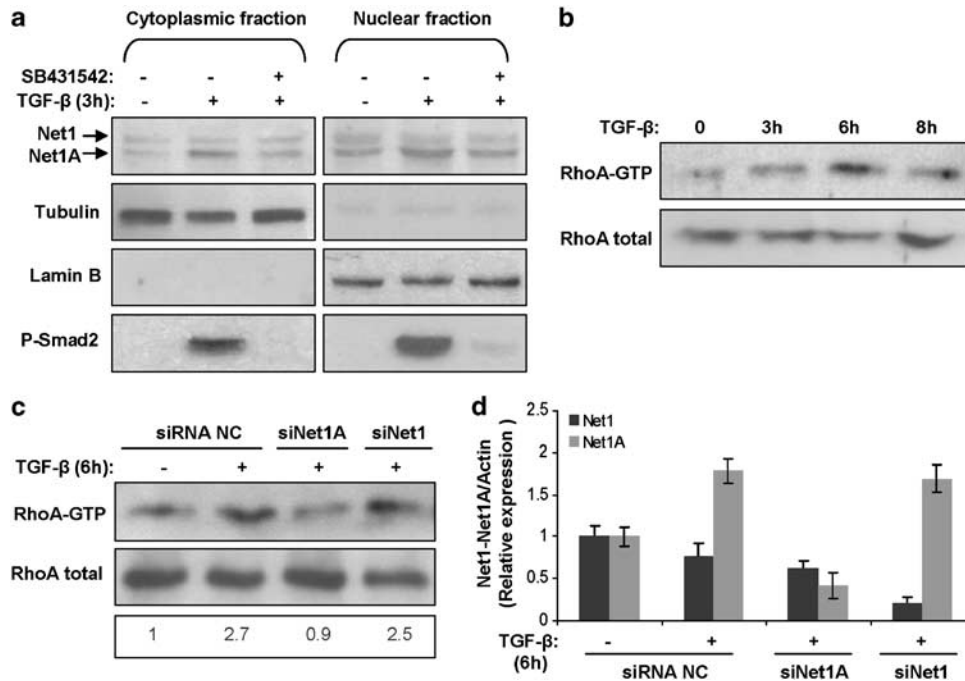


Figure 3 Net1A cytoplasmic upregulation is required for TGF- β -mediated RhoA activation. (a) Analysis of Net1 and Net1A protein levels in cytoplasmic and nuclear extracts of HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β or not for 3 h in the presence or absence of the TGF- β type I receptor (ALK5) inhibitor SB431542 (10 μ M). Tubulin was used as a cytoplasmic and Lamin B as a nuclear marker and served as a control for loading and purity of each fraction. Anti-P-Smad-2 immunoblot shows the efficiency of the SB431542 inhibitor. (b) Analysis of RhoA activation levels by GST-RBD Rhotekin pull-down assay in HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β at various time points. (c) Analysis of RhoA activation levels by GST-RBD Rhotekin pull-down assay in HaCaT keratinocytes transiently transfected with siRNA NC or specific siRNAs that selectively target either Net1A (siNet1A) or Net1 (siNet1) isoforms and treated or not with 5 ng/ml of TGF- β for 6 h. (d) Analysis of Net1 and Net1A mRNA levels by qRT-PCR showing the efficiency of Net1 and Net1A silencing in the RhoA activation assay in (c). The β -actin housekeeping gene mRNA serves as normalization control in (d). Error bars indicate s.d. in (d).

Interestingly, the upregulation of Net1A protein levels was followed by a relevant increase in RhoA activity after inhibiting the proteasome (Figure 4c), indicating that Net1A stabilization counts for RhoA activation.

miR-24 targets directly the 3'UTR of Net1A

It has been recently reported that RhoA is downregulated during TGF- β -induced EMT in NMuMG cells by two mechanisms. One implicates ubiquitination and degradation of RhoA by the proteasome (Wang *et al.*, 2003) and the other involves targeting of RhoA by the microRNA, miR-155 (Kong *et al.*, 2008). As Net1A was targeted for proteasomal degradation and this process was correlated with the TGF- β -induced EMT in HaCaT keratinocytes—as discussed below—we further investigated whether microRNAs may also be implicated in Net1A downregulation by TGF- β . By using the RNA22 (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) and TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) bioinformatic programs, we identified 6 miRNAs (miR-24, miR-155, miR-22, miR-200b, miR-145 and miR-206) predicted to target the 3' untranslated region (3'UTR) of Net1/Net1A mRNA, which is common for both isoforms. As Net1 was downregulated early upon TGF- β stimulation, we focused on the Net1A isoform. We identified miR-24 having the strongest impact on targeting Net1A mRNA and protein levels. Indeed,

overexpression of precursor miR-24 (pre-miR-24) by transient transfection of HaCaT keratinocytes led to downregulation of Net1A (and Net1) mRNA levels (Figure 5a). A clear effect was also observed at the protein level (Figure 5b). In addition, HaCaT cells were transiently transfected with a Net1A 3'UTR containing luciferase reporter plasmid along with the negative control pre-miRNA or the pre-miR-24, and 48 h after transfection cells were subjected to a luciferase assay. Overexpression of miR-24 led to a strong reduction of the luciferase activity, clearly indicating that Net1A 3'UTR is a direct target of miR-24 (Figure 5c).

In the context of TGF- β signaling, we found that miR-24 was upregulated after 24 h of TGF- β treatment and remained increased up to 48 h post treatment as estimated by qRT-PCR analysis of miR-24 levels (Figure 5d). Further analysis revealed that Smad3—and to a lesser extent Smad2—overexpression resulted in a strong increase in miR-24 levels, which was further enhanced after TGF- β treatment (Figure 5e). The upregulation of miR-24 by TGF- β implies another possible mechanism for the downregulation of Net1A apart from the implication of the proteasome. In order to address this hypothesis, HaCaT keratinocytes were transiently transfected with negative control pre-miRNA or the antisense oligonucleotide that targets miR-24

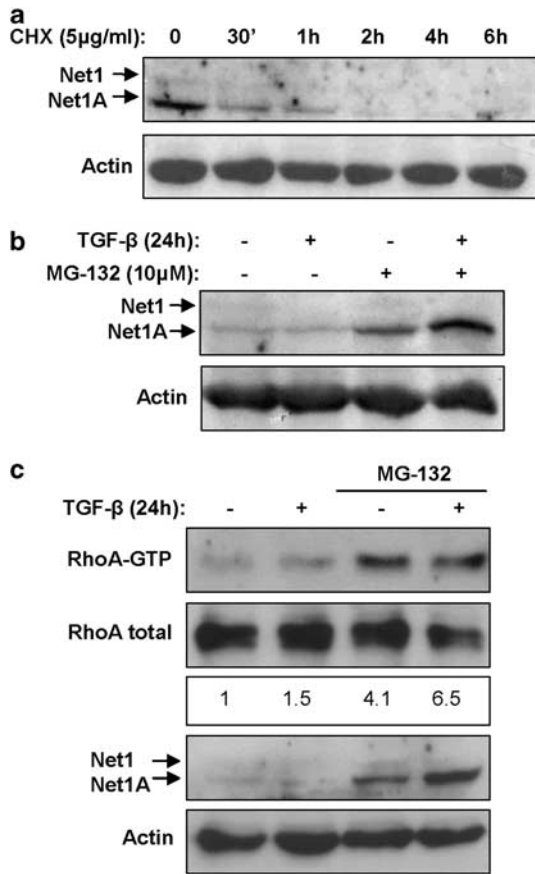


Figure 4 Net1A is targeted for degradation by the proteasome after long-term treatment with TGF- β . (a) Analysis of Net1 and Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes treated in full-serum medium with the inhibitor of protein synthesis cycloheximide (CHX; 5 μ g/ml) for various time points. (b) Analysis of Net1 and Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β or not for 24 h in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG-132 (10 μ M). (c) Analysis of RhoA activation levels by GST-RBD RhoGTP pull-down assay in HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β or not for 24 h in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG-132 (10 μ M) (upper panels). Anti-Net1/Net1A immunoblot shows the corresponding Net1 and Net1A levels in the same experiment (lower panels). Cells were treated with the MG-132 inhibitor 8 h before collection. β -Actin serves as immunoblot loading control.

(as-miR-24), treated with 5 ng/ml TGF- β or not for 24 h, followed by treatment or not with the proteasome inhibitor MG-132, 8 h before collection of the cells. As shown in Figure 5f, downregulation of miR-24 by as-miR-24 in the presence of TGF- β resulted in a small upregulation of Net1A protein, whereas inhibition of the proteasome resulted in a comparatively much stronger increase in Net1A protein levels, which was not further enhanced when combining as-miR-24 and MG-132 inhibitor. These results imply that miR-24 targets a small pool of Net1A for downregulation at the translational level, whereas proteasomal degradation accounts for the downregulation of the already translated Net1A protein. The efficiency of miR-24 downregulation by as-miR-24 is presented in Figure 5g.

Long-term downregulation of Net1 and Net1A by TGF- β is implicated in EMT

Based on recent reports that implicate Net1 downregulation in the EMT process (Nakaya *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2009), we investigated the role of TGF- β -induced downregulation of Net1/Net1A in EMT. For this, we studied the integrity of E-cadherin- and zonula occludens-1 (ZO-1)-mediated junctions, the expression of the mesenchymal markers N-cadherin and fibronectin, as well as the actin cytoskeleton using fluorescence microscopy after selectively silencing Net1 or Net1A and stimulating cells or not with TGF- β for 48 to 72 h. As shown in Figure 6A, silencing of Net1A led to the disruption of E-cadherin-supported adherens junctions even in the absence of TGF- β (Figure 6Ab), whereas silencing of Net1 had minor effect (Figure 6Ac). Very similar observations were evident for ZO-1-based tight junctions (Figure 6B). These findings imply that Net1A downregulation interferes with the stability of the epithelial junctions. Additionally, Net1A silencing in the presence of TGF- β led to a stronger expression of the mesenchymal markers N-cadherin (Figure 6Cb') and fibronectin (Figure 6Db') in comparison with control (Figures 6Ca' and Da') and Net1 silencing (Figures 6Cc' and Dc'). By studying actin cytoskeleton organization (Supplementary Figure S2A), we observed that Net1A (Supplementary Figure S2Ab)—but not Net1 (Supplementary Figure S2Ac)—downregulation alone was sufficient to reduce cortical actin staining and induce cell flattening (Supplementary Figure S2Ab). However, only TGF- β -stimulated HaCaT keratinocytes obtained the fibroblast-like morphology (Supplementary Figure S2Ab') showing actin stress fibers that were more robust in comparison with control (Supplementary Figure S2Aa') and Net1 silencing (Supplementary Figure S2Ac'). The same conclusions were drawn after studying the morphology of HaCaT keratinocytes by phase contrast microscopy (Supplementary Figure S2B). We further studied the mRNA levels of N-cadherin, fibronectin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and the transcriptional repressor of E-cadherin, Slug, by using qRT-PCR after selectively silencing Net1 or Net1A and stimulating cells with TGF- β for 48 h. In line with our observations from the immunofluorescence experiments, Net1A silencing in the presence of TGF- β led to the strongest upregulation of all markers in comparison with control and Net1 silencing (Figures 6E and F). The same conclusions were drawn after studying the effect of the selective Net1 and Net1A silencing on fibronectin and PAI-1 protein levels by western blotting (Supplementary Figure S2C).

miR-24 is implicated in the TGF- β -induced EMT

We further addressed the role of miR-24 in TGF- β -induced EMT in HaCaT keratinocytes. For this, cells were transiently transfected with negative control pre-miRNA or pre-miR-24 and then treated or not with TGF- β for 48 to 72 h, followed by study of the E-cadherin- and ZO-1-mediated junctions, as well as fibronectin and N-cadherin expression using immunofluorescence microscopy. As shown in Figure 7, overexpression of pre-miR-24 in the absence of TGF- β led to

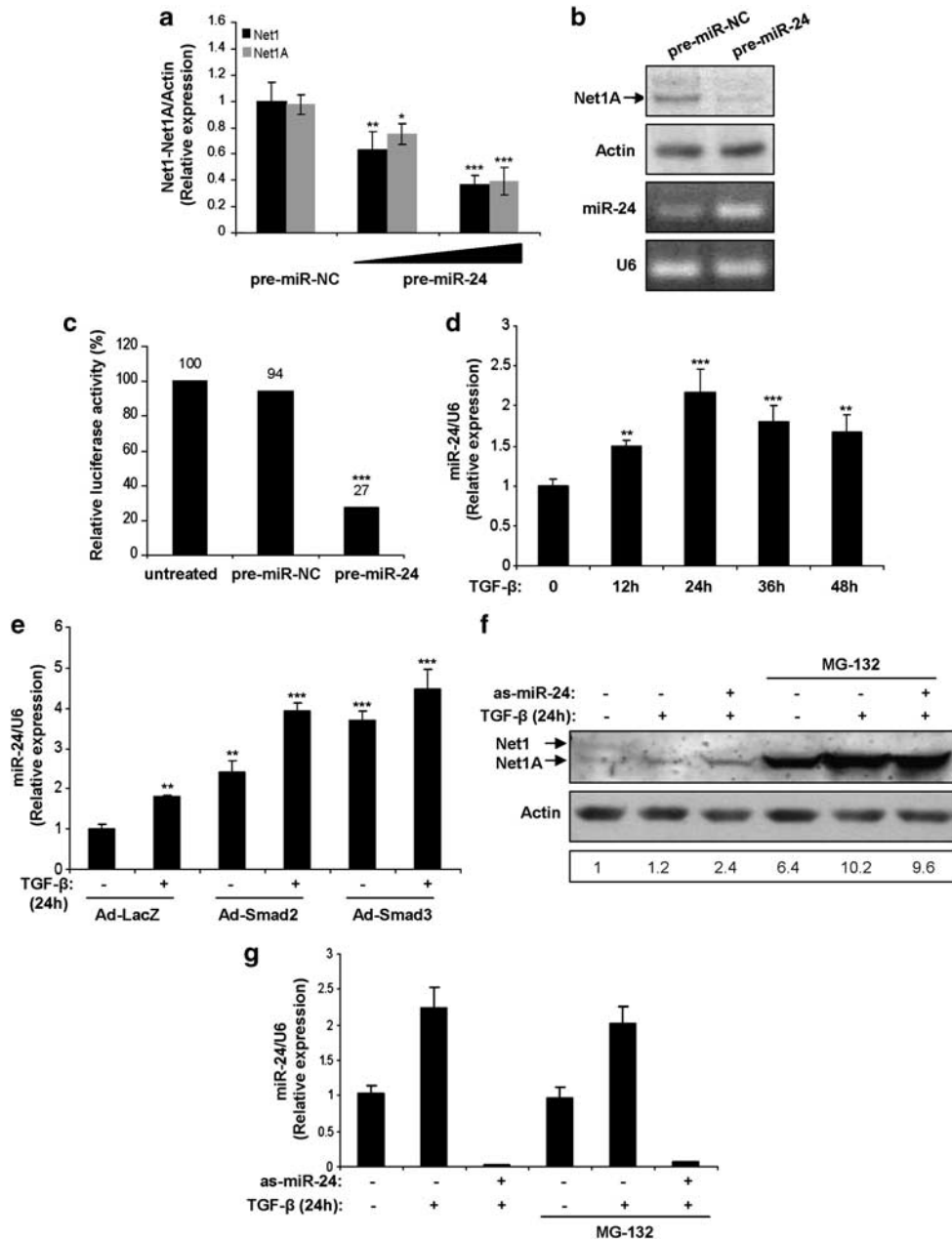


Figure 5 Net1A is targeted by the miR-24 microRNA. (a) Analysis of Net1 and Net1A mRNA levels by qRT-PCR in HaCaT keratinocytes transiently transfected with negative control pre-miRNA (pre-miR-NC) or with 50 and 100 nm (triangle) of pre-miR-24 ($n = 3$). (b) Analysis of Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes transiently transfected with pre-miR-NC and pre-miR-24. MiR-24 and loading control U6 RNAs, analyzed by RT-PCR, are shown from the same lysates as controls below the immunoblots. (c) HaCaT keratinocytes were transiently transfected with the Dual Luciferase reporter vector pEZX-MT01 containing the 3' UTR of Net1A along with negative control pre-miRNA or pre-miR-24 or left untreated. Luciferase activity was determined in cell lysates 48 h after transfection ($n = 3$). The control condition of vector alone transfection is normalized to 100%. (d) Analysis of miR-24 levels by qRT-PCR in HaCaT keratinocytes treated with 5 ng/ml TGF- β at various time points ($n = 3$). (e) Analysis of miR-24 levels by qRT-PCR in HaCaT keratinocytes infected with adenoviruses expressing β -galactosidase (LacZ) as control, wt-Smad2 and wt-Smad3 in the presence or absence of 5 ng/ml TGF- β for 24 h ($n = 3$). (f) Analysis of Net1A protein levels in HaCaT keratinocytes transiently transfected with pre-miR-NC or the antisense oligonucleotide for miR-24 (as-miR-24), treated with 5 ng/ml TGF- β or not for 24 h, followed by treatment or not with the proteasome inhibitor MG-132 (10 μ M) 8 h before collection of the cells. (g) Analysis of the corresponding miR-24 levels by qRT-PCR showing the efficiency of miR-24 downregulation using the as-miR-24 in (f). The β -actin housekeeping gene mRNA serves as normalization control in (a). U6 RNA levels serve as normalization control in (d), (e) and (g). Error bars indicate s.d. in (a), (c), (d), (e) and (g). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

a strong reduction in both E-cadherin (Figure 7Ab) and ZO-1 (Figure 7Bb) staining, which was further reduced in the presence of TGF- β (Figures 7Ab' and Bb').

Additionally, overexpression of pre-miR-24 in the presence of TGF- β resulted in a stronger expression of both N-cadherin (Figure 7Cb') and fibronectin

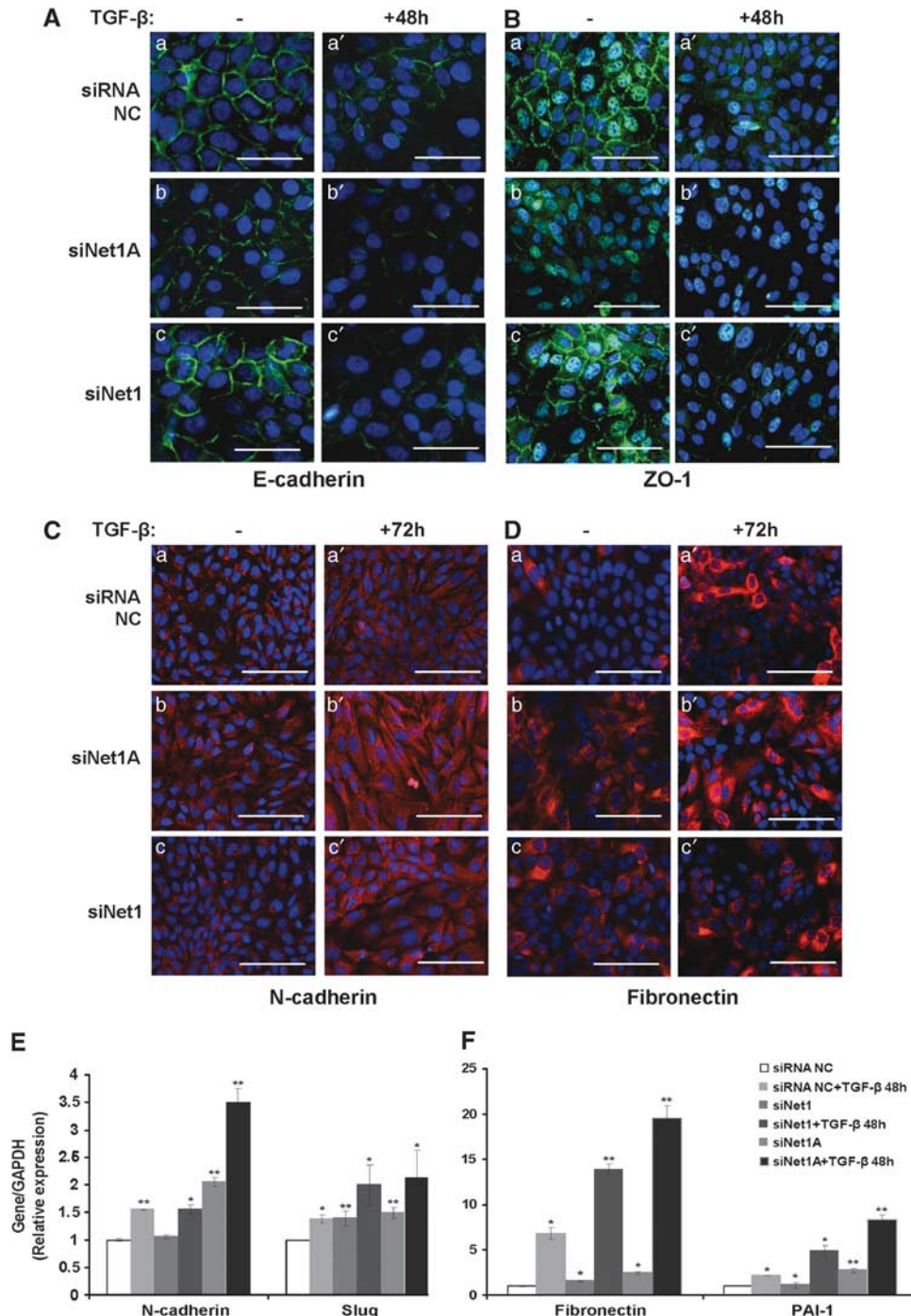


Figure 6 Effect of Net1 and Net1A downregulation in TGF- β -induced EMT of HaCaT keratinocytes. Immunostaining of the epithelial markers (A) E-cadherin (green) and (B) ZO-1 (green) and the mesenchymal markers (C) N-cadherin (red) and (D) fibronectin (red) and analysis of the mRNA levels by qRT-PCR of (E) N-cadherin and Slug ($n = 3$) as well as (F) fibronectin and PAI-1 ($n = 3$) in HaCaT cells transiently transfected with siRNA NC (a, a') or siRNA that selectively targets the Net1A (siNet1A; b, b') or the Net1 isoform (siNet1; c, c') and treated with 5 ng/ml TGF- β (a', b', c') or not (a, b, c) for 48 or 72 h. The nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). Bars indicate 25 μ m in (A) and 50 μ m in (B–D). The GAPDH housekeeping gene mRNA serves as normalization control in (E) and (F). Error bars indicate s.d. in (E) and (F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

(Figure 7Db') in comparison with control (Figure 7Ca' and Da'). We further studied the mRNA levels of N-cadherin, fibronectin, PAI-1 and Slug, by qRT-PCR after overexpression of pre-miR-24 and stimulation with

TGF- β for 48 h. In line with the immunofluorescence results, overexpression of pre-miR-24 in the presence of TGF- β led to stronger upregulation of all markers in comparison with control (Figures 7E and F). The same

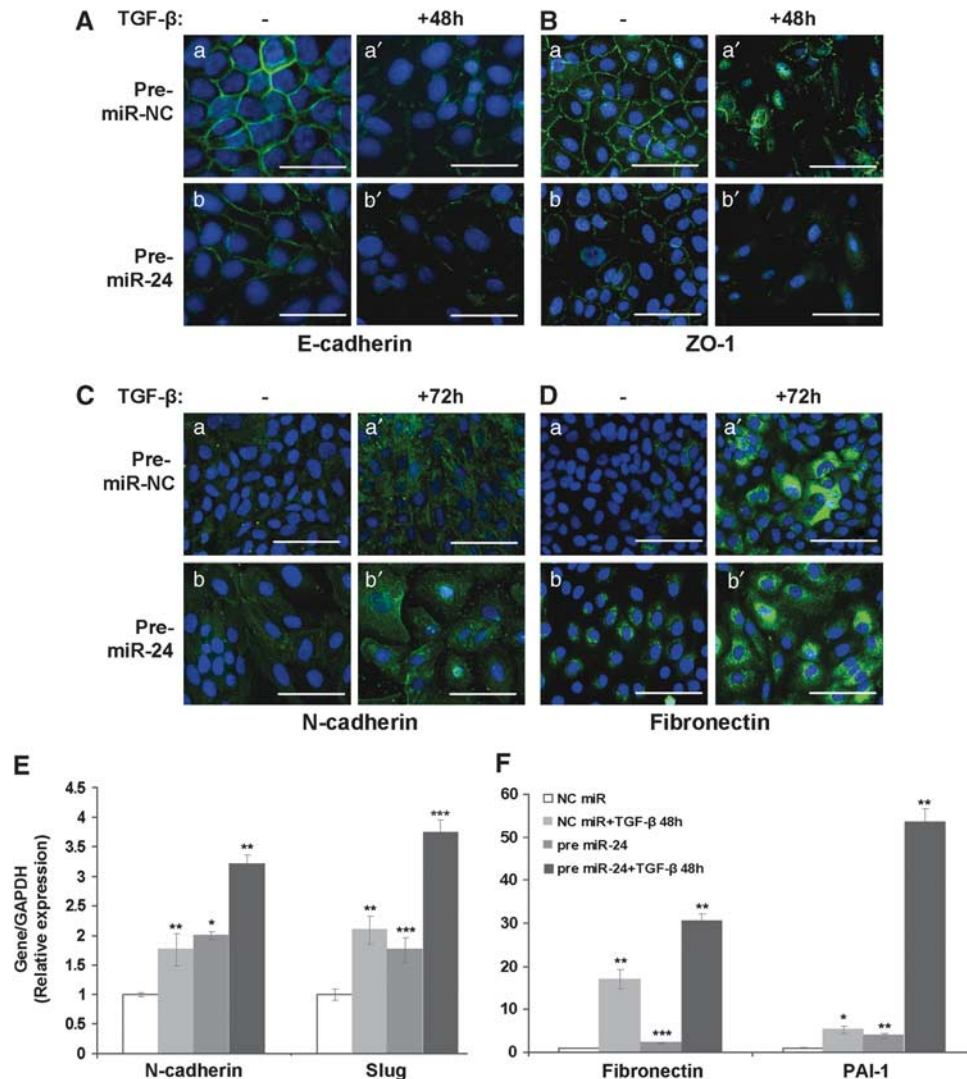


Figure 7 miR-24 is implicated in the TGF- β -induced EMT in HaCaT keratinocytes. Immunostaining of the epithelial markers (A) E-cadherin (green) and (B) ZO-1 (green) and the mesenchymal markers (C) N-cadherin (green) and (D) fibronectin (green) and analysis of the mRNA levels by qRT-PCR of (E) N-cadherin and Slug ($n=3$) as well as (F) fibronectin and PAI-1 ($n=3$) in HaCaT cells transiently transfected with pre-miR-NC (a, a') or pre-miR-24 (b, b') and treated with 5 ng/ml TGF- β (a', b') or not (a, b) for 48 or 72 h. The nuclei were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). Bars indicate 25 μ m in (A) and 50 μ m in (B–D). The GAPDH housekeeping gene mRNA serves as normalization control in (E) and (F). Error bars indicate s.d. in (E) and (F). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

conclusions were drawn after studying the effect of pre-miR-24 overexpression on fibronectin and PAI-1 protein levels by western blotting (Supplementary Figure S3A). Interestingly, it was evident that even in the absence of TGF- β stimulation, the cells showed clear signs of mesenchymal transition, as both E-cadherin- and ZO-1-based junctions decreased, supporting the looser overall morphology of the same cells shown under phase contrast microscopy (Supplementary Figure S3B). The quantitative mRNA analyses confirmed these observations, as PAI-1 and fibronectin basal levels increased 3–5-fold and N-cadherin and Slug levels increased twofold after pre-miR-24 transfection. Thus, miR-24 is implicated in the regulation of the EMT program in response to TGF- β , by targeting—among other potential targets—Net1A for downregulation.

Regulation of Net1/Net1A mRNA and miR-24 by TGF- β in cancer cell lines

We further investigated the role of TGF- β in the regulation of Net1/Net1A mRNA and miR-24 levels in various cancer cell lines. As shown in Figure 8a, TGF- β treatment for 3 h resulted in a strong increase of Net1A mRNA levels in MDAMB231 breast cancer cells and a minor increase in breast cancer cells T47D, whereas the weak increase observed in the prostate cancer cells DU145 was not significant. On the other hand, Net1 mRNA was downregulated in all three cell lines after 24–48 h of treatment. Furthermore, miR-24 was upregulated in all three cell lines tested after 24–48 h of TGF- β treatment (Figure 8b). Finally, we performed a systematic analysis of the basal expression levels of Net1 and Net1A by qRT-PCR in various cancer cell

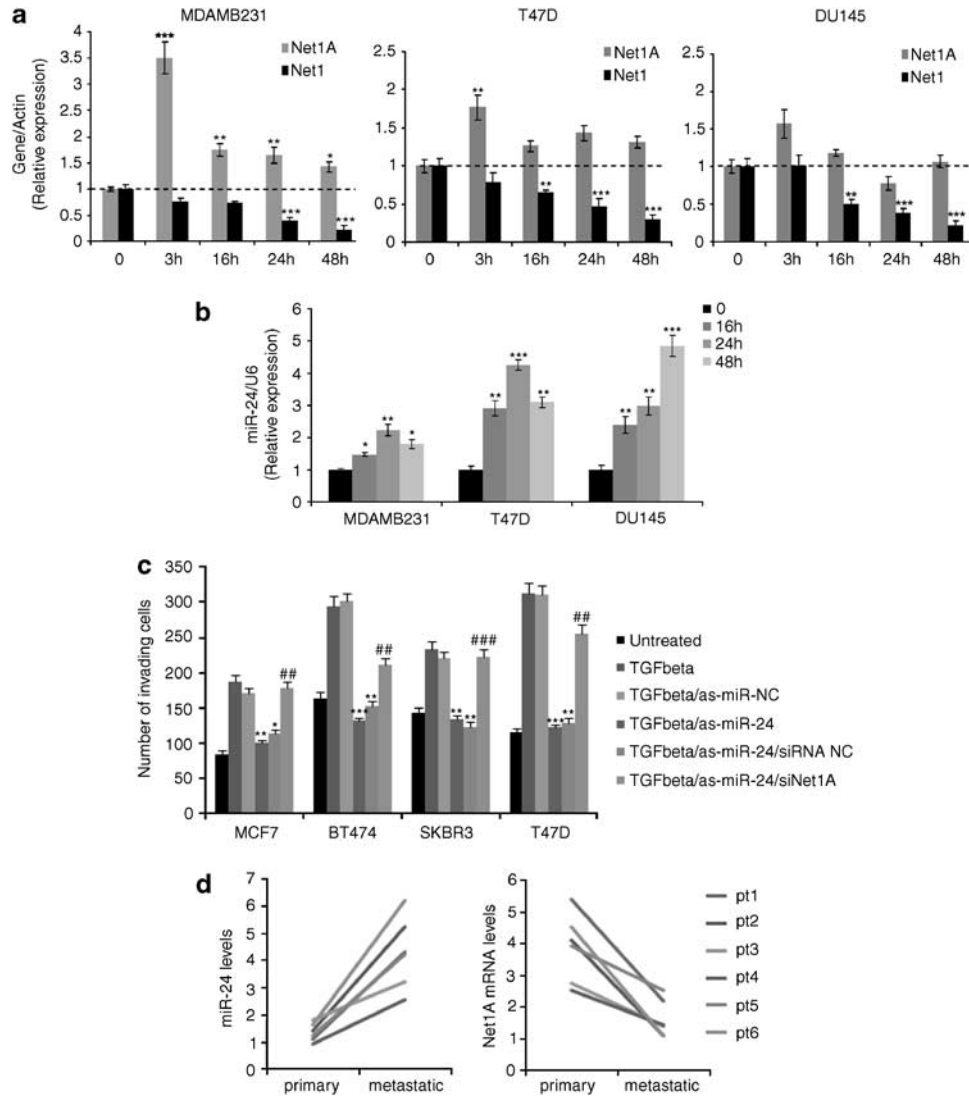


Figure 8 Net1/Net1A and miR-24 are regulated by TGF- β in cancer cells and are involved in breast cancer cell invasiveness and metastasis. **(a)** Analysis of the mRNA levels of Net1/Net1A by qRT-PCR in the breast cancer cell lines MDAMB231 and T47D and the prostate cancer cell line DU145 after treatment with 5 ng/ml TGF- β for 3, 16, 24 and 48 h ($n = 3$). **(b)** Analysis of miR-24 levels by qRT-PCR in MDAMB231, T47D and DU145 after treatment with 5 ng/ml TGF- β for 16, 24 and 48 h ($n = 3$). **(c)** Assessment of the invasive ability of the breast cancer cell lines MCF7, BT474, SKBR3 and T47D by performing matrigel invasiveness assays, after transiently transfecting cells with negative control antisense miRNA (as-miR-NC) or the antisense oligonucleotide for miR-24 (as-miR-24) or after co-transfecting cells with the as-miR-24 and the siRNA NC or the siRNA that targets Net1A isoform (siNet1A) in the presence of 5 ng/ml TGF- β for 24 h ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs TGF- β /as-miR-NC and ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs TGF- β /as-miR-24/siRNA NC. **(d)** Assessment of miR-24 and Net1A mRNA levels in six pairs of primary and metastatic breast tumors by qRT-PCR. The β -actin housekeeping gene mRNA serves as normalization control in **(a)** and **(d)** and U6 RNA levels serve as normalization control for miR-24 detection in **(b)** and **(d)**. Error bars indicate s.d. in **(a-c)**. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

lines of differential origin and tumorigenicity (Supplementary Figure S4). Although very low Net1 mRNA levels were observed in all cell lines tested, Net1A mRNA expression exhibited high variability. Interestingly, the more aggressive, metastatic or mesenchymal cancer cell lines (T47D, WM9, M5, HT1650, H157, DU145, HT1080 and MG63) seem to exhibit lower Net1A mRNA levels than the less tumorigenic MCF7 and HepG2 and the normal keratinocytes HaCaT, which is compatible with our findings on the role of Net1A during EMT.

miR-24 is implicated in breast cancer invasiveness and metastasis

We further studied the role of miR-24 in the TGF- β -induced invasiveness in matrigel of the breast cancer cell lines MCF7, BT474, SKBR3 and T47D. For this, cells were transiently transfected with the negative control as-miRNA (as-miR-NC) or the antisense oligonucleotide for miR-24 (as-miR-24) or were co-transfected with as-miR-24 and the negative control siRNA (siRNA NC) or the siRNA for Net1A (siNet1A) and treated or not with 5 ng/ml TGF- β for 24 h. As shown in Figure 8c,

downregulation of miR-24 resulted in suppression of the TGF- β -induced cell invasiveness, whereas it was restored to almost full extent after selective silencing of Net1A. These findings imply that miR-24 is important for the TGF- β -induced breast cancer cell invasiveness through Net1A regulation. Finally, we analyzed miR-24 and Net1A mRNA levels in six pairs of primary and metastatic breast tumors by qRT-PCR. As shown in Figure 8d, miR-24 levels were upregulated, whereas Net1A mRNA levels were instead decreased in metastatic compared with primary tumor samples. These data suggest that the miR-24/Net1A pathway is activated in metastatic breast carcinomas and support our model whereby the findings on EMT of HaCaT keratinocytes are of significant relevance to overall cancer cell behavior.

Discussion

Our study focuses on the differential regulation of the two isoforms of Net1 GEF by TGF- β . We report here that TGF- β selectively upregulates the Net1A—but not Net1—isoform in HaCaT keratinocytes (Figure 1). Analysis of the mechanism revealed that Smad3—and to a lesser extent Smad2—signaling is necessary for the increase in Net1A mRNA and protein levels (Figures 2a and b), while the MEK/ERK MAPK pathway is also involved in this process (Figures 2c and d). A possible hypothesis explaining the specificity of TGF- β toward the Net1A isoform may be the regulation of Net1 and Net1A by different promoters. As Net1A mRNA does not contain the first three exons of the *Net1* gene, but instead it consists of an extra region that is part of intron 3, we hypothesized that an active promoter may exist in this intronic region upstream to the transcriptional start site of the Net1A mRNA. The promoter analysis (Figure 2e) showed that the selective induction of the Net1A isoform by TGF- β is most likely regulated at a post-transcriptional level, such as alternative mRNA splicing. Further work is now required to investigate the contribution of alternative splicing, as a way to alter the Net1 versus Net1A transcript ratio. Recent findings on other genes whose alternative mRNA splicing is modulated directly by TGF- β (Shirakihara *et al.*, 2011) suggest that regulation of RNA splicing by TGF- β may be a more general phenomenon with wider implications for cancer biology.

It has been previously reported that the Net1 GEF is mainly localized in the nucleus. Unlike other GEFs, such as Vav, Db1 and p115RhoGEF, that require the release of an autoinhibitory conformation in order to act as GEFs toward small GTPases (Rossmann *et al.*, 2005; Garcia-Mata and Burrige, 2007), Net1 does not contain an autoinhibitory domain and its ability to activate RhoA is controlled by changes in its subcellular localization. Importantly, Net1 translocation from the nucleus to the cytoplasm is sufficient to activate RhoA (Schmidt and Hall, 2002; Qin *et al.*, 2005). In line with this, we found that the transcriptional upregulation of

the Net1A isoform enhanced cytoplasmic Net1A protein expression (Figure 3a). In addition, silencing each isoform selectively revealed that Net1A upregulation is necessary for the TGF- β -induced RhoA activation after 6 h of treatment (Figure 3c).

Another important finding of this work is the observed decrease of Net1A protein below basal levels after 24 h and its disappearance after 48 h of TGF- β treatment, whereas the corresponding mRNA levels remain elevated (Figures 1b and c). TGF- β targets for degradation many proteins involved in its pathway, such as Smad2/3, Smad7, ALK5, SnoN (Shi and Massague, 2003) and RhoA (Wang *et al.*, 2003). Additionally, Net1 is an unstable protein targeted for degradation by the proteasome in MCF-7 breast cancer cells (Carr *et al.*, 2009). In line with this, our experiments performed in the presence of the proteasome inhibitor MG-132 imply that the observed downregulation of Net1A protein after long-term TGF- β treatment is at least partially because of proteasomal degradation. Further work is now needed to identify potential E3 ubiquitin ligases and other protein components that participate in Net1A degradation among those that have been implicated in the regulation of TGF- β signaling such as Smurf1 and Smurf2 (Izzi and Attisano, 2004; Inoue and Imamura, 2008).

Recently, the Net1 GEF has been implicated in the regulation of epithelial cell polarity and EMT (Nakaya *et al.*, 2008; Carr *et al.*, 2009). In chicken embryos, it was shown that downregulation of Net1, triggered by an unknown factor, shut down basal RhoA activity and drove the onset of EMT (Nakaya *et al.*, 2008). In addition, Net1 has been involved in the regulation of adherens junctions through its interaction with the polarity protein Dlg1 (Garcia-Mata *et al.*, 2007; Carr *et al.*, 2009). This interaction was dependent on the formation of E-cadherin-mediated cell contacts whose disruption caused dissociation of Net1 from Dlg1, leading to Net1 degradation by the proteasome (Carr *et al.*, 2009). In line with these reports, we found that selective Net1A silencing disrupted E-cadherin- and ZO-1-mediated junctions and upregulated the mesenchymal markers N-cadherin and fibronectin as well as PAI-1 and the transcriptional repressor of E-cadherin, Slug. These findings emphasize the role of Net1A isoform downregulation by TGF- β in EMT in HaCaT cells.

Another novel finding of this work is the identification of miR-24 as a miRNA that targets Net1A during TGF- β -induced EMT. miR-24 has been recently implicated in various biological processes (Wang *et al.*, 2008; Lal *et al.*, 2009; Zaidi *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010) and has been reported to be regulated by TGF- β (Sun *et al.*, 2008) and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2; Sun *et al.*, 2009). Regulation by miRNAs provides a means for cells to prevent the accumulation of certain proteins by blocking protein translation. Our findings provide evidence that long-term TGF- β treatment may control Net1A downregulation via at least two distinct ways. According to this scenario, upregulation of miR-24 by TGF- β blocks partially the translation process of Net1A mRNA, whereas proteasomal degradation

targets the already translated Net1A protein. Recent published data support such dual regulation in TGF- β signaling (Kong *et al.*, 2008).

In addition, we report here that overexpression of miR-24 enhanced the TGF- β -induced EMT process and enforced the mesenchymal phenotype even in the absence of TGF- β . Moreover, it was demonstrated that miR-24 was upregulated in various TGF- β -treated cancer cell lines, whereas miR-24 was further shown to control TGF- β -induced invasion of various breast cancer cell lines by regulating Net1A. Taken together, our findings point out the role of miR-24 in TGF- β -induced EMT and cancer cell invasiveness. Interestingly, high levels of miR-24 have been detected in plasma and pleural effusions of cancer patients, further supporting the role of miR-24 in cancer (Lin *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011).

Finally, it should be mentioned that among the predicted miRNAs that target the 3'UTR of Net1A, we identified miR-155 and miR-200b, which have been implicated in the TGF- β -induced EMT either by targeting RhoA (Kong *et al.*, 2008) or Zeb1/Zeb2 (Gregory *et al.*, 2008), respectively. Further work is now in progress to address the role of these miRNAs in TGF- β -induced Net1A downregulation.

In conclusion, this study provides new evidence for the differential regulation of the two isoforms of the RhoA-specific GEF Net1 by TGF- β . It points out differential regulatory effects of TGF- β on the Net1A isoform, depending on the duration of the signal. We propose that short-term stimulation of HaCaT keratinocytes with TGF- β (Figure 9, left) results in upregulation of the Net1A isoform, which activates RhoA and potentially supports epithelial polarity, as proposed by many recent studies (Rajasekaran *et al.*, 2001; Sahai and Marshall, 2002; Vaezi *et al.*, 2002; Baum and Georgiou, 2011). On the other hand, long-term stimulation with TGF- β (Figure 9, right) reverses this effect and

downregulates Net1A to drive EMT, a process that requires proteasomal degradation and miRNA recruitment.

Materials and methods

Cell culture, adenoviruses and transient transfections

Human HaCaT keratinocytes, human embryonic kidney cells (HEK293) (used only for titration of adenoviruses) and the human cancer cell lines (MDAMB231, T47D, DU145, BT474, SKBR3 and MCF7) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium or RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin at 37 °C. Adenoviruses expressing LacZ and N-terminally Flag-tagged Smad2 and Smad3 were provided by K Miyazono (University of Tokyo, Tokyo, Japan) (Fujii *et al.*, 1999); all adenoviruses were amplified and titrated in HEK293 cells as described previously (Piek *et al.*, 1999). Adenoviral transient infections of cells using multiplicity of infection leading to a maximal rate of infection efficiency and protein expression, without obvious cytopathic effects, were performed as previously described (Kurisaki *et al.*, 2003). Transient transfections in HaCaT keratinocytes with siRNA NC or siRNAs targeting Net1 or Net1A, Smad2 or Smad3 were performed with Lipofectamine 2000 (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Overexpression and knockdown of miR-24 was achieved by transiently transfecting HaCaT cells with 100 nM of negative control pre-miRNA or pre-miR-24 and 120 nM of antisense oligonucleotide for miR-24 (as-miR-24) with Lipofectamine 2000.

qRT-PCR and miRNA detection

RNA extraction was performed with the illustra RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The first complementary DNA strand was synthesized by Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen/Life Technologies) and qRT-PCR was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA). All

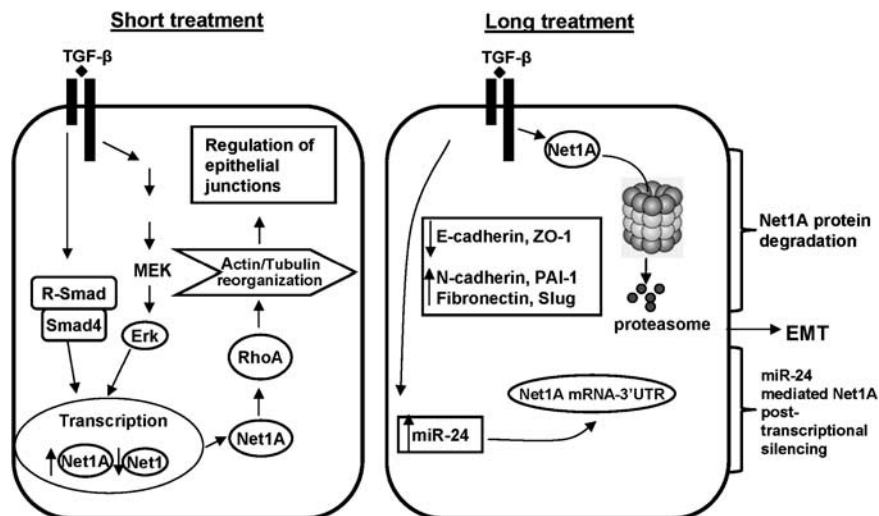


Figure 9 A model summarizing the current findings and emphasizing the short- and long-term effects of TGF- β on Net1/Net1A regulation and its relevance in EMT. The TGF- β type I and type II receptors are shown as black bars on the plasma membrane. See text for further details.

primer sequences used for the qRT-PCR experiments are shown in Supplementary Table S1. The β -actin or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) housekeeping genes were used as an internal control for mRNA normalization. For miR-24 detection, RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen/Life Technologies) and qRT-PCR was performed using the miR-Vana qRT-PCR detection kit (AMBION, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. U6 RNA detection was used for normalization of the samples.

Identification of microRNAs targeting the 3'UTR of Net1A through bioinformatic analysis

To identify if any microRNAs have binding sites in the 3'UTR of Net1A, computational analysis was performed using RNA22 program (<http://cbsrv.watson.ibm.com/rna22.html>). Specifically, the 3'UTR of Net1A was blasted against all known microRNA mature sequences. MicroRNAs having at minimum

7/8 nucleotides of their seed sequence complementary with the 3'UTR of Net1A were considered as positive hits. These predictions were validated using Targetscan v5.1 program (<http://www.targetscan.org/>).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the PENED program of the Greek Secretariat for Research and Technology (Grant no. PENED03-688). We thank Dr EA Papanikolaou for valuable comments.

References

- Baum B, Georgiou M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *J Cell Biol* **192**: 907–917.
- Carr HS, Cai C, Keinanen K, Frost JA. (2009). Interaction of the RhoA exchange factor Net1 with discs large homolog 1 protects it from proteasome-mediated degradation and potentiates Net1 activity. *J Biol Chem* **284**: 24269–24280.
- Derynck R, Akhurst RJ. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* **9**: 1000–1004.
- Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S et al. (1999). Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell* **10**: 3801–3813.
- Garcia-Mata R, Burrridge K. (2007). Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol* **17**: 36–43.
- Garcia-Mata R, Dubash AD, Sharek L, Carr HS, Frost JA, Burrridge K. (2007). The nuclear RhoA exchange factor Net1 interacts with proteins of the Dlg family, affects their localization, and influences their tumor suppressor activity. *Mol Cell Biol* **27**: 8683–8697.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G et al. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* **10**: 593–601.
- Ikushima H, Miyazono K. (2010). TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **10**: 415–424.
- Inoue Y, Imamura T. (2008). Regulation of TGF-beta family signaling by E3 ubiquitin ligases. *Cancer Sci* **99**: 2107–2112.
- Izzi L, Attisano L. (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 2071–2078.
- Javelaud D, Mauviel A. (2005). Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* **24**: 5742–5750.
- Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A, Stournaras C. (2009). Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J* **276**: 2947–2965.
- Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS et al. (2008). MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* **28**: 6773–6784.
- Kurisaki K, Kurisaki A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, Ten Dijke P et al. (2003). Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation. *Mol Cell Biol* **23**: 4494–4510.
- Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E et al. (2009). miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements. *Mol Cell* **35**: 610–625.
- Lee J, Moon HJ, Lee JM, Joo CK. (2010). Smad3 regulates Rho signaling via NET1 in the TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* **285**: 26618–26627.
- Lin SC, Liu CJ, Lin JA, Chiang WF, Hung PS, Chang KW. (2011). miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol* **46**: 204–208.
- Massague J. (2008). TGFbeta in cancer. *Cell* **134**: 215–230.
- Moustakas A, Heldin CH. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**: 3573–3584.
- Moustakas A, Heldin CH. (2008). Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett* **582**: 2051–2065.
- Moustakas A, Heldin CH. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**: 3699–3714.
- Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G. (2008). RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. *Nat Cell Biol* **10**: 765–775.
- Pardali K, Moustakas A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1775**: 21–62.
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin CH, ten Dijke P. (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* **112**(Pt 24): 4557–4568.
- Qin H, Carr HS, Wu X, Muallem D, Tran NH, Frost JA. (2005). Characterization of the biochemical and transforming properties of the neuroepithelial transforming protein 1. *J Biol Chem* **280**: 7603–7613.
- Qin W, Shi Y, Zhao B, Yao C, Jin L, Ma J et al. (2010). miR-24 regulates apoptosis by targeting the open reading frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells. *PLoS One* **5**: e9429.
- Rajasekaran SA, Palmer LG, Moon SY, Peralta Soler A, Apodaca GL, Harper JF et al. (2001). Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **12**: 3717–3732.
- Rossman KL, Der CJ, Sondek J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 167–180.

- Sahai E, Marshall CJ. (2002). ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol* **4**: 408–415.
- Schmidt A, Hall A. (2002). The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem* **277**: 14581–14588.
- Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J, Wang XF. (2001). The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* **276**: 15362–15368.
- Shi Y, Massague J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685–700.
- Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, Morita I *et al.* (2011). TGF-beta regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J* **30**: 783–795.
- Sun F, Wang J, Pan Q, Yu Y, Zhang Y, Wan Y *et al.* (2009). Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31. *Biochem Biophys Res Commun* **380**: 660–665.
- Sun Q, Zhang Y, Yang G, Chen X, Cao G, Wang J *et al.* (2008). Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. *Nucleic Acids Res* **36**: 2690–2699.
- Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, Fuchs E. (2002). Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell* **3**: 367–381.
- Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C. (2005). LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **280**: 11448–11457.
- Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C. (2008). A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* **275**: 4074–4087.
- Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D. (2010). Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *FASEB J* **24**: 891–905.
- Wang HR, Zhang Y, Ozdamar B, Ogunjimi AA, Alexandrova E, Thomsen GH *et al.* (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**: 1775–1779.
- Wang Q, Huang Z, Xue H, Jin C, Ju XL, Han JD *et al.* (2008). MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4. *Blood* **111**: 588–595.
- Xie L, Wang T, Yu S, Chen X, Wang L, Qian X *et al.* (2011). Cell-free miR-24 and miR-30d, potential diagnostic biomarkers in malignant effusions. *Clin Biochem* **44**: 216–220.
- Zaidi SK, Dowdy CR, van Wijnen AJ, Lian JB, Raza A, Stein JL *et al.* (2009). Altered Runx1 subnuclear targeting enhances myeloid cell proliferation and blocks differentiation by activating a miR-24/MKP-7/MAPK network. *Cancer Res* **69**: 8249–8255.
- Zhang YE. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* **19**: 128–139.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/one>)

TGF β -induced Early Activation of the Small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and Involves Src and the Guanine Nucleotide Exchange Factor Vav2

Elsa Papadimitriou¹, Dimitris Kardassis¹, Aristidis Moustakas^{2,3} and Christos Stournaras¹

¹Department of Biochemistry, University of Crete Medical School, Heraklion, ²Ludwig Institute for Cancer Research, Biomedical Center, Uppsala University, Uppsala, ³Institute for Medical Biochemistry and Microbiology, Science for Life Laboratory, BioMedical Center, Uppsala University, Uppsala

Key Words

TGF β • RhoA • Src • Vav2 • Smad2/3

Abstract

TGF β has been shown to induce short- and long-term actin reorganization controlled by Rho-GTPase signaling. A number of direct Smad target genes, rapidly activated by TGF β , have been previously reported to control the long-term Rho activation and actin reorganization. However, the molecular mechanisms that regulate the prompt stimulation of Rho GTPases by TGF β remain unknown. In the present study we report that TGF β rapidly stimulated RhoA and RhoB activation in JEG3 choriocarcinoma cells that lack endogenous Smad3. Inhibition of Smad2 expression via siRNA-mediated silencing or by blocking its phosphorylation using the T β RI inhibitor SB431542 did not prevent the early RhoA/B activation by TGF β indicating that this effect is Smad2/3-independent. Pre-treatment of the cells with the general tyrosine kinase inhibitor Genistein blocked the TGF β -induced early RhoA activation. In line with this finding, TGF β -stimulation resulted in a quick activation of the non-receptor tyrosine kinase Src, followed by activation of the guanine nucleotide

exchange factor (GEF) Vav2. Inhibition of Src kinase by the selective inhibitor of the Src family tyrosine kinases PP2 totally blocked the early TGF β -induced RhoA activation. Similarly, Vav2 silencing via siRNA reduced the TGF β -induced RhoA activation implying that the rapid Src/Vav2 stimulation was effective in regulating RhoA activation. Our present findings provide for the first time a clear evidence for the role of Src and Vav2-GEF in the early Smad2/3-independent Rho activation by TGF β .

Copyright © 2011 S. Karger AG, Basel

Introduction

Transforming growth factor β (TGF β) is the prototype member of a large superfamily of pleiotropic cytokines that control various physiological processes. TGF β is an important homeostatic regulator in various epithelial and endothelial cells [1-3]. TGF β acts via a “classical” pathway which involves the heterotetrameric complex of two type I (T β RI) and two type II (T β RII) Ser/Thr kinase membrane receptors. After ligand binding, the type II receptor trans-phosphorylates and acti-

vates the type I receptor, leading to phosphorylation of the downstream cytoplasmic effector proteins Smad2 and Smad3, (collectively termed as receptor-activated Smads, R-Smads), which in turn oligomerize with the common partner Smad4 and rapidly translocate to the nucleus, where they regulate gene expression [4, 5]. Apart from this well-established genomic pathway, several non-Smad signaling effectors have been described, including the mitogen-activated protein kinases ERK, JNK and p38, the phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3-kinase) and Ras- and Rho-GTPases [6-8]. These signaling pathways operating in parallel or in direct coordination with the Smad proteins regulate various early cell responses, including rapid actin reorganization [9, 10]. An extensively investigated signaling system of TGF β -induced cytoskeleton rearrangements includes the activation of the small Rho GTPases (for a recent review see [11]).

Rapid Rho-GTPase activation was found to operate in a variety of cell models of TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) such as in the atrioventricular canal (AVC) of the embryonic chicken heart [12], during tubulointerstitial fibrosis [13] and in proliferative vitreoretinopathy (PVR) [14]. In addition to their role in EMT, Rho-GTPases and their downstream effectors are activated rapidly by TGF β and contribute to cytoskeletal reorganization in various cell systems. Indeed, TGF β was reported to promote the differentiation of neural crest cells into vascular smooth muscle cells via a rapid activation of RhoA and ROCK1 [15] and the differentiation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells via a rapid activation of RhoA and its downstream kinases ROCK, PKN/PRK2 and p38 MAPK. Moreover, non-genomic signaling involving MAP kinases or the PI3 kinase as downstream effectors that cooperate with Rho-GTPases to achieve TGF β -induced cytoskeleton remodeling was reported in human prostate cancer cells [16, 17]. In previous studies we have thoroughly investigated the short-term and sustained actin cytoskeleton reorganization, the implication of early Rho-signaling and the cross-talk with Smad-pathways in TGF β treated fibroblasts [18-21]. In these cells, TGF β initiated rapid activation of the RhoA/B/ROCK/LIMK2/cofilin pathway regulating stress fiber formation [18, 19], but also a fibroblast to myofibroblast differentiation program, involving enhanced expression of α -SMA gene [20]. It was further demonstrated that the long-term actin reorganization was controlled by a Smad-dependent regulation of RhoB – but not RhoA – gene transcription in both, fibroblasts [20] and HaCaT keratinocytes [21]. While some direct Smad target genes that are rapidly activated

by TGF β , have been reported to control the long-term Rho activation and actin reorganization, the involvement of early signaling that may regulate the rapid stimulation of Rho GTPases in response to TGF β remains unknown.

In the present study we have used a cellular model that lacks endogenous Smad3 expression (JEG3 choriocarcinoma cells) [22] to identify early TGF β -activated molecular targets that may control the rapid activation of Rho-GTPases. We report that TGF β rapidly stimulated RhoA- and RhoB-GTPases. This effect was Smad2/3 independent as documented by specific silencing of Smad2, or by blocking of the T β RI by its specific inhibitor SB431542. Moreover, TGF β activates rapidly the non-receptor tyrosine kinase Src and its downstream effector, the Rho-GEF Vav2. Inhibition of Src by PP2 totally blocked the early TGF β -induced RhoA activation, while silencing of Vav2 by a specific siRNA inhibited the TGF β -induced RhoA activation. These findings imply for the first time that the rapid activation of Src/Vav2 may control the early Rho-GTPase activation upon TGF β stimulation.

Methods and Materials

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin/streptomycin for cell culture, Superscript II reverse transcriptase, dNTPs and Lipofectamine 2000 were purchased from Invitrogen/Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from BioChrom Labs (Terre Haute, IN, USA). Recombinant mature human TGF β 1 was purchased from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, USA). The ECL western blotting analysis system and the illustra RNAspin Mini RNA isolation kit were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Anti-Smad2 (sc-6200), anti-RhoA (sc-26C4), anti-RhoB (sc-180), anti-Rac1 (sc-95) and anti-Cdc42 (sc-8401) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-P-Smad2 (3101S) and anti-Vav2 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-P-Src Y418 and anti-P-Src Y529 were purchased from Biosource/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The SB431542 inhibitor and Genistein were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MI, USA). Anti-actin, secondary anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate were from Chemicon International Inc (Temecula, CA, USA). The PP2 inhibitor was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA) and the GST-Rhoteckin-RBD protein beads and the GST-PAK-PBD protein beads were purchased from Cytoskeleton Inc. (Denver, USA). Short-interfering (si) RNA for Smad2 and Vav2 were purchased from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) and the negative control siRNA was purchased from AMBION (Austin, USA). Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix was purchased from Fermentas (Maryland, USA).

Cell culture and transient transfections

Human JEG3 choriocarcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, glutamine and penicillin/streptomycin at 37°C. Transient transfections in JEG3 cells with negative control siRNA or siRNAs targeting Smad2 or Vav2 were performed in two rounds with Lipofectamine 2000 according to manufacturer's instructions.

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

RNA extraction was performed with the illustra RNAspin Mini RNA isolation kit according to manufacturer's instructions. The first cDNA strand was synthesized by Superscript II reverse transcriptase and qRT-PCR was performed using Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix. β -actin housekeeping gene was used as an internal control for mRNA normalization.

Determination of GTP-loaded RhoA, RhoB and Rac1, Cdc42 levels

For affinity precipitation with GST-RhoA/RhoB protein beads, cells were either transiently transfected in two rounds with negative control siRNA or specific siRNAs targeting Smad2 or Vav2 with Lipofectamine 2000, were serum-starved for 24 hours and then stimulated with 5 ng/ml TGF β or not for 5 minutes or alternatively pretreated with the inhibitors SB431542, PP2 and Genistein and then stimulated with 5 ng/ml TGF β or not for 5 minutes. The cells were then washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed with Cell lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.3 M NaCl, 2% IGEPAL, supplemented with protease inhibitors). Equal volumes of cleared cell lysates were incubated with 20 μ l (60 μ g) GST-RhoA/RhoB protein beads attached to glutathione-sepharose at 4°C for 1 hour. Beads were washed 3 times with wash buffer (25 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl₂, 40 mM NaCl), resuspended in sample buffer and analyzed in parallel with equal volumes of total cell lysates (TCL) on a 12% polyacrylamide gel by SDS-PAGE followed by immunoblotting with RhoA or RhoB antibody.

The same procedure was followed for the determination of the Rac1 and CDC42 activity by using instead the GST-PAK-PDB protein beads attached to glutathione-sepharose and specific antibodies for Rac1 and CDC42 in the western blots.

Quantification of the immunoblots was performed with Tinascan v.2.07d software (Raytest GmbH, Germany).

Affinity precipitation of active Vav2 GEF with GST-RhoA (G17A) sepharose beads

For affinity precipitation of active Vav2 GEF with the mutated, nucleotide-free form of RhoA, GST-RhoA (G17A) bound on sepharose beads, cells were serum-starved for 24 hours and then treated with 5 ng/ml TGF β for various time points. The cells were then washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with lysis buffer (20 mM Hepes pH: 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton). Cleared cell lysates were incubated with 20 μ g of freshly made GST-RhoA (G17A) sepharose beads at 4°C for 1 hour. Beads were then

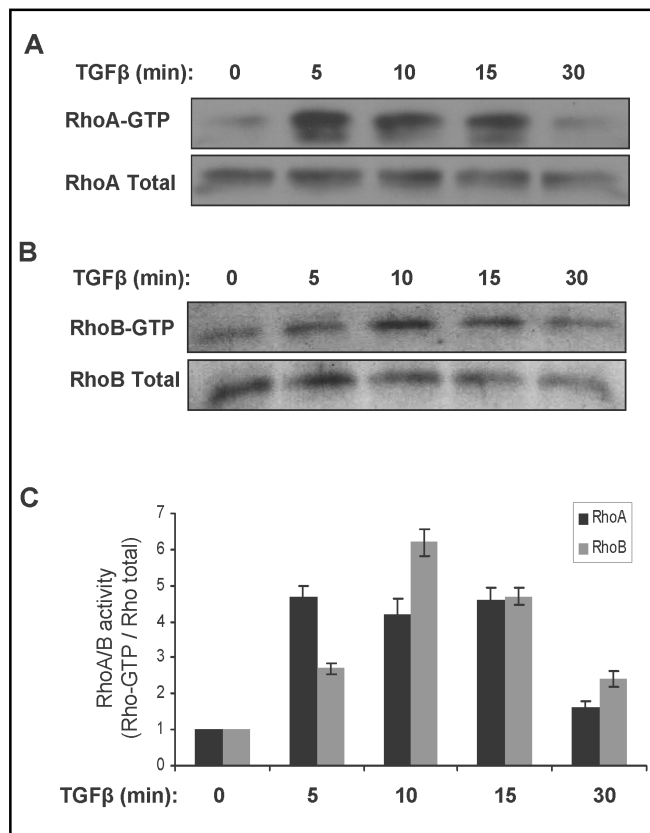


Fig. 1. RhoA and RhoB are activated in Smad3 deficient JEG3 choriocarcinoma cells after short TGF β treatment. Analysis of RhoA (A) and RhoB (B) activation levels by GST-RhoA/RhoB pull-down assay in JEG3 cells treated with 5 ng/ml TGF β for various time points (5 to 30 minutes). A and B show representative figures from n=3 and n=2 distinct experiments respectively.

washed 3 times with lysis buffer, resuspended in sample buffer and analyzed in parallel with total cell lysates (TCL) on a 10% polyacrylamide gel by SDS-PAGE followed by immunoblotting with Vav2 antibody.

For preparation of the GST-RhoA (G17A) sepharose beads, competent bacteria were transformed with the pGEX-GST RhoA (G17A) expression vector (generous gift from K. Burrige) [23]. Bacteria were grown in a 200 ml culture (1:50 dilution) at 37°C for approximately 2 hours until OD_{600nm}=0.6 and the GST-RhoA (G17A) protein expression was induced with 0.5 mM IPTG at room temperature for 16 hours or at 30°C for 5 hours. Bacteria were then resuspended in 10 ml STE buffer (10 mM Tris-HCl pH: 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). The GST-RhoA (G17A) protein was extracted from the bacteria after sonication and addition of 1% Triton X-100 followed by incubation on ice for 20 minutes. The protein was bound to sepharose beads after incubation of the lysate with precleared glutathione-sepharose beads at 4°C for 4 hours. Finally the beads were washed 2 times with STE buffer supplemented with 1%

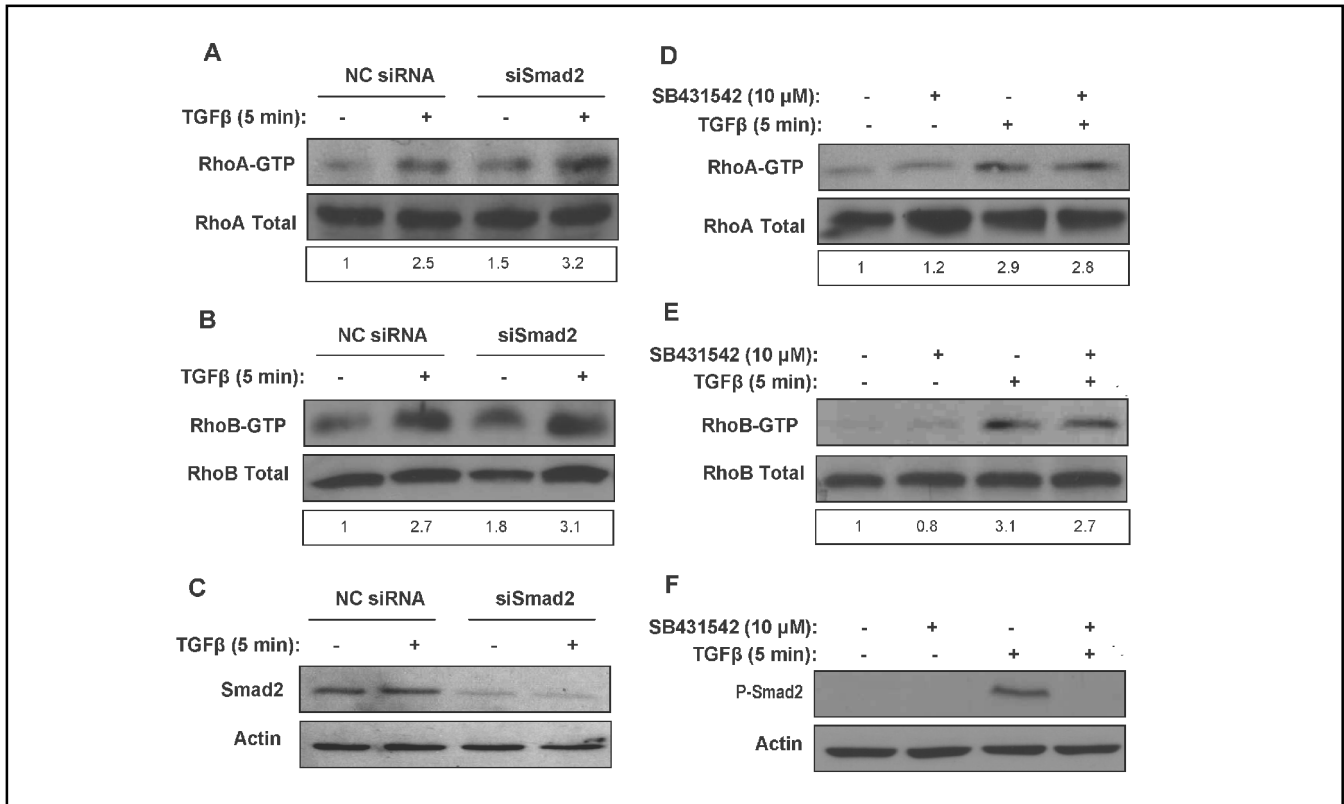


Fig. 2. The early activation of RhoA and RhoB by TGFβ is Smad-independent. RhoA (n=3) (A) and RhoB (n=2) (B) activation levels by GST- RhoA/RhoB pull-down assay in JEG3 cells transiently transfected with a negative control (NC) siRNA or a specific siRNA that targets Smad2 and treated or not with 5 ng/ml of TGFβ for 5 minutes. (C) Analysis of Smad2 protein levels showing the efficiency of Smad2 silencing in the RhoA and RhoB activation assays in panels A and B. Analysis of RhoA (n=3) (D) and RhoB (n=2) (E) activation levels by GST- RhoA/RhoB pull-down assay in JEG3 cells treated with 5 ng/ml TGFβ or not for 5 minutes in the presence or absence of the TGFβ type I receptor (ALK5) inhibitor SB431542 (10 μM). (F) Analysis of P-Smad2 levels showing the efficiency of SB431542 inhibitor in the RhoA and RhoB activation assays in panels D and E. β-actin serves as immunoblot loading control in panels C and F.

Triton X-100 and 1 mM DTT, 2 times with high salt buffer (10 mM Tris HCl pH: 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM DTT) and 1 time with PBS supplemented with 1 mM DTT and analyzed with SDS-PAGE and Coomassie staining for the determination of the concentration of the GST-RhoA (G17A) protein on the sepharose beads.

Results

Early RhoA/B activation by TGFβ in the absence of Smad2 and Smad3

The rapid and sustained activation of Rho GTPases by TGFβ was reported previously in various cell models, including fibroblasts [18, 19], HaCaT keratinocytes [21], PC3 prostate cancer cells [16, 24], retinal pigment epithelial cells (RPE) [14] and rat pulmonary arterial smooth muscle cells [15]. In order to investigate the role of the Smad pathway in the early TGFβ-induced Rho

activation, we used JEG3 choriocarcinoma cells that lack the endogenous Smad3 protein. Cells were serum-starved for 24 hours and then stimulated with 5 ng/ml TGFβ for 5 to 30 minutes. The activity of RhoA was assessed by affinity precipitation using the GST- RhoA/RhoB agarose beads. Fig. 1A demonstrates a clear and significant early activation of RhoA GTPase (5 to 15 minutes upon TGFβ treatment) that declined after 30 minutes. Similarly, RhoB activation was evident after 5 minutes of TGFβ addition, peaked at 10 minutes and declined after 30 minutes of TGFβ stimulation.

To investigate whether the observed rapid activation of RhoA and RhoB by TGFβ is Smad2-independent, we silenced the expression of the endogenous Smad2 gene by transfecting the Smad3-deficient JEG3 cells with a siRNA that specifically silences Smad2. As shown in Figs. 2A and 2B, the early TGFβ induced RhoA and RhoB activation remained unaffected in Smad2 knock out cells,

implying that this effect is Smad2- and Smad3-independent. The efficacy of the specific Smad2 siRNA on the expression of Smad2 is demonstrated in Fig. 2C. Furthermore, we used the specific inhibitor SB431542 that blocks the TGF β type I receptor kinase in order to provide additional experimental evidence on the role of the TGF β type I receptor. For this, cells were pretreated with the SB431542 inhibitor for 1 hour, then stimulated with TGF β for 5 minutes and the activation of both RhoA and RhoB was evaluated using the GST-RhoA pull down assay. Figs 2D and 2E document that RhoA and RhoB remained activated after stimulation with TGF β in the presence of the SB431542 inhibitor. The efficiency of the inhibitor in blocking Smad2 phosphorylation is shown in Fig. 2F. These results clearly indicate that TGF β promotes rapid RhoA and RhoB activation via a molecular mechanism that does not involve the kinase activity of the type I receptor and neither of the two specific R-Smads that this receptor phosphorylates.

TGF β induces rapid Src and Vav2 activation

Searching for molecular targets that may link TGF β to the rapid Rho activation, we first addressed the possible involvement of tyrosine kinases in this process. For this purpose, cells were initially pre-treated with the general tyrosine kinase inhibitor Genistein for 1 hour, stimulated with 5 ng/ml TGF β for 5 minutes, followed by measurement of the RhoA activity using the GST-RhoA pull down assay. As shown in Fig. 3A, increasing concentrations of Genistein significantly inhibited the early RhoA activation by TGF β implying the involvement of tyrosine kinase effectors in this process. To further explore this finding we assessed the phosphorylation levels of the non receptor tyrosine kinase Src. We focused on Src since several reports in the past have documented c-Src regulation by TGF β [25-29]. As shown in Fig. 3B, TGF β treatment induced a rapid activation of Src tyrosine kinase, as estimated by the increase in the phosphorylation of residue Y418, which is necessary for full catalytic activity. This activation peaked at 5 minutes and persisted for up to 60 minutes, while the inhibitory phosphorylation of Src in residue Y529, became evident only after 15 minutes of TGF β stimulation indicating that the activation of Src by TGF β is tightly regulated. In a control experiment we monitored the phosphorylation of Smad2 by TGF β and found that Smad2 phosphorylation could be detected after 5 minutes, became more evident after 15 minutes and persisted for at least 60 minutes (Fig. 3B).

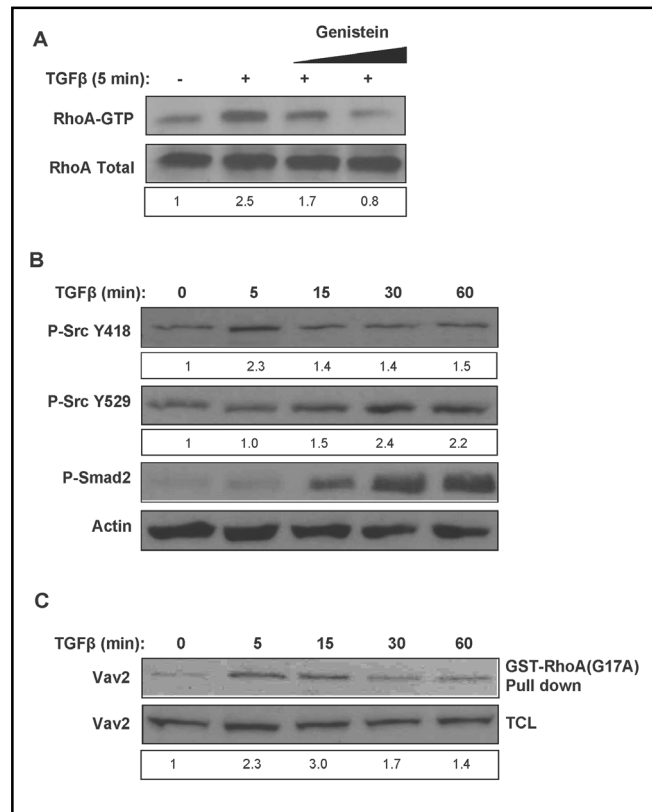


Fig. 3. TGF β induces rapid Src and Vav2 activation. A. Analysis of RhoA activation levels by GST-RhoA pull-down assay in JEG3 cells treated with 5 ng/ml TGF β or not for 5 minutes in the presence or absence of increasing concentrations (50 and 100 μ M, triangle) of the general tyrosine kinase inhibitor Genistein (Representative figure from n=3 distinct experiments). B. Analysis of the phosphorylation levels of Src kinase in residues Y418 (auto-phosphorylation site necessary for full catalytic activity) and Y529 (negative regulatory site) in JEG3 cells treated with 5 ng/ml TGF β for various early timepoints (5 to 60 minutes) (Representative figure from n=2 distinct experiments). Immunoblotting for P-Smad2 shows the activation of the classical TGF β /Smad pathway. β -actin serves as immunoblot loading control. C. Analysis of Vav2 activation by the GST-RhoA (G17A) pull-down assay, using the mutated and nucleotide-free form of RhoA (G17A) that exhibits high affinity for activated GEFs, in JEG3 cells treated with 5 ng/ml TGF β for various early time points (5 to 60 minutes) (Representative figure from n=3 distinct experiments).

Src activation has been linked to the phosphorylation and activation of the Rho-GEF Vav2 [30-32], which in turn may be associated with the activation of the small Rho GTPases [33, 34]. Vav2 has been functionally linked to the three major Rho family members, Rac1, Cdc42 and RhoA [31, 32, 35-39]. To explore the role of Vav2 in RhoA activation by TGF β , we used an affinity precipitation assay that specifically detects activated GEFs

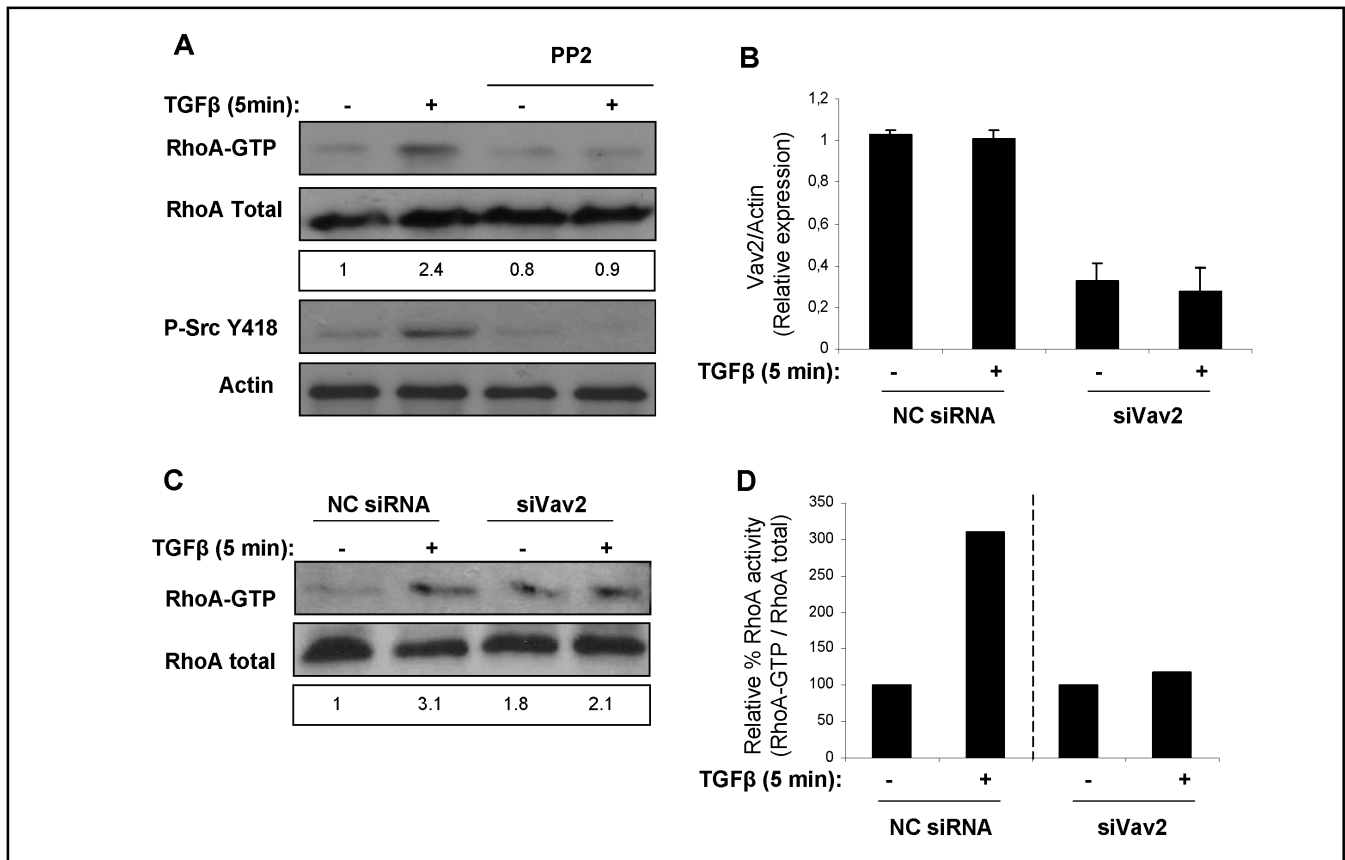


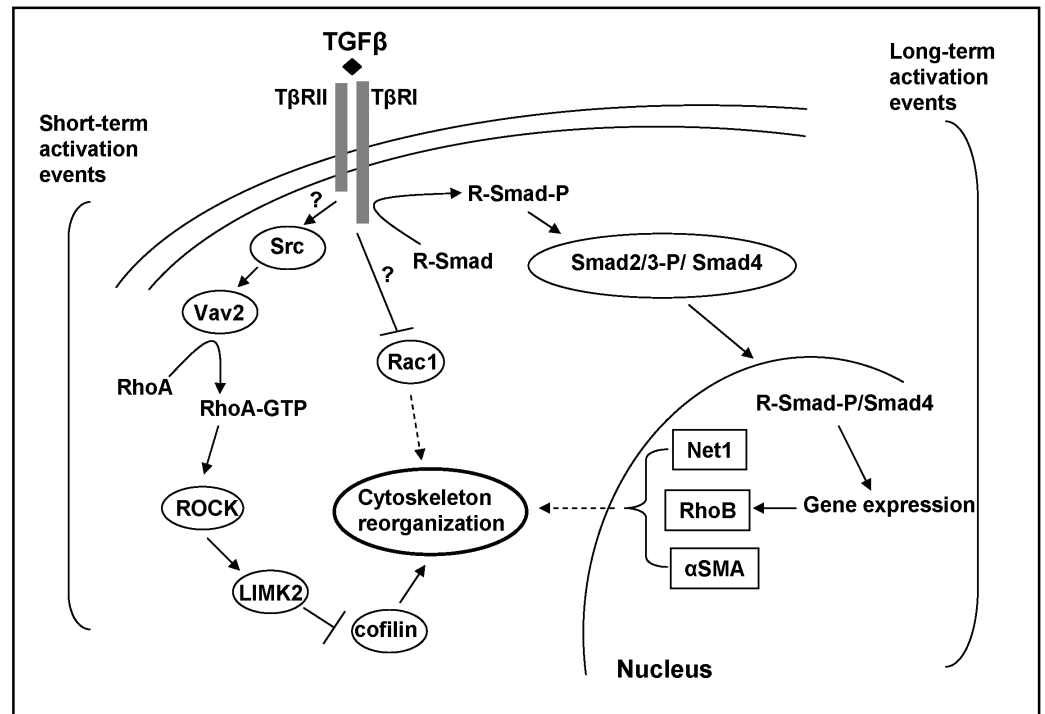
Fig. 4. Src and Vav2 activation is required for the TGFβ induced early RhoA stimulation. (A) Analysis of RhoA activation levels by GST- RhoA-RBD pull-down assay in JEG3 cells treated with 5 ng/ml TGFβ or not for 5 minutes in the presence or absence of the Src kinase inhibitor PP2 (10 μM) (Representative figure from n=3 distinct experiments). Immunoblotting for P-Src Y418 shows the efficiency of the PP2 inhibitor. β-actin serves as immunoblot loading control. (B) Analysis of Vav2 mRNA levels by qRT-PCR showing the efficiency of Vav2 silencing in the RhoA activation assay in panel C. (C) Analysis of RhoA activation levels by GST- RhoA-RBD pull-down assay in JEG3 cells transiently transfected with a negative control (NC) siRNA or a specific siRNA that targets Vav2 and treated or not with 5 ng/ml of TGFβ for 5 minutes (Representative figure from n=4 distinct experiments). (D) Densitometric quantification (% percentage) of RhoA activity (RhoA-GTP/RhoA total) of the immunoblot in panel C in TGFβ-stimulated versus non-stimulated cells treated with either NC siRNA or siVav2. In both parts of the graph the RhoA activity in the non-stimulated cells is set to 1.

using a mutated, nucleotide-free form of RhoA (G17A) that exhibits high affinity only for activated GEFs [23]. For this purpose, JEG3 cells were serum-starved for 24 hours, stimulated with 5 ng/ml TGFβ for 5 to 60 minutes and the activity of Vav2 GEF was estimated by pull down assay using the GST-RhoA (G17A) sepharose beads. Fig. 3C shows a rapid (5 minutes) Vav2 activation upon TGFβ treatment which peaked at 15 minutes and steadily declined afterwards. It is noted that the kinetics of the pull-down experiments (Fig. 3C) closely correlate to the kinetics of Src phosphorylation (Fig. 3B). These findings clearly show that TGFβ treatment induces rapid phosphorylation of Src and activation of Vav2 in JEG3 cells.

Src and Vav2 activation is required for the TGFβ induced early RhoA stimulation

We further explored whether the rapid activation of Src and Vav2 by TGFβ is directly involved in the early, Smad2/3-independent RhoA activation. For this, we first pretreated JEG3 cells with the specific Src kinase inhibitor PP2 for 1 hour, then stimulated with 5 ng/ml TGFβ for 5 minutes and assessed the RhoA activation with the GST-RhoA-RBD pull down assay. Interestingly, the PP2 inhibitor fully blocked the observed early RhoA activation by TGFβ (Fig. 4A), clearly indicating that the Src kinase activity is necessary for this effect. The efficacy of PP2 in inhibiting Src activity is shown in Fig. 4A, lower panel. To further explore the potential direct involvement of Vav2

Fig. 5. A model summarizing the current findings and emphasizing the short-term TGF β signaling towards RhoA regulation and actin reorganization. The long-term activation events towards RhoA/B regulation and actin reorganization involving Smad-dependent transcriptional regulation are also briefly presented.



in RhoA activation by TGF β , cells were transfected with a siRNA that targets and significantly downregulates Vav2 expression as indicated by qRT-PCR analysis (Fig. 4B). When cells were transfected with the Vav2 siRNA in the absence of TGF β , a reproducible but moderate (up to 1,8 fold) induction of RhoA activity was observed relative to the activity of RhoA after control siRNA transfection (Fig. 4C, lane 3). This finding implies that downregulation of endogenous Vav2 may increase basal RhoA activity. This observation could be attributed to the reported role of Vav2 in regulating Rac1 and explained by a competitive mechanism between Rho and Rac activity which could be triggered after Vav2 silencing [40]. Irrespective of the exact mechanism however, the measured effect of Vav2 silencing on basal RhoA activity is rather weak. Interestingly, after TGF β stimulation, silencing of Vav2 almost completely blocked the ligand-dependent activation of RhoA (Fig. 4C, lanes 3 and 4, Fig. 4D), implying that the observed Vav2 activation is directly implicated in the early activation of RhoA by TGF β .

As mentioned above, Vav2 activation by TGF β as monitored by the GST-RhoA (G17A) pull down assay could also implicate the activation of Rac1 and Cdc42, [33, 34]. To explore this possibility, we measured the activity of Rac1 and Cdc42 after short TGF β treatment in JEG3 cells by using the GST-PAK-PBD pull down assay. Interestingly, no modulation in the activity levels of either Rac1 or Cdc42 could be observed in this cell model

(data not shown), while in Swiss 3T3 fibroblasts we even observed a significant downregulation in Rac1 and Cdc42 activity (data not shown) after short treatment with TGF β . The above findings further emphasize that the TGF β induced activation of Vav2 in JEG3 cells leads to RhoA but not to Rac1 or Cdc42 stimulation.

Discussion

Rapid activation of members of the Rho-family of small GTPases by TGF β , leading to control of actin cytoskeleton rearrangements has been reported in a variety of cell types; however, the molecular mechanisms that regulate this early event remain poorly defined. In the present study we provide strong experimental evidence that TGF β rapidly activates Src/Vav2 signaling, which is directly involved in the early activation of RhoA. This conclusion is supported by a) the rapid TGF β -induced phosphorylation of Src at residue Y418, b) the pull-down experiments showing that Vav2 is activated as early as 5 minutes upon TGF β treatment and c) the inhibition of TGF β -induced RhoA activation when cells were pretreated either with the specific Src inhibitor PP2, or transfected with a small interfering RNA targeting Vav2.

We have used in this study the JEG3 choriocarcinoma cell line that lacks endogenous Smad3 thus representing a valuable model to analyze rapid TGF β effects. Treatment of these cells with TGF β generated

an early (within 5 minutes) and robust activation of RhoA/B GTPases, confirming reports in other cell models that this cytokine may influence rapidly Rho signaling. To exclude the involvement of the classical TGF β /Smad-signaling pathway, RhoA/B activation was assayed in cells pretreated either with the specific T β RI inhibitor SB431542 or in cells transfected with a siRNA targeting Smad2. Both series of control experiments revealed convincingly that the TGF β -induced early RhoA/B activation remained unaffected. Taking into account that JEG3 cells do not express Smad3, these results support the notion that the rapid activation of the RhoA/B small GTPases by TGF β is a Smad2 and Smad3-independent process. Accordingly, it can be clearly differentiated from the long-term TGF β -induced Rho activation (and actin reorganization) that has been previously reported to be controlled, at least in part, by genes that are activated by the TGF β /Smad pathway including RhoB [21], endothelin-1 [41, 42], sphingosine kinase-1 [43, 44], the Rho guanine exchange factor (GEF) Net1 [45] and the alpha-smooth muscle actin (α -SMA) [20].

Several reports have documented differential c-Src regulation by TGF β . TGF β has been shown to down-regulate Src family kinases in PC3 prostate cancer cells, playing a crucial role in the regulation of cell growth [25]. Moreover, TGF β was reported to significantly decrease v-Src kinase activity and protein abundance in Src-transformed 3Y1 fibroblasts (SR-3Y1) [26]. On the other hand, Src was activated by TGF β in mammary epithelial cells [27], in human mesangial cells [28], while TGF β -dependent Src signaling activation was also reported to control urokinase up-regulation and invasion in human ovarian cancer cells [29]. In line with the latter reports, in the present study we clearly demonstrate an early and significant increase in the autophosphorylation of Src on residue Y418 by TGF β , which is required for full catalytic activity. Moreover, this effect was shown to be directly implicated in the rapid RhoA activation by this cytokine in JEG3 choriocarcinoma cells, supporting thus the pleiotropic action of TGF β . Since RhoA activation was not inhibited by the specific T β RI inhibitor (Fig. 2A) we assume that the observed Src (and Vav2) activation is most probably triggered by the T β RII Ser/Thr kinase membrane receptor. This assumption is in line with recent reports that link Src kinase to T β RII receptor through β 3 integrins [46].

Previous studies indicated that Src activation by phosphorylation may stimulate the Rho-GEF Vav2 [30-32],

which in turn may associate with, and activate the Rho GTPases [33, 34]. In the present work we provide for the first time clear experimental evidence for a direct involvement of the Src/Vav2 signaling effectors in TGF β -induced rapid RhoA GTPase activation. It should be noted that Vav2 is not a specific GEF for RhoA, as it has been reported to be able to activate all three major small Rho GTPases (Rac1, Cdc42 and Rho) [33, 34]. Accordingly, the observed early activation of Vav2 by TGF β may also implicate the activation of Rac1 and Cdc42. However, we show that TGF β does not modulate the activation of Rac1 and Cdc42 in JEG3 cells at early time points (data not shown) or even downregulates Rac1 and Cdc42 activity after short TGF β treatment in another cell system (Swiss 3T3 fibroblasts, data not shown), which further support our conclusions that the TGF β induced activation of Vav2 is linked to RhoA activation. In other cell types it is possible that TGF β regulates Rac1 or Cdc42 activity via Vav2, which remains to be examined in future studies. Interestingly, these early effects reported in our study are clearly different from the previously reported transcriptional regulation of Vav family members by TGF β [47], or the reported TGF β -induced recruitment of the HER2/Vav2/Rac1/Pak1/actin/actinin complex to lamellipodia that may increase the metastatic properties and survival of HER2-overexpressing cells [48].

In conclusion, in the present study we provide novel mechanistic insights highlighting the early activation of the Src/Vav2 signaling that regulates the rapid and Smad2/3-independent TGF β -induced RhoA GTPase activation, providing a link between the TGF β receptor complex and the rapidly activated Rho/ROCK/LIMK2/cofilin pathway (Fig. 5). This mechanism is clearly different from the previously reported long-term transcriptional regulation of the small GTPase RhoB by TGF β involving the Smad machinery [20, 21] (Fig. 5). It will be interesting to explain how the early and late mechanisms of Rho-GTPase activation are linked with each other or whether the early and late mechanisms serve distinct functions, which are of course both based on the modulation of actin dynamics in cells that respond to TGF β .

Acknowledgements

This work was supported by the PENED program of the Greek Secretariat for Research and Technology (Grant # PENED03-688).

References

- 1 Massague J: Tgf-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998;67:753-791.
- 2 Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992;119:1017-1021.
- 3 Siegel PM, Massague J: Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:807-821.
- 4 Shi Y, Massague J: Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
- 5 Moustakas A, Heldin CH: The regulation of TGF-beta signal transduction. *Development* 2009;136:3699-3714.
- 6 Javelaud D, Mauviel A: Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and smad signaling downstream of TGF-beta: Implications for carcinogenesis. *Oncogene* 2005;24:5742-5750.
- 7 Moustakas A, Heldin CH: Non-smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 2005;118:3573-3584.
- 8 Zhang YE: Non-smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res* 2009;19:128-139.
- 9 Papakonstanti EA, Stournaras C: Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 2008;582:2120-2127.
- 10 Moustakas A, Heldin CH: Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett* 2008;582:2051-2065.
- 11 Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A, Stournaras C: Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J* 2009;276:2947-2965.
- 12 Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucci I, Kapus A: Central role for rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F911-924.
- 13 Lee J, Ko M, Joo CK: Rho plays a key role in TGF-beta1-induced cytoskeletal rearrangement in human retinal pigment epithelium. *J Cell Physiol* 2008;216:520-526.
- 14 Chen S, Crawford M, Day RM, Briones VR, Leader JE, Jose PA, Lechleider RJ: RhoA modulates smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *J Biol Chem* 2006;281:1765-1770.
- 15 Deaton RA, Su C, Valencia TG, Grant SR: Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 mapk. *J Biol Chem* 2005;280:31172-31181.
- 16 Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P: Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases CDC42 and rho. *Mol Biol Cell* 2002;13:902-914.
- 17 Edlund S, Landstrom M, Heldin CH, Aspenstrom P: Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small gtpase CDC42. *J Cell Sci* 2004;117:1835-1847.
- 18 Moustakas A, Stournaras C: Regulation of actin organisation by TGF-beta in h-ras-transformed fibroblasts. *J Cell Sci* 1999;112:1169-1179.
- 19 Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C: Lim-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2005;280:11448-11457.
- 20 Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C: A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by smad proteins and rho GTPases. *FEBS J* 2008;275:4074-4087.
- 21 Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D: Transcriptional regulation of the small GTPase rhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *FASEB J* 2010;24:891-905.
- 22 Xu G, Chakraborty C, Lala PK: Expression of TGF-beta signaling genes in the normal, premalignant, and malignant human trophoblast: Loss of smad3 in choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:47-55.
- 23 Garcia-Mata R, Wennerberg K, Arthur WT, Noren NK, Ellerbroek SM, Burrridge K: Analysis of activated gaps and gefs in cell lysates. *Methods Enzymol* 2006;406:425-437.
- 24 Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Szucs G, Spriewald BM, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH: Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008;58:2553-2564.
- 25 Atfi A, Drobetsky E, Boissonneault M, Chapdelaine A, Chevalier S: Transforming growth factor beta down-regulates Src family protein tyrosine kinase signaling pathways. *J Biol Chem* 1994;269:30688-30693.
- 26 Fukuda K, Kawata S, Tamura S, Matsuda Y, Inui Y, Igura T, Inoue S, Kudara T, Matsuzawa Y: Transforming growth factor-beta1-induced degradation of activated Src tyrosine kinase in rat fibroblasts. *Oncogene* 1998;16:3349-3356.
- 27 Maeda M, Shintani Y, Wheelock MJ, Johnson KR: Src activation is not necessary for transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial to mesenchymal transitions (emt) in mammary epithelial cells. Ppl directly inhibits TGF-beta receptors i and ii. *J Biol Chem* 2006;281:59-68.
- 28 Mishra R, Zhu L, Eckert RL, Simonson MS: TGF-beta-regulated collagen type i accumulation: Role of Src-based signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1361-1369.
- 29 Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T: Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-mapk-dependent signaling in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2004;279:8567-8576.
- 30 Gianni D, Bohl B, Courtneidge SA, Bokoch GM: The involvement of the tyrosine kinase c-Src in the regulation of reactive oxygen species generation mediated by nadph oxidase-1. *Mol Biol Cell* 2008;19:2984-2994.
- 31 Murata T, Ohnishi H, Okazawa H, Murata Y, Kusakari S, Hayashi Y, Miyashita M, Itoh H, Oldenburg PA, Furuya N, Matozaki T: CD47 promotes neuronal development through Src- and FRG/Vav2-mediated activation of Rac and CDC42. *J Neurosci* 2006;26:12397-12407.
- 32 Kim M, Nozu F, Kusama K, Imawari M: Cholecystokinin stimulates the recruitment of the Src-RhoA-phosphoinositide 3-kinase pathway by Vav-2 downstream of G(alpha)3 in pancreatic acini. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;339:271-276.
- 33 Abe K, Rossman KL, Liu B, Ritola KD, Chiang D, Campbell SL, Burrridge K, Der CJ: Vav2 is an activator of CDC42, Rac1, and RhoA. *J Biol Chem* 2000;275:10141-10149.
- 34 Hornstein I, Alcover A, Katzav S: Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal* 2004;16:1-11.
- 35 Garrett TA, Van Buul JD, Burrridge K: VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Exp Cell Res* 2007;313:3285-3297.
- 36 Lai SY, Ziober AF, Lee MN, Cohen NA, Falls EM, Ziober BL: Activated vVav2 modulates cellular invasion through Rac1 and CDC42 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2008;44:683-688.

- 37 Yi F, Chen QZ, Jin S, Li PL: Mechanism of homocysteine-induced Rac1/nadph oxidase activation in mesangial cells: Role of guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:909-918.
- 38 Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Gao B, Zhang Y, Krepinsky JC: Mechanical stretch-induced RhoA activation is mediated by the rhoGEF Vav2 in mesangial cells. *Cell Signal* 2010;22:34-40.
- 39 Boettcher JP, Kirchner M, Churin Y, Kaushansky A, Pompaiah M, Thorn H, Brinkmann V, Macbeath G, Meyer TF: Tyrosine-phosphorylated caveolin-1 blocks bacterial uptake by inducing Vav2-rhoa-mediated cytoskeletal rearrangements. *PLoS Biol* 2010;8:8.
- 40 Burridge K, Doughman R: Front and back by rho and rac. *Nat Cell Biol* 2006;8:781-782.
- 41 Rodriguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S: Functional cooperation between smad proteins and activator protein-1 regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res* 2003;92:1288-1295.
- 42 Gohla A, Offermanns S, Wilkie TM, Schultz G: Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 1999;274:17901-17907.
- 43 Medlin MD, Staus DP, Dubash AD, Taylor JM, Mack CP: Sphingosine 1-phosphate receptor 2 signals through leukemia-associated rhoGEF (larg), to promote smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:1779-1786.
- 44 Yamanaka M, Shegogue D, Pei H, Bu S, Bielawska A, Bielawski J, Pettus B, Hannun YA, Obeid L, Trojanowska M: Sphingosine kinase 1 (sphk1) is induced by transforming growth factor-beta and mediates timp-1 up-regulation. *J Biol Chem* 2004;279:53994-54001.
- 45 Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J, Wang XF: The activity of guanine exchange factor Net1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 2001;276:15362-15368.
- 46 Galliher AJ, Schiemann WP: Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type ii receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 mapk during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* 2007;67:3752-3758.
- 47 Trenkle T, McClelland M, Adlkofer K, Welsh J: Major transcript variants of Vav3, a new member of the Vav family of guanine nucleotide exchange factors. *Gene* 2000;245:139-149.
- 48 Wang SE, Shin I, Wu FY, Friedman DB, Arteaga CL: Her2/neu (erbB2) signaling to rac1-pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 2006;66:9591-9600.