



HELLENIC REPUBLIC
UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF BIOLOGY



FOUNDATION FOR RESEARCH &
TECHNOLOGY – HELLAS (FORTH)
INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY
& BIOTECHNOLOGY (IMBB)

‘Ο ρόλος της πρωτεΐνης Smyd2 στην απόκριση οξείας φάσης’

Ταχματζίδη Ευαγγελία

Μεταπτυχιακή φοιτήτρια (AM: 359)

Πρόγραμμα: Μοριακή Βιολογία και Βιοϊατρική

Μεταπτυχιακή Ερευνητική Εργασία

Επιβλέπων καθηγητής: Χαράλαμπος Σπηλιανάκης

Επιβλέπων ερευνητής: Δρ. Ιωάννης Ταλιανίδης

Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής – Εργαστήριο Δρ. Ιωάννη Ταλιανίδη

Νοέμβριος, 2017

Περίληψη

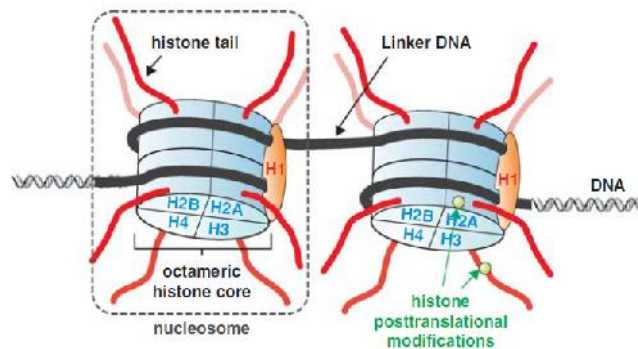
Η πρωτεΐνη Smyd2 είναι μία μεθυλοτρανσφεράση ιστονών η οποία ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση ποικίλων γονιδίων μέσω μονο-μεθυλίωσης της H3K4 και δι-μεθυλίωσης της H3K36. Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε ο ρόλος της πρωτεΐνης αυτής στην απόκριση οξείας φάσης, που διεξάγουν τα ηπατοκύτταρα μέσω ενεργοποίησης από προ-φλεγμονώδεις κυτοκίνες κατά τη διάρκεια φλεγμονής. Επαγωγή του ανοσολογικού συστήματος με λιποπολυσακχαρίτη και μέτρηση των επιπέδων έκφρασης 14 ειδικών γονιδίων που εκφράζονται σε συνθήκες απόκρισης οξείας φάσης σε ποντίκια αγρίου τύπου, ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης Smyd2 (Smyd2-LivKO) στο ήπαρ και ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO) έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή δε συμμετέχει στη ρύθμιση και λειτουργία της απόκρισης οξείας φάσης. Παράλληλα λόγω της πιθανής δράσης της πρωτεΐνης Smyd2 ως ογκογονίδιο και της υπερέκφρασης της που παρατηρείται στον καρκίνο του ήπατος (Hepatocellular carcinoma – HCC), ο οποίος αποτελεί τον τρίτο πιο θανατηφόρο καρκίνο παγκοσμίως, εξετάστηκε ο ρόλος της στην καρκινογένεση του ήπατος. Χημική επαγωγή καρκίνου του ήπατος με διέθυλνιτροζαμίνη στις τρεις παραπάνω σειρές ποντικίων έδειξε ότι τα Smyd2-KO παρουσιάζουν σημαντική μείωση στον αριθμό και στο μέγεθος των περιοχών όγκου σε αντίθεση με τα Smyd2-LivKO και αγρίου τύπου που παρουσιάζουν όγκους στον ίδιο βαθμό. Μέσω της φαινοτυπικής αυτής εξέτασης απορρέει το συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη Smyd2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία HCC, αναδεικνύοντας την σημασία της περαιτέρω μελέτης της για την πιθανή χρήση της ως στόχο αντικαρκινικής θεραπείας.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	4
Σκοπός	13
Υλικά και Μέθοδοι	14
Αποτελέσματα	16
Συζήτηση	23
Ευχαριστίες	26
Βιβλιογραφία	27

Εισαγωγή

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το γενετικό υλικό (DNA) συνδέεται με εξειδικευμένες ιστονικές και μη ιστονικές πρωτεΐνες, σχηματίζοντας τη χρωματίνη. Βασική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης αποτελεί το νουκλεόσωμα, το οποίο αποτελείται από DNA και ιστόνες, μικρές βασικές πρωτεΐνες που φέρουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα λυσίνης και αργινίνης (Εικόνα 1) (Kornberg & Lorch, 1977; Luger *et al.*, 1997). Πιο συγκεκριμένα, δύο αντίγραφα από κάθε ιστόνη H2A, H2B, H3 και H4 διαμορφώνουν έναν πρωτεϊνικό πυρήνα, το οκταμερές των ιστονών, γύρω από το οποίο περιελίσσεται δύο φορές το νήμα της διπλής έλικας του DNA, μεγέθους 147 ζευγών βάσεων (Luger *et al.*, 1997). Τα διαδοχικά νουκλεοσώματα που σχηματίζονται ενώνονται μεταξύ τους με τμήμα DNA, το συνδετικό DNA, μεγέθους περίπου 10-70 ζευγών, το οποίο ποικίλει μεταξύ των ειδών και των κυτταρικών τύπων (Woodcock & Ghosh, 2010). Ιστόνες όπως η H1 και μη ιστονικές πρωτεΐνες αντιδρούν με τα νουκλεοσώματα και συμμετέχουν στην περαιτέρω αναδίπλωση της χρωματίνης (Wong *et al.*, 1998; Wolffe, 1999).

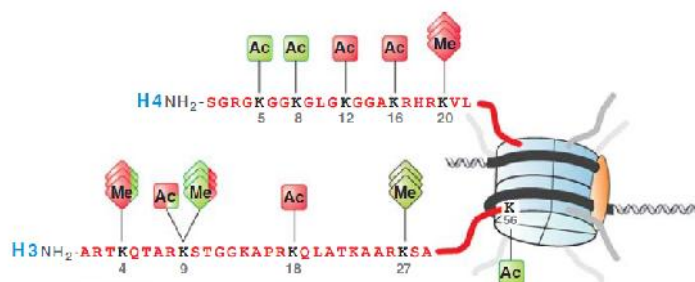


Εικόνα 1: Δομή της χρωματίνης (Fullgrabe *et al.*, 2011)

Η χρωματινική δομή παρουσιάζει δυναμικότητα και όχι στατικότητα (Bannister & Kouzarides, 2011). Η ιδιότητα αυτή είναι πολύ σημαντική για την προσβασιμότητα του γενομικού DNA σε πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν μία σειρά πυρηνικών διαδικασιών όπως την έκφραση γονιδίων, την επιδιόρθωση του DNA, την αντιγραφή του DNA και το γενετικό ανασυνδυασμό (Hargreaves & Crabtree, 2011). Ένας κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου επηρεάζεται η δομή της χρωματίνης αλλά και η λειτουργία της αποτελεί η τροποποίηση των ιστονών. Η τροποποίηση των ιστονών περιλαμβάνει πολλά είδη μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (Post-translational modifications - PTMs), οι οποίες ανάλογα με τη φύση τους επιφέρουν ποικίλα αποτελέσματα (Bannister & Kouzarides, 2011).

Κάθε ιστόνη αποτελείται από 3 μέρη, το καρβοξυ-τελικό άκρο και το σφαιρικό πυρήνα τα οποία εντοπίζονται στο εσωτερικό του νουκλεοσώματος και συμμετέχουν στις ιστονικές αλληλεπιδράσεις και τη μη δομημένη αμινο-τελική ουρά που προεξέχει από το νουκλεόσωμα και αλληλεπιδρά με το περιβάλλον (McGhee & Felsenfeld 1980). Εκτεταμένα μελετημένα ως προς τις τροποποιήσεις ιστονών αποτελεί η μη δομημένη αμινο-τελική ουρά (Εικόνα 2)(Tan *et al.*, 2011). Η πρώτη τροποποίηση ιστόνης αναφέρθηκε πριν από περίπου 50 χρόνια όταν ο Murray ταυτοποίησε τη μεθυλίωση καταλοΐπου λυσίνης ιστόνης σε κύτταρα θύμου μοσχαριού (Murray, 1964). Η εύρεση αυτή οδήγησε στη μετέπειτα ανακάλυψη της ακετυλίωσης καταλοΐπου λυσίνης και της φωσφορυλίωσης καταλοΐπου σερίνης στις ιστόνες, τροποποιήσεις οι οποίες παρατηρήθηκαν σε διαφορετικούς οργανισμούς, όπως ανθρώπινα λεμφοκύτταρα, κύτταρα του ήπατος αρουραίου, κύτταρα θύμου μοσχαριού και στον αρακά (Kleinsmith *et al.*, 1966; Ord & Stocken, 1967; DeLange *et al.*, 1968; Gershay *et al.*, 1968; Viladi *et al.*, 1968). Το 1975 προστέθηκαν στη λίστα των τροποποιήσεων η ουβικιτινυλίωση και η ADP-ριβοζυλίωση (Goldknopf *et al.*, 1975; Ueda *et al.*, 1975), ενώ από το 2003 έως και σήμερα ανακαλύπτονται συνεχώς καινούργιες όπως η σουμοϋλίωση, η φορμυλίωση, η κροτονυλίωση καταλοΐπων λυσίνης και άλλες (Shiio & Eisenman, 2003; Tan *et al.*, 2011). Από το 2002 και μετά με τη χρήση της τεχνικής φασματομετρία μάζας δόθηκε η

δυνατότητα εύρεσης τροποποιήσεων σε όλη την πεπτιδική έκταση των ιστονών, και όχι μόνο στις περιοχές που εδράζονται στο αμινο-τελικό άκρο τους (Van Leeuwen *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 2002). Συνολικά έχουν βρεθεί πάνω από 120 αμινοξικά κατάλοιπα ιστονών τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν και τουλάχιστον 11 είδη τροποποίησης, αριθμοί οι οποίοι συνεχώς αυξάνονται (Martin and Zhang, 2007; Ruthenburg *et al.*, 2007).



Εικόνα 2: Τροποποιήσεις ιστονών (Fullgrabe *et al.*, 2011)

Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορούν να επηρεάσουν τη δομή της χρωματίνης μέσω τριών κύριων μηχανισμών (Kouzarides, 2007; Ruthenburg *et al.*, 2007). Ο πρώτος μηχανισμός προτείνει ότι οι τροποποιήσεις επιφέρουν αλλαγές στα ηλεκτροστατικά φορτία των ιστονών με αποτέλεσμα να επηρεάζεται είτε η ίδια η δομή τους είτε η αλληλεπίδραση τους με το DNA (Shogren-Knaak *et al.*, 2006; Fierz *et al.*, 2011). Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ακετυλίωση καταλοίπων λυσίνης, η οποία οδηγεί σε χαλάρωση της χρωματίνης άρα σε γονιδιακή ενεργοποίηση (Struhl, 1998). Κατά την ακετυλίωση το ολικό φορτίο της ουράς από ισχυρά βασικό μετατρέπεται σε ουδέτερο, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δύναμη πρόσδεσης των ιστονών στο DNA, ανοίγοντας θέσεις πρόσδεσης παραγόντων σ' αυτό (Struhl, 1998). Παράλληλα, ο δεύτερος μηχανισμός προτείνει ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών αποτελούν θέσεις πρόσδεσης ειδικών πρωτεϊνών (Zentneret & Henikoff, 2013; Patel & Wang, 2013). Παραδείγματα του μηχανισμού αυτού είναι η chromo-domain που προσδένεται σε μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης και σχετίζεται με δημιουργία ετεροχρωματίνης και η bromo-domain που προσδένεται σε ακετυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης και σχετίζεται με γονιδιακή ενεργοποίηση (Wyssocka *et al.*, 2005; Zeng & Zhou, 2002). Τέλος ο τρίτος μηχανισμός προτείνει ότι οι τροποποιήσεις ιστονών μπορούν να αποτρέψουν την πρόσδεση ενός παράγοντα στη χρωματίνη. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν το σύμπλοκο NuRD, το οποίο κατά την τρι-μεθυλίωση της λυσίνης 4 (H3K4me3) απομακρύνεται από την ιστόνη H3 και το συν-κατασταλτικό σύμπλοκο INHAT, το οποίο χάνει τη συγγένεια του για τις ουρές των ιστονών H3 κατά τη φωσφορυλίωση της θρεονίνης 3 (H3-T3) και ακετυλίωση της λυσίνης 9 και 14 (H3-K9/K14) (Nishioka *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2004).

Μεθυλίωση Ιστονών

Μια ιδιαίτερα πολύπλοκη τροποποίηση ιστονών αποτελεί η μεθυλίωση. Κατά τη μεθυλίωση των ιστονών μία μεθυλική ομάδα προστίθεται σε μία αμινική ομάδα ενός βασικού καταλοίπου και πιο συγκεκριμένα σε ένα κατάλοιπο λυσίνης, αργινίνης ή ιστιδίνης (Murray, 1964; Byvoet *et al.*, 1972; Fischle *et al.*, 2008). Στα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να προστεθούν μία, δύο ή τρεις μεθυλικές ομάδες σχηματίζοντας αντίστοιχα μία μονο- (me1), δι- (me2) ή τρι-μεθυλιωμένη (me3) λυσίνη, λόγω του ότι φέρουν μία NH₃⁺ ομάδα στην οποία κάθε υδρογόνο μπορεί να αντικατασταθεί από μία μεθυλική ομάδα (Murray, 1964; Paik & Kim, 1967; Hempel *et al.*, 1968). Τα κατάλοιπα αργινίνης που φέρουν μία NH₂ και μία NH₂⁺ ομάδα, μπορούν να σχηματίσουν μία μόνο-μεθυλιωμένη (me1), μία συμμετρική δι-μεθυλιωμένη (me2s) και μία μη-συμμετρική δι-μεθυλιωμένη (me2a) λυσίνη (Byvoet *et al.*, 1972; Borun *et al.*, 1972). Τέλος για τα κατάλοιπα ιστιδίνης υπάρχουν αναφορές ότι μπορούν να μονο-μεθυλιωθούν, ένα φαινόμενο το οποίο παρατηρείται σπάνια (Borun *et al.*, 1972; Gershey *et al.*, 1969).

Οι επιπτώσεις της μεθυλίωσης καταλοίπων ιστονών εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες (Greer & Shi, 2014). Η θέση και το είδος του καταλοίπου που μεθυλιώνεται φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα της τροποποίησης στη ρύθμιση διαφόρων πυρηνικών διαδικασιών. Για παράδειγμα, η δι-μεθυλίωση της λυσίνης 79 της ιστόνης H3, H3K79me2, παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η τρι-μεθυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης H3, H3K9me3, σχετίζεται με ετεροχρωματίνη, η συμμετρική δι-μεθυλίωση της αργινίνης 8 της ιστόνης H3, H3R8me2s, πιθανολογείται ότι παίζει ρόλο στην αναστολή της μεταγραφής και η συμμετρική δι-μεθυλίωση της αργινίνης 3 της ιστόνης H4, H4R3me2s, έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με την καταστολή της μεταγραφής (Schulze *et al.*, 2009; Lehnertz *et al.*, 2003; Di Lorenzo & Bedford, 2011). Παράλληλα ο διαφορετικός βαθμός μεθυλίωσης ακόμα και στο ίδιο κατάλοιπο μπορεί να προσδώσει διαφορετικές λειτουργίες στις ιστόνες. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί το κατάλοιπο λυσίνης 20 της ιστόνης 4 (H4K20) το οποίο έχει βρεθεί σε τρεις μεθυλιωμένες καταστάσεις, με καθεμία από τις οποίες να έχει διαφορετική λειτουργία. Η μονο-μεθυλιωμένη λυσίνη 20, H3K20me1, συμμετέχει στην καταστολή της μεταγραφής, η δι-μεθυλιωμένη λυσίνη 20, H3K20me2, κατέχει σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση του DNA ενώ η τρι-μεθυλιωμένη λυσίνη 20, H3K20me3, σχετίζεται με ετεροχρωματίνη (Zhang & Reinberg, 2001). Επιπρόσθετα υπάρχουν περιπτώσεις που συγκεκριμένες τροποποιήσεις μπορούν να σχετίζονται ταυτόχρονα με αντίθετες διαδικασίες, όπως γονιδιακή ενεργοποίηση και καταστολή. Στην περίπτωση αυτή ανήκει η δι- και τρι-μεθυλιωμένη λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (H3K4me2 και H3K4me3), οι οποίες έχει δείχθει ότι σχετίζονται με γονιδιακή ενεργοποίηση, αλλά παρατηρούνται και σε γονιδιακή καταστολή (Shi *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2006). Στη συσχέτιση με γονιδιακή καταστολή βρέθηκε ότι και στα δύο μεθυλιωμένα κατάλοιπα προσδέεται μία PHD-domain, η οποία περιέχει την κατασταλτική πρωτεΐνη ING2 (Shi *et al.*, 2006). Μία πιθανή εξήγηση είναι η πρόσδεση διαφορετικών κάθε φορά παραγόντων που επιφέρουν τα αντίστοιχα αποτελέσματα (Greer & Shi, 2014). Τέλος ο συνδυασμός τροποποιήσεων μπορεί να προκαλέσει διαφορετικά αποτελέσματα από ότι θα προέκυπτε από την κάθε μία ξεχωριστά. Μεμονωμένες η τρι-μεθυλίωση της λυσίνης 4 και 27 της ιστόνης H3 (H3K4me3 και H3K27me3) σχετίζονται με ενεργοποίηση και καταστολή της γονιδιακής έκφρασης αντίστοιχα, μαζί όμως καθιστούν το γονίδιο ικανό να μεταγραφεί (Bernstein *et al.*, 2006). Οι συνδυασμοί αυτοί ίσως αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες με πολλαπλές επικράτειες, οι οποίες επηρεάζουν με συγκεκριμένο τρόπο τα αποτελέσματα των τροποποιήσεων (Greer & Shi, 2014).

Μεθυλοτρανσφεράσες Ιστονών

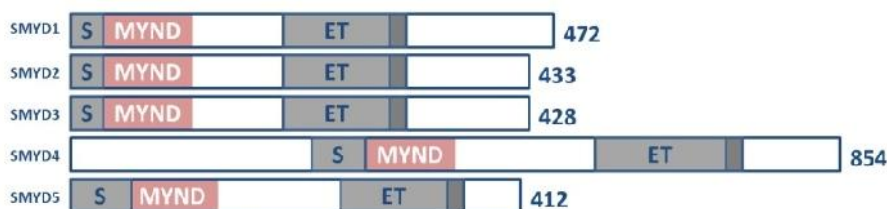
Η προσθήκη μεθυλικών ομάδων σε κατάλοιπα λυσίνης και αργινίνης ιστονών πραγματοποιείται από τις μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί τρεις τέτοιες οικογένειες ενζύμων, οι οποίες χρησιμοποιούν τον παράγοντα SAM (S-adenosyl-L-methionine) ως δότη μεθυλομάδας (Murray, 1964). Πιο συγκεκριμένα, οι πρώτες δύο οικογένειες περιλαμβάνουν ένζυμα τα οποία μεθυλιώνουν κατάλοιπα λυσίνης (Histone lysine methyltransferases – HKMTs), ενώ η τρίτη οικογένεια αποτελείται από πρωτεΐνες που μεθυλιώνουν κατάλοιπα αργινίνης (Histone arginine methyltransferases – HRMTs) (Lachner & Jenwein, 2002; Zhang & Reinberg, 2001). Οι PKMTs διακρίνονται περαιτέρω στις πρωτεΐνες που φέρουν την επικράτεια SET (SET domain-containing proteins) και σε αυτές που δεν τη φέρουν (Dot1 like proteins) (Rea *et al.*, 2000; Feng *et al.*, 2002). Οι μεθυλοτρανσφεράσες αυτές έχει δείχθει ότι δεν εστιάζονται μόνο στη μεθυλίωση ιστονών ενσωματωμένες στη χρωματίνη αλλά και σε ελεύθερες ιστόνες και μη ιστονικές πρωτεΐνες (Rea *et al.*, 2000; Huang & Berger, 2008).

Οικογένεια πρωτεϊνών SMYD

Μία σημαντική υποοικογένεια των HKMTs που περιέχει την πρωτεϊνική επικράτεια SET αποτελεί η οικογένεια πρωτεϊνών SMYD (SET and MYND domain-containing proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές καταλύουν την προσθήκη μίας ή περισσότερων μεθυλικών ομάδων σε μία αμινική ομάδα ενός καταλοίπου λυσίνης,

δίνοντας ως προϊόν μία μόνο-, δι- ή τριμεθυλιωμένη λυσίνη (Rea *et al.*, 2000). Απαραίτητο στοιχείο για την επίτευξη της αντίδρασης αυτής καθίσταται ο συμπαράγοντας SAM (S-adenosyl-L-methionine), ο οποίος ως δότης μεθυλομάδας κατά το πέρας της αντίδρασης μετατρέπεται σε SAH (S-adenosyl-L-homocysteine) (Murray, 1964).

Τα ένζυμα SMYD οφείλουν την ενεργότητα τους σε δύο υψηλά συντηρημένες, δομικά και λειτουργικά, πρωτεϊνικές επικράτειες: την επικράτεια SET (Drosophila proteins Suppressor of variegation, Enhancer of Zeste, Trithorax) και την επικράτεια MYND (Myeloid, Nervy and DEAF-1) (Gottlieb *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006). Πιο συγκεκριμένα η πρωτεϊνική περιοχή SET αποτελείται από 130-140 αμινοξικά κατάλοιπα, είναι διατηρημένη σε πολλές πρωτεΐνες θηλαστικών και δίνει τη δυνατότητα προσθήκης μεθυλικών ομάδων σε κατάλοιπα λυσίνης (Dillon *et al.*, 2005; Qian & Zhou, 2006). Παράλληλα η πρωτεϊνική περιοχή MYND διαμορφώνει μοτίβα ψευδαργύρου κατάλληλα για πρόσδεση σε πρωτεΐνες και είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών SMYD με τα πρωτεϊνικά τους υποστρώματα (Leinhart & Brown, 2011; Liu *et al.*, 2007). Η πρωτεϊνική επικράτεια SET βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών (Εικόνα 3) και χωρίζεται σε δύο τμήματα λόγω παρεμβολής της πρωτεϊνικής επικράτειας MYND (Gottlieb *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2006). Οι πρωτεΐνες SMYD ξεχωρίζουν από τις υπόλοιπες μεθυλοτρανσφεράσες που περιέχουν την επικράτεια SET λόγω της ύπαρξης της επικράτειας MYND (Leinhart & Brown, 2011).



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών SMYD των θηλαστικών.

Γκρι χρώμα: απεικόνιση της χωρισμένης σε δύο τμήματα δομικής περιοχής SET, ροζ χρώμα: απεικόνιση της δομικής περιοχής MYND, σκούρο γκρι: απεικόνιση της δομικής περιοχής μετά -SET πλούσιας σε κατάλοιπα κυστεΐνης (Leinhart & Brown, 2011)

Η οικογένεια SMYD αποτελείται από πέντε μέλη (SMYD 1-5), εκ των οποίων η κάθε πρωτεΐνη έχει το δικό της πρωτεϊνικό υπόστρωμα και σχετίζεται με διαφορετικές κυτταρικές διαδικασίες. Μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες SMYD 1-3 παρουσιάζουν εκτός των άλλων και ένα κοινό υπόστρωμα, την ιστονική πρωτεΐνη H3 (Ferguson *et al.*, 2011). Σύγκριση της αλληλουχίας τους έδειξε ότι υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους, παρόλο του γεγονότος ότι η καθεμία έχει τα δικά της ξεχωριστά υποστρώματα (Abu-Fartha *et al.*, 2011). Πιο συγκεκριμένα η πρωτεΐνη SMYD1 καταλύει την προσθήκη μεθυλομάδας στην ιστονική πρωτεΐνη H3K4, η SMYD 2 καταλύει τη μεθυλίωση των ιστονικών πρωτεϊνών H3K36, H3K4, της λυσίνης 370 της μη ιστονικής πρωτεΐνης p53, της λυσίνης 810 της μη ιστονικής πρωτεΐνης RB1 και της λυσίνης 313 της μη ιστονικής πρωτεΐνης PTEN και η SMYD 3 καταλύει τη δι- ή τριμεθυλίωση της H3K4 και τη μεθυλίωση της λυσίνης 831 του υποδοχέα-1 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR1)(Xu *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012; Nakakido *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2006). Η δράση της πρωτεΐνης SMYD 4 δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί πλήρως αν και έχει χαρακτηριστεί ως ογκοκαταστολέας στον καρκίνο του μαστού (Hu *et al.*, 2009). Τέλος η SMYD 5 πραγματοποιεί μεθυλίωση της ιστονικής πρωτεΐνης H4 και ρυθμίζει την έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων μέσω τριμεθυλίωσης της ιστονικής πρωτεΐνης H4K20 (Stender *et al.*, 2012).

Η δράση των πρωτεϊνών SMYD σχετίζεται με ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τη ρύθμιση της ανάπτυξης και της λειτουργίας του σκελετικού και καρδιακού μυ, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την απόκριση σε βλάβες του DNA και με τη λειτουργία των σαπερονών (Leinhart & Brown, 2011; Du *et al.*, 2014; Al-Shar'i & Alnabulsi, 2016; Abu-Fartha *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2006). Τα τελευταία χρόνια μελέτες έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές έχουν κάποιο ρόλο σε καρδιαγγειακές

νόσους και στην εξέλιξη διαφόρων τύπων καρκίνου όπως του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του ήπατος και του ακανθοκυτταρικού καρκινώματος του οισοφάγου (Sirinurong *et al.*, 2010; Colón-Bolea & Crespo, 2014; Hamamoto & Nakamura, 2016). Για το λόγο αυτό οι πρωτεΐνες SMYD βρίσκονται πλέον στο επίκεντρο των ερευνών, με στόχο την πιθανή χρήση τους ως στόχους φαρμάκων.

SMYD2

Η πρωτεΐνη Smyd2 είναι μία μεθυλοτρανσφεράση ιστονών η οποία έχει μοριακό βάρος 49,7 kDa και αποτελείται από 433 αμινοξικά κατάλοιπα. Οι πρώτες μελέτες για τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής πραγματοποιήθηκαν από τον Brown *et al.* το 2006. Στη δουλειά αυτή για πρώτη φορά εξετάστηκε εκτός των άλλων το μοτίβο έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής στους ιστούς και η τοποθεσία της μέσα στο κύτταρο. Μέσω αποτύπωσης Northern βρέθηκε ότι το γονίδιο αυτό παρουσιάζει αυξημένη γονιδιακή έκφραση στην καρδιά, στον εγκέφαλο, στο συκώτι, στα νεφρά, στο θύμο αδένα και στις ωοθήκες. Παράλληλα μικρότερα ποσοστά ανιχνεύτηκαν σε έμβρυα όπου περαιτέρω ανάλυση του προτύπου έκφρασης έδειξε ότι τα Smyd2 μετάγραφα στα έμβρυα τοποθετούνται στην καρδιά και στον υποθάλαμο του εγκεφάλου. Μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού προέκυψε ότι η Smyd2 πρωτεΐνη τοποθετείται στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου (Brown *et al.*, 2006).

Η πρωτεΐνη Smyd2 ανήκει στις PKMTs και φέρει την πρωτεϊνική επικράτεια SET, η ύπαρξη της οποίας υποδηλώνει την πιθανή δράση της πρωτεΐνης αυτής ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών. *In vitro* και *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι η Smyd2 έχει την ικανότητα μεθυλίωσης της ιστόνης H3. Δύο διαφορετικές ομάδες έχοντας διαφορετικές προσεγγίσεις επιβεβαίωσαν ότι η ύπαρξη της επικράτειας SET είναι απαραίτητη για τη δράση της Smyd2 στη μεθυλίωση, καθώς μεταλλαγμένες εκδοχές της δεν κατάφεραν να μεθυλιώσουν (Brown *et al.*, 2006; Abu-Farha *et al.*, 2008).

Η ομάδα Abu-Farha *et al.* πραγματοποιώντας ChIP-HTMS, μία μέθοδος η οποία περιλαμβάνει ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο IP σε συνδυασμό με την τεχνική ανάλυσης μεθυλοτρανσφεράσης (Histone methyl transferase assay – HTMS assay), έδειξαν ότι η πρωτεΐνη Smyd2 αλληλεπιδρά με 21 πυρηνικές πρωτεΐνες. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες με βάση τη λειτουργία τους, στις πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τις ιστόνες, όπως η πρωτεΐνη Erb4113 και στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δυναμικότητα των μικροσωληνίσκων, όπως η πρωτεΐνη CLASP2. Ανάλυση των πρωτεϊνών αυτών φανέρωσε ότι οι επικράτειες MYND και SET είναι απαραίτητες για τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Εξετάζοντας τη δομή των πρωτεϊνών βρέθηκε ότι πέντε πρωτεΐνες περιέχουν το PXLXP μοτίβο, όπως η πρωτεΐνη Erb4113, στο οποίο μπορεί να προσδεθεί η MYND επικράτεια. Μέσω πειραμάτων αποδείχθηκε ότι η MYND πρωτεϊνική επικράτεια είναι απαραίτητη στην αλληλεπίδραση με την Erb4113, λόγω της πρόσδεσής της στο διατηρημένο αυτό μοτίβο. Άλλες αλληλεπιδράσεις έδειξαν ότι απαραίτητη είναι η λειτουργικότητα της SET πρωτεϊνικής επικράτειας, αφού έλλειψη δύο διατηρημένων περιοχών της δεν επέτρεψε την αλληλεπίδραση της SMYD2 με την πρωτεΐνη p53 (Abu-Farha *et al.*, 2008).

Η πρωτεΐνη Smyd2 συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω μεθυλίωσης ιστονών

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο Brown *et al.* απέδειξαν ότι η πρωτεΐνη Smyd2 έχει δράση μεθυλοτρανσφεράσης με υπόστρωμα την ιστόνη H3. Ειδικότερα η ομάδα αυτή, μέσα από *in vitro* πειράματα που πραγματοποίησε, έδειξε ότι η Smyd2 δι-μεθυλιώνει συγκεκριμένα το κατάλοιπο λυσίνης 36 της ιστόνης H3, H3K36me2, απουσία της σαπερόνης HPS90a. Η μεθυλιωμένη H3K36 είναι γνωστό ότι συσχετίζεται με γονιδιακή ενεργοποίηση, πειράματα όμως έδειξαν ότι η μεθυλίωση του συγκεκριμένου αμινοξικού καταλοίπου από τη Smyd2 οδηγεί σε γονιδιακή καταστολή (Brown *et al.*, 2006). Έχοντας ως δεδομένο ότι στη ζύμη η μεθυλίωση της H3K36 από τη SET2 επιφέρει γονιδιακή καταστολή λόγω της αλληλεπίδρασης της με το σύμπλοκο Rpd3-Sin3, ένα σύμπλοκο από-ακετυλίωσης ιστονών (histone

deacetylase complex – HDAC), εξετάστηκε η τυχόν αλληλεπίδραση της Smyd2 με ανθρώπινο ομόλογο HDAC. Με τον τρόπο αυτό προέκυψε ότι η Smyd2 αλληλεπιδρά με το Sin3A σύμπλοκο από-ακετυλίωσης ιστονών, το οποίο έχει συσχετιστεί προηγουμένως με τη μεθυλιωμένη H3K36 που τοποθετείται στις κωδικές περιοχές ενεργών μεταγραφικά γονιδίων (Keogh *et al.*, 2005; Carrozza *et al.*, 2005).

Τρία χρόνια μετά την πρώτη ανάλυση της Smyd2 ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, αποδείχθηκε *in vitro* και αργότερα *in vivo* από την ομάδα Abu-Farha *et al.* ότι η Smyd2 παρουσία της σαπερόνης HSP90a έχει την ικανότητα μεθυλίωσης της ιστόνης 3 στο κατάλοιπο λυσίνης 4, H3K4me, η οποία οδηγεί κυρίως σε γονιδιακή ενεργοποίηση. Όπως προκύπτει πειραματικά η ύπαρξη του παράγοντα αυτού καθορίζει τη συγγένεια της Smyd2 ως προς τα ιστονικά της υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία του παράγοντα HSP90a ευνοεί την ύπαρξη μεθυλιωμένης H3K4, ενώ η απουσία του αυξάνει τη συγγένεια της Smyd2 για τη δι-μεθυλίωση της H3K36. Ο ακριβής τρόπος με τον οποίο η Smyd2 αλληλεπιδρά με την HSP90a δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί, καθώς οι επικράτειες SET και MYND όπως αποδείχθηκε δεν είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση (Abu-Farha *et al.*, 2008). Είναι γνωστό ότι η HSP90a αλληλεπιδρά με άλλα μόρια μέσω του TRP δομικού μοτίβου (Tetratricopeptide repeat – TRP) που αυτά περιέχουν όπως η πρωτεΐνη PP5 (Yang *et al.*, 2005). Ανάλυση της αλληλουχίας της Smyd2 δείχνει ότι υπάρχει ένα τέτοιο δομικό μοτίβο, καθιστώντας το έναν πιθανό τρόπο αλληλεπίδρασης (Abu-Farha *et al.*, 2008).

Άλλος ένα τρόπος μέσω του οποίου η Smyd2 μπορεί να επηρεάζει τη ρύθμιση της μεταγραφής είναι η αλληλεπίδραση της με την RNApolIII και την RNA ελικάση, HELZ που παρατηρήθηκε από την ομάδα Diehl *et al.* το 2010. Το αντίκτυπο των δύο αυτών αλληλεπιδράσεων μένει να εξεταστεί (Diehl *et al.*, 2010).

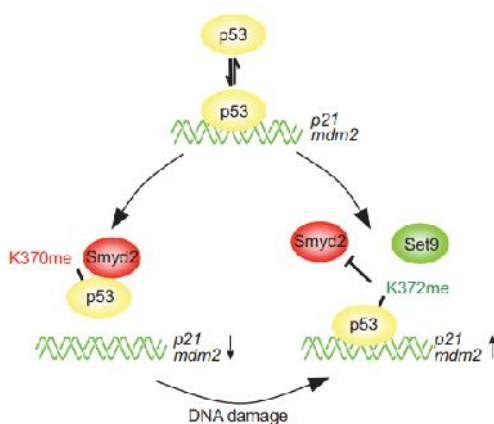
Υπερέκφραση της Smyd2 σε 293T κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη στατιστικά σημαντική αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης 41 γονιδίων, εκ των οποίων στα 37 γονίδια παρατηρήθηκε αύξηση και στα 4 παρατηρήθηκε μείωση (Abu-Farha *et al.*, 2008). Μερικά παραδείγματα υπερέκφρασης αποτελούν τρεις πρωτεΐνες του συμπλόκου SWI/SNF που συμμετέχει στη διευθέτηση των νουκλεοσωμάτων υδρολύοντας ATP ως πηγή ενέργειας, η πρωτεΐνη CHD9 η οποία είναι ένας μεσεγχυματικός ρυθμιστής που μπορεί και προσδέεται στη μεθυλιωμένη ιστόνη 3, πολλές πρωτεΐνες που περιέχουν μεταλλικές δομές δακτυλίου ψευδαργύρου (Zinc-finger) μέσω των οποίων προσδέονται στο DNA και η πρωτεΐνη MEF2C η οποία είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας και ρυθμίζει την έκφραση της Smyd1 πρωτεΐνης (Roberts & Orkin, 2004; Lee *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Phan *et al.*, 2005). Παράλληλα παράδειγμα μείωσης του επιπέδου έκφρασης αποτελεί η πρωτεΐνη WRD9 η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SMARCA4 και μέσω της bromo-domain περιοχής που περιέχει προσδέεται σε ακετυλιωμένες ιστόνες (Huang *et al.*, 2003). Μελετώντας τη λειτουργία του κάθε γονιδίου το οποίο επηρεάστηκε από την υπερέκφραση της Smyd2 προέκυψαν 3 κατηγορίες γονιδίων, αυτά που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, αυτά που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μεταγραφής και αυτά που αφορούν την αναδιάρθρωση της χρωματίνης (Abu-Farha *et al.*, 2008).

Η πρωτεΐνη Smyd2 ως πιθανός ογκογόνος παράγοντας μέσω μεθυλίωσης μη-ιστονικών πρωτεϊνών

Η πρώτη μη ιστονική πρωτεΐνη την οποία βρέθηκε να μεθυλιώνει η Smyd2 είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 από την ομάδα Huang *et al.* το 2006. Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, το γονίδιο του οποίου παρουσιάζει μεταλλάξεις στο 50% των ανθρώπινων ειδών καρκίνου. Κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, της απόπτωσης και της επιδιόρθωσης του DNA σε απόκριση μιας ποικιλίας παραγόντων γενετοξικού στρες (Genotoxic stress) (Apella & Anderson, 2001). Η ρύθμιση της μεταγραφικής του ιδιότητας είναι πολύπλοκη και πραγματοποιείται κυρίως μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως ακετυλίωση, ουβικιτινυλίωση, σουμουλίωση και μεθυλίωση (Brooks & Gu, 2003; Chuiikov *et al.*, 2004).

In vitro και αργότερα *in vivo* πειράματα έδειξαν ότι η Smyd2 μονο-μεθυλιώνει την p53 στο κατάλοιπο λυσίνης 370 (p53K370me1), μια τροποποίηση η οποία επιδρά αρνητικά στη μεταγραφική της δράση. Η p53K370me1 έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων που επάγονται από

την πρωτεΐνη p53, λόγω της μειωμένης ικανότητας της πρωτεΐνης αυτής να προσδεθεί στο DNA. Εξετάζοντας τα επίπεδα απόπτωσης παρουσία και απουσία της πρωτεΐνης Smyd2 ύστερα από έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες που προκαλούν βλάβες στο DNA, βρέθηκε ότι η Smyd2 μέσω μεθυλίωσης της p53 επηρεάζει το σταμάτημα του κυτταρικού κύκλου (Cell cycle arrest) και την απόπτωση. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι μειωμένη συγκέντρωση Smyd2 λόγω χρήσης shRNA αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που οδηγούνται σε απόπτωση μέσω της δράσης της p53. Παράλληλα ερευνώντας τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της p53K370me1 από την Smyd2 και της p53K372me1 από την Set9, δύο αντίθετες ως προς τα αποτελέσματα τροποποιήσεις όσο αφορά τη δράση της p53, προτάθηκε ότι υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ των μορίων p53 που προσδένονται στο DNA και αυτών που παραμένουν ελεύθερα. Η p53K370me1 από τη Smyd2 ωθεί την ισορροπία προς την απομάκρυνση των μορίων από το DNA, ενώ η p53K372me1 από την Set9 ευνοεί την πρόσδεση στο DNA παρεμποδίζοντας ταυτόχρονα τη Smyd2 να μεθυλιώσει την p53, και επάγει την έκφραση της p21 και της Mdm2 (Εικόνα 4). Από τα παραπάνω στοιχεία απορρέει ότι η Smyd2 πιθανά δρα ως ογκογονίδιο λόγω καταστολής της δράσης της p53 (Huang *et al.*, 2006).



Εικόνα 4: Μοντέλο στο οποίο περιγράφεται η ενεργοποίηση και καταστολή της p53 μέσω μεθυλίωσης από την Smyd2 και Set9 (Huang *et al.*, 2006)

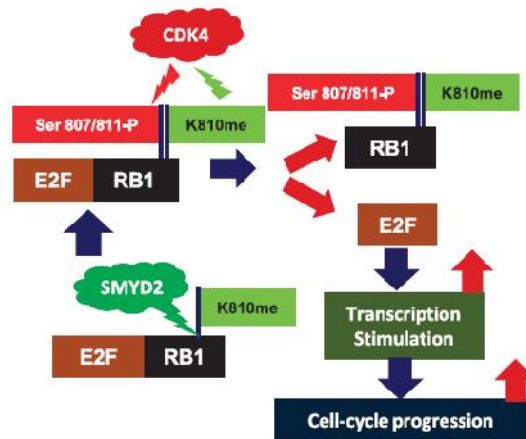
Παρόλο που η δράση της Smyd2 στην p53 έχει συσχετιστεί με καρκινογένεση σε κάποιες περιπτώσεις είναι σημαντική, όπως στην περίπτωση της καρδιακής ανεπάρκειας. Όπως είναι γνωστό η απόπτωση κατέχει σημαντικό ρόλο στη ισχαιμική καρδιοπάθεια η οποία συχνά οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια. Η ομάδα Sajjad *et al.* βρήκαν *in vitro* ότι έκθεση καρδιομυοκυττάρων σε παράγοντες που προκαλούν απόπτωση όπως η αγωγή με CoCl₂ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της Smyd2 και ως εκ τούτου των επιπέδων της p53K370me1 και την αύξηση των επιπέδων της p53, η οποία οδηγεί σε απόπτωση. Εκτοπική υπερέκφραση της Smyd2 μετά από αγωγή με CoCl₂ είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της p53, την επαναφορά της ποσότητας της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl2 και τη μείωση της δράσης της Caspase-3. Παράλληλα *in vivo* αποδείχθηκε ότι η δράση της Smyd2 είναι απαραίτητη για την παρεμπόδιση της απόπτωσης που επάγεται από την p53 μετά από βλάβες στην καρδιά, καθιστώντας τη Smyd2 μία καρδιοπροστατευτική πρωτεΐνη (Sajjad *et al.*, 2014).

Τέσσερα χρόνια μετά την ανακάλυψη ότι η Smyd2 μπορεί να μεθυλιώσει μη ιστονικές πρωτεΐνες η ομάδα Saddic *et al.* βρήκαν ακόμα ένα υπόστρωμα της, την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ρετινοβλαστώματος (Retinoblastoma – RB), η οποία κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου η αγρίου τύπου πρωτεΐνη Rb παραμένει συνεχώς σε φωσφορυλιωμένη μορφή λόγω απώλειας ρύθμισης των CDKs, επιτρέποντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Cho *et al.*, 2012). Η ενεργότητα της πρωτεΐνης αυτής εξαρτάται κυρίως από τη μορφή με την οποία βρίσκεται, στην ανενεργή φωσφορυλιωμένη της μορφή επιτρέπει τη φυσιολογική ροή του κυτταρικού κύκλου, ενώ στην ενεργή μη φωσφορυλιωμένη της μορφή σταματά ο κυτταρικός κύκλος στη φάση G1 (Weinberg, 1995). Εκτός της φωσφορυλίωσης έχει δειχθεί ότι η Rb ρυθμίζεται και μέσω άλλων

μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως ακετυλίωση, ουβικιτινυλίωση, σουμοϋλίωση και μεθυλίωση (Chan *et al.*, 2001; Ledl *et al.*, 2005; Kalejta & Shenk, 2003; Saddic *et al.*, 2010).

Η ομάδα Saddic *et al.* το 2010 έδειξαν *in vitro* ότι η Smyd2 είναι ικανή να μονο-μεθυλιώσει την πρωτεΐνη Rb στο κατάλοιπο λυσίνης 860 (RbK860me1). Τα επίπεδα της RbK860me1 παρατηρήθηκε ότι επηρεάζονται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κύτταρο, καθώς πειράματα έδειξαν ότι κύτταρα τα οποία μπαίνουν ξανά στον κυτταρικό κύκλο μέσω κάποιου σήματος οδηγούν στην μείωση των επιπέδων της RbK860me1 σε σχέση με κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ληθάργου (Quiescent), παρόλο του γεγονότος ότι τα επίπεδα της Rb παραμένουν σταθερά. Παράλληλα αλλαγή εμφανίζεται στα επίπεδα τόσο της Rb όσο και της RbK860me1 όταν τα κύτταρα βγαίνουν από τον κυτταρικό κύκλο κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαφοροποίησης τους σε μυϊκά. Άλλος ένα παράγοντας που έχει αντίκτυπο στα επίπεδα της Rb είναι η εμφάνιση βλαβών στο DNA, η οποία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της RbK860me1 σε αντίθεση με τα επίπεδα της Rb που παραμένουν σταθερά. Εξετάζοντας το αντίκτυπο της μεθυλίωσης της Rb στην ικανότητα πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα E2F, προέκυψε ότι η μεθυλίωση στο συγκεκριμένο κατάλοιπο δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση της Rb με τον E2F. Το μεθυλιωμένο όμως αυτό κατάλοιπο βρέθηκε ότι μπορεί να λειτουργήσει ως σημείο πρόσδεσης για το μεταγραφικό παράγοντα L3MBTL1 μέσω μιας 3xMBT περιοχής που περιέχει (Saddic *et al.*, 2010). Ο παράγοντας αυτός έχει την ικανότητα συμπύκνωσης της χρωματίνης και καταστολής της έκφρασης γονιδίων μέσα στα οποία συμπεριλαμβάνονται και γονίδια στόχοι της Rb (Trojer *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2007).

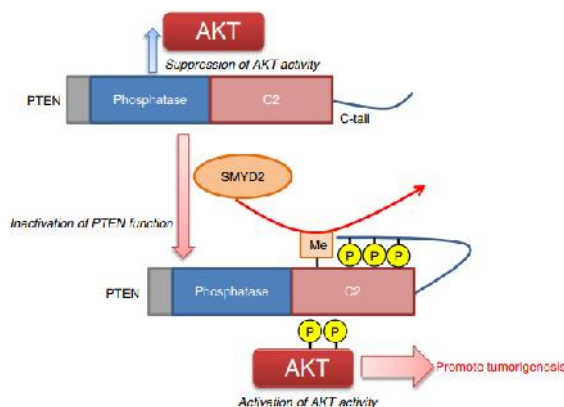
Η ομάδα Cho *et al.* το 2012 έδειξαν *in vitro* και *in vivo* ότι η πρωτεΐνη Rb μπορεί να μεθυλιωθεί από τη Smyd2, εκτός του καταλοίπου 860, και στο κατάλοιπο λυσίνης 810 (RbK810me1). Η μεθυλίωση στο κατάλοιπο αυτό βρέθηκε ότι ενισχύει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Rb στα κατάλοιπα σερίνης 807/811, μία τροποποίηση η οποία εμποδίζει την αλληλεπίδραση της Rb με τον E2F με αποτέλεσμα τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από τη φάση G1 στην S (Εικόνα 5) (Cho *et al.*, 2012).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της φωσφορυλίωσης της RB1 μέσω μεθυλίωσης από τη Smyd2 (Cho *et al.*, 2012)

Ακόμα μία μη ιστονική πρωτεΐνη η οποία αποτελεί υπόστρωμα της Smyd2 είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη PTEN (Phosphatase and tensin homologue) (Nakakido *et al.*, 2015). Η PTEN έχει δράση λιπιδικής φωσφατάσης μέσω της οποίας ανταγωνίζεται το AKT μονοπάτι σηματοδότησης (Myers *et al.*, 1998). Το AKT μονοπάτι επηρεάζει πολλές φυσιολογικές λειτουργίες όπως την κυτταρική επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό μεταβολισμό (Manning & Cantley, 2007). Η ρύθμιση της δράσης του PTEN είναι πολύπλοκη και πραγματοποιείται κυρίως μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως ακετυλίωση, οξειδωση, ουβικιτινυλίωση, σουμοϋλίωση, φωσφορυλίωση και μεθυλίωση (Nakakido *et al.*, 2015).

Το 2015 παρατηρήθηκε *in vitro* και *in vivo* από την ομάδα Nakakido *et al.* ότι η Smyd2 δι-μεθυλιώνει την PTEN στο κατάλοιπο λυσίνης 313 (PTEN-K313me2). Πειράματα Knockdown της Smyd2 σε καρκινικά κύτταρα μαστού έδειξαν ότι καταστέλλεται η κυτταρική αύξηση και εξετάζοντας περαιτέρω τη φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα των κυττάρων στη φάση G1 ήταν αυξημένα, ενώ αυτά στη φάση S είχαν μειωθεί, υποδεικνύοντας ότι η Smyd2 επηρεάζει τη μετάβαση από τη G1 στην S. Είναι βιβλιογραφικά γνωστό ότι η PTEN ρυθμίζει αρνητικά τη μετάβαση από τη G1 στην S, οπότε προτάθηκε ότι ίσως η μεθυλίωση από τη Smyd2 επηρεάζει τη δράση της PTEN. Παράλληλα Knockdown της Smyd2 είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων της φωσφορυλιωμένης AKT. Όπως αποδείχθηκε η δι-μεθυλίωση της PTEN ενισχύει τη φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο σερίνης 380, η οποία πιθανόν μέσω αναδιάταξης της τρισδιάστατης δομής δεν επιτρέπει την καταστολή του AKT μονοπατιού. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η δι-μεθυλίωση της PTEN από τη Smyd2 λειτουργεί αρνητικά στην ογκοκατασταλτική δράση της PTEN και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού AKT το οποίο οδηγεί σε ογκογένεση (Εικόνα) (Nakakido *et al.*, 2015).



Εικόνα 6: Μοντέλο αναπαράστασης της δράσης της Smyd2 στην PTEN (Nakakido *et al.*, 2015)

Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι σε πολλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης Smyd2, όπως ο καρκίνος στο μαστό, στο κόλον, στο δέρμα, στο πάγκρεας, στον προστάτη (Cho *et al.*, 2012). Παράλληλα πειράματα έδειξαν ότι στη λευχαιμία και στον καρκίνο του οισοφάγου παρατηρείται υπερέκφραση (Sakamoto *et al.*, 2014; Komatsu *et al.*, 2009). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρήθηκε ότι ασθενείς με Οξεία λεμφοβλαστική λευχαιμία σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα έκφρασης της Smyd2, τα οποία μειώνονται σημαντικά ύστερα από χημειοθεραπεία (Sakamoto *et al.*, 2014). Στη δεύτερη περίπτωση *in vitro* πειράματα σε ESCC κύτταρα (Esophageal squamous cell carcinoma cells) έδειξαν ότι η καταστολή της Smyd2 παρεμποδίζει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων, ενώ η υπερέκφραση της προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Komatsu *et al.*, 2009).

Η Smyd2 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην ενεργοποίηση των μακροφάγων

Το 2008 η ομάδα Abu-Farha *et al.* έδειξαν ότι η Smyd2 εκφράζεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Περαιτέρω μελέτη της Smyd2 στα μακροφάγα από την ομάδα Xu *et al.* έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή δρα ως αρνητικός ρυθμιστής στην ενεργοποίηση των μακροφάγων και στην M1 πόλωση. Σύγκριση των επιπέδων mRNA και των επιπέδων της Smyd2 σε κύτταρα του μυελού των οστών, ώριμα μακροφάγα (M0 macrophage) και σε ενεργοποιημένα μακροφάγα από LPS έδειξαν ότι παρατηρείται μείωση των επιπέδων της Smyd2 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σε M1. Παράλληλα πειράματα στα οποία πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των κυττάρων με LPS έδειξαν ότι υπερέκφραση της Smyd2 αναστέλλει την ενεργοποίηση των μακροφάγων με την καταστολή της έκφρασης των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών TNF- α και IL-6. Η καταστολή της έκφρασης των δύο αυτών γονιδίων από τη Smyd2 οφείλεται σε δύο λόγους, σε επιγενετικές τροποποιήσεις και σε αλλαγές που υφίστανται τα μονοπάτια σηματοδότησης.

Στην πρώτη περίπτωση η Smyd2 βρέθηκε ότι αλλάζει το πρότυπο τροποποιήσεων των ιστονών στα γονίδια αυτά, με το να εμποδίζει τη δι και τρι-μεθυλίωση της H3K4 και να αυξάνει τα επίπεδα της κατασταλτικής τροποποίησης H3K36me2. Στη δεύτερη περίπτωση δρα εμποδίζοντας τη μεταβίβαση του σήματος μετά από επαγωγή με LPS μέσω των μονοπατιών NF-kB και ERK, ίσως τροποποιώντας κάποια πρωτεΐνη των δύο αυτών μονοπατιών. Τέλος υπερέκφραση της Smyd2 καταστέλλει τη διαφοροποίηση σε Th17 κύτταρα και ενισχύει τη διαφοροποίηση σε iTreg, ως απόκριση στα υψηλά επίπεδα παραγωγής του TGF-β και στη χαμηλή έκκριση της IL-6. Με βάση τα παραπάνω προκύπτει ότι η Smyd2 κατέχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των μακροφάγων κατά τη διάρκεια φλεγμονής (Xu *et al.*, 2015).

Σκοπός εργασίας

Συνοψίζοντας γνωρίζουμε ότι η πρωτεΐνη Smyd2 ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών, μεθυλιώνει την H3K36 και H3K4 επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση ποικίλων γονιδίων. Προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο έδειξαν ότι διάφορες μεθυλοτρανσφεράσες εμπλέκονται στους μηχανισμούς απόκρισης οξείας φάσης που πραγματοποιείται στο ήπαρ. Ο πιθανός ρόλος της μεθυλοτρανσφεράσης Smyd2 στο μηχανισμό αυτό δεν έχει ακόμα εξεταστεί. Ταυτόχρονα από το 2006 και μετά η μελέτη της πρωτεΐνης Smyd2 ως μεθυλοτρανσφεράση σε ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες την καθιστά πιθανό ογκογονίδιο. Το 2012 η Oncomine εξετάζοντας τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης αυτής σε διάφορα είδη καρκίνου στον άνθρωπο έδειξε ότι η Smyd2 παρουσιάζει υπερέκφραση σε πολλά είδη, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του ήπατος (Hepatocellular carcinoma – HCC) (Cho *et al.*, 2012).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι:

- Η εύρεση του πιθανού ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στην απόκριση οξείας φάσης που πραγματοποιείται από τα ηπατοκύτταρα κατά τη φλεγμονή.

Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκαν σε 3 σειρές ποντικών, ποντίκια αγρίου τύπου, ποντίκια με καταστολή της Smyd2 μόνο στο ήπαρ (Smyd2-LivKO) και ποντίκια με καταστολή της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO) τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών της απόκρισης οξείας φάσης μετά από χορήγηση λιποπολυσακχαρίτη για την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης.

- Η εύρεση του ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στο μηχανισμό καρκινογένεσης του ήπατος.

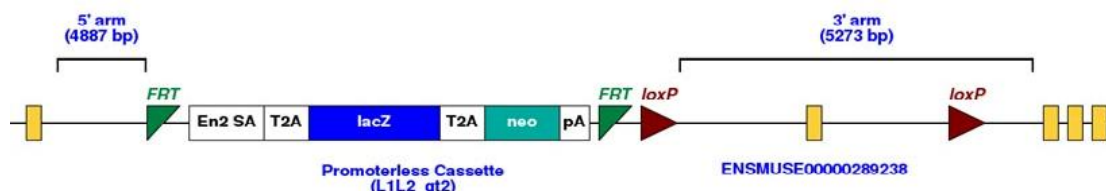
Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε χημική επαγωγή καρκίνου του ήπατος με διέθυλνιτροζαμίνη σε 3 σειρές ποντικών, ποντίκια αγρίου τύπου, ποντίκια με καταστολή της Smyd2 μόνο στο ήπαρ (Smyd2-LivKO) και ποντίκια με καταστολή της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO) έτσι ώστε να εξεταστεί φαινοτυπικά η ικανότητα σχηματισμού καρκίνου σε έλλειψη της πρωτεΐνης Smyd2.

Υλικά και Μέθοδοι

Ποντίκια

Στην παρούσα εργασία για την εύρεση του ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στην απόκριση οξείας φάσης και στον καρκίνο του ήπατος χρησιμοποιήθηκαν τρεις σειρές ποντικών, ποντίκια αγρίου τύπου (BL6), ποντίκια με καταστολή της Smyd2 μόνο στο ήπαρ (Smyd2-LivKO) και ποντίκια με καταστολή της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO).

Αρχικά παραλήφθηκαν από το Jackson Laboratory ποντίκια C57BL/6 ετερόζυγα για την περιοχή που παρουσιάζεται στην εικόνα 7 μεταξύ των εξωνίων ένα και τρία του γονιδίου της Smyd2. Η περιοχή αυτή περιέχει FRT αλληλουχίες που αναγνωρίζει η FLP ρεκομπινάση και LoxP αλληλουχίες που αναγνωρίζει η Cre ρεκομπινάση. Μεταξύ των FRT αλληλουχιών τοποθετούνται οι μάρτυρες επιλογής, ενώ εκατέρωθεν του εξωνίου 2 τοποθετούνται οι LoxP αλληλουχίες. Τα ποντίκια αυτά διασταυρώθηκαν με C57BL/6 ποντίκια που φέρουν την FLP ρεκομπινάση για την απομάκρυνση της “neo cassette” και στη συνέχεια αφού προέκυψαν ομόζυγα ποντίκια ως προς την Lox/Lox περιοχή διασταυρώθηκαν με C57BL/6 ποντίκια που φέρουν την Afr-Cre. Λόγω του υποκινητή AFP που προέρχεται από το γονίδιο Alpha fetoprotein, η Cre εκφράζεται μόνο στο ήπαρ όπου και απομακρύνεται το εξώνιο 2. Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν ποντίκια με καταστολή της Smyd2 μόνο στο ήπαρ (Smyd2-LivKO). Στα ποντίκια αυτά επιβεβαιώθηκε η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης στο ήπαρ μέσω qPCR.



Εικόνα 7: Μεταξύ των εξωνίων 1 και 3 του γονιδίου της Smyd2 έχει τοποθετηθεί μία “neo cassette” η οποία περιβάλλεται από FLP αλληλουχίες για την απομάκρυνσή της και δύο LoxP αλληλουχίες για την απομάκρυνση του εξωνίου 2.

Τα ετερόζυγα C57BL/6 ποντίκια για την περιοχή που παρουσιάζεται στην εικόνα 7 διασταυρώθηκαν με C57BL/6 ποντίκια που φέρουν την Cre-Deleter, απομακρύνοντας με τον τρόπο αυτό το εξώνιο 2 από όλα τα κύτταρα. Στη συνέχεια μέσω κατάλληλων διασταυρώσεων επιλέχθηκαν ομόζυγα ποντίκια, στα οποία λείπει το εξώνιο δύο και από τα δύο χρωμοσώματα. Αποτέλεσμα αυτού ήταν η δημιουργία ποντικών με καταστολή της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO). Στα ποντίκια αυτά επιβεβαιώθηκε η καταστολή της έκφρασης της πρωτεΐνης σε διάφορους ιστούς μέσω qPCR.

Τα ποντίκια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν διατηρούνταν σε κλουβιά, τα οποία ήταν τοποθετημένα μέσα σε έναν απαλλαγμένο από παθογόνα και ελεγχόμενο ως προς τη θερμοκρασία χώρο. Ακολουθούσαν έναν κύκλο 12 ωρών σκοταδιού, 12 ωρών φωτός και τρέφονταν με συγκεκριμένη τροφή (19% πρωτεΐνη, 5% λίπος) και νερό κατά βούληση.

Ενέσεις DEN για την επαγωγή καρκίνου

Για την επαγωγή καρκίνου του ήπατος χορηγήθηκε στα ποντίκια διέθυλνιτροζαμίνη (Diethylnitrosamine – DEN), ένα γνωστό χημικό καρκινογόνο για το ήπαρ. Σε ποντίκια ηλικίας 14 ημερών χορηγήθηκαν μέσω ενδοπεριτονιακής ένεσης 25mg/kg DEN (N0756, Sigma) και θυσιάστηκαν σε ηλικία 10 μηνών.

Ενέσεις LPS για την επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης

Για την επαγωγή απόκρισης οξείας φάσης χορηγήθηκε στα ποντίκια λιποπολυσακχαρίτης (Lipopolysaccharides – LPS), ένα χαρακτηριστικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των αρνητικών

κατά Gram βακτηρίων, το οποίο ενεργοποιεί τα κύτταρα της έμφυτης ανοσίας μέσω του υποδοχέα τύπου Toll-4. Σε ποντίκια ηλικίας 60 ημερών χορηγήθηκαν μέσω ενδοπεριτονιακής ένεσης 5mg/kg LPS (L2630, Sigma) και θυσιάστηκαν έξι ώρες μετά την ένεση.

Απομόνωση RNA - qPCR

Η απομόνωση του ολικού RNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του παράγοντα TRI-reagent (T9424, Sigma), σύμφωνα με τις οδηγίες που προτείνει η εταιρεία. Στη συνέχεια το δείγμα υπέστη πέψη με την RQ1 RNase-free DNase (M6101, Promega) για την απομάκρυνση του DNA. Ένα μg από το δείγμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία μονόκλωνου cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (28025013, Invitrogen). Τα επίπεδα των mRNA των επιθυμητών γονιδίων μετρήθηκαν με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantative PCR – qPCR) σε STEP-ONE Real Time PCR μηχανήμα ανίχνευσης μέσω του αντιδραστηρίου SYBR Green όπως περιγράφηκε το 2006 από την ομάδα Kyrmizi *et al.*. Οι τιμές έκφρασης των γονιδίων δίνονται ως ο λόγος μεταξύ των επιθυμητών γονιδίων και ενός εσωτερικού γονιδίου αναφοράς, του γονιδίου *Gardh*, ο οποίος αποτελεί έναν παράγοντα κανονικοποίησης για την ποσότητα του RNA που απομονώθηκε από ένα δείγμα και στη συνέχεια κανονικοποιήθηκε με την τιμή του κοντρόλ. Για κάθε γονίδιο το οποίο εξετάστηκε, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν για κάθε δείγμα.

Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των επιπέδων mRNA κάθε γονιδίου αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα:

SOCS3	Forward	5' TCACGGCTGCCAACATCTGGG 3'
	Reverse	5' GACCATGGCGCACGGAG 3'
SAA3	Forward	5' ACATGTGGCGAGCCTACTCTG 3'
	Reverse	5' TGCTCCATGTCCCGTGAACCTT 3'
SAA2	Forward	5' AGAAAATCAGTGATGCAAGAG 3'
	Reverse	5' CAGTCCAGGAGGTCTGTAGTA 3'
SAA1	Forward	5' ACATGTGGCGAGCCTACACTG 3'
	Reverse	5' TCATGTCCTCTGCCGAAGAA 3'
HPX	Forward	5' CGGCTGGAGAAGGAACCTGGG 3'
	Reverse	5' GTTGGGGCCAAGAGACTTGTC 3'
HP	Forward	5' CGAGAAGCAATGGGTGAACAC 3'
	Reverse	5' CAGCCACTGGTCACTGATCAA 3'
CRP	Forward	5' TCGGACTTTTGGTCATGAA 3'
	Reverse	5' TTCCAAAATATGAGAATGTCTG 3'
FGA	Forward	5' GAAGGAGAAACTCGCAACACT 3'
	Reverse	5' CTGGTCTCTTGATCGCAATAA 3'
C9	Forward	5' CCTGTGCTCCTGCCAATGAT 3'
	Reverse	5' CCCCTTCCATGTGAACCA 3'
C4	Forward	5' GTGGAGGACAAGGACGGCTAC 3'
	Reverse	5' AGTTGCGGGTCTGACCTAT 3'
C3	Forward	5' GGCAGCAACGCAAGTTCA 3'
	Reverse	5' TGTCTTCCCAATGATGTAGC 3'
AGT	Forward	5' GGCAAATCTGAACAACATTGG 3'
	Reverse	5' CTGAGTCCTGCTCGTAGATGG 3'
A2M	Forward	5' GGGCCAAATACAAAGATAGCA 3'
	Reverse	5' GACCAACTCCTCCGCTCCA 3'
SAP	Forward	5' CTGGACCAAGCATGGACAAGC 3'
	Reverse	5' CGGGAAAGGTCACTGTAGGTT 3'

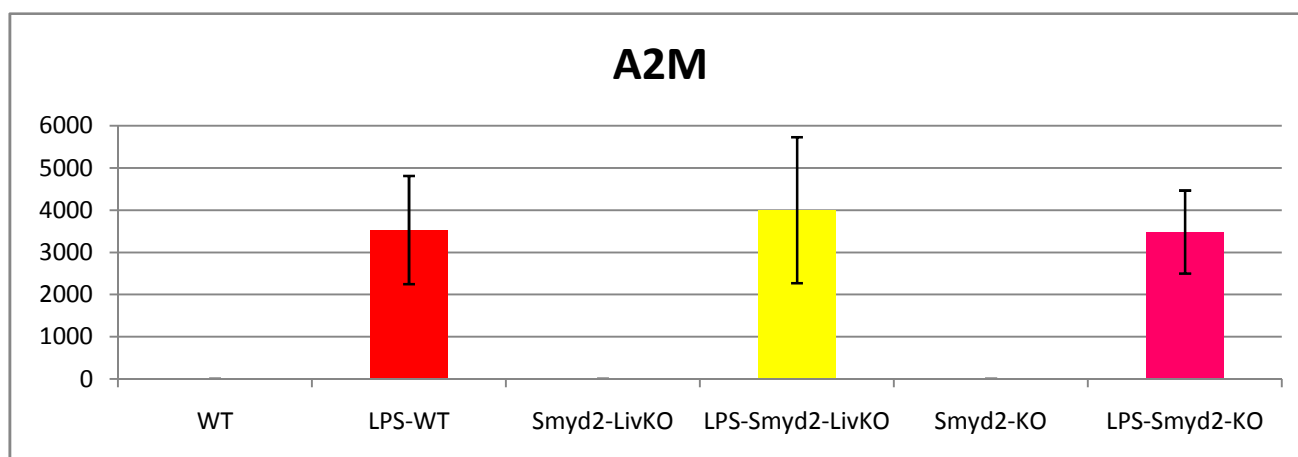
Αποτελέσματα

➤ Εύρεση του πιθανού ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στην απόκριση οξείας φάσης

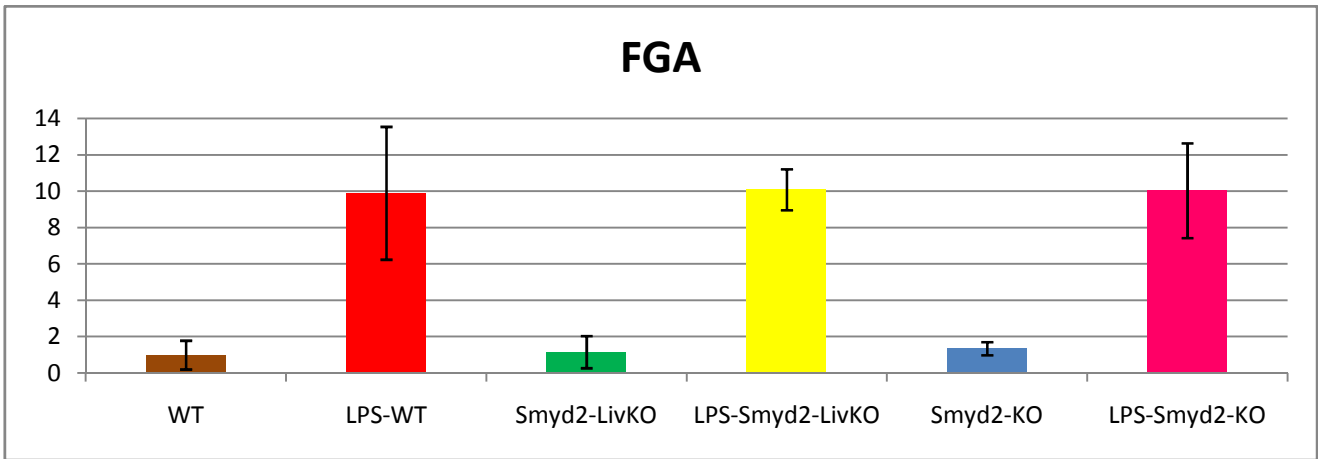
Στην παρούσα εργασία αρχικά εξετάστηκε ο πιθανός ρόλος της πρωτεΐνης Smyd2 στην απόκριση οξείας φάσης που πραγματοποιείται από τα ηπατοκύτταρα. Είναι γνωστό ότι κατά τη φλεγμονή πραγματοποιείται από τα φλεγμονώδη κύτταρα η παραγωγή των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών IL-1α/β, IL-6, IFN-α/γ και IL-8. Μέσω των παραπάνω κυτοκινών προωθείται η παραγωγή μιας ομάδας πρωτεϊνών του αίματος από τα ηπατοκύτταρα, οι πρωτεΐνες οξείας φάσης. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν ως στόχο την αποτροπή μόλυνσης, απομάκρυνση πιθανών παθογόνων, ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και επαναφορά της ομοιόστασης (Janeway *et al.*, 2001).

Για να εξετάσαμε αν η έλλειψη της Smyd2 επηρεάζει την απόκριση οξείας φάσης αναλύσαμε τα επίπεδα των mRNA κάποιων πρωτεϊνών της απόκρισης οξείας φάσης που η έκφρασή τους εξαρτάται από την IL-6 σε ποντίκια αγρίου τύπου (WT), ποντίκια με καταστολή της Smyd2 μόνο στο ήπαρ (Smyd2-LivKO) και ποντίκια με καταστολή της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO) μετά από επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης μέσω χορήγησης LPS και χωρίς επαγωγή ανοσολογικής απόκρισης. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκαν τα mRNA επίπεδα των παρακάτω 14 γονιδίων A2M, AGT, C3, C4, C9, CRP, FGA, HP, HPX, SAA1, SAA2, SAA3, SAP, SOCS3 (Διαγράμματα 1-14). Τα παραπάνω γονίδια μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μεταγραφικό παράγοντα από τον οποίο ρυθμίζονται. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα γονίδια A2M και FGA που ρυθμίζονται από τον παράγοντα STAT3, ενώ η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα γονίδια CRP, HP, SAA1, SAA2, SAA3 και SAP που ρυθμίζονται από τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB και STAT3. Τέλος η τρίτη κατηγορία περιέχει τα γονίδια AGT, C3, C4 και C9 που ρυθμίζονται από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, STAT3 και CEBPb. Σύγκριση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι η έλλειψη της Smyd2 δεν επιφέρει σε καμία από τις τρεις παραπάνω κατηγορίες σημαντικές αλλαγές στην απόκριση οξείας φάσης, καθώς τα επίπεδα mRNA τόσο στα WT όσο και στα Smyd2-LivKO και Smyd2-KO είναι σχεδόν τα ίδια.

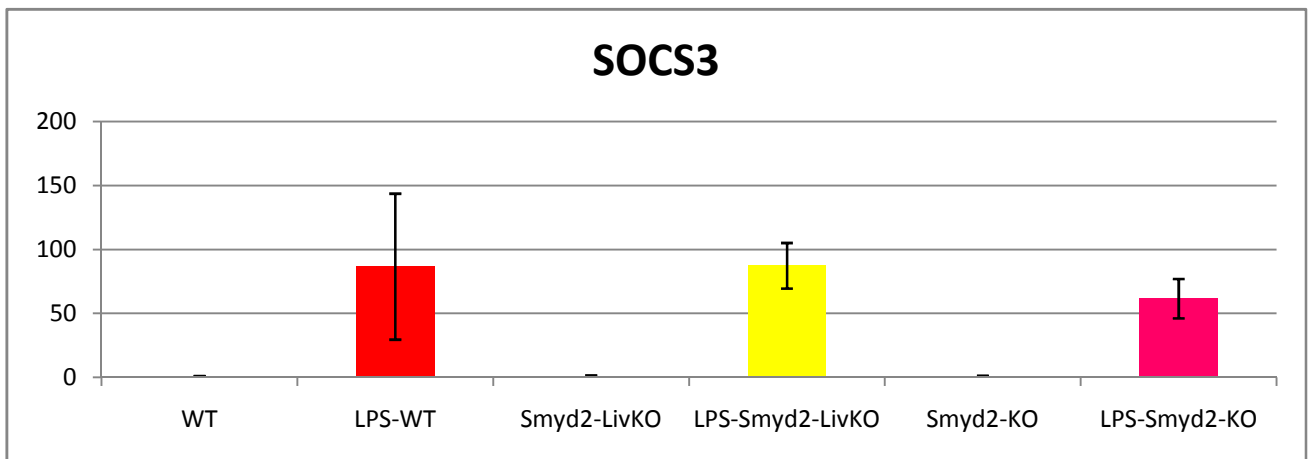
Γονίδια απόκρισης οξείας φάσης ρυθμιζόμενα από το μεταγραφικό παράγοντα STAT3



Διάγραμμα 1: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης A2M στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

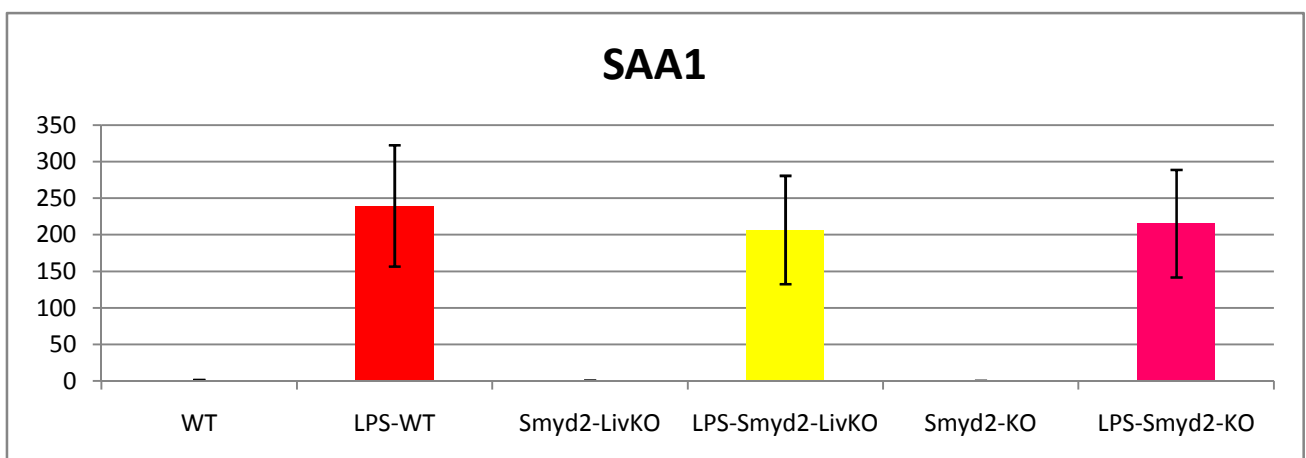


Διάγραμμα 2: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης FGA στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. \pm τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

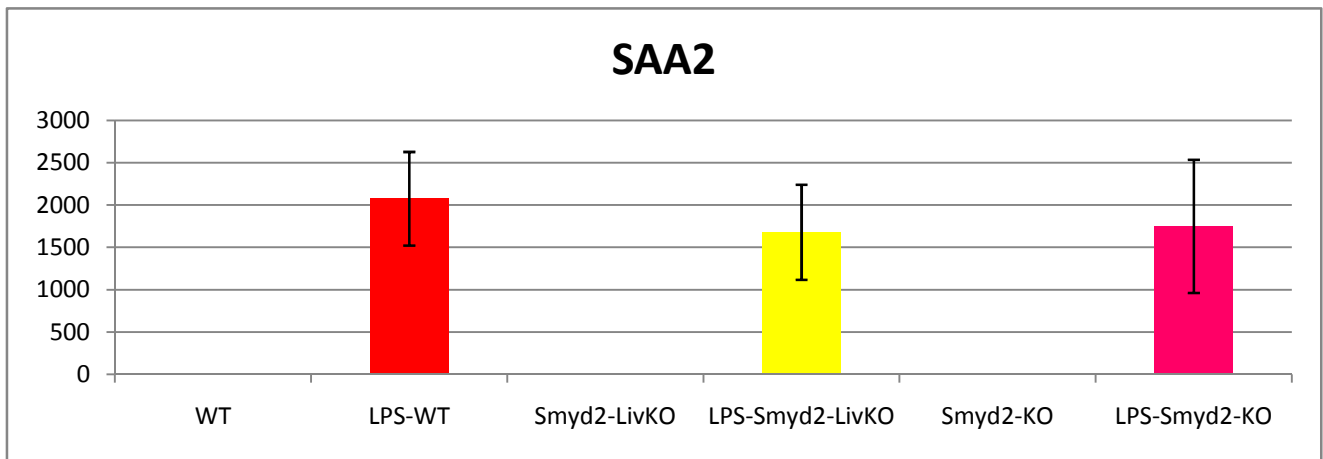


Διάγραμμα 3: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης SOCS3 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. \pm τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

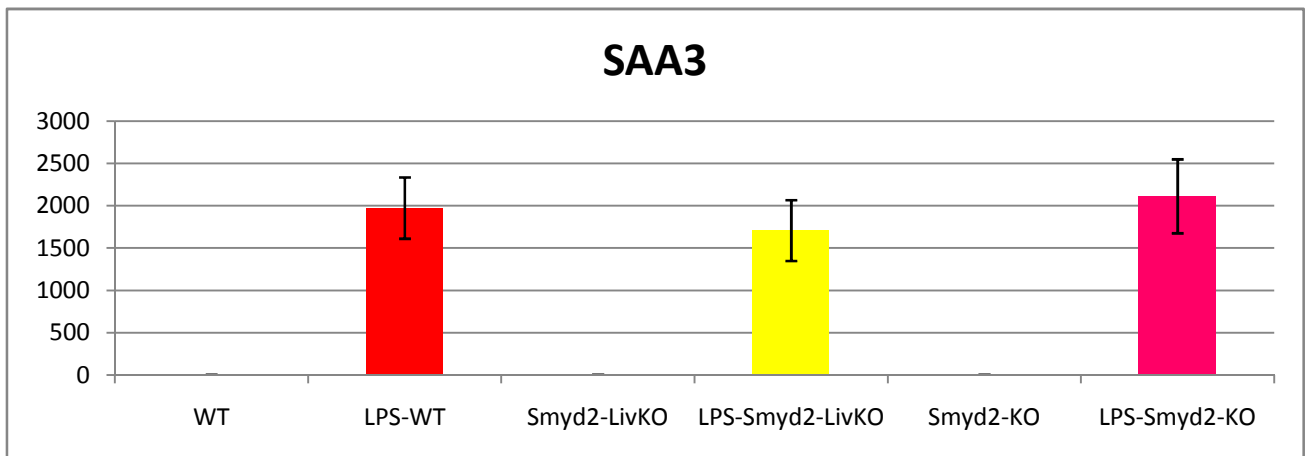
Γονίδια απόκρισης οξείας φάσης ρυθμιζόμενα από το μεταγραφικό παράγοντα STAT3 και NF-kB



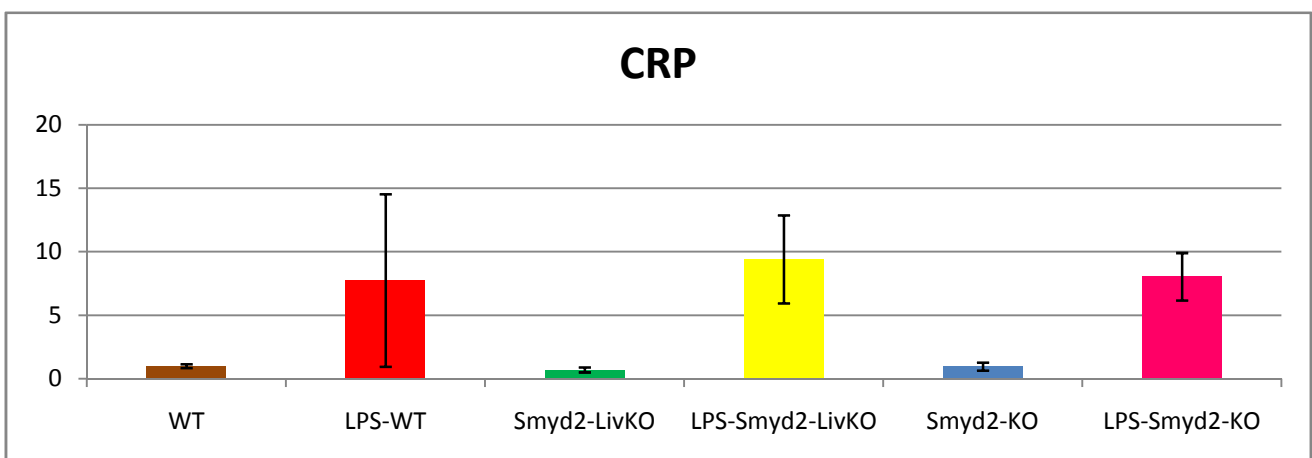
Διάγραμμα 4: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης SAA1 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. \pm τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



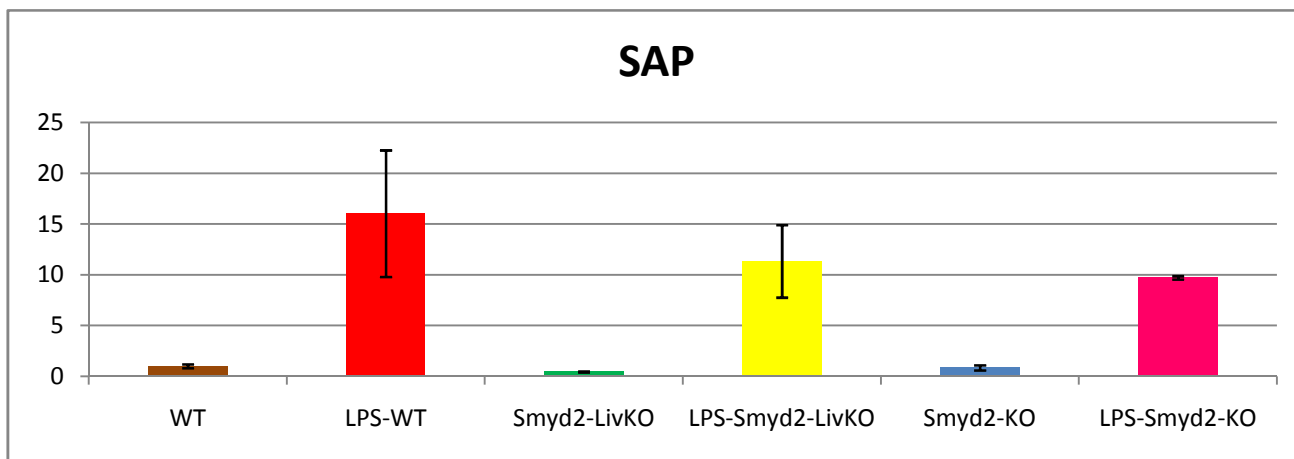
Διάγραμμα 5: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης SAA2 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



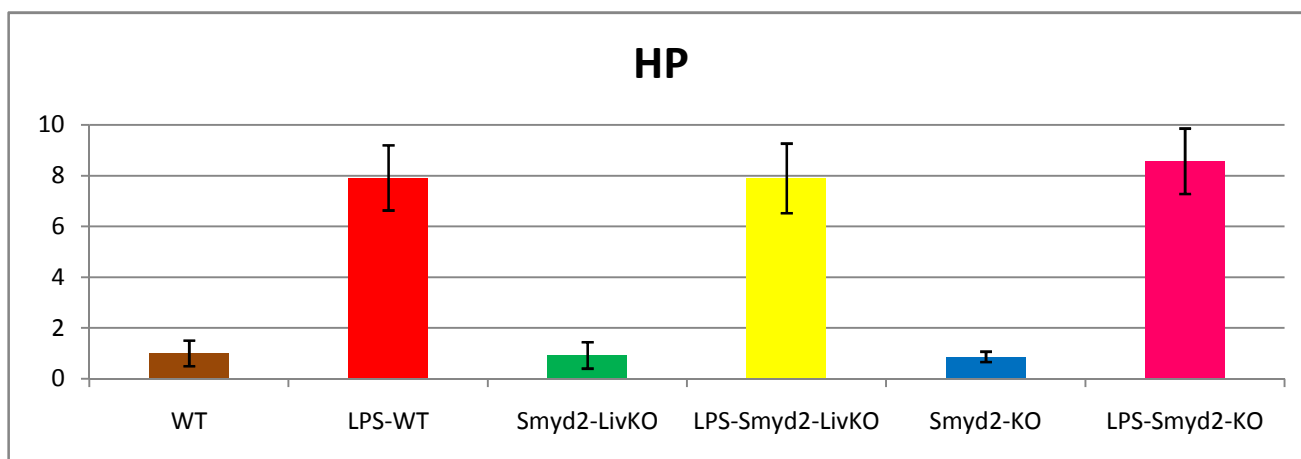
Διάγραμμα 6: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης SAA3 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



Διάγραμμα 7: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης CRP στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

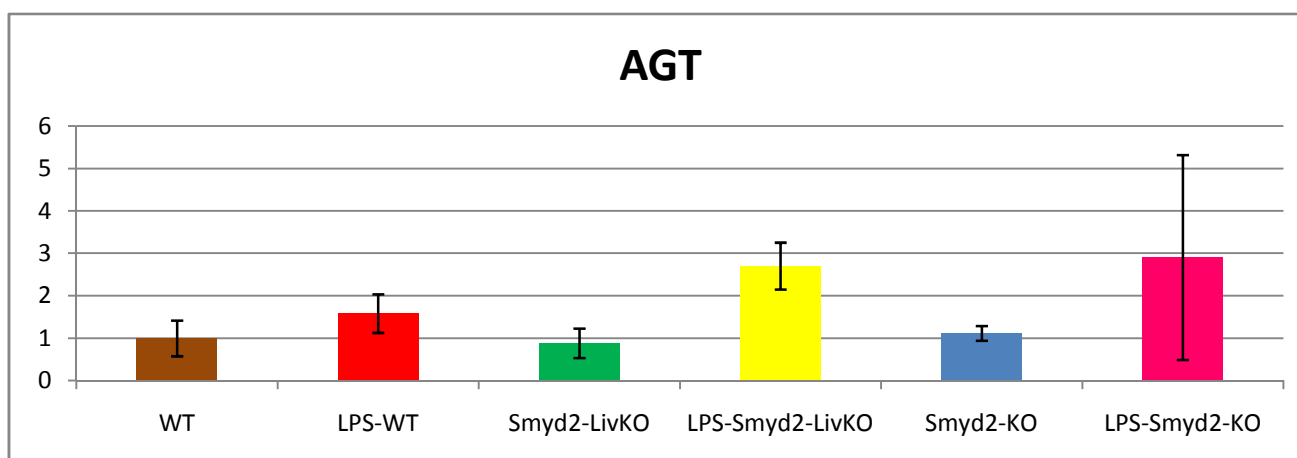


Διάγραμμα 8: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης SAP στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

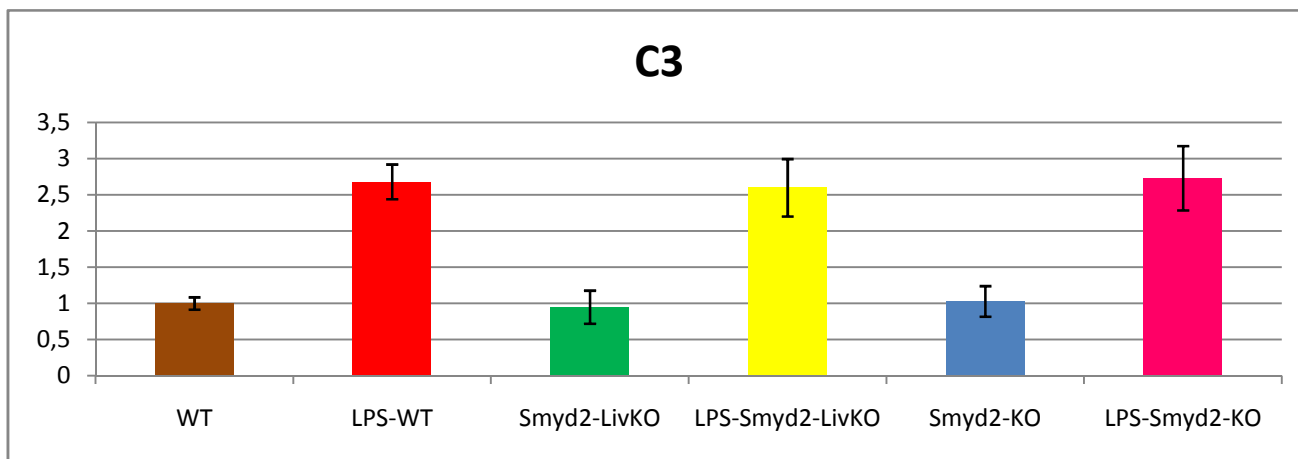


Διάγραμμα 9: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης HP στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

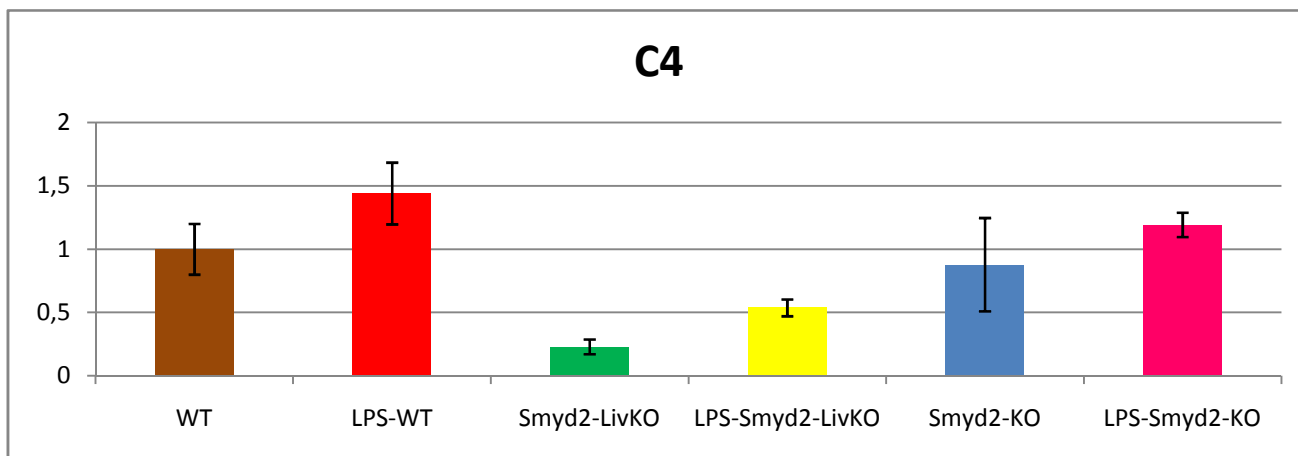
Γονίδια απόκρισης οξείας φάσης ρυθμιζόμενα από το μεταγραφικό παράγοντα STAT3 και NF-κB και CEBPβ



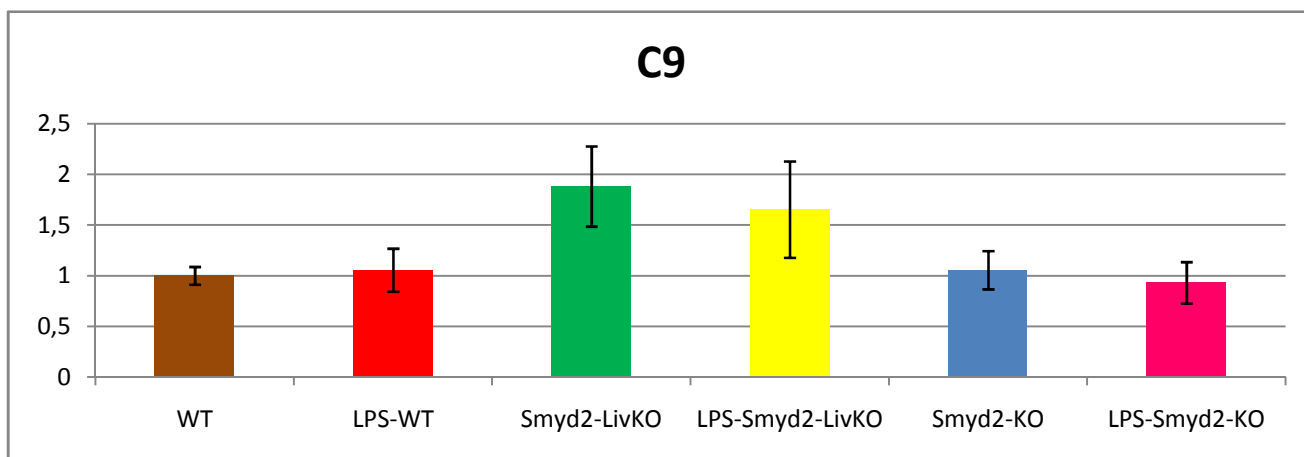
Διάγραμμα 10: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης AGT στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



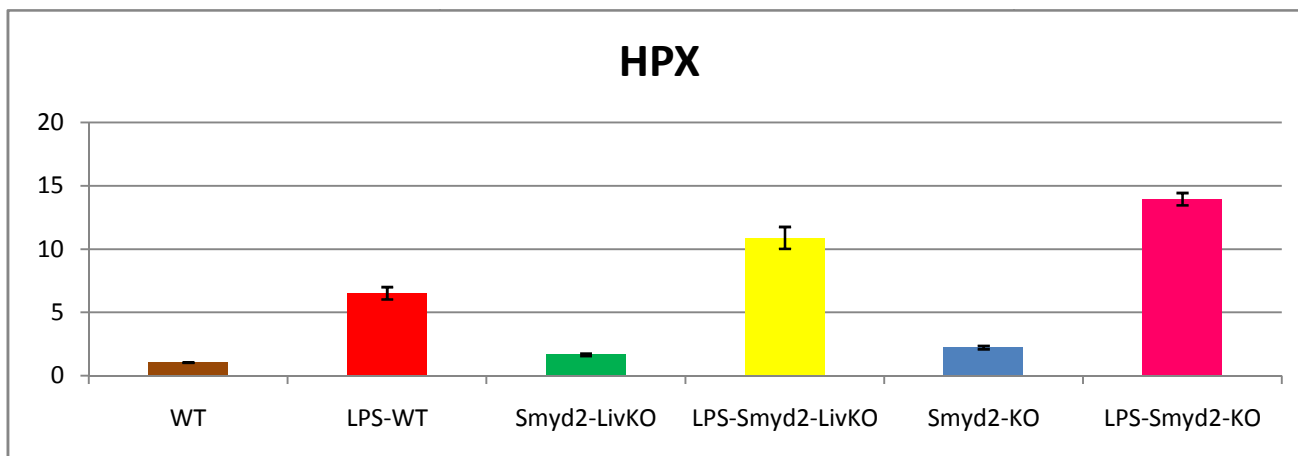
Διάγραμμα 11: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης C3 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



Διάγραμμα 12: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης C4 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



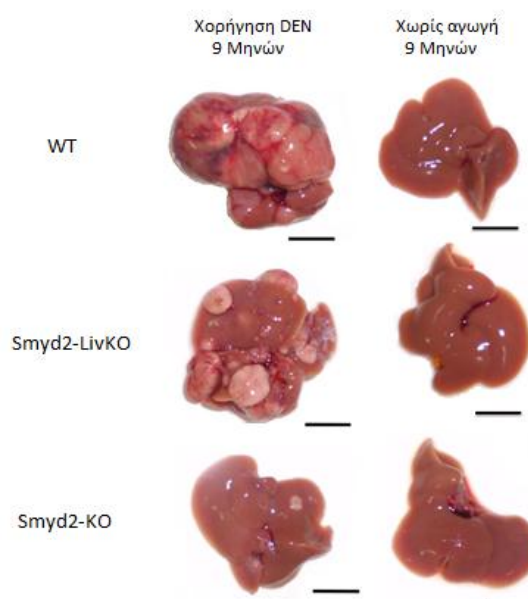
Διάγραμμα 13: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης C9 στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. ± τυπική απόκλιση 4 ποντικών.



Διάγραμμα 14: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζονται τα επίπεδα mRNA της πρωτεΐνης HPX στο ήπαρ δύο μηνών ποντικών WT, Smyd2-LivKO και Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση LPS. Η κάθε μπάρα αναπαριστά το μέσο όρο των mRNA επιπέδων κανονικοποιημένα με τα επίπεδα mRNA του γονιδίου αναφοράς *Gardh*. \pm τυπική απόκλιση 4 ποντικών.

➤ Εύρεση του ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στο μηχανισμό καρκινογένεσης του ήπατος

Παράλληλα για την εξέταση της σχέσης μεταξύ Smyd2 και καρκίνου του ήπατος, αναλύσαμε ποντίκια αγρίου τύπου (αναφερόμενα ως Wild type - WT), ποντίκια με καταστολή της Smyd2 μόνο στο ήπαρ (Smyd2-LivKO) και ποντίκια με καταστολή της πρωτεΐνης Smyd2 σε όλα τα κύτταρα (Smyd2-KO) μετά από χημική επαγωγή καρκίνου στο ήπαρ με DEN. Υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκε κάποια μακροσκοπική αλλαγή σε αυτά τα μοντέλα, δείχνοντας ότι η Smyd2 πρωτεΐνη δεν είναι απαραίτητη στη φυσιολογική ανάπτυξη του ήπατος (Εικόνα 8). Παρόλα αυτά όταν στα ποντίκια χορηγήθηκε η καρκινογόνος ουσία DEN για να επαχθή καρκίνος στο ήπαρ, παρατηρήσαμε διαφορές στην ικανότητα σχηματισμού όγκου. Μακροσκοπική εξέταση αποκάλυψε μία δραματική μείωση στον αριθμό και στο μέγεθος των περιοχών όγκου στο ήπαρ του Smyd2-KO σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Εικόνα 8). Παράλληλα μακροσκοπική εξέταση έδειξε ότι τα Smyd2-LivKO παρουσιάζουν ίδιο αριθμό και μέγεθος περιοχών όγκου στο ήπαρ σε σχέση με τα αγρίου τύπου (Εικόνα 8). Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η Smyd2 είναι απαραίτητη για το σχηματισμό καρκίνου στο ήπαρ.



Εικόνα 8: Μακροσκοπική απεικόνιση ήπατος από 9 μηνών ποντίκια WT, Smyd2-LivKO, Smyd2-FKO χωρίς και μετά από χορήγηση DEN. _ 1cm

Ο σχηματισμός καρκίνου του ήπατος μέσω χημικής επαγωγής από τον παράγοντα DEN ξεκινά λόγω βλαβών στο DNA, οι οποίες οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο ακολουθούμενο από χρόνια φλεγμονή και πολλαπλασιασμό κυττάρων που διέφυγαν την απόπτωση (Verna *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 2005; Kohno *et al.*, 2005). Βλάβη σε κάποιο από αυτά τα αρχικά γεγονότα θα μπορούσε να εξηγήσει το χαμηλό ποσοστό σχηματισμού καρκίνου στο ήπαρ στα Smyd2-KO ποντίκια.

Συζήτηση

➤ Εύρεση του ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στην απόκριση οξειάς φάσης

Στόχος της παρούσας εργασίας υπήρξε η εύρεση του ρόλου της μεθυλοτρανσφεράσης Smyd2 στην απόκριση οξειάς φάσης, μία διαδικασία που ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια ανοσολογικής απόκρισης και διεξάγεται από τα ηπατοκύτταρα. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών απόκρισης οξειάς φάσης σε Smyd2-KO, Smyd2-LivKO και αγρίου τύπου μετά από χορήγηση LPS για την ενεργοποίηση ανοσολογικής απόκρισης.

Η απόκριση οξειάς φάσης αποτελεί ένα κομμάτι της έμφυτης ανοσίας το οποίο ενεργοποιείται σε διάφορα ερεθίσματα όπως τραύμα σε ιστό, μόλυνση, στρες, νεοπλασία και φλεγμονή. Είναι μία πολύπλοκη και μη ειδική αντίδραση η οποία περιλαμβάνει φυσικούς και μοριακούς φραγμούς και αποκρίσεις που έχουν ως στόχο την αποτροπή μόλυνσης, απομάκρυνση πιθανών παθογόνων, ενεργοποίηση της ανοσολογικής απόκρισης και επαναφορά της ομοιόστασης. Η απόκριση οξειάς φάσης πραγματοποιείται από τα ηπατοκύτταρα τα οποία παράγουν και εκκρίνουν τις πρωτεΐνες απόκρισης οξειάς φάσης στο αίμα, μετά από ενεργοποίησή τους από την προ-φλεγμονώδη κυτοκίνη ιντερλευκίνη 6 που παράγεται στο σημείο του τραύματος από κοκκιοκύτταρα και μονοκύτταρα κύτταρα. Παράλληλα έχει δειχθεί ότι τα Kupffer κύτταρα λόγω του σήματος των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών, παράγουν IL-6 την οποία παρουσιάζουν στα ηπατοκύτταρα μέχρι την απομάκρυνση της αρχικής απειλής (Gruys *et al.*, 2005).

Οι πρωτεΐνες απόκρισης οξειάς φάσης αποτελούν μια ομάδα πρωτεϊνών των οποίων η συγκέντρωση στο πλάσμα του αίματος μεταβάλλεται μέχρι και 25% ως απόκριση σε φλεγμονή. Πρωτεΐνες της ομάδας αυτής που αυξάνουν την ποσότητα τους αποτελούν η A2M (Alpha 2-macroglobulin) που δρα ως αντι-πρωτεάση και είναι ικανή να απενεργοποιήσει ποικιλία πρωτεασών, η AGT (Angiotensin) που προκαλεί αγγειοσυστολή, η C3 (Complement component 3) που συμμετέχει στην ενεργοποίηση του συστήματος του συμπληρώματος μέσω της κλασσικής και εναλλακτικής οδού, η C4 (Complement component 4) και η C9 (Complement component 9) που αποτελούν μέλη του συμπληρώματος το οποίο ενισχύει την ικανότητα των αντισωμάτων και των φαγοκυττάρων για την απομάκρυνση μικροβίων και νεκρών κυττάρων από τον οργανισμό και ενισχύει την φλεγμονή, η CRP (C-reactive protein) που δρα ως οψωνίνη με το να προσδένεται σε κατάλοιπα και πολυσακχαρίτες βακτηρίων, μυκήτων, παράσιτων έτσι ώστε να ενεργοποιήσει το συμπλήρωμα και τη φαγοκυττάρωση, η FGA (Fibrinogen alpha) που εμφανίζει αγγειοσυσταλτικές και χημειοτακτικές δραστηριότητες, η HP (Haptoglobin) που μειώνει τις οξειδωτικές βλάβες με το να προσδένει ελεύθερη αιμοσφαιρίνη, η HPX (Hemorexin) που έχει την ικανότητα να προσδένει ομάδες αίμας οι οποίες απελευθερώνονται από την HPX και ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του υποδοχέα AT1-R (Angiotensin II type I receptor), οι SAA1, SAA2 και SAA3 (Serum amyloid A 1-3) που συμμετέχουν στη στρατολόγηση μονοκυττάρων, πολυμορφοπύρηνων κυττάρων και T-κυττάρων, η SAP (Serum amyloid P component) η οποία θεωρείται ομόλογο της CRP σε κάποια είδη οργανισμών, η SOCS3 που είναι αρνητικός ρυθμιστής των μονοπατιών σηματοδότησης των κυτοκινών (Cray *et al.*, 2009).

Μελετώντας τα επίπεδα έκφρασης των 14 προαναφερθέντων πρωτεϊνών απόκρισης οξειάς φάσης μετά από χορήγηση LPS, συμπεραίνουμε ότι δεν παρατηρείται κάποια διαφορά μεταξύ ποντικών αγρίου τύπου, ποντικών Smyd2-LivKO και ποντικών Smyd2-KO. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η έλλειψη της Smyd2 είτε από τα ηπατοκύτταρα είτε από όλους τους κυτταρικούς πληθυσμούς του οργανισμού των ποντικών δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση και τη λειτουργία της απόκρισης οξειάς φάσης.

➤ Εύρεση του ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στο μηχανισμό καρκινογένεσης του ήπατος

Ταυτόχρονα στην παρούσα εργασία εξετάστηκε ο ρόλος της πρωτεΐνης Smyd2 στην καρκινογένεση του ήπατος. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα σε πολλούς τύπους καρκίνου στον άνθρωπο παρατηρείται

υπερέκφραση της πρωτεΐνης Smyd2, όπως στον καρκίνο του ήπατος (Cho *et al.*, 2012). Παράλληλα γνωρίζουμε ότι μέσω της δράσης της Smyd2 καταστέλλεται η ογκοκατασταλτική δράση της πρωτεΐνης p53, εξασθενεί η δράση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN και ευνοείται η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης RB1, οδηγώντας στην εμφάνιση καρκίνου (Huang *et al.*, 2006; Nakakido *et al.*, 2015; Cho *et al.*, 2012). Λόγω των επιπτώσεων που επιφέρει η δράση της Smyd2 στα υποστρώματα της, έχει προταθεί ότι ίσως λειτουργεί ως ογκογονίδιο (Leinhart & Brown, 2011). Τέλος δεδομένα από ποντίκια με πλήρη έλλειψη της πρωτεΐνης Smyd2 (Knockdown), δείχνουν ότι η απουσία της καταστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων (Komatsu *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2012).

Για την εύρεση του ρόλου της πρωτεΐνης Smyd2 στην καρκινογένεση του ήπατος εξετάστηκαν μακροσκοπικά ποντίκια Smyd2-KO, Smyd2-LivKO και αγρίου τύπου μετά από χορήγηση παράγοντα για τη χημική επαγωγή HCC. Χημική επαγωγή καρκίνου του ήπατος στις σειρές ποντικών Smyd2-KO, Smyd2-LivKO και αγρίου τύπου έδειξε ότι τα Smyd2-KO δεν έχουν ικανότητα σχηματισμού καρκίνου σε αντίθεση με τα Smyd2-LivKO και αγρίου τύπου τα οποία παρουσιάζουν τον ίδιο αριθμό και μέγεθος όγκων. Η αδυναμία σχηματισμού καρκίνου στα Smyd2-KO φανερώνει ότι η έλλειψη της Smyd2 επηρεάζει κάποιον κυτταρικό τύπο, ο οποίος σε αγρίου τύπου ποντίκι και υπό συνθήκες DEN μπορεί μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού να σχηματίσει καρκίνο.

➤ Μελλοντικά πειράματα

Ένας πιθανός κυτταρικός τύπος του ήπατος που μπορεί να ευθύνεται για την αδυναμία σχηματισμού καρκίνου στο ήπαρ μετά από χημική επαγωγή στα Smyd2-KO είναι τα προγονικά για τον καρκίνο του ήπατος κύτταρα (HCC progenitor cells - HcPC) που βρέθηκαν το 2013 από την ομάδα He *et al.*. Με βάση το πρότυπο έκφρασής τους τα HcPCs πιθανολογείται ότι προέρχονται από προ-κακοήθεις αλλοιώσεις ή αλλιώς εστίες τροποποιημένων ηπατοκυττάρων, οι οποίες παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά σε αρσενικό ποντίκι τρεις μήνες μετά από χορήγηση DEN. Τα κύτταρα μέσα στις εστίες αυτές είναι μικρότερα από τα περιβάλλοντα παρεγχυματικά και ίδια σε μέγεθος με τα HcPCs. Μεταμόσχευση των κυττάρων αυτών σε φυσιολογικό ήπαρ δείχνει ότι από μόνα τους δεν έχουν την ικανότητα δημιουργίας υποδόριου όγκου ή ηπατικού όγκου. Αντιθέτως βλάβη στο ήπαρ προκαλούμενη από uPA (ουρακινάση) ή μέσω χορήγησης CCl₄ έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία του κατάλληλου μικροπεριβάλλοντος για τα HcPCs σχηματισμού καρκίνου, καθώς παρέχει σε αυτά τις απαραίτητες κυτοκίνες και παράγοντες ανάπτυξης που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό τους (He *et al.*, 2013).

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μελλοντικά θα πρέπει να εξεταστεί ο ρόλος της πρωτεΐνης Smyd2 στην ικανότητα των HcPCs, σε κατάλληλο περιβάλλον, να σχηματίζουν καρκίνο. Για το σκοπό αυτό θα χρησιμοποιηθούν τρία είδη ποντικών, τα Smyd2-LivKO και Smyd2-KO από όπου θα απομονωθούν τα HcPCs και τα MUP-uPA ποντίκια στα οποία θα μεταμοσχευτούν για να παρατηρηθεί η ικανότητα σχηματισμού καρκίνου στο ήπαρ. Πιο συγκεκριμένα σε 15 ημερών Smyd2-LivKO και Smyd2-KO ποντίκια θα πραγματοποιηθεί μέσω ενδοπεριτονιακής ένεσης με DEN χημική επαγωγή καρκίνου του ήπατος. Σε ηλικία πέντε μηνών τα ποντίκια αυτά θα θυσιαστούν και θα απομονωθούν τα HcPCs όπως περιγράφηκε στη δουλειά των He *et al.* το 2013. Στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά θα μεταμοσχευτούν μέσω ενδοσπληνικής ένεσης (intrasplenic injection) σε 21 ημερών MUP-uPA ποντίκια, τα οποία υποβάλλονται σε χρόνια ηπατική βλάβη και κυτταρικό πολλαπλασιασμό λόγω παραγωγής uPA, καθιστώντας το μικροπεριβάλλον κατάλληλο για το σχηματισμό καρκίνου από τα HcPCs. Πέντε μήνες μετά τα ποντίκια θα θυσιαστούν και μέσω μακροσκοπικής εξέτασης θα αποκαλυφθεί αν τα HcPCs είναι υπεύθυνα για την προστασία από τον καρκίνο του ήπατος σε έλλειψη της Smyd2. Στην περίπτωση που η έλλειψη της Smyd2 καθιστά αδύνατον για τα HcPCs να πολλαπλασιαστούν, τα MUP-uPA ποντίκια που δέχτηκαν το μόσχευμα των Smyd2-KO ποντικών δε θα παρουσιάσουν καρκίνο σε σχέση με τα MUP-uPA ποντίκια που δέχτηκαν το μόσχευμα των Smyd2-LivKO ή των WT που θα παρουσιάσουν καρκίνο.

Ο καρκίνος του ήπατος (Hepatocellular carcinoma – HCC) είναι αποτέλεσμα χρόνιας ασθένειας του ήπατος, η οποία απαιτεί πολλές δεκαετίες για να εξελιχθεί (El-Serag, 2011). Στατιστικές αναλύσεις δείχνουν ότι ο HCC αποτελεί τον τρίτο πιο θανατηφόρο και πέμπτο πιο κοινό καρκίνο παγκοσμίως, καθιστώντας αναγκαία την εύρεση τεχνικών έγκαιρης πρόγνωσης και θεραπείας. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα συμπεραίνουμε ότι η πρωτεΐνη Smyd2 κατέχει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία HCC αναδεικνύοντας την σημασία της περαιτέρω μελέτης της για την πιθανή χρήση της ως στόχο αντικαρκινικής θεραπείας.

Ευχαριστίες

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Δρ. Ιωάννη Ταλιανίδη για την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Παράλληλα θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στα άτομα του εργαστηρίου, τη Γαλανοπούλου Ουρανία, την Κοντάκη Χαρούλα, την Κουκάκη Μαρίνα και τον Παπαματθαϊάκη Διονύση για την βοήθεια που μου παρείχαν το διάστημα αυτό.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Χαράλαμπο Σπηλιανάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε πριν από χρόνια να ξεκινήσω τα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο του και για τις πολύτιμες συμβουλές που πρόθυμα πάντα μου προσφέρει.

Βιβλιογραφία

- Abu-Farha M, Lambert JP, Al-Madhoun AS, Elisma F, Skerjanc IS, Figeys D (2011) The tale of two domains: proteomics and genomics analysis of SMYD2, a new histone methyltransferase. *Mol Cell Proteomics* 7(3):560-72.
- Abu-Farha M, Lanouette S, Elisma F, Tremblay V, Butson J, Figeys D, Couture JF (2011) Proteomic analyses of the SMYD family interactomes identify HSP90 as a novel target for SMYD2. *J Mol Cell Biol* 3(5):301-8.
- Al-Shar'i NA, Alnabulsi SM (2016) Explaining the autoinhibition of the SMYD enzyme family: A theoretical study. *J Mol Graph Model* 68:147-57.
- Appella E, Anderson CW (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268:2764–2772.
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 21(3):381-95.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125:315–26.
- Borun TW, Pearson D, Paik WK (1972) Studies of histone methylation during the HeLa S-3 cell cycle. *J Biol Chem* 247:4288–98.
- Brooks CL, Gu W (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:164–171.
- Brown MA, Sims RJ 3rd, Gottlieb PD, Tucker PW (2006) Identification and characterization of Smyd2 - a split SET-MYND domain-containing histone H3 lysine 36-specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol Cancer* 5:26.
- Byvoet P, Shepherd GR, Hardin JM, Noland BJ (1972) The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 148:558–67.
- Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP, Workman JL (2005) Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123:581-592
- Chan HM, Krstic-Demonacos M, Smith L, Demonacos C, La Thangue NB (2001) Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat. Cell Biol.* 3:667–674.
- Cho HS, Hayami S, Toyokawa G, Maejima K, Yamane Y, Suzuki T, Dohmae N, Kogure M, Kang D, Neal DE, Ponder BA, Yamaue H, Nakamura Y, Hamamoto R (2012) RB1 methylation by SMYD2 enhances cell cycle progression through an increase of RB1 phosphorylation. *Neoplasia*14(6):476-86.
- Chuiikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, Barlev NA, Reinberg D (2004) Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* 432(7015):353-60.
- Colón-Bolea P, Crespo P (2014) Lysine methylation in cancer: SMYD3-MAP3K2 teaches us new lessons in the Ras-ERK pathway. *Bioessays* 36(12):1162-9.
- Cray C, Zaias J, Altman NH (2009) Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comp Med* 59(6): 517–526.
- DeLange RJ, Fambrough DM, Smith EL, Bonner J (1968) Calf and pea histone IV. I. Amino acid compositions and the identical COOH-terminal 19-residue sequence. *J. Biol. Chem.* 243:5906–5913.
- Di Lorenzo A, Bedford MT (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett* 585(13):2024–2031.

- Diehl F, Brown MA, van Amerongen MJ, Novoyatleva T, Wietelmann A, Harriss J, Ferrazzi F, Böttger T, Harvey RP, Tucker PW, Engel FB (2010) Cardiac deletion of Smyd2 is dispensable for mouse heart development. *PLoS One* 5(3):e9748.
- Dillon SC, Zhang X, Trievel RC, Cheng X (2005) The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biology* 6(8):227.
- Du SJ, Tan X, Zhang J (2014) SMYD proteins: key regulators in skeletal and cardiac muscle development and function. *Anat Rec (Hoboken)* 297(9):1650-62.
- El-Serag HB (2011) Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365:1118–1127.
- Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y (2002) Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Current biology: CB* 12:1052–8.
- Ferguson AD, Larsen NA, Howard T, Pollard H, Green I, Grande C, Cheung T, Garcia-Arenas R, Cowen S, Wu J, Godin R, Chen H, Keen N (2011) Structural basis of substrate methylation and inhibition of SMYD2. *Structure* 19(9):1262-73.
- Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW (2011) Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nat Chem Biol* 7: 113–119.
- Fischle W, Franz H, Jacobs SA, Allis CD, Khorasanizadeh S (2008) Specificity of the chromodomain Y chromosome family of chromodomains for lysine-methylated ARK(S/T) motifs. *J Biol Chem* 283:19626–35.
- Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B (2011) Histone onco-modifications. *Oncogene*30(31):3391-403.
- Gershey EL, Haslett GW, Vidali G, Allfrey VG (1969) Chemical studies of histone methylation. Evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone fractions. *J Biol Chem* 244:4871–7.
- Gershey EL, Vidali G, Allfrey VG (1968) Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of epsilon-N-acetyllysine in the f2a1 histone. *J. Biol. Chem.* 243:5018–5022
- Goldknopf IL, Taylor CW, Baum RM, Yeoman LC, Olson MO, Prestayko AW, Busch H (1975) Isolation and characterization of protein A24, a ‘histone-like’ non-histone chromosomal protein. *J. Biol. Chem.* 250:7182–7187.
- Gottlieb PD, Pierce SA, Sims RJ, Yamagishi H, Weihe EK, Harriss JV, Maika SD, Kuziel WA, King HL, Olson EN, et al. (2002) Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. *Nat. Genet.* 31:25–32.
- Greer EL, Shi Y (2014) Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet* 13(5):343-57.
- Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ (2005) Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6(11): 1045–1056.
- Hamamoto R, Nakamura Y (2016) Dysregulation of protein methyltransferases in human cancer: An emerging target class for anticancer therapy. *Cancer Science* 107(4):377-84.
- Hargreaves DC, Crabtree GR (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 21:396–420.
- He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalapour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M

- (2013) Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 155(2):384-96.
- Hempel K, Lange HW, Birkofer L (1968) Epsilon-N-trimethyllysine, a new amino acid in histones. *Die Naturwissenschaften* 55:37.
- Hu L1, Zhu YT, Qi C, Zhu YJ (2009) Identification of Smyd4 as a potential tumor suppressor gene involved in breast cancer development. *Cancer Res* 69(9):4067-72.
- Huang H, Rambaldi I, Daniels E, Featherstone M (2003) Expression of the Wdr9 gene and protein products during mouse development. *Dev. Dyn.* 227:608–614.
- Huang J, Berger SL (2008) The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Curr Opin Genet Dev* 18:152–8.
- Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL (2006) Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* 444(7119):629-32.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) Immunobiology 5th ed - The immune system in health and disease p732. London (UK): Taylor & Francis.
- Johnson CN, Adkins NL, Georgel P (2005) Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action. *Biochem. Cell Biol.* 83:405–417.
- Kalejta RF, Shenk T (2003) Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:3263–3268
- Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ, Boone C, Emili A, Weissman JS, Hughes TR, Strahl BD, Grunstein M, Greenblatt JF, Buratowski S, Krogan NJ (2005) Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123:593-605.
- Kleinsmith LJ, Allfrey VG, Mirsky AE (1966) Phosphoprotein metabolism in isolated lymphocyte nuclei. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 55:1182–1189.
- Kohno H, Suzuki R, Sugie S, Tanaka T (2005) Beta-catenin mutations in a mouse model of inflammation-related colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci* 96:69–76.
- Komatsu S, Imoto I, Tsuda H, Kozaki KI, Muramatsu T, Shimada Y, Aiko S, Yoshizumi Y, Ichikawa D, Otsuji E, Inazawa J (2009) Overexpression of SMYD2 relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 30(7):1139-46.
- Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98: 285–294.
- Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693–705.
- Lachner M, Jenuwein T (2002) The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14:286-298.
- Ledl A, Schmidt D, Müller S (2005) Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* 24:3810–3818.
- Lee DY, Teyssier C, Strahl B D, Stallcup MR (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* 26:147–170.

- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13(14):1192-200
- Leinhart K, Brown M (2011) SET/MYND lysine methyltransferases regulate gene transcription and protein activity. *Genes (Basel)* 2(1):210–218.
- Liu Y, Chen W, Gaudet J, Cheney MD, Roudaia L, Cierpicki T, Klet RC, Hartman K, Laue TM, Speck NA, Bushweller JH (2007) Structural basis for recognition of SMRT/N-CoR by the MYND domain and its contribution to AML1/ETO's activity. *Cancer Cell* 11(6):483-97.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260.
- Maeda S, Kamata H, Luo JL, Leffert H, Karin M (2005) IKKβ couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell* 121:977–990.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274.
- Martin C, Zhang Y (2007) Mechanisms of epigenetic inheritance. *Curr Opin Cell Biol* 19:266–272.
- McGhee JD, Felsenfeld G (1980) Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem* 49:1115–1156.
- Min J, Allali-Hassani A, Nady N, Qi C, Ouyang H, Liu Y, MacKenzie F, Vedadi M, Arrowsmith CH (2007) L3MBTL1 recognition of mono- and dimethylated histones. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14:1229–1230.
- Murray K (1964) The occurrence of epsilon-N-methyl lysine in histones. *Biochemistry* 127:10–15.
- Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK (1998) The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13513–13518.
- Nakakido M, Deng Z, Suzuki T, Dohmae N, Nakamura Y, Hamamoto R (2015) Dysregulation of AKT Pathway by SMYD2-Mediated Lysine Methylation on PTEN. *Neoplasia* 17(4):367-73.
- Ng HH, Feng Q, Wang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Zhang Y, Struhl K (2002) Lysine methylation within the globular domain of histone H3 by Dot1 is important for telomeric silencing and Sir protein association. *Genes Dev.* 16:1518–1527.
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D (2002) Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev* 16:479-489.
- Ord MG, Stocken LA (1967) Phosphate and thiol groups in histone f3 from rat liver and thymus nuclei. *Biochem. J.* 102:631–636.
- Paik WK, Kim S (1967) E-N-dimethyllysine in histones. *Biochemical and biophysical research communications* 27:479–83.
- Patel DJ, Wang Z (2013) Readout of epigenetic modifications. *Annu. Rev. Biochem.* 82:81–118.
- Phan D, Rasmussen TL, Nakagawa O, McAnally J, Gottlieb PD, Tucker PW, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2005) BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. *Development* 132:2669–2678.
- Qian C, Zhou MM (2006) SET domain protein lysine methyltransferases: structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 63(23):2755-63.

- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406:593–9.
- Roberts CW, Orkin SH (2004) The SWI/SNF complex—chromatin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4:133–142.
- Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD (2007) Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:983–994.
- Saddic LA, West LE, Aslanian A, Yates JR 3rd, Rubin SM, Gozani O, Sage J (2010) Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem* 285(48):37733–40.
- Sajjad A, Novoyatleva T, Vergarajauregui S, Troidl C, Schermuly RT, Tucker HO, Engel FB (2014) Lysine methyltransferase Smyd2 suppresses p53-dependent cardiomyocyte apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1843(11):2556–62.
- Sakamoto LH, Andrade RV, Felipe MS, Motoyama AB, Pittella Silva F (2014) SMYD2 is highly expressed in pediatric acute lymphoblastic leukemia and constitutes a bad prognostic factor. *Leuk Res* 38:496–502.
- Schneider R, Bannister AJ, Weise C, Kouzarides T (2004) Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications. *J Biol Chem* 279(23):23859–62
- Schulze JM, Jackson J, Nakanishi S, Gardner JM, Hentrich T, Haug J, Johnston M, Jaspersen SL, Kobor MS, Shilatifard A (2009) Linking cell cycle to histone modifications: SBF and H2B monoubiquitination machinery and cell-cycle regulation of H3K79 dimethylation. *Mol Cell* 35:626–41.
- Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Peña P, Lan F, Kaadige MR, Lacoste N, Cayrou C, Davrazou F, Saha A, Cairns BR, Ayer DE, Kutateladze TG, Shi Y, Côté J, Chua KF, Gozani O. (2006) ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442:96–9.
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100:13225–13230.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR, Peterson CL (2006) Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311:844–847.
- Sirinupong N, Brunzelle J, Ye J, Pirezada A, Nico L, Yang Z (2010) Crystal structure of cardiac-specific histone methyltransferase SmyD1 reveals unusual active site architecture. *J Biol Chem* 285(52):40635–44.
- Stender JD, Pascual G, Liu W, Kaikkonen MU, Do K, Spann NJ, Boutros M, Perrimon N, Rosenfeld MG, Glass CK (2012) Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Mol Cell* 48(1):28–38.
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes* 12(5):599–606.
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146(6):1016–28.
- Trojer P, Li G, Sims RJ 3rd, Vaquero A, Kalakonda N, Boccuni P, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nimer SD, Wang YH, Reinberg D (2007) L3MBTL1, a histone-methylation-dependent chromatin lock. *Cell* 129:915–928.
- Ueda K, Omachi A, Kawaichi M, Hayaishi O (1975) Natural occurrence of poly(ADP-ribosyl) histones in rat liver. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 72:205–209.

- Van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE (2002) Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core. *Cell* 109:745–756.
- Verna L, Whysner J, Williams GM (1996) N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol. Ther.* 71:57–81.
- Vidali G, Gershey EL, Allfrey VG (1968) Chemical studies of histone acetylation. The distribution of epsilon-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J. Biol. Chem.* 243:6361–6366.
- Wolffe AP (1999) Architectural regulations and Hmg1. *Nat Genet* 22:215-217.
- Wong J, Patterton D, Imhof A, Guschin D, Shi YB, Wolffe AP (1998) Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO J* 17:520-534.
- Woodcock CL, Ghosh RP (2010) Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a000596.
- Wysocka J, Swigut T, Milne TA, Dou Y, Zhang X, Burlingame AL, Roeder RG, Brivanlou AH, Allis CD (2005) WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121:859–872.
- Xu G, Liu G, Xiong S, Liu H, Chen X, Zheng B (2015) The histone methyltransferase Smyd2 is a negative regulator of macrophage activation by suppressing interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α) production. *J Biol Chem* 290(9):5414-23.
- Xu S, Wu J, Sun B, Zhong C, Ding J (2011) Structural and biochemical studies of human lysine methyltransferase Smyd3 reveal the important functional roles of its post-SET and TPR domains and the regulation of its activity by DNA binding. *Nucleic Acids Res* 39(10):4438-49.
- Yang J, Roe SM, Cliff, MJ, Williams M A, Ladbury JE, Cohen PT, Barford D (2005) Molecular basis for TPR domain-mediated regulation of protein phosphatase 5. *EMBO J* 24:1–10.
- Zeng L, Zhou MM (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513:124–128.
- Zentner GE, Henikoff S (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20:259–266.
- Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* 15: 2343–2360.