**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ**

# ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

# Μελέτη του σηματοδοτικού μονοπατιού του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (TGF-β) *in vivo*, με χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών.

Κων/να Σκούρτη-Σταθάκη

Επιβλέπων καθηγητής: Αν. Καθ. Δ. Καρδάσης

Σεπτέμβριος 2008

Ο επιβλέπων,

Δημήτρης Καρδάσης
Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

# ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Δημήτρη Καρδάση για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποίησω την εργασία αυτή κάτω από την καθοδήγηση και την επίβλεψή του. Καθόλη τη διάρκεια της διατριβής μου, με βοήθησε με τις γνώσεις του, την εμπειρία του και τις συμβουλές του –πειραματικές και επαγγελματικές, εφόδια που με κάνουν να αισθάνομαι πολύ τυχερή που συνεργαστήκαμε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους και τις πολύτιμες συμβουλές τους...Βέτα, Γιάννα, Ελευθερία, Έφη, Κάλλια, Σόφη, Παναγιώτη, σας ευχαριστώ για τη βοήθεια και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί. Ιωάννα μου, καλή αρχή!

Ευχαριστώ πολύ στους φίλους μου εδώ στο Ηράκλειο για τη συμπαράστασή και το αστείρευτο κέφι τους που με ενδυναμώνει. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Alex για τη συμπαράσταση, τη βοήθειά του και την αγάπη του.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου, τους γονείς μου και την αδελφούλα μου για την απεριόριστη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να κυνηγήσω τα όνειρά μου.

**Στους γονείς μου, Δημήτρη και Σοφία**

# Περιεχόμενα

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ** 1

**ABSTRACT** 3

**ΕΙΣΑΓΩΓΗ** 5

Πώς τα κύτταρα διαβάζουν τα σήματά τους; 5

Το σήμα του TGF-β 5

«Μη ρωτάς τι μπορεί να κάνει ένα σήμα με ένα κύτταρο, αλλά τι μπορεί να κάνει ένα κύτταρο με ένα σήμα» 7

Η ενεργοποίηση των Smad 10

Σχηματίζοντας το σύμπλοκο των Smad 11

Οι συνεργαζόμενοι παράγοντες που προσδένονται στο DNA καθορίζουν την επιλογή των γονιδίων στόχων 14

Μεταγραφική ενεργοποίηση-συνενεργοποιητές των Smad 16

Μεταγραφική καταστολή-συγκαταστολείς των Smad 17

Η δομή, η ρύθμιση και η λειτουργία της Smad3: ο ρόλος-κλειδί του linker 19

Οι μεταλλαγές σε συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής του linker 21

Η δράση του TGF-β στον καρκίνο: Απώλεια της επαγόμενης από TGF-β καταστολής 23

Η δράση του TGF-β στον καρκίνο: Προ-διεισδυτικές και μεταστατικές λειτουργίες του TGF-β 24

BCAR3: Ένα καινούριο γονίδιο-στόχος της σηματοδότησης μέσω TGF-β 27

Ταυτοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου BCAR3 27

Η αλληλεπίδραση των πρωτεινών BCAR3-BCAR1: ο ρόλος τους στην κυτταρική μετανάστευση 28

Η πρωτείνη BCAR3 και οι μικρές GTPases: η εμπλοκή της BCAR1 31

Η πρωτείνη BCAR3 και το μονοπάτι του TGF-β 33

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ 34**

**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 35**

**ΥΛΙΚΑ 35**

**ΜΕΘΟΔΟΙ 36**

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel) 36

Πέψεις DNA με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών 37

Απομόνωση τμημάτων DNA. 37

Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction) 38

Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB για την ανάπτυξη στελεχών του βακτηρίου E.coli 38

Βακτηριακός μετασχηματισμός (transformation) 38

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening) 39

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation) 39

Κυτταροκαλλιέργειες 40

Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections) 40

Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal 41

Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay) 42

Πηκτή πολυακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών 42

Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot) 43

Μέθοδος απομόνωσης mRNA 44

RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) και δημιουργία cDNA 45

Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση του Trizol 46

Παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοικών πλασμιδίων σε κύτταρα *E.coli* 46

Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών 47

Μέτρηση σχηματισμού ιικών πλακών (plaque assay) 48

Μέθοδος μέτρησης σχηματισμού φθορίζοντων ιικών στιγμάτων
(fluorescence forming assay) 50
Πλασμιδιακές κατασκευές 51

**ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 55**

**Ερευνητικός στόχος 1 55**

Μέρος 1ο: Παραγωγή, τιτλοδότηση και έλεγχος έκφρασης των ανασυνδυασμένων ιών AdSmad3(P229A)-6myc, AdSmad3(Q222A)-6myc, AdSmad3-6myc, AdbioSmad3, AdGFP, AdALK5, AdlacZ 55

Μέρος 2ο: Μελέτη της μεταγραφής γονιδίων στόχων του μονοπατιού του TGF-β, PAI-1 και p21, υπό την επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτείνης, AdSmad3(P229A)-6myc, AdSmad3(Q222A)-6myc 62

**Ερευνητικός στόχος 2 68**

Παραγωγή και τιτλοδότηση των ανασυνδυασμένων ιών AdbioSmad3 και AdBirA 69
Πείραμα βιοτινυλίωσης της πρωτείνης AdbioSmad3 σε κύτταρα HaCaT κάνοντας χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών 69

**Ερευνητικός στόχος 3 71**

Μέρος 1ο: Μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 σε συνθήκη προσθήκης TGF-β, και σύγκριση με τη συμπεριφορά του PAI-1 71

Μέρος 2ο: Μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 μετά από προσθήκη του ανασυνδυασμένου αδενοϊού AdALK5, και σύγκριση με τη συμπεριφορά του γονιδίου PAI-1 75

Μέρος 3ο: Μελέτη της επίδρασης του υποδοχέα ALK5 και των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου BCAR3 77

**ΣΥΖΗΤΗΣΗ** **81**

Ο ιός AdSmad3(P229A)-6myc καταστέλλει την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του μονοπατιού του TGF-β, σε συνθήκη προσθήκης TGF-β για 1h και συνθήκη προσθήκης του ιού AdALK5ca. 81

Η βιοτινυλίωση πρωτεινών σε κύτταρα HaCaT κάνοντας χρήση των AdbioSmad3 και AdBirA ανοίγει το δρόμο για πειράματα βιοτινυλίωσης σε ζώα 84

Μελέτη της ρύθμισης και λειτουργίας του ανθρώπινου γονιδίου BCAR3, ενός καινούριου γονιδίου-στόχου του μονοπατιού του TGF-β, καθώς και του ρόλου του στην ανάπτυξη και τον καρκίνο 85

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** **89**

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο TGF-β (transforming growth factor-β) αποτελεί έναν σημαντικό αναστολέα της ανάπτυξης των επιθηλιακών κυττάρων και ανήκει στη μεγάλη υπερ-οικογένεια των πλειοτροπικών κυτοκινών που ρυθμίζουν ποικίλες βιολογικές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της ομοιόστασης των ενήλικων ιστών. Ο TGF-β σηματοδοτεί μέσω μεμβρανικών υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης Ser/Thr, οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα μέσω ενδοκυττάριων μορίων Smad2, Smad3 και Smad4. Οι πρωτεΐνες Smad περιέχουν συντηρημένες MH1 και MH2 επικράτειες (domains), που χωρίζονται μεταξύ τους από μια ευέλικτη linker επικράτεια. Τα σύμπλοκα των Smads ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και καθορίζουν τη βιολογική απόκριση στον TGF-β.

Τελευταία δεδομένα δείχνουν ότι η επικράτεια linker της Smad3 περιέχει μια περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η περιοχή αυτή είναι ικανή να στρατολογήσει τον μεταγραφικό συνενεργοποιητή p300 και είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω Smad3. Η κατασκευή και ταυτοποίηση μεταλλαγών, από το εργαστήριο μας σε προηγούμενη μελέτη, στην περιοχή του linker της Smad3, στα συντηρημένα κατάλοιπα P229 και Q222 οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλαγές αυτές έχουν κατασταλτικό ρόλο στο μόριο της Smad3. Ένας από τους στόχους μας ήταν η μελέτη των μεταλλαγών αυτών *in vivo* και επομένως η μεταφορά των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 σε ευκαρυωτικά κύτταρα με τη χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών.

Για τον καθορισμό του ρόλου των μεταλλαγών στη Smad3 in vivo, έγινε μελέτη της μεταγραφής δύο γονιδίων-στόχων του μονοπατιού του TGF-β, των PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) και p21 (CDKN1A), παρουσία αδενοϊών που φέρουν τις μεταλλαγμένες μορφές Smad3(P229A) και Smad3(Q222A). Δείξαμε ότι ο ιός AdSmad3(P229A)-6myc καταστέλλει την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του μονοπατιού του TGF-β, σε συνθήκη προσθήκης TGF-β για 1h και σε συνθήκη προσθήκης του ιού AdALK5ca.

Δεύτερος στόχος της εργασίας ήταν η ανάπτυξη ενός συστήματος βιοτινυλίωσης πρωτεινών *in vivo* κάνοντας χρήση ανασυνδυασμέων αδενοϊών με σκοπό τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων σε ζωντανούς οργανισμούς. Για το σκοπό αυτό κατασκευάσαμε ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν την πρωτείνη Smad3bio

(που φέρει την αγρίου τύπου Smad3 σε σύντηξη με τον επίτοπο Bio) και τη λιγάση βιοτίνης BirA και δείξαμε ότι με το σύστημα αυτό μπορεί να επιτευχθεί βιοτινυλίωση της Smad3 σε κύτταρα HaCaT.

Ο τρίτος ερευνητικός σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της ρύθμισης και της λειτουργίας ενός καινούριου άμεσου στόχου του μονοπατιού του TGF-β, του γονιδίου BCAR3 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 3). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μελέτης της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 και μελέτη μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου BCAR3, παρουσία συστατικών του μονοπατιού του TGF-β. Δείξαμε ότι η μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 αυξάνεται σημαντικά μετά από προσθήκη του TGF-β σε κύτταρα HaCaT. Η ενεργοποίηση αυτή φαίνεται να είναι υψηλότερη όταν ο TGF-β προστίθεται για 3h. Η αύξηση αυτή ήταν πολύ χαμηλότερη όταν το πείραμα διεξήχθησε σε κύτταρα HepG2. Επίσης, η μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 αυξάνεται σηματικά μετά από προσθήκη του αναδυνδυασμένου αδενοϊού AdALK5 σε κύτταρα HaCaT. Τέλος, βρέθηκε ότι ο υποκινητής του γονιδίου BCAR3 ενεργοποιείται σημαντικά παρουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα caALK5 και των μεταγραφικών παραγόντων Smad3 και Smad4 σε κύτταρα HEK293T και HepG2.

Ο TGF-β παίζει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και στον ενήλικο οργανισμό ρυθμίζοντας την ομοιόσταση σε διάφορους ιστούς. Στην ανάπτυξη του καρκίνου, ο TGF-β παίζει διπλό ρόλο: είναι καταστολέας της ογκογένεσης σε φυσιολογική κατάσταση και επαγωγέας της ογκογένεσης σε προχωρημένη καρκινική κατάσταση. Τα δεδομένα μας για καταστολή του μορίου της Smad3 *in vivo* από τη μεταλλαγή P229A στην περιοχή του linker αποτελούν χρήσιμη γνώση για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών εργαλείων για τη θεραπεία του καρκίνου σε περιπτώσεις υπερλειτουργίας του μονοπατιού του TGF-β. Επιπρόσθετα, η επιβεβαίωση ότι το γονίδιο BCAR3 ρυθμίζεται και ενεργοποιείται από το μονοπάτι του TGF-β αποτελεί σημαντική γνώση για τη μελέτη της λειτουργίας του γονιδίου καθώς και για περαιτέρω σχεδιασμό νέων στρατηγικών στη θεραπεία του καρκίνου.

# ABSTRACT

Transforming growth factor-β (TGF-β) is an important growth-inhibitor of epithelial cells and belongs to the large family of pleiotropic cytokines that regulate diverse biological functions during development and adult tissue homeostasis. TGF-β signals via membrane bound Ser/Thr kinase receptors which transmit their signals via the intracellular signalling molecules Smad2, Smad3 and Smad4. These Smad proteins contain conserved MH1 and MH2 domains separated by a flexible linker domain. Smad complexes regulate gene expression and determine the biological response to TGF-β.

Recent work has demonstrated that the linker domain of Smad3 contains a Smad transcriptional activation domain. This domain is capable of recruiting the p300 transcriptional co-activator and is required for Smad3-dependent transcriptional activation. The identification of mutations, generated in our lab in previous studies, in the conserved residues P229 and Q222 of the linker domain has led to the conclusion that these mutations play suppressive roles on the Smad3 molecule. The first aim of this Thesis was the study of these mutations *in vivo* and the introduction of the mutated forms to eukaryotic cells using recombinant adenoviruses.

To determine the role of these mutations on Smad3 protein, we examined their effect on the transcriptional activation of two known gene-targets of the TGF-β signalling pathway, PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) and p21 (CDKN1A), in the presence of adenoviruses that express the mutated forms, Smad3(P229A) and Smad3(Q222A). We showed that the AdSmad3(P229A)-6myc adenovirus suppresses the transcriptional activation of gene-targets when the cells were treated with TGF-β for 1h and when they were infected with the AdALK5ca adenovirus.

The second aim of this Thesis was the development of a protein biotinylation system *in vivo* using recombinant adenoviruses in order to study protein-protein interactions in living organisms. To address this purpose, we generated recombinant adenoviruses that express the Smad3bio protein (that expresses the wt Smad3 protein in frame with the Bio epitope) and the biotine ligase BirA and we showed that using this system the Smad3 protein can be biotinylated in HaCaT cells.

The third aim of this Thesis was the study of the regulation and function of a novel direct target of the TGF-β signalling pathway, called BCAR3 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 3) gene. We studied the transcription of this novel gene and the transcriptional activation of the promoter of BCAR3, in the presence of components of the TGF-β signalling pathway. We demonstrated that transcription of BCAR3 gene is significantly increased when HaCaT cells were treated with TGF-β. This activation seems higher when HaCaT cells were treated with TGF-β for 3h. The above increase was much lower when we performed the same experiment in HepG2 cells. In addition to this, the transcription of BCAR3 gene increases when HaCaT cells are infected with the AdALK5ca adenovirus. Finally, we showed that BCAR3 promoter is activated in the presence of caALK5 receptor and Smad3 and Smad4 transcription factors in HEK293T and HepG2 cells.

TGF-β plays important roles both during development and in the adult organism by regulating homeostasis in several tissues. In cancer development, TGF-β plays a dual role: it is tumour suppressor during the healthy state and tumour promoter during the advanced cancer state. Our finding that the P229A mutation in the linker region of Smad3 is an inactivating mutation can lead to the development of new therapeutics for the treatment of cancer that is caused by deregulation of the TGF-β signalling pathway. The additional confirmation that the BCAR3 gene is regulated and activated by the TGF-β signalling pathway is important knowledge for the study of the function of BCAR3 gene and the design of new strategies for the treatment of cancer.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Πώς τα κύτταρα διαβάζουν τα σήματά τους;

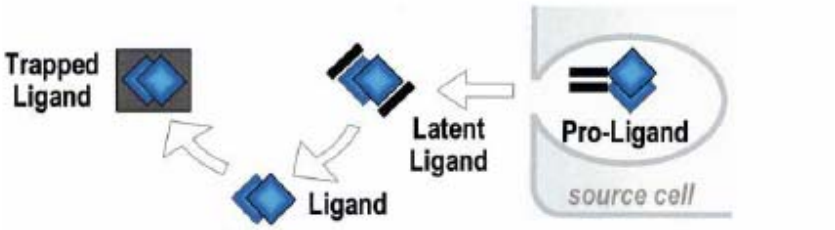
Δύο σημαντικές αντιλήψεις αρχίζουν να ρίχνουν φως στο ερώτημα του πως τα κύτταρα διαβάζουν τα σήματα από τις κυτοκίνες. Πρώτον, είναι όλο και πιο ξεκάθαρο ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυτοκινών δεν είναι απομονωμένοι μηχανισμοί, αλλά κομμάτια ενός πυκνού δικτύου. Μέσω διάφορων κοινών συνδέσεων και επανατροφοδοτικών μηχανισμών, το δίκτυο επιτηρεί και ρυθμίζει τη δραστηριότητα κάθε μονοπατιού και επομένως, καθορίζει τη φύση και το συγχρονισμό των μεταφερόμενων σημάτων. Δεύτερον, το μονοπάτι παρέχει στο κύτταρο πληροφορία για την άφιξη ενός συγκεκριμένου σήματος αλλά δεν παρέχει ακριβείς οδηγίες. Το κύτταρο, πιο πολύ από ότι το μονοπάτι, καθορίζει το αποτελέσμα του σήματος (Massague, 2000).

## Το σήμα του TGF-β

Τα μέλη της οικογένειας του TGF-β είναι εκκρινόμενα πολυπεπτίδια που ενεργοποιούν κυτταρικές αποκρίσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης. Περισσότερα από 60 μέλη της οικογένειας του TGF-β έχουν ταυτοποιηθεί σε πολυκύτταρους οργανισμούς, εκ των οποίων τουλάχιστον 29 και πιθανόν πάνω από 42 πρωτείνες κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Μεταξύ αυτών των 60 μελών, υπάρχουν τρεις TGF-βs, πέντε ακτιβίνες και τουλάχιστον οχτώ BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια (Feng and Derynck, 2005).

Οι παράγοντες που σχετίζονται με τον TGF-β φτιάχνονται σαν μεγάλα πρόδρομα μόρια στα οποία ένα καρβοξυτελικό ώριμο πολυπεπτίδιο κόβεται πρωτεολυτικά (Annes et al., 2003) (Εικόνα 1). Το ώριμο μόριο του TGF-β είναι ένα διμερές από δύο πολυπεπτίδια 12.5kDa ενωμένα με ένα δισουλφιδικό δεσμό. Δύο αντίγραφα του προ-πεπτιδίου παραμένουν ενωμένα με τον TGF-β και τον διατηρούν σε ένα ανενεργό σύμπλοκο γνωστό ως LTBP (Latent TGF-β Binding Proteins). Το LTBP παίζει ρόλο στη στόχευση του συμπλόκου στην εξωκυττάρια ύλη, όπου ο TGF-β ενεργοποιείται και

απελευθερώνεται από το προ-σύμπλοκο μέσω πρωτεολυτικής πέψης (Annes et al., 2003). Άλλα μέλη της οικογένειας του TGF-β επίσης εκφράζονται ως ομοδιμερή ή ετεροδιμερή που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό, εκκρίνονται ως σύμπλοκα και υποβάλλονται σε πρωτεολυτική ενεργοποίηση. Οι δραστηριότητες των μελών της οικογένειας του TGF-β συχνά ρυθμίζονται από εκκρινόμενες πρωτείνες και πρωτείνες σχετιζόμενες με την εξωκυττάρια ύλη που ενώνονται με προσδέτες σε διάλυμα και έτσι, απομονώνουν τους προσδέτες από πρόσβαση με τους υποδοχείς τους ή βοηθούν να εξασφαλιστεί άμεση διαθεσιμότητα (Annes et al., 2003). Επιπρόσθετα, διάφορες πρωτείνες από την κυτταρική επιφάνεια λειτουργούν σαν συνυποδοχείς και βοηθούν στην παρουσίαση του προσδέτη στον υποδοχέα.

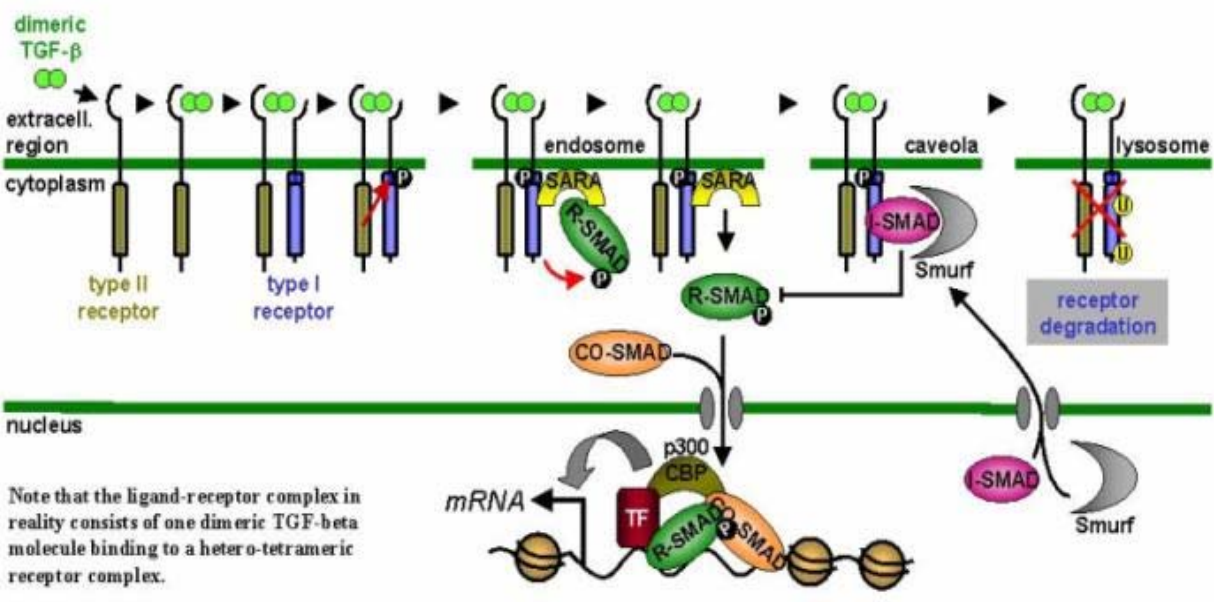



**Εικόνα 1: Ο προσδέτης TGF-β .** Τα μέλη της οικογένειας του TGF-β είναι διμερείς προσδέτες που παραμένουν στη λανθάνουσα (latent) μορφή όντας προσδεδεμένοι με το προ-πεπτίδιο ή στην παγιδευμένη (trapped) μορφή όντας προσδεδεμένοι σε παράγοντες που κρατούν παγιδευμένο τον προσδέτη. Όταν απελευθερωθεί από αυτές τις ανενεργές καταστάσεις, ο προσδέτης ενώνεται στους μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I και τύπου II και ξεκινά το μονοπάτι της σηματοδότησης (Massague et al., 2005).

**«Μη ρωτάς τι μπορεί να κάνει ένα σήμα με ένα κύτταρο, αλλά τι μπορεί να κάνει ένα κύτταρο με ένα σήμα»**

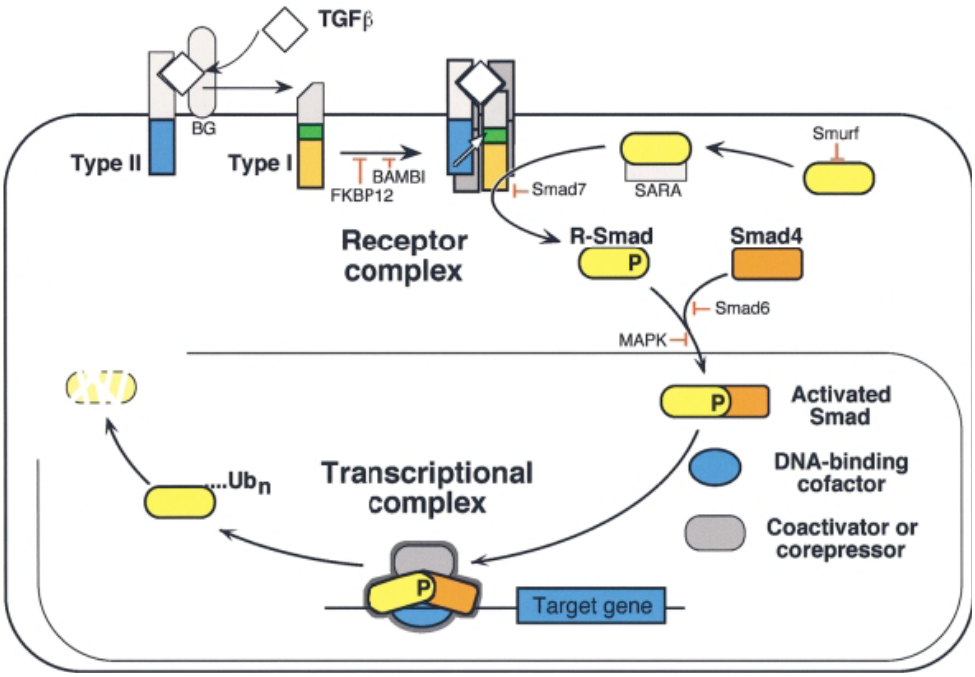
Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας TGF-β είναι μια απαραίτητη κυτοκίνη-αναστολέας της κυτταρικής ανάπτυξης. Ο TGF-β εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες και φυσικά η αναστολή της ανάπτυξης είναι μονάχα μία από αυτές. Ο TGF-β και άλλα μέλη της οικογένειας ελέγχουν πολλές θεμελιώδεις πλευρές της κυτταρικής συμπεριφοράς, όπως μετανάστευση, προσκόλληση, διαφοροποίηση και αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος. Η σηματοδότηση μέσω TGF-β (Εικόνα 2) είναι ένας σημαντικός κινητήριος μοχλός της κυτταρικής ανάπτυξης και μορφογένεσης, με καθαρούς ρόλους σε διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης. Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο TGF-β δεν παίζει το ρόλο του αναστολέα της ανάπτυξης νωρίς κατά την εμβρυογένεση. Αργότερα, καθώς ο ιστός ωριμάζει, πολλοί κυτταρικοί τύποι αποκτούν την ικανότητα να αποκρίνονται στον TGF-β με αναστολή της ανάπτυξης ή κυτταρικό θάνατο. Επομένως, η φύση και οι αλλαγές του κυττάρου καθορίζουν την καθοριστική απόκριση στην κυτοκίνη αυτή, και όχι από μόνος του ο TGF-β (Siegel and Massague, 2003).

Σε αντίθεση με τις κλασικές ορμόνες, των οποίων οι δράσεις είναι λίγες και καθορισμένες, τα μέλη της οικογένειας του TGF-β έχουν πολλά και διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο και την κατάσταση του κυττάρου. Για παράδειγμα, στην ίδια επουλώσιμη πληγή, ο TGF-β μπορεί να προωθεί ή να αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ανάλογα με το εάν ο στόχος είναι ένας ινοβλάστης ή ένα κερατινοκύτταρο (Ashcroft et al., 1999). Σε μαστικά επιθηλιακά κύτταρα, ο TGF-β προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης ή μεταστατική συμπεριφορά ανάλογα με το επίπεδο της ογκογόνου δραστηριότητας της Ras πρωτείνης στο κύτταρο (Oft et al., 1996). Επίσης, η ανθρώπινη BMP4 και το ορθόλογο στη *Drosophila*, DPP, μπορούν να σηματοδοτήσουν ραχιαιοποίηση στη μύγα (Padgett et al., 1993), αλλά σχηματισμό οστών στα σπονδυλωτά (Sampath et al., 1993). Τα μέλη της οικογένειας του TGF-β είναι πολυ-λειτουργικές ορμόνες, των οποίων η φύση των αποτελεσμάτων τους εξαρτάται από αυτό που λέμε «το κυτταρικό περιεχόμενο».




**Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση του μονοπατιού του TGF-β.** Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας TGF-β ενώνεται στον υποδοχέα τύπου ΙΙ και στρατολογεί τον υποδοχέα τύπου Ι στο σύμπλοκό του. Ο υποδοχέας τύπου ΙΙ φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου Ι στην περιοχή GS (GS domain). Ο ενεργοποιημένος τύπου Ι υποδοχέας φωσφορυλιώνει τις Smads που είναι σε σύμπλοκο με τον υποδοχέα (Smad2/3), επιτρέποντας έτσι, την απελεθεύρωσή τους από τις κυτταροπλασματικές πρωτείνες-«άγκυρες» όπως η πρωτείνη SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). Οι φωσφορυλιωμένες μορφές Smad2/3 που συναντώνται ως διμερή ή τριμερή με τη Smad4, μεταφέρονται στον πυρήνα και αλληλεπιδρούν με άλλους προσδεδεμένους στο DNA παράγοντες καθώς και με συνενεργοποιητές ή συγκαταστολείς, με σκοπό τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδιών-στόχων του TGF-β (Massague 1998). Να σημειωθεί ότι τα σύμπλοκα του υποδοχέα του TGF-β που υπάρχουν σε μεμβρανικές περιοχές οι οποίες σχηματίζουν καλυμένα κυστίδια (coated pits) πιθανόν ενδοκυτώνονται μέσω της δράσης των πρωτεινών κινητήρων-δυνεΐνες- κατά μήκος των μικροσωληνίσκων, και τοποθετούνται στα ενδοσώματα. Οι υποδοχείς που βρίσκονται στα ενδοσώματα μπορούν να πάνε πίσω στην πλασματική μεμβράνη (ανακύκλωση) ή να μεταφερθούν στα λυσοσώματα όπου το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη αποικοδομείται (κόκκινο Χ). Τα σύμπλοκα υποδοχέα-προσδέτη που βρίσκονται σε μεβρανικές περιοχές, τα λεγόμενα lipid rafts, σχετίζονται με τις Smad7 και Smurf λιγάσες ουβικουϊτίνης και εσωτερικεύονται στα καβεόλια (caveolae). Αυτά τα σύμπλοκα προχωρούν στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση και παραμένει άγνωστο εάν εμπλέκονται στη σηματοδότηση. Η πιθανότητα για ενδοεπικοινωνία μεταξύ της δεξαμενής ενδοσωμικού υποδοχέα και της δεξαμενής υποδοχέα από τα καβεόλια (caveolae) δεν έχει αποδειχθεί (Moustakas and Heldin, 2008).

Είναι προφανές ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGF-β μπορεί να χρειάζεται να είναι πολυάριθμα και πολύπλοκα ώστε να δικαιολογούν αυτήν την ποικιλία των κυτταρικών αποκρίσεων. Όμως, ένα ανέλπιστα απλό σύστημα φαίνεται να ελέγχει τις πολλές και διαφορετικές αποκρίσεις του TGF-β. Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει μια οικογένεια από πρωτεΐνες-κινάσες που παίζουν το ρόλο των μεμβρανικών υποδοχέων και μια οικογένεια από υποστρώματα υποδοχέων, τις πρωτείνες Smad, οι οποίες μεταφέρονται στον πυρήνα και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Ο προσδέτης TGF-β συγκεντρώνει ένα σύμπλοκο υποδοχέα που ενεργοποιεί τις πρωτείνες Smad και στη συνέχεια, οι Smad σχηματίζουν μεταξύ τους σύμπλοκα πολλών υπομονάδων που ρυθμίζουν τη μεταγραφή (Massague 1998). Έτσι, δύο βασικά βήματα είναι αρκετά για να μεταφέρουν το ορμονικό σήμα στα γονίδια-στόχους του μονοπατιού (Εικόνα 3).




**Εικόνα 3: Τα δύο βασικά βήματα μεταφοράς του σήματος του TGF-β στα γονίδια-στόχους του μονοπατιού.** Το σύστημα περιλαμβάνει μια οικογένεια από μεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι είναι κινάσες, και μια οικογένεια από υποστρώματα υποδοχέων (τις πρωτείνες Smad), οι οποίες πηγαίνουν στον πυρήνα όπου δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες. Ο προσδέτης TGF-β συγκεντρώνει ένα σύμπλοκο υποδοχέων που ενεργοποιεί τις πρωτείνες Smad και οι πρωτείνες Smad σχηματίζουν ένα πολυπρωτεϊνικό-σύμπλοκο που ρυθμίζει τη μεταγραφή (Massague and Wotton, 2000).

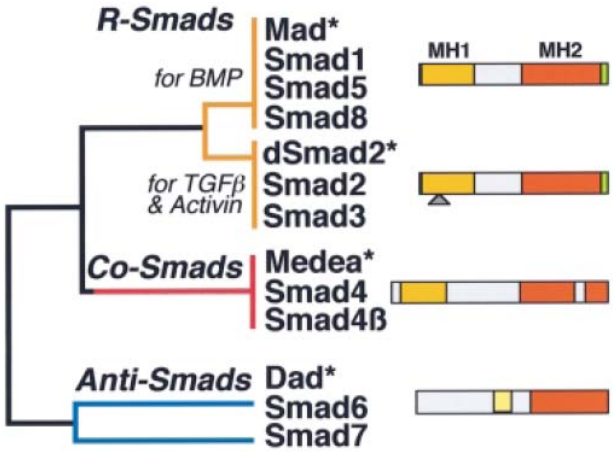
Το ερώτημα που γεννάται αναπόφευκτα είναι πως μπορεί ένα τόσο απλό σύστημα να ρυθμίζει μια πληθώρα από αποκρίσεις ειδικές για κάθε κύτταρο; Το σύμπλοκο των Smad που έρχεται στον πυρήνα συναντάται από μια ομάδα πρωτεινών-συνεργατών που είναι ειδική για τον κάθε κυτταρικό τύπο για κάθε συγκεκριμένη συνθήκη. Οι συνεργάτες αυτοί καθορίζουν τις αλληλουχίες DNA που θα ενωθεί το σύμπλοκο των Smad, τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές και συγκαταστολείς που θα στρατολογηθούν, τους υπόλοιπους μεταγραφικούς παράγοντες που θα συνεργαστούν και πόση ώρα θα διαρκέσει όλη αυτή η διαδικασία. Επομένως, το μείγμα των συνεργατών των Smad και των ρυθμιστών που είναι παρόν σε ένα δεδομένο κύτταρο καθόλη τη διάρκεια της σηματοδότησης από τον TGF-β είναι αυτό που αποφασίζει το αποτέλεσμα της απόκρισης και έτσι, είναι αυτό που καθορίζει, σε μοριακό επίπεδο, το κυτταρικό περιεχόμενο.

**Η ενεργοποίηση των Smad**

Οι πρωτείνες Smad είναι μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων των σπονδυλωτών, των εντόμων και των νηματωδών (Εικόνα 4) (Heldin et al., 1997). Σήμερα, οι πρωτείνες Smad είναι τα μόνα υποστρώματα των υποδοχέων του TGF-β με αποδεδειγμένη ικανότητα να αναπαράγουν σήματα. Ο μηχανισμός της ενεργοποίησης των υποδοχέων του TGF-β, εν συντομία, είναι ο ακόλουθος: Δύο διαφορετικές διαμεμβρανικές κινάσες Ser/Thr, γνωστές ως υποδοχείς τύπου I και τύπου II, ενώνονται από τον προσδέτη, οποίος λειτουργεί ως παράγοντας ένωσης των υποδοχέων (Εικόνα 2). Πριν συμβεί αυτό, ο υποδοχέας τύπου I είναι καταλυτικά ανενεργός επειδή η περιοχή GS (GS domain) έχει εντεθεί στην περιοχή κινάσης (kinase domain), βγάζοντας από τη θέση του το καταλυτικό κέντρο (Huse et al., 1999). Στο ενεργοποιημένο (από τον προσδέτη) σύμπλοκο, ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει την περιοχή GS και ενεργοποιεί με τον τρόπο αυτό, τον υποδοχέα τύπου I.

Οι υποδοχείς τύπου I αναγνωρίζουν ειδικά μια υποομάδα των πρωτεινών Smad, τις λεγόμενες Receptor-activated Smads (R-Smads) (Massague, 1998). Η υποομάδα αυτή περιλαμβάνει τις πρωτείνες Smad2 και Smad3, που αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς του TGF-β και της ακτιβίνης και τις πρωτείνες Smad1, Smad5 και Smad8 που

αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς BMP (Εικόνα 4). Οι R-Smads αποτελούνται από δύο συντηρημένες περιοχές που σχηματίζουν σφαιρικές δομές που χωρίζονται από την περιοχή του linker (Εικόνα 4 και Εικόνα 6) (Shi et al., 1997, 1998). Η αμινοτελική περιοχή MH1 έχει ενεργότητα πρόσδεσης στο DNA, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή MH2 οδηγεί το μόριο στον πυρήνα και έχει ενεργότητα ρύθμισης της μεταγραφής. Η φωσφορυλίωση μέσω υποδοχέα της αλληλουχίας SSxS που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο φαίνεται να απελευθερώνει αυτές τις δύο περιοχές από μια αμοιβαία ανασταλτική αλληλεπίδραση και να οδηγεί στην ενεργοποίηση των R-Smads και την είσοδό τους στον πυρήνα (Εικόνα 3).




**Εικόνα 4: Η οικογένεια των πρωτεινών Smad.** Δενδρόγραμμα που δείχνει την ομοιότητα της ακολουθίας μεταξύ των τριών υποοικογενειών των Smad. Οι Receptor-activated Smads (R-Smads) και οι Cooperative Smads (Co-Smads) περιέχουν συντηρημένες N-τελικές (MH1) και C-τελικές (MH2) περιοχές που χωρίζονται από έναν ευέλικτο linker. Μόνο η MH2 περιοχή είναι συντηρημένη στις κατασταλτικές Smads (anti-Smads ή I-Smads). Η πράσινη λωρίδα αντιπροσωπεύει τα σημεία φωσφορυλίωσης από τον υποδοχέα στο καρβοξυτελικό άκρο των R-Smads. Το τρίγωνο αντιπροσωπεύει το εναλλακτικά ματισμένο (alternative spliced) ένθεμα στη Smad2. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν αντιπροσωπευτικά μέλη της οικογένειας στη *Drosophila*.

## Σχηματίζοντας το σύμπλοκο των Smad

Στο δρόμο για τον πυρήνα, οι R-Smads αλληλεπιδρούν με μέλη της δεύτερης υποομάδας, που ονομάζονται Co-Smads (Εικόνα 4). Τα δύο μέλη των Co-Smads στα

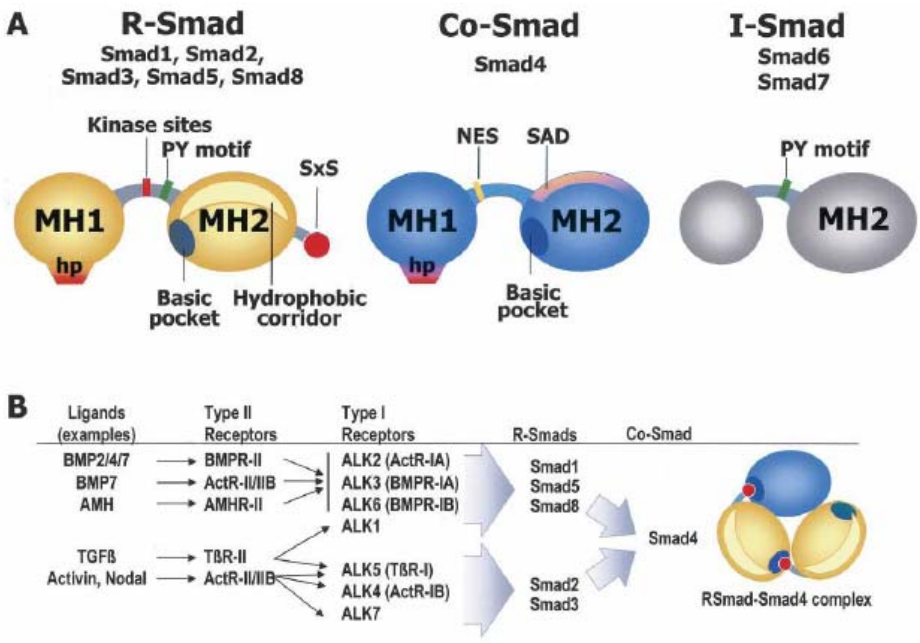
σπονδυλωτά που σχετίζονται πολύ μεταξύ τους είναι η Smad4 και η Smad4β (η Smad4β είναι γνωστή και ως Smad10 και έχει ταυτοποιηθεί μόνο στο *Xenopus*) (Εικόνα 4) (Howell et al., 1999; Masuyama et al., 1999). Οι Co-Smads έχουν τη δομή MH1- linker-MH2, αλλά δεν έχουν το μοτίβο SSXS, καθώς δεν φωσφορυλιώνονται από τον υποδοχέα (Εικόνα 6). Οι αλληλεπιδράσεις τους με τις R-Smads ρυθμίζονται βασικά από τις επαφές των MH2 περιοχών (Εικόνα 5) (Hata et al., 1997; Wu et al., 1997). Οι Co-Smads μοιράζονται από όλες τις R-Smads (Lagna et al., 1996; Masuyama et al., 1999) και είναι απαραίτητες όχι για την είσοδο στον πυρήνα αλλά για το σχηματισμό λειτουργικών μεταγραφικών συμπλόκων (Liu et al., 1997). Οι Co-Smads, καθώς και οι R-Smads μπορούν να πάρουν μέρος στην προσδέση με το DNA και τη στρατολόγηση μεταγραφικών συμπαραγόντων.

Η Smad4 σχηματίζει ομοτριμερή σε διάλυμα. Μια τριμερής στερεοδιαμόρφωση έχει προταθεί να είναι η βέλτιστη για την πρόσδεση των Smad στο DNA (Johnson et al., 1999). Είναι σημαντικό όμως να τονιστεί ότι οι πρωτείνες Smad υπάρχουν και ως μονομερή (Kawabata et al., 1998).

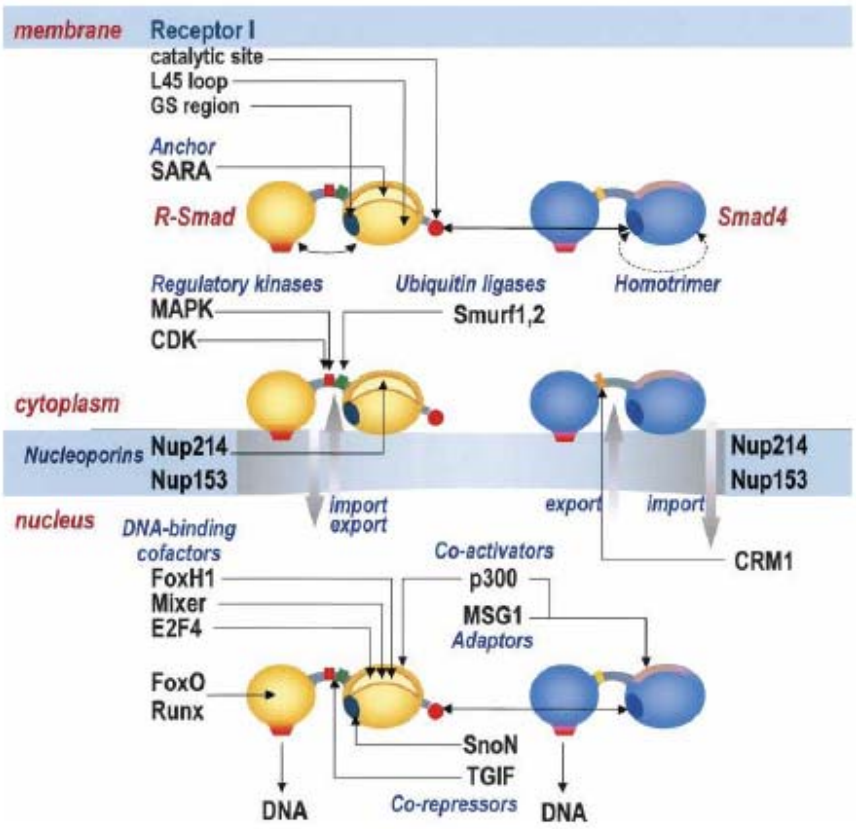
Οι Smad3 και Smad4 μπορούν να προσδένονται άμεσα στο SBE (Smad Binding DNA Element), το οποίο περιέχει μόνο τέσσερα ζεύγη βάσεων (5'-GTCT-3' ή η ανάστροφη ακολουθία 5'-AGAC-3'), μέσω των N-τελικών MH1 περιοχών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές είναι αδύναμες και ανεπαρκείς να μεταδώσουν την επιλεκτικότητα του υποκινητή (Shi et al., 2003), και έτσι τα σύμπλοκα Smad3-Smad4 συνεργάζονται, (όπως θα περιγραφεί λεπτομερέστερα στην παράγραφο «Οι συνεργαζόμενοι παράγοντες καθορίζουν την επιλογή των γονιδίων στόχων») με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως τα μέλη της οικογένειας AP-1, TFE3 και FoxG1 (Massague et al., 2000; Seoane et al., 2004) για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Παρά το γεγονός ότι είναι εξαιρετικά ομόλογη με τη Smad3, η Smad2 δεν είναι ικανή να προσδένεται άμεσα στο DNA εξαιτίας της ένθεσης 30 επιπλέον αμινοξέων αμέσως πριν την φουρκέτα πρόσδεσης στο DNA. Τα σύμπλοκα Smad2-Smad4 δεν προσδένονται από μόνα τους στο DNA, αλλά απαιτούν επιπλέον μεταγραφικούς παράγοντες να τα στοχεύουν σε ειδικές αλληλουχίες (ten Dijke et al., 2004).

Οι περιοχές MH1 και MH2 προσδένονται σε πρωτεΐνες όπως προσαρμοστές ουβικουϊτινιλίωσης και υποστρώματα, μεταγραφικούς συνενεργοποιητές και μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 8) (Moustakas et al., 2001). Επιπρόσθετα, η Smad3 φέρει περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης (transactivation domain) στην περιοχή του linker (Prokova et al., 2005).




**Εικόνα 5: Οι πρωτείνες Smad και τα δομικά στοιχεία τους.** (A) Οι πρωτείνες Smad αποτελούνται από δύο συντηρημένες σφαιρικές παριοχές, τις MH1 και MH2 και ένα μη συντηρημένο linker. Στις R-Smads και τη Smad4, η MH1 περιοχή περιέχει μια β-hairpin δομή για πρόσδεση στο DNA. Οι I-Smads δεν έχουν MH1 περιοχή. Η περιοχή του linker περιέχει πολλές θέσεις φωσφορυλίωσης για τις MAPKs, CDKs και άλλες κινάσες. Στις R-Smads και I-Smads, η περιοχή του linker περιέχει ένα PY μοτίβο για αναγνώριση από τις WW περιοχές στις λιγάσες ουβικουϊτίνης, Smurf. Η περιοχή του linker στη Smad4 περιέχει ένα NES. Στην επιφάνεια των MH2 των R-Smads υπάρχει ο λεγόμενος υδροφοβικός διάδρομος (hydrophobic corridor) που χρησιμεύει ως σημείο για ποικίλες αλληλεπιδράσεις. (B) Παραδείγματα μελών της οικογένειας του TGF-β και οι σχέσεις με τους υποδοχείς και τις Smads. Το σχήμα δείχνει ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο από Smads που αποτελείται από δύο μόρια R-Smad και ένα μόριο Smad4 (στο σχήμα φαίνονται μόνο οι MH2 περιοχές των μορίων). Να σημειωθεί ότι έχουν περιγραφεί και ετεροδιμερή σύμπλοκα από R-Smad-Smad4. (Massague at al., 2005)

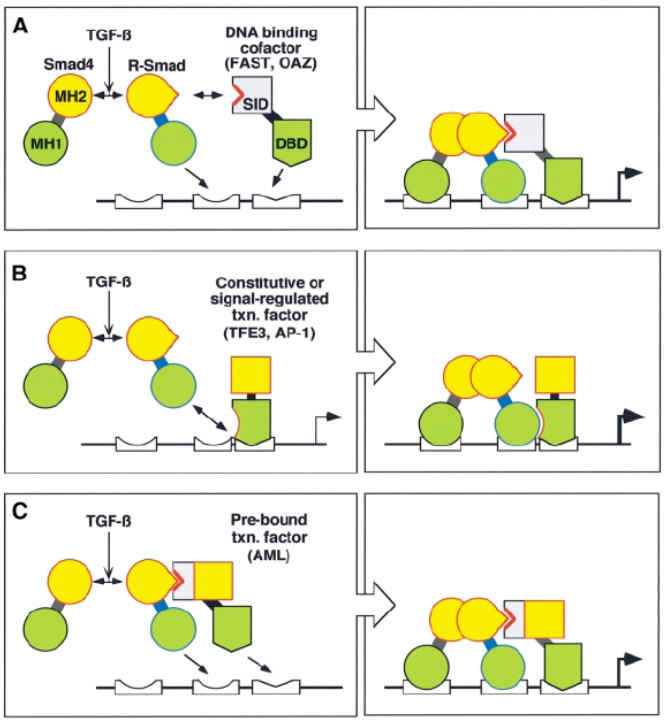



**Εικόνα 6: Τα σημεία αλληλεπιδράσεων στις πρωτείνες Smad.** Μια περίληψη από τις πιο αντιπροσωπευτικές αλληλεπιδράσεις των R-Smads και Smad4 με άλλες πρωτείνες στο κυτταρόπλασμα, τον πυρηνικό πόρο και τον πυρήνα. (Massague at al., 2005)

## Οι συνεργαζόμενοι παράγοντες που προσδένονται στο DNA καθορίζουν την επιλογή των γονιδίων στόχων

Οι πρωτείνες Smad μπορούν να επιτύχουν υψηλή συγγένεια και επιλεκτικές αλληλεπιδράσεις με το DNA μέσω αλληλεπίδρασής τους με πρωτείνες-συνεργάτες (Εικόνα 7). Οι πρωτείνες Smad φτιάχνουν με αυτές τις πρωτείνες σύμπλοκα συγκεκριμένης σύστασης και γεωμετρίας. Οι περιοχές των πρωτεινών Smad που προσδένονται στο DNA και οι συνεργάτες τους θα μπορούν να δράσουν συνεργατικά εάν οι αντίστοιχες αλληλουχίες DNA είναι παρούσες στη σωστή απόσταση και στο σωστό προσανατολισμό στον υποκινητή ενός γονιδίου-στόχου, ώστε η αλληλεπίδραση να είναι πολύ εξειδικευμένη. Από τα μερικές εκατοντάδες γονίδια-στόχους του

μονοπατιού του TGF-β σε ένα δεδομένο κύτταρο, μόνο ορισμένα θα στοχευτούν από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό RSmad-Smad4-πρωτείνη συνεργάτης, ενώ η στόχευση δε θα γίνει σε κύτταρα που δεν εκφράζουν τη συγκεκριμένη πρωτείνη συνεργάτη. Αυτό θα μπορούσε να καταστήσει μια γονιδιακή απόκριση στον TGF-β κυτταρο-εξαρτώμενη. Κάποιες πρωτείνες- συνεργάτες μπορούν να αλληλεπιδράσουν μόνο με τις Smad2/3, ενώ άλλες μόνο με τις Smad1/5/8 και έτσι, εξασφαλίζεται η εξειδίκευση μονοπατιού για τις γονιδιακές αποκρίσεις στον TGF-β και τον BMP. Επιπρόσθετα, σε μερικές περιπτώσεις οι συνεργάτες των Smad καθορίζουν και το είδος του αποτελέσματος – ενεργοποίηση ή καταστολή- που θα συμβεί σε ένα γονίδιο-στόχο. Έτσι, οι πρωτείνες-συνεργάτες των Smad παρέχουν τέσσερα επίπεδα εξειδίκευσης: (1) εξειδίκευση στο γονίδιο-στόχο, (2) εξειδίκευση στο μονοπάτι, (3) εξειδίκευση στον κυτταρικό τύπο και (4) συγκεκριμένο μεταγραφικό αποτέλεσμα.




**Εικόνα 7: Οι πρωτείνες-συνεργάτες των Smad.** Γενικά μοντέλα για την αναγνώριση και ρύθμιση συγκεκριμένων γονιδίων-στόχων από τις πρωτείνες Smad σε συνεργασία με πρωτείνες, όπως η FAST και η OAZ (μοντέλο A), συστατικούς (TFE, CBF) ή σηματο-εξαρτώμενους (AP-1) μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με την περιοχή MH1 παρουσία ενός αγωνιστή (μοντέλο B) ή με τη MH2 περιοχή σε βασική κατάσταση (basal state) (μοντέλο C). Παρόλο που φαίνονται σε κάθε μοντέλο δύο ρυθμιστικά στοιχεία αναγνώρισης από τις πρωτείνες Smad, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο το ένα σε ορισμένα γονίδια. (Massague and Wotton, 2000).

**Μεταγραφική ενεργοποίηση-συνενεργοποιητές των Smad**

Οι R-Smads και η Smad4 είναι ικανές να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή (Εικόνα 8), και αυτή η λειτουργία εξαρτάται βασικά από την MH2 περιοχή (Massague, 1998). Μεταγραφική ενεργοποίηση από τις R-Smads φαίνεται να συμβαίνει, τουλάχιστον εν μέρει, από την ικανότητά τους να στρατολογούν τους γενικούς συνενεργοποιητές p300 και CBP (Feng et al., 1998; Janknecht et al., 1998; Pouponnot et al., 1998; Shen et al., 1998). Οι πρωτείνες p300 και CBP έχουν ενεργότητα ακετυλο-τρανσφεράσης ιστονών (histone acetyl transferase-HAT), και επομένως, η στρατολόγησή τους από το σύμπλοκο Smad μπορεί να αυξήσει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων αλλάζοντας τη δομή των νουκλεοσωμάτων και αναμορφώνοντας τη χρωματίνη. Αυτή η αλληλεπίδραση ρυθμίζεται άμεσα από την MH2 περιοχή των R-Smads. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της πρωτείνης p300 και της Smad4 έχει χαρτογραφηθεί στο αμινοτελικό άκρο της MH2 περιοχής (de Caestecker et al., 2000).

Μερικά από τα παρατηρούμενα συνεργασιακά αποτελέσματα των πρωτεινών Smad και των πρωτεινών-συνεργατών μπορεί να είναι στο επίπεδο της στρατολόγησης συνενεργοποιητών. Οι συνενεργοποιητές p300 και CBP είναι μεγάλες πρωτείνες με διακριτές περιοχές για αλληλεπίδραση με διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες.

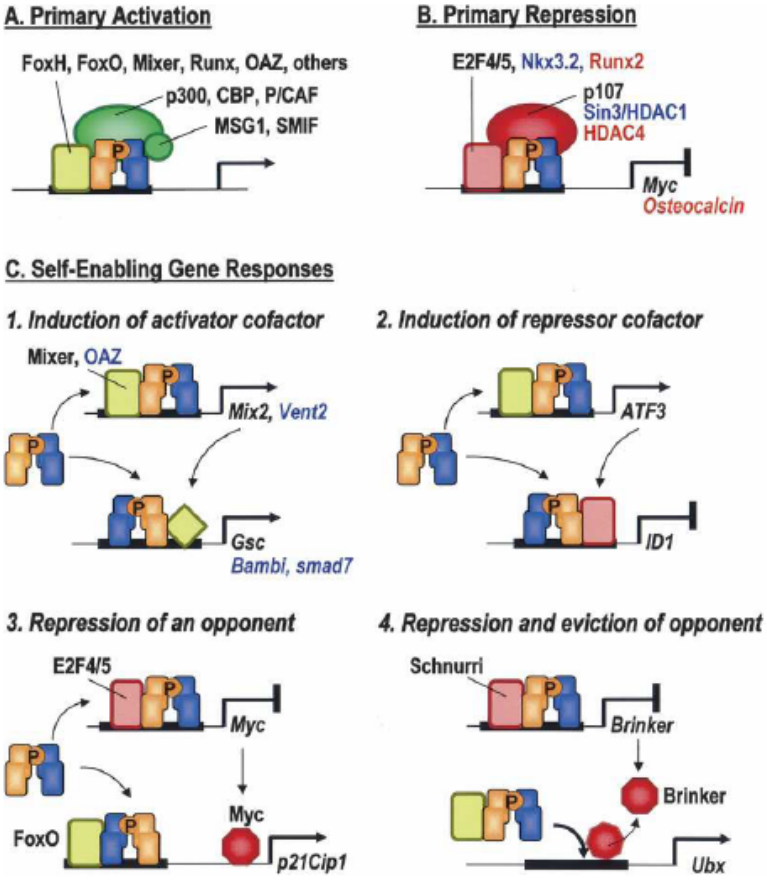
Οι πρωτείνες Smad αλληλεπιδρούν και με άλλους γενικούς ρυθμιστές της μεταγραφής. Ο αναδιοργανωτής της χρωματίνης P/CAF, που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο p300/CBP, έχει δειχθεί να αλληλεπιδρά με την MH2 περιοχή των R-Smads ( Kato et al., 2002). Στους πιο ειδικούς ρυθμιστές της μεταγραφής που αλληλεπιδρούν με τις πρωτείνες Smad συγκαταλέγονται πρωτείνες όπως η SMIF και η Swift (Massague et al., 2005). Η SMIF είναι ένας συμπαράγοντας που αλληλεπιδρά με τη Smad4 και είναι παρών στο κυτταρόπλασμα όταν δεν υπάρχει TGF-β ή BMP. Η SMIF δεν είναι από μόνη της μεταγραφικός ενεργοποιητής αλλά αλληλεπιδρά με τη Smad4 (μέσω της περιοχής SAD) και την πρωτείνη p300 και με τον τρόπο αυτό, ενισχύει τη γονιδιακή έκφραση. Το ίδιο συμβαίνει και με μία άλλη πρωτείνη, τη MSG1. Η πρωτείνη Swift είναι μια πρωτείνη του *Xenopus* που περιέχει την περιοχή BRCT (BRCA1 C-terminal). Αλληλεπιδρά με τη Smad2 και ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω ακτιβίνης νωρίς κατά της διάρκεια της ανάπτυξης (Massague et al., 2005).

**Μεταγραφική καταστολή-συγκαταστολείς των Smad**

Παρόλο που οι πρωτείνες Smad έχουν φυσική ενεργότητα ενίσχυσης της μεταγραφής, υπάρχουν και παραδείγματα γονιδίων που καταστέλλονται μεταγραφικά από τις πρωτείνες Smad. Η καταστολή του γονιδίου c-Myc (Εικόνα 8) στο πλαίσιο της κυτοστατικής απόκρισης του TGF-β ήταν ένα από τα πρώτα σημαντικά παραδείγματα του αποτελέσματος αυτού (Siegel and Massague, 2003). Με βάση μελέτες που έγιναν κάνοντας χρήση της τεχνολογίας των microarrays, βρέθηκε ότι τουλάχιστον το ένα τέταρτο όλων των αποκρισέων του TGF-β σε κύτταρα θηλαστικών είναι αποκρίσεις γονιδιακής καταστολής (Chen et al., 2001; Zavadil et al., 2001; Kang et al., 2003).

Η homeodomain πρωτείνη TGIF καταστέλλει την Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή στρατολογώντας απακετυλάσες ιστονών (HDACs) (Wotton et al., 1999). Η TGIF αλληλεπιδρά με τις Smad2/3 με TGF-β-επαγόμενο τρόπο, με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση της TGIF σε DNA στοιχεία-ειδικά για τις πρωτείνες Smad. Η στρατολόγηση της TGIF και των, σχετιζόμενων με αυτή, HDACs οδηγεί στην καταστολή της μεταγραφής. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να επηρεαστούν γονίδια, τα οποία φυσιολογικά ενεργοποιούνται από τη σηματοδότηση του TGF-β.

Η πρωτείνη Ski αρχικά ανακαλύφθηκε ως προϊόν του ρετροϊικού ογκογονιδίου v-ski. Η Ski, και η σχετιζόμενη με αυτή, SnoN έχουν πλέον ταυτοποιηθεί ως αλληλεπιδρώσες πρωτείνες με τις Smad3 και Smad4 και έχουν δειχθεί ως συγκαταστολείς των Smad2/3 (Akiyoshi et al., 1999; Luo et al., 1999; Sun et al., 1999). Σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση των Smad με την TGIF, η αλληλεπίδραση των Smad με τις Ski και SnoN παρατηρείται κάτω από βασικές συνθήκες και εξαφανίζεται κατά τις πρώτες ώρες του TGF-β ερεθίσματος (Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999). Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και μπορεί να ρυθμίζεται από αποικοδόμηση των πρωτεινών αυτών που επάγεται από τον TGF-β και ρυθμίζεται από το πρωτεάσωμα.



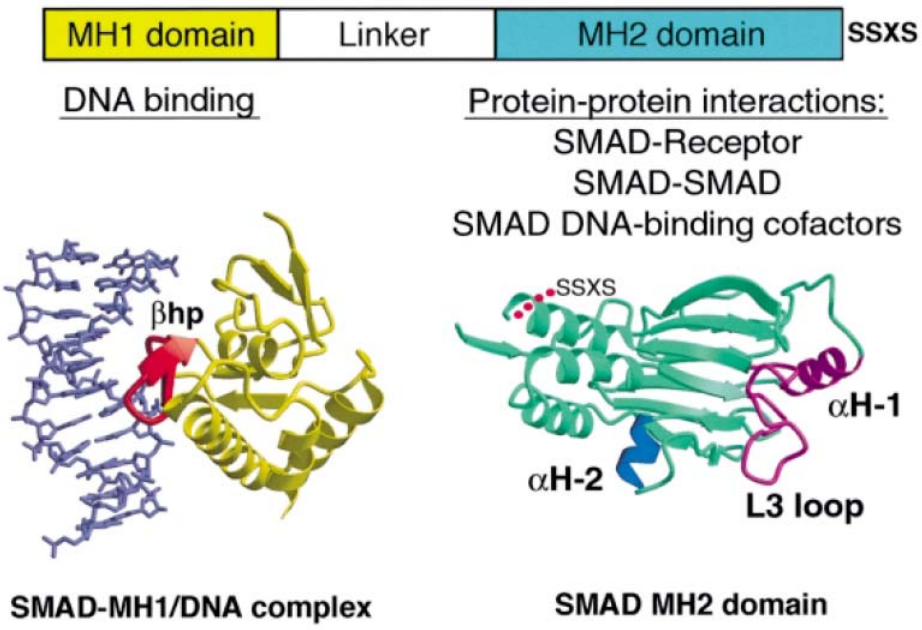

**Εικόνα 8: Μοντέλα μεταγραφικής ρύθμισης από τις πρωτείνες Smad**. (A) Σύμπλοκα RSmads-Smad4 σε συνδυασμό με παράγοντες που προσδένονται στο DNA, σχηματίζουν σύμπλοκα που στοχεύουν συγκεκριμένα γονίδια. Οι FoxH, FoxO και Mixer είναι παραδείγματα παραγόντων συνεργατών για τις Smad2/3-Smad4 και ο OAZ για τις Smad1/5-Smad4. Αυτά τα σύμπλοκα μπορούν να στρατολογούν συνενεργοποιητές (όπως οι p300, CBP, P/CAF) με τη βοήθεια πρωτεινών-συνεργατών (όπως οι πρωτείνες MSG1 και SMIF). (B) Οι RSmads-Smad4 μπορούν επίσης να στρατολογούν συγκαταστολείς. Οι Smad1-Smad4 με την Nkx3.2 μπορούν να στρατολογήσουν τη mSin3/HDAC1. Οι Smad3-Smad4 με την E2F4/5 μπορούν να στρατολογήσουν την p107 και μαζί με την Runx2 μπορούν να στρατολογήσουν τη HDAC4. Τα χρώματα υποδεικνύουν λειτουργικά συνδεδεμένα μέρη. (C) Σε πολλές περιπτώσεις, η ρύθμιση της μεταγραφής μέσω των πρωτεινών Smad φαίνεται να εμπλέκει ένα μηχανισμό αυτο-ενίσχυσης όπου οι πρωτείνες Smad επάγουν μια γονιδιακή απόκριση η οποία επιτρέπει μια άλλη γονιδιακή απόκριση που ρυθμίζεται από τις Smad. (Massague et al., 2005)

**Η δομή, η ρύθμιση και η λειτουργία της Smad3: ο ρόλος-κλειδί του linker**

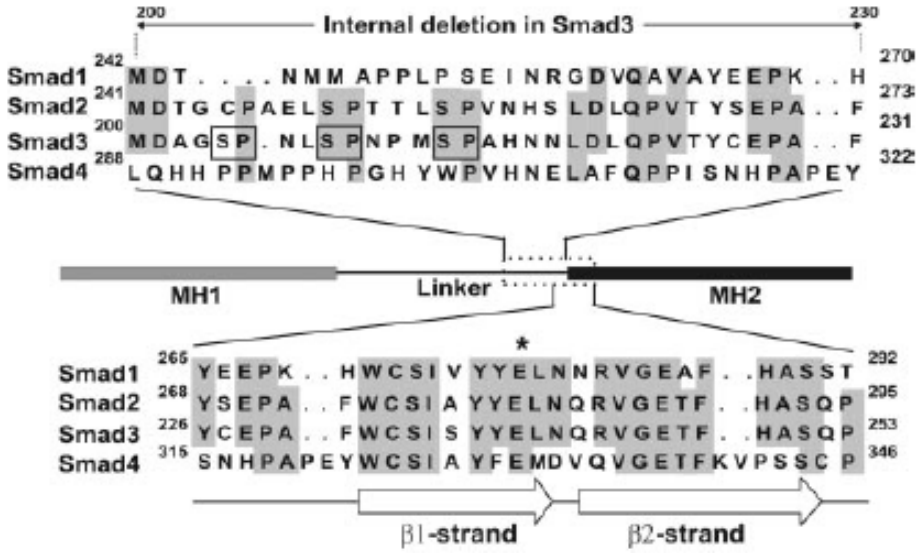
Όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες παραγράφους, η βιολογική σημασία ενός TGF-β σήματος εξαρτάται από τη δόση και τη διάρκεια του σήματος, καθώς και από τον τύπο, την κατάσταση και το περιβάλλον του κυττάρου-στόχου. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τις Smad πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές συγγένειες για τα σύμπλοκα των Smad πρωτεϊνών και τα στοχεύουν σε διαφορετικά γονίδια. Η διαθεσιμότητα των ενεργών Smad συμπλόκων δείχνει ποια γονίδια είναι ενεργοποιημένα και επομένως, καθορίζει τη βιολογική απόκριση στον TGFβ (Jayaraman et al., 2000; Chacko et al., 2004). Το προηγούμενο δόγμα όριζε ότι η μεταγραφική ενεργότητα των συμπλόκων αυτών εξαρτάται από τη Smad4 και την SAD (Smad Activation Domain) περιοχή της. Έχει δειχθεί ότι, όπως η Smad4, η linker επικράτεια της Smad3 περιέχει μια Smad περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η περιοχή αυτή είναι ικανή να στρατολογήσει τον p300 μεταγραφικό συνενεργοποιητή και απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω Smad3 (Wang et al., 2005). Μια λεπτομερεστέρη μελέτη μεταλλιξέγενεσης της Smad3 μέσω του GAL4 συστήματος (Prokova et al., 2005) τώρα δείχνει ότι όλα αυτά τα Smad σύμπλοκα δεν είναι ισόποσα φτιαγμένα και μπορεί να περιέχουν διαφορετικό αριθμό μορίων από μεταγραφικούς συνενεγοποιητές δίνοντας έτσι ποικίλα μεταγραφικά ποσοστά σε διάφορα γονίδια-στόχους. Στο μέλλον αυτό θα είναι σημαντικό για τον καθορισμό των στοιχειομετριών όλων των συστατικών των Smad μεταγραφικών συμπλόκων, που θα απαιτούν σημαντικές κρυσταλλογραφικές αναλύσεις. Αυτό είχε, για κάποιο καιρό, παρεμποδιστεί από την «ευλύγιστη» φύση των Smad linker όταν εξετάζονταν στο πλαίσιο των απομονωμένων Smad και είχε χρειαστεί να αποκοπούν ώστε να κρυσταλλωθούν επιτυχών τα ετερο-ολιγομερή των Smad (Chacko et al., 2004).

Συνοψίζοντας τα ευρήματα από τη δημοσίευση των Prokova et al, 2005, θα μπορούσε να τονιστεί (καθώς η δημοσίευση αποτέλεσε μία από τις αφορμές της παρούσας μελέτης) ότι η Smad3 φέρει δύο περιοχές μεταγραφικής ενεργοποίησης: η μια βρίσκεται στην MH2 περιοχή και η άλλη στην περιοχή του linker (Εικόνα 9). Η αφαίρεση της περιοχής του linker αποκάλυψε ότι η περιοχή 200-230aa (Εικόνα 10) είναι η ελάχιστη περιοχή που χρειάζεται για μεταγραφική ενεργότητα. Η αφαίρεση του

κομματιού 200-230aa δεν είχε καμία επίδραση στη σταθερότητα, τη συσσώρευση στον πυρήνα, τη φωσφορυλίωση μέσω του τύπου I υποδοχέα και τον ολιγομερισμό της Smad3 με τον εαυτό της και τις άλλες Smad. Η αφαίρεση αυτή κατήργησε τη μεταγραφική ενεργοποίηση εν μέρει λόγω της έλλειψης των φυσικών αλληλεπιδράσεων των συνενεργοποιητών όπως ο p/CAF και CBP, με την περιοχή αυτή. Οι αντίστοιχες περιοχές σε άλλες Smad, όπως η Smad1, Smad2 και Smad4, είναι επίσης μεταγραφικά ενεργές.




**Εικόνα 9: Οι δομικές περιοχές της πρωτείνης Smad3 και οι λειτουργίες τους.** Αναπαράσταση των τριτοταγών δομών της MH1 περιοχής και της MH2 περοχής της Smad3 που ενώνεται στην αλληλουχία AGAC. Οι βασικές αλληλεπιδράσεις των δύο περιοχών αναφέρονται. Οι δομές που παίζουν ρόλο σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις δείχνονται με διαφορετικά χρώματα: η β-hairpin (βhp) που ρυθμίζει την πρόσδεση στο DNA, ο L3 βρόγχος (loop) και η α-έλικα 1 (αH-1) που παίζει ρόλο στην ειδίκευση των αλληλεπιδράσεων των πρωτεινών Smad με τους υποδοχείς τύπου I, και η α-έλικα 2 (αH-2) που παίζει ρόλο στην ειδίκευση της αλληλεπίδρασης της πρωτείνης Smad2 με το FAST. Το μοτίβο SSXS είναι το σημείο φωσφορυλίωσης από τον υποδοχέα. (Shi et al., 1997, 1998; Wu et al., 2000). Η περιοχή του linker φέρει τη δεύτερη περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής.




**Εικόνα 10: Ομολογία μεταξύ της Smad3 και άλλων μελών της οικογένειας των πρωτεινών Smad στη μεταγραφικά ενεργή περιοχή 200-253aa.** Τα αμινοξέα που είναι ταυτόσημα στην οικογένεια των Smad φαίνονται με γκρι χρώμα.Το μάυρο τόξο υποδεικνύει την εσωτερική διαγραφή σε ολόκληρη τη Smad3. Τα λευκά παχιά τόξα υποδεικνύον τα β-πτυχωτά φύλλα. Μια missense μεταλλαγή σε ένα συντηρημένο αμινοξύ στη Smad4 (E330), που σχετίζεται με όγκους, υποδεικνύεται με αστερίσκο. Τα μοτίβα Ser/Pro στη Smad3 που είναι πιθανοί στόχοι φωσφορυλίωσης από τις κινάσες MAP φαίνονται με ανοιχτά τετράγωνα. (Prokova et al., 2005).

## Οι μεταλλαγές σε συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής του linker

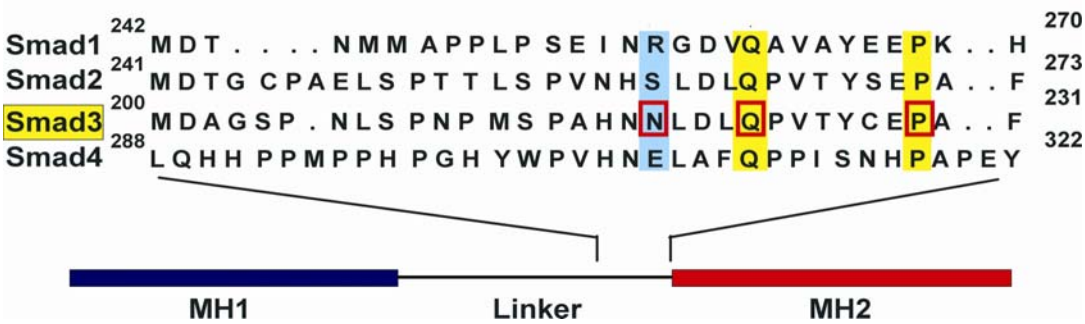
Κάνοντας μεταλλαξιγένεση στην περιοχή του linker της Smad3, ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν συγκεκριμένα συντηρημένα κατάλοιπα, τα οποία είναι σημαντικά για μεταγραφική ενεργοποίηση και προσδίδουν επιλεκτικότητα στον ολιγομερισμό (Εικόνα 11) (Μάνος Σιδεράκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων αυτών ήταν άκρως ενδιαφέροντα. Μελετώντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση της Smad3, διαπιστώθηκε ότι το μετάλλαγμα Q222A μειώνει στο 50% τη βασική ενεργότητα και αναστέλλει τη μεταγραφική λειτουργία της Smad3 και Smad4, εύρημα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αφού δεν αλληλεπιδρά μαζί τους. Το μετάλλαγμα P229A δρα ως dominant negative της Smad3 και καταστέλλει τη δράση της Smad4. Εν αντιθέσει, το N218A δρα ως wt και ενισχύει τη μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 και Smad4, όταν συνεκφράζεται μαζί τους.

Μελετώντας τον ολιγομερισμό (ομο-και ετερο-) των Smad, το μετάλλαγμα Q222A εμποδίζει τον ολιγομερισμό, ενώ το μετάλλαγμα P229A εμποδίζει τον ομο-ολιγομερισμό, αλλά όχι τον ετερο-ολιγομερισμό. Η Smad3(P229A) προσδένεται μόνο στην Smad4. Μελετώντας την τοποθέτηση στον πυρήνα, το μετάλλαγμα Q222A εμποδίζει την τοποθέτηση στον πυρήνα και συναντάται στο κυτταρόπλασμα, ενώ το μετάλλαγμα P229A μεταφέρεται στον πυρήνα. Το μετάλλαγμα N218A φαίνεται να έχει παρόμοια τοπολογία με τη wt Smad3. (Μάνος Σιδεράκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα)

Το προτεινόμενο μοντέλο συμπεριφοράς για το μετάλλαγμα Smad3(Q222A) είναι ότι πιθανόν είτε δεν φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα TβRI και έτσι, οι R-Smads δεν ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα, είτε δεσμεύει στο κυτταρόπλασμα τους συνενεργοποιητές p/CAF και CBP/p300. Όσον αφορά στο μετάλλαγμα Smad3 P229A, το οποίο είναι και το πιο ενδιαφέρον, προτείνεται ότι αλληλεπιδρά με τις Smad4 και Smad2 στο κυτταρόπλασμα και τις εμποδίζει να λειτουργήσουν. Επομένως, η έκφραση της Smad3 P229A μειώνει τη διαθεσιμότητα των Smad4 και Smad2 και συνεπώς μειώνει τον αριθμό των ενεργών μεταγραφικών συμπλόκων. Η Smad3wt επηρεάζεται εξαιτίας της μειωμένης ελεύθερης Smad4 (Μάνος Σιδεράκης, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα, φαίνεται ότι η περιοχή του linker δεν είναι απλά μια ευέλικτη άρθρωση που επιτρέπει στις πιο σημαντικές MH1 και MH2 να κάνουν τη δουλειά τους. Είναι μάλλον καιρός να θεωρήσουμε το linker σαν μια τρίτη σημαντική δομική περιοχή στη βιολογία των Smad.




**Εικόνα 11: Μεταλλαγές σε συντηρημένα αμινοξέα της περιοχής του linker της πρωτείνης Smad3.** Οι μεταλλαγές στα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα Gln στη θέση 222 και Pro στη θέση 229 της περιοχής του linker, 200-230 που ευθύνεται για μεταγραφική ενεργοποίηση. Και τα δύο αμινοξέα αντικαταστάθηκαν από Ala. Επίσης, έγινε και μια αντικατάσταση ενός μη συντηρημένου αμινοξέος, της Asn, στη θέση 218 από Ala.

**Η δράση του TGF-β στον καρκίνο: Απώλεια της επαγόμενης από TGF-β καταστολής**

Δεδομένης της κυτταροστατικής και αποπτωτικής λειτουργίας του TGF-β, δεν είναι παράξενο το γεγονός ότι το μονοπάτι αυτό διαταράσσεται από σωματικές μεταλλαγές σε περιπτώσεις καρκίνου (Derynck et al., 2001; Massague et al., 2000; Wakefield et al., 2002). Εκτός όμως από τις σωματικές μεταλλάξεις, έχουν περιγραφεί και μεταλλάξεις σε γαμετικά κύτταρα συστατικών του μονοπατιού του TGF-β (Massague et al., 2000).

Μεταλλαγές στο γονίδιο του *TRβII* έχουν ταυτοποιηθεί σε περιπτώσεις σποραδικών και κληρονομικών περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι μεταλλαγές αυτές συμβαίνουν από την ενσωμάτωση ή αφαίρεση μίας ή δύο βάσεων αδενίνης σε μια περιοχή από δέκα αδενίνες που κωδικοποιεί την εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα των μεταλλαγών αυτών είναι είτε σχηματισμός ελλειματικών και ανενεργών μορφών του υποδοχέα (Lu et al., 1996), είτε, σε ποσοστό 15%, απενεργοποίηση της περιοχής με δραστικότητα κινάσης του υποδοχέα (Grady et al., 1999). Μεταλλαγές στο γονίδιο του *TRβI* έχουν ταυτοποιηθεί σε καρκίνους του μαστού (Chen at al., 1998), των ωοθηκών (Wang et al., 2000), του παγκρέατος (Goggins et al., 1998), καθώς και σε λεμφώματα Τ-κυττάρων (Schiemann et al., 1999).

Το γονίδιο *SMAD4* ήταν το πρώτο που ταυτοποιήθηκε ως ογκοκατασταλτικό και ευθύνεται για το 10% των περιπτώσεων καρκίνου του παχέος εντέρου (Miyaki et al., 1999), εκ των οποίων το 30% είναι μεταστατικοί (Schutte et al., 1996), και για το 50% των περιπτώσεων του καρκίνου του παγκρέατος (Hahn et al., 1996).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SMAD2* σε περιπτώσεις καρκίνου είναι σπάνιες και αφορούν κυρίως περιπτώσεις καρκίνου του παχέος εντέρου και των πνευμόνων (Uchida et al., 1996; Eppert et al., 1996).

**Η δράση του TGF-β στον καρκίνο: Προ-διεισδυτικές και μεταστατικές λειτουργίες του TGF-β**

Η απώλεια των λειτουργίας του υποδοχέα ή των πρωτεινών Smad είναι υπεύθυνες για ένα σχετικά μικρό ποσοστό των περιπτώσεων όπου τα καρκινικά κύτταρα γίνονται ανθεκτικά στη κυτταροστατική και αποπτωτική δράση του TGF-β. Τις περισσότερες φορές, απώλεια της απόκρισης που έχει να κάνει με την αναστολή της ανάπτυξης στα καρκινικά κύτταρα συμβαίνει σε ένα επίπεδο κάτω από το βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β. Αυξανόμενη παραγωγή του TGF-β συμβαίνει σε πολλούς καρκινικούς τύπους και σχετίζεται με τη σοβαρότητα του όγκου (Derynck et al., 2001). Ο TGF-β που προέρχεται από όγκο, μπορεί να επηρεάσει πολλούς κυτταρικούς τύπους που είναι σε γειτονία με τον αναπτυσσόμενο όγκο (όπως ινοβλάστες, επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος) ώστε να παράγει ένα περιβάλλον που ευνοεί την ανπατυξη του όγκου, τη διείσδυση και τη μετάσταση. Παρόλα αυτά, ο TGF-β μπορεί να επιδείξει ογκογόνο δράση δρώντας στα ίδια τα καρκινικά κύτταρα. Αυτό έχει δειχθεί με υπερέκφραση είτε ενεργών είτε αρνητικά επικρατούντων μορφών του TGF-β υποδοχέα σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως σε μεταστατικά κύτταρα του παχέος εντέρου(Ott et al., 1998) ή σε μεταστατικά κύτταρα του μαστού που κάνουν μετάσταση στα οστά (Yin et al., 1999). Τα τελευταία χρόνια, έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά στο καθορισμό των μοριακών και κυτταρικών βάσεων των ογκογονικών επιδράσεων του TGF-β τόσο στο μικροπεριβάλλον όσο και στους ίδιους τους όγκους (Εικόνα 12).

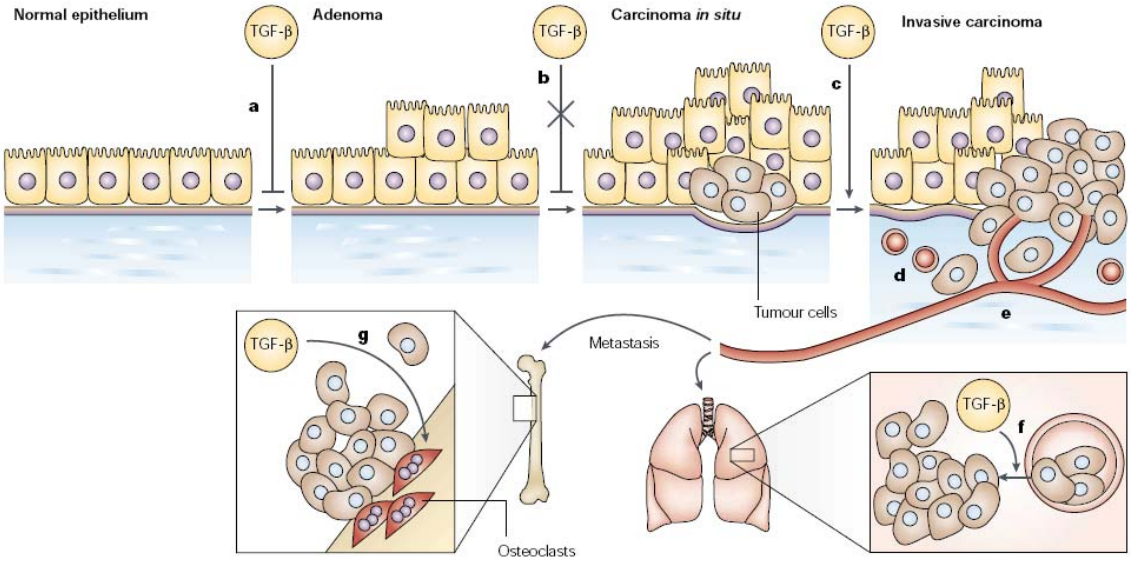
Ανοσοκαταστολή: Η ικανότητα του TGF-β να αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών αιμοποιητικών κυττάρων έχει εμφανείς συνέπειες για τους όγκους που εκφράζουν αυξημένα επίπεδα αυτής της κυτοκίνης. Οι εμφανιζόμενοι όγκοι καταστέλλουν τη λειτουργία των Τ κυτταροτοξικών (CTLs) και Τ βοηθητικών κυττάρων ($T_H$). Επίσης, ο TGF-β φαίνεται να επιδρά στην ενεργοποίηση των Τ κυττάρων μέσω αρνητικών επιδράσεων στα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APC), όπως τα δενδριτικά κύτταρα (Geissmann et al., 1999). Επιπρόσθετα, ο TGF-β μπορεί να αναστείλει την έκφραση των μορίων του μέγιστου συμπλόκου ιστοσυμβατότητας τάξης ΙΙ (MHC II) σε διάφορα κύτταρα, μέσω ενός Smad3-εξαρτώμενου μηχανισμού (Dong et al., 2001). Τέλος, στόχοι

της ανοσοκαταστολής μέσω TGF-β μπορεί να είναι τα φυσικά κύτταρα φονιάδες (natural killer cells) (Arteaga et al., 1993) και τα ουδετερόφιλα κύτταρα (Chen et al., 1998).

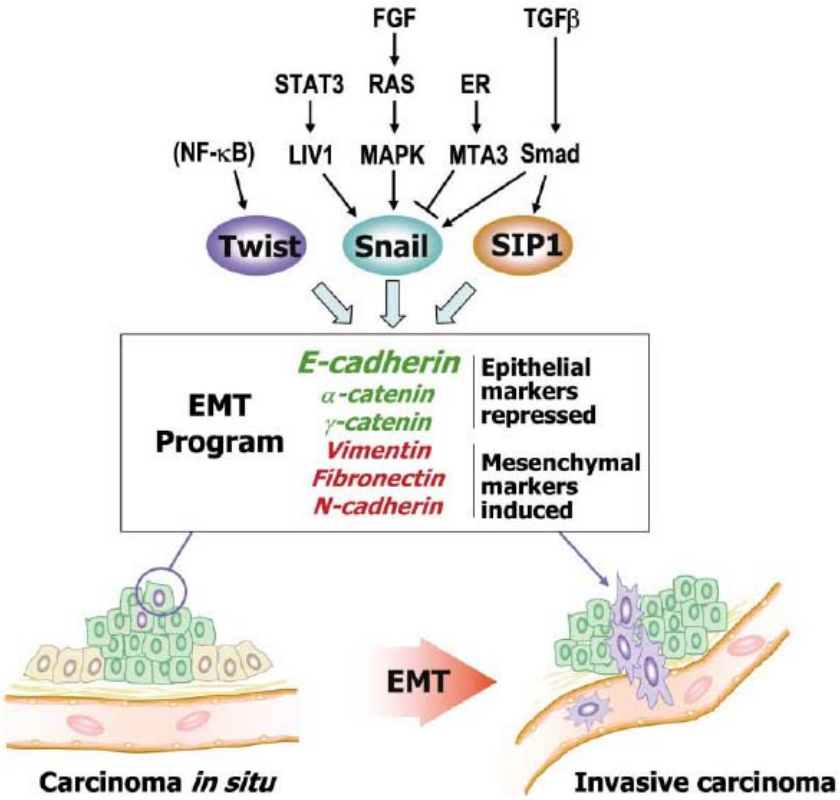
Αγγειογένεση: Η ικανότητα των όγκων να επάγουν σχηματισμό νέων αγγείων από ήδη υπάρχον αγγείο είναι ιδιαίτερα σημαντική για την προοδευτική ανάπτυξη και μετάνασταση του νεοπλάσματος. Ο TGF-β μπορεί να επάγει την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων, όπως ο VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ο CTGF (Connective-Tissue Growth Factor) σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες (Petrovaara et al., 1994; Shimo et al., 2001). Η έκφραση της αγγειοποιητίνης-1 (ANG-1), πρωτείνης που διατηρεί την ακεραιότητα των αγγείων, καταστέλλεται από τον TGF-β σε κύτταρα ινοβλαστών (Enholm et al., 1997). Επίσης, ο TGF-β επάγει την έκφραση, έκκριση ή ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνασών σε επιθηλιακά κύτταρα και κύτταρα όγκων, επιτρέποντας την απελευθέρωση των επιθηλιακών κυττάρων στην κυκλοφορία του αίματος (Derynck et al., 2001).

Επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT): Η μεταναστευτική ικανότητα των επιθηλιακών κυττάρων εξαρτάται από την απώλεια των κυτταρικών επαφών και την απόκτηση ινοβλαστικών χαρακτηριστικών, διαδικασία η οποία ονομάζεται «επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση» (EMT) (Εικόνα 13). Το σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω TGF-β συνεργάζεται με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια για τη ρύθμιση της EMT, διαδικασία η οποία θεωρείται ότι ευνοεί τις διεισδυτικές και μεταστατικές ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων. Ένας από τους βασικούς παράγοντες απενεργοποίησης ή μεταγραφικής καταστολής κατά την EMT είναι ο ασβεστο-εξαρτώμενος υποδοχέας E-cadherin (Oft et al., 1996; Miettinen et al., 1994; Thiery et al., 2002). Ο TGF-β επάγει επίσης την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων SNAIL και SIP1 που καταστέλλουν το γονίδιο της E-cadherin (Comjin et al., 2001; Peinado et al., 2003).

Επαγωγή ιστοειδικής μετάστασης: Η ικανότητα του TGF-β μονοπατιού να επάγει μετάσταση καρκινικών κυττάρων του μαστού στα οστά επιτυγχάνεται με την επαγωγή της έκφρασης των γονιδίων CTGF και IL-11 (Kang et al., 2003b) καθώς και άλλων παραγόντων. Τα οστά είναι πολύ επιρρεπή στις ογκογόνες συνέπειες του TGF-β.




**Εικόνα 12: Τα σημεία δράσης του TGF-β κατά την πρόοδο του καρκίνου.** a). Ο TGF-β περιορίζει την ανάπτυξη του φυσιολογικού επιθηλίου και των όγκων που βρίσκονται σε πρώϊμο στάδιο. b) Απώλεια της απόκρισης «αναστολή της ανάπτυξης» εξατίας της απώλειας των υποδοχέων του TGF-β ή των πρωτεινών Smad, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτηξη πιο επιθετικά αναπτυσσόμενων όγκων ευνοώντας τη συσσώρευση περισσότερων ογκογόνων μεταλλαγών. c) Τα καρκινικά κύτταρα που έχουν χάσει την κυτταροστατική απόκριση αλλά έχουν διατηρήσει τα συστατικά του μονοπατιού του TGF-β υποβάλλονται σε EMT σε απόκριση στον TGF-β, και γίνονται πιο διεισδυτικά. d) Ο TGF-β που πρόερχεται από όγκους δημιουργεί ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον, καταστέλοντας τη λειτουργία των Τ κυττάρων, επιτρέποντας στα καρκινικά κύτταρα να αποδράσουν από τα κυτταροτοξικά Τ κύτταρα. e) Ο TGF-β μπορεί να επάγει μια αγγειογόνο απόκριση ενισχύοντας τη στρατολόγηση νέων αιμοφόρων αγγείων τα οποία συντηρούν την καρκινική ανάπτυξη και εξάπλωση. f) Η προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στο ενδοθήλιο και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων σε όργανα όπως οι πνεύμονες ευνοούνται από την TGF-β σηματοδότηση. g) Ο TGF-β διεγείρει την έκφραση γονιδίων όπως ο παράγοντας διαφοροποίησης στα οστά, IL-1 (interleukin-1) και ο αγγειογόνος παράγοντας CTGF (Connectine Tissue Growth Factor), παράγοντες οι οποίοι ευνοούν τη μετάσταση καρκινικών κυττάρων του μαστού στα οστά. (Siegel and Massague, 2003).




**Εικόνα 13: Οι οδηγοί και ρυθμιστές της EMT.** Τα μόρια που παίζουν ρόλο στη διαδικασία αυτή, καθώς και ο ρόλος τους φαίνονται στο σχήμα. (Kang and Massague, 2004).

## BCAR3: Ένα καινούριο γονίδιο-στόχος της σηματοδότησης μέσω TGF-β

### Ταυτοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου BCAR3

Τα αντι-οιστρογόνα όπως η ταμοξιφένη μπορούν να είναι αποτελεσματική θεραπεία για τους τοπικούς και μεταστατικούς καρκίνους του μαστού που είναι θετικοί στον υποδοχέα άλφα των οιστρογόνων (ERα). Παρόλα αυτά, έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις ανθεκτικότητας σε θεραπείες με αντι-οιστρογόνα (Clarke et al., 2003). Ενώ οι μοριακοί μηχανισμοί που προσδίδουν αυτή την ανθεκτικότητα εξακολουθούν να είναι αντικείμενο έρευνας, μελέτες σε ζώα και κυτταρικές σειρές έχουν δείξει, κατά επανάληψη, καινούρια σηματοδοτικά μονοπάτια σε καρκινικά κύτταρα του μαστού τα

οποία αποκτούν ανθεκτικότητα σε αντι-οιστρογόνα (McClelland et al., 2001; Lu et al., 2003; Meijer et al., 2006).

Σε μια προσπάθεια ταυτοποίησης αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση που θα επέτρεπαν αρχικά οιστρογονο-εξαρτώμενα καρκινικά κύτταρα να μεγαλώσουν παρουσία της ταμοξιφένης, ο Dorssers και οι συνεργάτες του πραγματοποίησαν ενσωμάτωση ρετροιών σε καρκινικά κύτταρα ZR-75-1 και στη συνέχεια επέλεξαν για ανθεκτικότητα στη ταμοξιφένη (Dorssers et al., 1993). Μέσα στους 80 ανθεκτικούς στην ταμοξιφένη κλώνους που απομονώθηκαν, οι έξι ήταν αποτέλεσμα μιας ανεξάρτητης ενσωμάτωσης του ρετροϊού στον υποκινητή του γονιδίου BCAR3 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance 3) και της επακόλουθης υπερέκφρασής του (van Agthoven et al., 1998). Επακόλουθο screening και άλλων καρκινικών σειρών του μαστού επιβεβαίωσε τα υψηλότερα επίπεδα του BCAR3 μεταγράφου σε ERα-θετικές από ότι ERα-αρνητικές καρκινικές σειρές του μαστού.

Ως αποτέλεσμα μελετών από διάφορα εργαστήρια, έχει πλέον αποδειχθεί ότι η πρωτείνη BCAR3 είναι μέλος μιας οικογένειας που απαρτίζεται από τρείς ανθρώπινες πρωτείνες: τις NSP1, NSP2/BCAR3, NSP3. Η οικογένεια αυτή ονομάζεται NSP (Novel SH2-containing Protein) (Lu et al., 1999b). Στα ποντίκια, εκφράζονται μόνο τα δύο μέλη της οικογένειας NSP: η πρωτείνη AND-34, η ομόλογη της BCAR3, και η CHAT/SHEP, ομόλογη της NSP3 (Cai et al., 1999; Dodelet et al., 1999; Sakakibara and Hattori, 2000).

Κάθε μία από τις πρωτείνες της NSP οικογένειας περιέχει μία αμινοξική SH2 περιοχή και μία καρβοξυτελική περιοχή με μέτρια ομολογία στη Cdc25 Ras υποοικογένεια των παραγόντων GDP ανταλλαγής (GDP exchange factor). Τα μέλη της οικογένειας μοιράζονται 25-39% ομοιότητα (Εικόνα 14) (Lu et al., 1999b).

## **Η αλληλεπίδραση των πρωτεινών BCAR3-BCAR1: ο ρόλος τους στην κυτταρική μετανάστευση**

Ο Dorssers και οι συνεργάτες του, σε μια μετέπειτα μελέτη, βρήκαν τέσσερις ακόμα κλώνους από κύτταρα ZR-75-1, οι οποίοι ήταν αποτέλεσμα ενσωμάτωσης ρετροϊού στο γονίδιο BCAR1, το ανθρώπινο ομόλογο του p130Cas, και επακόλουθη υπερέκφραση της πρωτείνης αυτής (Brinkman et al., 2000). Οι πρωτείνες BCAR1 και

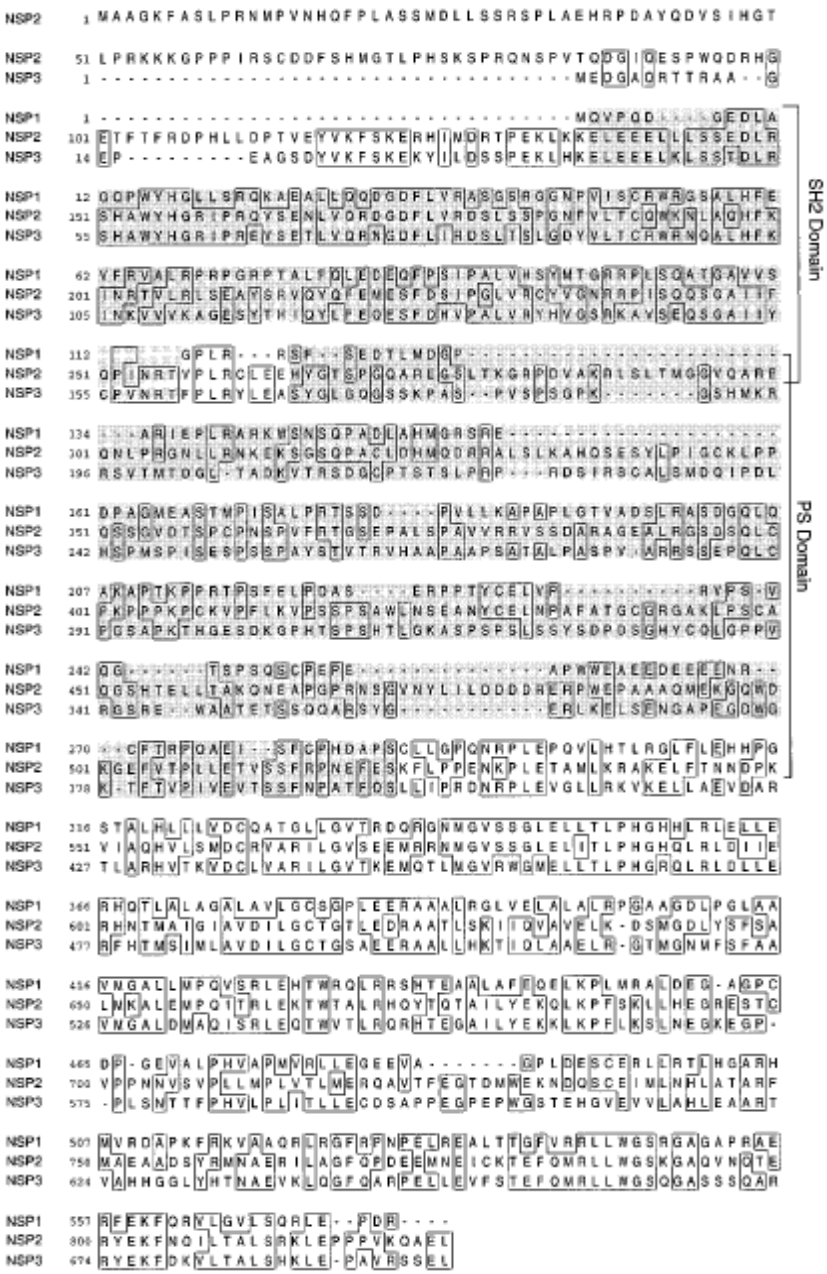
BCAR3 έχουν κοινή δομή. Η καρβοξυτελική περιοχή της BCAR3 ενώνεται με την καρβοξυτελική περιοχή της BCAR1, παρέχοντας έτσι επιπλέον υποστήριξη στη λειτουργική συσχέτιση των δύο πρωτεινών (Gotoh et al., 2000).

Η BCAR1 παίζει ρόλο στη μετανάστευση διαφόρων κυτταρικών τύπων μέσω της λειτουργίας της ως πρωτείνη σκαλωσιά (scaffolding protein) (Bouton et al., 2001, Defilippi et al., 2006). Ο ρόλος της όμως στη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων του μαστού δεν είχε διευκρινιστεί για καιρό παρόλο που η BCAR1 εκφράζεται και σε καρκινικές σειρές μαστού και σε όγκους (van de Flier et al., 2000, van de Flier et al., 2001). Η φωσφορυλίωση της BCAR1 σε κατάλοιπα Tyr από τις Src κινάσες (Brabek et al., 2005), παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία της ως ρυθμιστής της κυτταρικής μετανάστευσης. Οι φωσφορυλιωμένες μορφές της BCAR1 τοποθετούνται στην κυτταρική μεμβράνη (Sakai et al., 1994, Stupack et al., 2000). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η τοποθέτηση της BCAR1 στην κυτταρική μεμβράνη είναι ιδιαίτερα σημαντική, ενώ ο μηχανισμός της τοποθέτησης παραμένει αδιευκρίνιστος.

Η υπερέκφραση των πρωτεινών BCAR1 και BCAR3 στους ινοβλάστες ευνοεί την κυτταρική μετανάστευση (Riggins et al., 2003). Έχει δειχθεί ότι και άλλα μέλη της NSP οικογένειας έχουν παρόμοιες λειτουργίες. Για παράδειγμα, η μετανάστευση κυττάρων COS-7 σε απόκριση στον παράγοντα EGF (Epidermal Growth Factor) αυξάνεται όταν στα κύτταρα υπερεκφράζεται η πρωτείνη NSP3 και αυξάνεται σε ακόμη υψηλότερα επίπεδα όταν υπεκφράζεται και η πρωτείνη BCAR1. Η διέγερση με τον παράγοντα EGF στα κύτταρα αυτά είχε ως αποτέλεσμα την συντοποθέτηση των πρωτεινών NSP3 και BCAR1 στις μεμβρανικές πτυχώσεις (Sakakibara et al., 2000).

Παρόλο που η λειτουργία της πρωτείνης BCAR3 έχει κυρίως εμπλακεί στον αντιοιστρογονο-ανθεκτικό πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων του μαστού (van Agthoven et al., 1998, Yu et al., 2002), ο ρόλος του στην κινητικότητα των κακρινικών κυττάρων του μαστού δεν είχε διευκρινιστεί μέχρι το 2007. Το 2007, ο Schrecengost και οι συνεργάτες του εξέτασαν καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού που διέφεραν μεταξύ τους ως προς το στάδιο και την επιθετικότητα του όγκου ώστε να μελετήσουν τον πιθανό ρόλο της πρωτείνης BCAR3 στη μετανάστευση και διείσδυση. Βρέθηκε ότι η BCAR3 εκφράζεται σε σύμπλοκο με την BCAR1 στην πλειονότητα αυτών των καρκινικών κυττάρων. Σε κύτταρα με χαμηλή μεταναστευτική δυνατότητα, η

υπερέκφραση της BCAR3 είχε ως αποτέλεσμα την ενισχυμένη μετανάστευση και συντοποθέτηση με την BCAR1 στην κυτταρική μεμβράνη. Αντίθετα, η μείωση της έκφρασης της BCAR3 από τις πιο επιθετικές κυτταρικές σειρές ανέστειλε τη μετανάστευση και διείσδυση, και προκάλεσε επανατοποθέτηση της BCAR1 μακριά από την κυτταρική μεμβράνη και ισχνή απόκριση στο ερέθισμα του EGF (Schrecengost et al., 2007). Τα δεδομένα αυτά οδήγουν στο συμπέρασμα ότι η πρωτείνη BCAR3 μπορεί να ρυθμίζει τη μετανάστευση καρκινικών κυττάρων του μαστού, τοποθετώντας την πρωτείνη BCAR1 στην κυτταρική μεμβράνη.




**Εικόνα 14: Δομικά χαρακτηριστικά και στοίχιση των πρωτεινών NSP1, NSP2/BCAR3, NSP3**. Δείχνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα όπως προκύπτουν από τα κλωνοποιημένα cDNA των πρωτεινών. Τα όρια της περιοχής SH2 και της περιοχής πλούσιας σε Pro/Ser (P/S rich region) υποδεικνύονται με γκρι χρώμα. (Lu et al., 1999b)

## Η πρωτείνη BCAR3 και οι μικρές GTPases: η εμπλοκή της BCAR1

Οι μικρές GTPases (small GTPases) είναι βασικοί ρυθμιστές της δυναμικής της ακτίνης. Η BCAR3 έχει βρεθεί να αυξάνει την κατάσταση ενεργοποίησης διάφορων μικρών GTPασών, όπως οι Rac1, Cdc42, R-Ras, RalA, και η Rap1 (Gotoh et al., 2000, Cai et al., 2003, Felekkis et al., 2005). Παρόλο που η καρβοξυτελική περιοχή της BCAR3 έχει χαμηλή ομολογία με την περιοχή GEF της Cdc25, παραμένει αδιευκρίνιστο εάν το μόριο έχει φυσική GEF ενεργότητα. Είναι πιθανό όμως, η BCAR3 να ενεργοποιεί τις παραπάνω GTPases, έμμεσα μέσω άλλων πρωτεινών GEF (Bos et al., 2001).

Σύμφωνα με την πρόσφατη μελέτη του Schrecengost και των συνεργατών του υποστηρίζεται ότι η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να γίνεται μέσω της BCAR1 και της αλληλεπιδρώσας με τη BCAR1, Crk, η οποία ενώνεται με τις πρωτείνες DOCK180 και C3G για να ενεργοποίησουν τις Rac1 και Rap1 αντίστοιχα (Feller et al., 2001). Στους ινοβλάστες, η Rap1 έχει δειχθεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην προώθηση της μετανάστευσης μέσω της BCAR3 (Riggins et al., 2003, Sakakiraba et al., 2002). Η πρωτείνη BCAR3 μπορεί να ενεργοποίησει αυτές τις μικρές GTPases ανεξάρτητα από την BCAR1. Παρόλο που τα δεδομένα του Schrecengost και των συνεργατών του υποστηρίζουν τη τοποθέτηση της BCAR1 από το κυτταρόπλασμα στην κυτταρική μεμβράνη, ως μία από τις λειτουργίες της BCAR3, δεν υπάρχουν στοιχεία ούτε για το μηχανισμό με τον οποίο η BCAR3 στοχεύεται στη μεβράνη, αλλά ούτε και για τη ρύθμιση αυτού του μηχανισμού. Στους ινοβλάστες, η μεμβρανική τοποθέτηση της BCAR3 θα μπορούσε να μη συνδέεται με την προώθηση της μετανάστευσης, καθώς μια μεταλλαγμένη μορφή της πρωτείνης που δεν έχει το καρβοξυτελικό άκρο συνεχίζει να το τοποθετείται στη μεμβράνη, αλλά δεν επάγει κυτταρική μετανάστευση (Riggins et al., 2003). Είναι ενδιαφέρον το εύρημα ότι μεταλλάγματα της BCAR3 που περιέχουν υποκατάσταση του συντηρημένου αμινοξέος Arg171(R171V) που βρίσκεται στην SH2 περιοχή, δεν τοποθετούνται στη μεμβράνη σε ινοβλάστες REF-52. Επομένως, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η SH2 περιοχή μπορεί να παίζει ρόλο στην κυτταρική τοποθέτηση της BCAR3. Οι ενεργοποιημένοι Eph υποδοχείς (κινάσες τυροσίνης) μπορούν να αλληλεπιδρούν με την SH2 περιοχή της πρωτείνης NSP1 και οι EGFR (υποδοχείς του EGF-κινάσες τυροσίνης) μπορούν να αλληλεπιδρούν με την SH2 περιοχή

της πρωτείνης NSP3 (Lu et al., 1999, Dail et al., 2004). Με βάση τα δεδομένα αυτά, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η τοποθέτηση της BCAR3 στη μεμβράνη γίνεται μέσω αλληλεπίδρασης με φωσφορυλιωμένους υποδοχείς τυροσίνης.

Η αρχική ανακάλυψη του BCAR3 ως γονίδιο ικανό για την επαγωγή της ανθεκτικότητας σε ταμοξιφένη ταιριάζει με τη μετέπειτα ανακάλυψη του ρόλου του ως ρυθμιστής της μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων του μαστού. Καρκινικά κύτταρα του μαστού που είναι ανθεκτικά στη ταμοξιφένη φαίνεται να διαθέτουν αυξημένη κινητικότητα και διεισδυτικότητα (Hiscox et al., 2004). Οι Yu και Feig έδειξαν ότι η υπερέκφραση της συστατικά ενεργής R-Ras, αλλά όχι των Ral ή Rap1, οδηγούν σε ανεξαρτησία από οιστρογόνα σε κύτταρα MCF-7 μέσω της σηματοδότησης PI3K **(**Phosphoinositide 3-kinases**)** και AKT (οικογένεια κινασών Ser/Thr) (Yu and Feig, 2002). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η υπερέκφραση της BCAR3 σε πλήρες μέγεθος (όχι οι ελλειματικές μορφές που δεν εκφράζουν την SH2 περιοχή ή την καρβοξυτελική περιοχή) επιτρέπουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων του μαστού ZR-75-1, παρουσία του φαρμάκου ICI 182,780 (ανταγωνιστής υποδοχέων οιστρογόνων), μέσω διαδικασίας που εξαρτάται από την ενεργοποίηση της Rac1 μέσω του μονοπατιού PI3K (Cai et al., 2003, Felekis et al., 2005). Η ενεργοποίηση της πρωτείνης Rac1, διαδικασία σημαντική για το σχηματισμό λαμελλιποδίων και μεμβρανικών πτυχώσεων, είναι συχνά συζευγμένη με αλληλεπιδράσεις με τη πρωτείνη BCAR1 (Klemke et al., 1998). Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η PI3K έχει διπλό ρόλο ως ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και κινητικότητας, εγείροντας την πιθανότητα ότι οι αλληλπιδράσεις PI3K/ BCAR1 μπορεί να συντελούν στη BCAR3-εξαρτώμενη ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης (Keely et al., 1997, Roymans and Slegers 2001, Samuels and Ericson 2006).

Επομένως, οι πρωτείνες BCAR3 και BCAR1, όπως η PI3K, μπορεί να έχουν διττές λειτουργίες στην προώθηση του αντιοιστρογονο-ανθεκτικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης. Μελλοντικές μελέτες είναι, λοιπόν, απαραίτητες για την ανακάλυψη αυτών των λειτουργιών σε κυτταρικές καλλιέργειες, μοντέλα ζώων που θα μελετούν την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση καθώς και σε ανθρώπινους όγκους.

**Η πρωτείνη BCAR3 και το μονοπάτι του TGF-β**

Μέχρι πρότινος, δεν είχε αναφερθεί εμπλοκή της πρωτείνης BCAR3 στο μονοπάτι του TGF-β. Το 2008 όμως βρέθηκε ότι το γονίδιο BCAR3 είναι ένας καινούριος άμεσος στόχος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β (Δρ. Βάσω Επισκόπου, Medical Research Council, Λονδίνο, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Όπως είναι φανερό, τα ερωτήματα που γεννώνται είναι πολλά. Ο ρόλος της πρωτείνης BCAR3 στον καρκίνο δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος και η εμπλοκή της στο μονοπάτι που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών εργαλείων στην καταπολέμηση του καρκίνου.

Η εξάρτηση των καρκινικών κυττάρων του μαστού από οιστρογόνα συνδέεται με τη σηματόδοτηση της προσκόλλησης: ERα-θετικές και αντιοιστρογονο-ευαίσθητες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού αναπτύσσονται ως σφιχτά δεμένα φύλλα του επιθηλίου με υψηλή προσκόλληση μέσω της E-cadherin. Αντίθετα, οι περισσότερες ERα-αρνητικές και αντιοιστρογονο-ανθεκτικές καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού έχουν μεσεγχυματικό πρότυπο κυτταρικής ανάπτυξης με απώλεια της έκφρασης της E-cadherin (Lacroix and Leclerq 2004). Με βάση το δεδομένο αυτό, μπορούμε να πούμε ότι σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT) (Εικόνα 13), όπως αυτό του TGF-β σε επιθηλιακές κυτταρικές σειρές θα μπορούσε να είναι αντικείμενο σημαντικής μελέτης. Έτσι, το εύρημα ότι το γονίδιο BCAR3 είναι στόχος του μονοπατιού του TGF-β είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον και χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

# ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

**Ερευνητικός στόχος 1**

Η κατασκευή και η ταυτοποίηση μεταλλαγών από τον Μάνο Σιδεράκη, στην περιοχή του linker της Smad3, στα συντηρημένα κατάλοιπα P229 και Q222 οδήγησαν στο συμπεράσμα ότι η μεταλλαγή Q222A έχει κατασταλτική δράση στο μόριο της Smad3 και η μεταλλαγή P229A μετατρέπει τη Smad3 σε αρνητικά επικρατούσα πρωτείνη. Ο πρώτος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη των μεταλλαγών αυτών *in vivo* με τη χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών.

**Ερευνητικός στόχος 2**

Η εισαγωγή του συστήματος της βιοτινυλίωσης σε ζώα είναι μια σημαντική πρόκληση. Η βασική αρχή του συστήματος είναι ότι πρωτείνες που εκφράζονται σε σύντηξη με τον επίτοπο bio βιοτινυλιώνονται *in vivo*, όταν συνεκφράζεται η βακτηριακή λιγάση BirA και μπορούν να απομονωθούν μέσω σφαιριδίων στρεπταβιδίνης-αγαρόζης, τα οποία αναγνωρίζουν το βιοτινυλιωμένο επίτοπο. Ο δέυτερος ερευνητικός στόχος ήταν να κατασκευαστούν αδενοϊοί που να εκφράζουν τη λιγάση βιοτίνης BirA και την αγρίου τύπου Smad3 που φέρει τον επίτοπο Bio και να ελεγχθεί η λειτουργικότητα του συστήματος σε κυτταροκαλλιέργειες.

**Ερευνητικός στόχος 3**

Η ανακάλυψη ότι το γονίδιο BCAR3 (Breast Cancer Anti-estrogen Resistance) είναι καινούριος άμεσος στόχος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β (Δρ. Βάσω Επισκόπου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) γεννά ερωτήματα για τη λειτουργία και τη ρύθμιση του γονιδίου. Ο τρίτος ερευνητκός σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της ρύθμισης και λειτουργίας του γονιδίου BCAR3.

# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

## ***Υλικά:***

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Πλασμίδια αναφοράς (Reporter plasmids): pGL3 basic BCAR3 promoter-luc
- Πλασμίδια συμπλήρωσης (Fill-up plasmids): ssDNA (salmon sperm DNA) της Gibco
- Πλασμίδια έκφρασης, σε ευκαρυωτικά κύτταρα, των πρωτεϊνών: pcDNAIII-Smad3-6myc, pAdTrack-CMV-Smad3-6myc, pAdTrack-CMV-bioSmad3, pAdTrack-CMV-P229ASmad3-6myc, pAdTrack-CMV-Q222ASmad3-6myc, pAdTrack-CMV-GFP, pAdTrack-CMV-BirA,

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη πραγματοποίηση των πειραματικών μεθόδων προέρχονται από τις εξής πηγές: Τα χημικά είναι από τη MERCK ή τη Sigma. Η αγαρόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS. Το θρεπτικό υλικό LB που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract της εταιρείας Difco. Τα ένζυμα περιορισμού, η Taq πολυμεράση, η η T4 DNA λιγάση και τα ρυθμιστικά τους διαλύματα προέρχονται από τις εταιρίες Minotech, New England Biolabs, ή Promega. Τα δεόξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia. Το αντιδραστήριο Trizol, που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του mRNA από ευκαρυωτικά κύτταρα, αγοράστηκε από την εταιρία Invitrogen. Η αντίστροφη μεταγραφάση (Superscript reverse transcriptase) και οι τυχαίοι εξαμερείς εκκινητές (random hexamer primers) που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) αγοράστηκαν από την Invitrogen. Η RnaseA και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma. Για την απομόνωση τμημάτων DNA από πηκτή αγαρόζης και την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν τα QIAquick Gel Extraction Kit της QiaGen, $C_{ONCERT}^{TM}$ Rapid Gel extraction System και $C_{ONCERT}^{TM}$ High Purity Plasmid Midiprep System της Gibco-BRL. Ο δείκτης μοριακού βάρους λBstEII κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από το Ι.Τ.Ε. (Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης). Ο δείκτης μοριακού βάρους για τη πηκτή πολυακρυλαμήδης είναι από την New England Biolabs. Στα πειράματα βιοτινυλίωσης χρησιμοποιήθηκαν

σφαιρίδια αγαρόζης που είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη (Streptavidin beads) και στρεπταβιδίνη ομοιοπολικά συζευγμένη με HRP (horseradish peroxidase) που αγοράστηκαν από την Sigma. Οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκαν από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Τα αντισώματα α-myc monoclonal (mouse), α-HA (mouse), και α-Smad3 (rabbit) είναι των εταιριών Sigma, Roche και Zymed Laboratories αντίστοιχα. Το αντίσωμα α-Adhexon5 (mouse) είναι από την εταιρία Chemicon. Τα δεύτερα αντισώματα α-mouse-FITC, α-mouse-HRP και α-rabbit-HRP είναι της εταιρίας Chemicon. Για την αυτοραδιογραφία χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Super Signal®West Pico Chemiluminesecent Substrate), ειδικό για την ανίχνευση του HRP, είναι της εταιρίας PIERCE και το υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (Kodak-Scientific Imaging Film) της εταιρείας Kodak. Τα αντιδραστήρια για τις κυτταροκαλλιέργειες (DMEM {Dulbecco's modified Eagle's medium}, FBS {Fetal Bovine Serum}, Τρυψίνη-EDTA, PBS, Πενικιλίνη – Στρεπτομυκίνη) είναι της Gibco-BRL. Το ONPG (ο-νιτροφαινυλο-γαλακτοπυρανοζίτης) που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma. Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστικότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega. Ο ανθρώπινος γενετικά ανασυνδυασμένος μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β1 (TGF-β1), που αποτελεί τον συνδέτη (ligand) των αντίστοιχων υποδοχέων TGF-βRI και TGF-βRII αγοράστηκε από την εταιρία R & D Systems. Όλα τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν, συντέθηκαν στο εργαστήριο Μικροχημείας του Ι.Τ.Ε. Τέλος, τα υπόλοιπα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από κοινές εμπορικές πηγές στην μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα.

## ***Μέθοδοι:***

**Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel).**

Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% και 2% (παρασκευαστικό gel). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής :

Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 150ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1,5 gr αγαρόζης. Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται 7,5 μl

βρωμιούχου αιθιδίου (χρωστική για το DNA), και εκχύνεται σε ειδικό εκμαγείο. Αφού το πήκτωμα στερεοποιηθεί, φέρεται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει 1x TAE ως ρυθμιστικό διάλυμα - φορέα της ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100 Volt, ενώ για την απομόνωση τμήματος DNA από παρασκευαστικό gel γίνεται στα 50 Volt. Ο δείκτης που χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των DNAs που ηλεκτροφορούμε, είναι το DNA του φάγου λ κομμένο με το περιοριστικό ένζυμο BstII. Τα μοριακά μεγέθη που παίρνουμε είναι (KD):8458, 7242, 6369, 5686, 4822/4327, 3675, 2322/1929, 1371/1264, 702/224/114. Τα DNAs φορτώνονται στη πηκτή μαζί με 1x loading buffer (6x= 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in H2O, 15% ficoll (type 400) in H2O.

**Πέψεις DNA με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών**

Σε πρώτο στάδιο, πραγματοποιούνται δοκιμαστικές πέψεις ως εξής: η ποσότητα DNA που κόβουμε είναι 1μg. Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιούμε είναι 10-12 u/μl και η συγκέντρωση ενζύμου που απαιτείται για αποτελεσματικό κόψιμο είναι 2x σε σχέση με τη ποσότητα του DNA. Τα ρυθμιστικά διαλύματα των ενζύμων είναι 10 φορές συγκεντρωμένα και η ποσότητα που χρησιμοποιούμε είναι ίση ή μεγαλύτερη με τα μl του ενζύμου. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10 φορές τα μl του ρυθμιστικού διαλύματος και συμπληρώνεται με ddH2O. Οι αντιδράσεις, για τα περισσότερα ένζυμα πραγματοποιούνται στους $37^0$C για 2h.

Για τις πέψεις μεγάλης κλίμακας, οι ποσότητες των DNAs που κόβουμε είναι 17μg του φορέα στον οποίο θέλουμε να ενθέσουμε ένα κομμάτι DNA, και 30μg από τα ενθέματα. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται, στην απαιτούμενη θερμοκρασία, για 16 ώρες (over night). Οι ποσότητες του ενζύμου και του ρυθμιστικού διαλύματος, υπολογίζονται με τον τρόπο που έχει είδη περιγραφεί.

(Τα ένζυμα πρέπει να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στο πάγο)

**Απομόνωση τμημάτων DNA.**

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) και τα ενθέματα (inserts), τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης, όπως περιγράφεται παραπάνω, και οι ζώνες

αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας. Ακολούθως, οι ζώνες τοποθετούνται σε κολώνες του QIAquick Gel Extraction Kit της Qiagen, οπότε ακολουθείται η προτεινόμενη από την κατασκευάστρια εταιρεία, πειραματική διαδικασία.

**Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction).**

Οι αντιδράσεις σύνδεσης έγιναν σε τελικό όγκο 10μl ή 20μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 200 ng. Για την αντίδραση απαιτείται το ένθεμα του DNA να είναι 3 με 4 φορές περισσότερο από το φορέα. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, 1μl από ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.

**Παρασκευή θρεπτικού μέσου LB για την ανάπτυξη στελεχών του βακτηρίου E.coli**

- ✓ LB για υγρή καλλιέργεια: 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1%NaCl. Αναδεύουμε το διάλυμα και αποστειρώνουμε το LB μέσα σε κωνική φιάλη.
- ✓ LB για στερεή καλλιέργεια: μετά την ανάδευση προσθέτουμε 1.5% άγαρ και μετά αποστειρώνουμε. Πριν στερεοποιηθεί το LB, το προσθέτουμε σε πιάτα Petri.

Για την επιλογή βακτηριακών αποικιών που φέρουν πλασμίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αμπικιλίνη, προσθέτουμε στο LB Amp 100μg/ml (τελική συγκέντρωση).

**Βακτηριακός μετασχηματισμός (transformation)**

Για το βακτηριακό μετασχηματισμό χρησιμοποιούμε τα στελέχη DH5α, DH10β και BL21 της *E.coli*, το (κύτταρα ικανά να μετασχηματιστούν, competent cells). Η διαδικασία έχει ως εξής: Τα competent στελέχη διατηρούνται στους -80$^0$C. Ξεπαγώνουμε τα κύτταρα στον πάγο και σε 100μl κυττάρων προσθέτουμε ~1μg από το DNA που θέλουμε να μεγαλώσουμε ή 10-15μl της αντίδρασης σύνδεσης. Αφήνουμε στον πάγο για 30min. Πραγματοποιούμε heat sock στους 42$^0$C για 45sec και τοποθετούμε ξανά στο πάγο για 2-3min. Προσθέτουμε, κοντά σε φλόγα, 900μl LB. Επωάζουμε στους 37$^0$C για 1h. Το τρυβλίο Perti με θρεπτικό LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη, όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37$^0$ C για να αποκτήσει

την κατάλληλη θερμοκρασία. Σε στείρες συνθήκες, απλώνουμε στα τρυβλία, με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου, 100μl από τα μετασχηματισμένα κύτταρα. Η επώαση γίνεται στους $37^0$C για 16 - 18 ώρες (over night).

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

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε 2 ml LB-ampicillin, για 16 -18 ώρες, στους $37^0$ C υπό συνεχή ανάδευση. Από κάθε καλλιέργεια λαμβάνεται 1,5 ml, φυγοκεντρείται σε 14000 rpm για 2 min, σε θερμοκρασία δωματίου και αφού αναρροφηθεί το υπερκείμενο με πιπέττα Pasteur υπό κενό, το κυτταρικό ίζημα επαναδιαλύεται σε 600μl διαλύματος λύσης (lysis buffer : 8% sucrose, 5% Triton-100x, 500mMEDTA pH8.0, 50mM Tris-HCl pH 7.5). Κατόπιν στα κύτταρα προστίθενται 20 μl λυσοζύμης (10 mg/ml) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Ακολουθεί βρασμός για 90 δευτερόλεπτα και μεταφορά των δειγμάτων σε πάγο. Το αποτέλεσμα της προαναφερθήσας διαδικασίας είναι η παραμονή του πλασμιδιακού DNA εν διαλύσει, ενώ οι μεμβράνες, οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA του βακτηριακού κυττάρου είναι δυνατό να κατακρημνιστούν. Για το σκοπό αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 14000 rpm για 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ίζημα (debris) απομακρύνεται με οδοντογλυφίδα, και το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με 600 μl παγωμένης ισοπροπανόλης. Τα δείγματα αφήνονται στους $-200^0$ C, για 30 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14000 rpm επί 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Το DNA κατακρημνίζεται ως ίζημα, εκπλένεται με 700 μl 75% αιθανόλης και φυγοκεντρείται στις 14000 rpm επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αναρρόφηση της αλκοόλης, τα δείγματα ξηραίνονται υπό κενό και το DNA επαναδιαλύεται σε 30 μl αποστειρωμένου nanopure νερού που περιέχει RNAse (10 mg/ml).

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

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν κολώνες Qiagen (Qiagen- tip 500), βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας. Το πλασμιδιακό

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

**Κυτταροκαλλιέργειες.**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές HEK911, HaCaT, HEK293T και HepG2 που προέρχονται από νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου, ανθρώπινα κερατινοκύτταρα, νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου και κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 $cm^2$ και 175 $cm^2$ και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα $37^0C$ και σε συνθήκες 5% $CO_2$ . Αποθέματα καλλιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία $-80^0C$ σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48 - 72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραίωση στις φλάσκες 1:10). Τα θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω κυτταρικές σειρές είναι το High Glucose 10% FBS [50ml=44ml DMEM (4500 Glucose), 1ml Penicillin /Streptomycin, 5ml FBS],

**Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).**

Οι παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης $Ca_3(PO_4)_2$ με τα εκάστοτε κατάλληλα και επιθυμητά πλασμίδια. Τα HaCaT και τα HEK293T αραιώνονται σε $2.5x10^5$ κύτταρα ανά well και σε $5x10^5$ κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και p100, ενώ τα HepG2 σε διπλάσιες ποσότητες αντίστοιχα, την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Τα κύτταρα μετρώνται με αιμοκυττόμετρο Neubauer, της εταιρείας Hauser Scientific. Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε 6-well (χρησιμοποιούνται στο luciferase assay) παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει συνήθως 2 μg πλασμιδίου αναφοράς, 6 μg πλασμιδίου έκφρασης ή/και πλασμιδίου συμπλήρωσης, 2

μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31μl $CaCl_2$ 2M και 195 μl $ddH_2O$ ($H_2O$ for injections). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 12 μg.
Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-100 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης, Western blotting) το μείγμα περιέχει μέχρι 30 μg πλασμιδίου έκφρασης, 31μl $CaCl_2$ 2M και ποσότητα $ddH_2O$ ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl.

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο Hepes Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mMHepes pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM $Na_2HPO_47H_2O$, 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους $37^0$ C για 16 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και συλλέγονται σε 300 μl διαλύματος λύσης (lysis buffer)-στην περίπτωση των πειραμάτων σε 6-wells- είτε σε 1 ml PBS -στην περίπτωση των πειραμάτων σε τρυβλία p-100 ή p-60. Στην πρώτη περίπτωση, οι κυτταρικές μεμβράνες κατακρημνίζονται με φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη δεύτερη περίπτωση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 min στους $4^0$C, και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο PBS (100-200 μl). Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία - $80^0$C.

**<u>Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal.</u>**

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για τον σκοπό αυτό το μείγμα περιέχει πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal). Σε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456 μl Sodium Phosphate buffer (0.1M pH 7.3), 132 μl ONPG (8 mg/ml σε 0.1 M Sodium Phosphate buffer), και 6 μl 100x salt (3M KCl, 1M $MgCl_2$, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd $H_2O$, τελικός όγκος 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο $37^0$ C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με

προσθήκη 200 μl διαλύματος $Na_2CO_3$ 1 M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

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

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον υποκινητή του πλασμιδίου αναφοράς, ως αποτέλεσμα της επιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης. Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστικότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly) και που, επίσης, εκφράζεται στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 60μl από τα 100μl επαναδιαλυμένου σε Tris-HCl pH 7,9 250mM κυτταρικού εκχυλίσματος και 60μl υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε δείγματος δίνεται από το λουμινόμετρο (Illuminometer) σε RLU/s.

**Πηκτή πολυακρυλαμίδης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών**

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο φάσεις:

- το stacking gel (6ml)=> 3,6ml $ddH_2O$, 0,9ml 30% ακρυλαμίδη, 1.5ml stacking buffer, 60μl 10% APS, 6μl TEMED.
- το running gel (10ml)=> 10,5%= 3,9ml $ddH_2O$, 3,5ml 30% ακρυλαμίδη, 2,5ml running buffer, 160μl 10% APS, 8μl TEMED

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε συσκευή Bio-Rad Protean electroblot στα 200V. Το ρυθμιστικό διάλυμα–φορέας μέσα στο οποίο τοποθετείται η Πηκτή για την ηλεκτροφόρηση είναι το 1xTGS [10x TGS (1L)= 30.3gr Tris, 144.2gr Glycine, 10gr SDS, pH 8.3]

Ο δείκτης που χρησιμοποιούμε για να υπολογίσουμε τα μεγέθη των πρωτεϊνών είναι ο Prestained Protein Marker (PPM). Τα μοριακά μεγέθη (KD) που παίρνουμε από

τον δείκτη είναι: PPM=175, 83, 62, 47.5, 32.5, 25, 16.5, 6.5. Οι πρωτεΐνες φορτώνονται στη πηκτή μαζί με 2x SDS Loading Buffer (τελική συγκέντρωση 1x)

*Διαλύματα*

- *30% ακρυλαμίδη= σε 100ml dd$H_2O$ προσθέτουμε 29gr acrylamide, 1gr bis-acrylamide και φιλτράρουμε (0,45 ή 0,22 μm).*
- *stacking buffer= 0,5M Tris, 0,4% w/v SDS, pH 6.8 φιλτράρουμε με φίλτρο 0,45 ή 0,22 μm.*
- *running buffer= 1,5M Tris, 0,4% w/v SDS, pH 8.8 φιλτράρουμε με φίλτρο 0,45 ή 0,22 μm.*
- *APS 10% (10ml)=1gr APS σε 1ml dd$H_2O$.*
- *Sample buffer 2x (10ml)= 0,625ml Tris 2M, 4ml SDS 10%, 0,4ml β-mercaptoethanol, 1ml Glycerol, 2mg Bromophenol Blue, 100mM DTT, pH 6.8*

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

Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση με την μέθοδο που έχει ήδη περιγραφεί. Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το 4X SDS Loading Buffer [2.5 ml Tris-HCl, 1.6 ml β-mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue]. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 8.5%, 10.5% ή 12.5%. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 grTris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 200 Volt και με χρήση της συσκευής Bio-Rad Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης με 1000 ml Transfer Buffer [700 ml H2O, 100 ml 10x TGS, 200 ml methanol].

Ακολουθεί χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Poinceau, έκπλυση με διάλυμα TBS-T [1x TBS, 0.05% Tween-20] [1 L 10x TBS: 90 gr NaCl, 250 ml Tris-HCl 2M pH 7.3] για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με έκπλυση με διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20] για 1 ώρα. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 16 ώρες (over night) στου $4^0$C με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα

TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, αραιωμένο 1: 10000 σε TBS-T, δευτερεύον αντίσωμα HRP, γίνεται και πάλι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης σε Fuji medical X-Ray film (Super RX) για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer: 100 mM2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) και επώαση στους $50^0$C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις και επωάσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

**<u>Μέθοδος απομόνωσης mRNA</u>**

Κύτταρα HepG2 ή HEK293T απλώνονται σε πιάτα p-60s. Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας (επιμόλυνση ή επώαση με κάποιο παράγοντα), ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 1ml Trizol. Μετά την ομογενοποίηση των κυττάρων, το εκχύλισμα συγκεντρώνεται σε epp των 2ml. Στη συνέχεια προθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο ($CHCl_3$) και αναδεύουμε ισχυρά (vortex) για 10sec. Το μείγμα αφήνεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 15min, στους $4^0$C. Μετά τη φυγοκέντρηση σχηματίζονται δύο φάσεις, η ανόργανη (πάνω φάση) και η οργανική (κάτω φάση). Μεταφέρουμε την ανόργανη φάση (~500μl) σε ένα 1,5ml epp και προσθέτουμε 500μl ισοπροπανόλης. Αναδεύουμε ελαφρά και αφήνουμε για 10 λεπτά σε RT. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 15min, στους $4^0$C. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και ξεπλένουμε με 1ml 75% αιθανόλη (EtOH). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000rpm, για 15min, στους $4^0$C. Αφαιρούμε την EtOH και στεγνώνουμε το ίζημα του RNA. Επαναδιαλύουμε το RNA σε 50μl $ddH_2O$. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του RNA με τη

φωτομέτρησή του στα 260nm. Κατα τη διαδικασία που περιγράφηκε θα πρέπει να τηρούνται στείρες συνθήκες.

**RT-PCR (reverse transcriptase-PCR) και δημιουργία cDNA**

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό του mRNA, ακολουθεί το η αντίδραση για το RT-PCR.

RNA (200μg/μl) -> 5μl

Random Primers (100ng/μl) -> 3μl

dNTPs (2μM) -> 5μl

$ddH_2O$ -> 21μl

5 λεπτά στους $65^0$C. Άμεση τοποθέτηση στο πάγο. Στη συνέχεια προσθέτουμε:

5x First Strand Buffer ->10μl

0,1M DTT -> 5μl

2 λεπτά στους $25^0$C. Στη συνέχεια προσθέτουμε το ένζυμο:

Super Script II RT -> 1μl

50μl

Το πρόγραμμα που ακολουθείτε στη συνέχεια είναι

10min στους $25^0$C

50min στους $42^0$C

15min στους $70^0$C

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του mRNA τον διαφόρων γονιδίων που εξετάσαμε παρουσιάζονται στον **πίνακα 1:**

| | **Primers** | **Size of product** |
|---|---|---|
| **BCAR3** | **5'primer:** ggatccacatcttctggacccaactg | 450bp |
| | **3' primer:** ggttgattttgaagtgctgacgaggtt | |

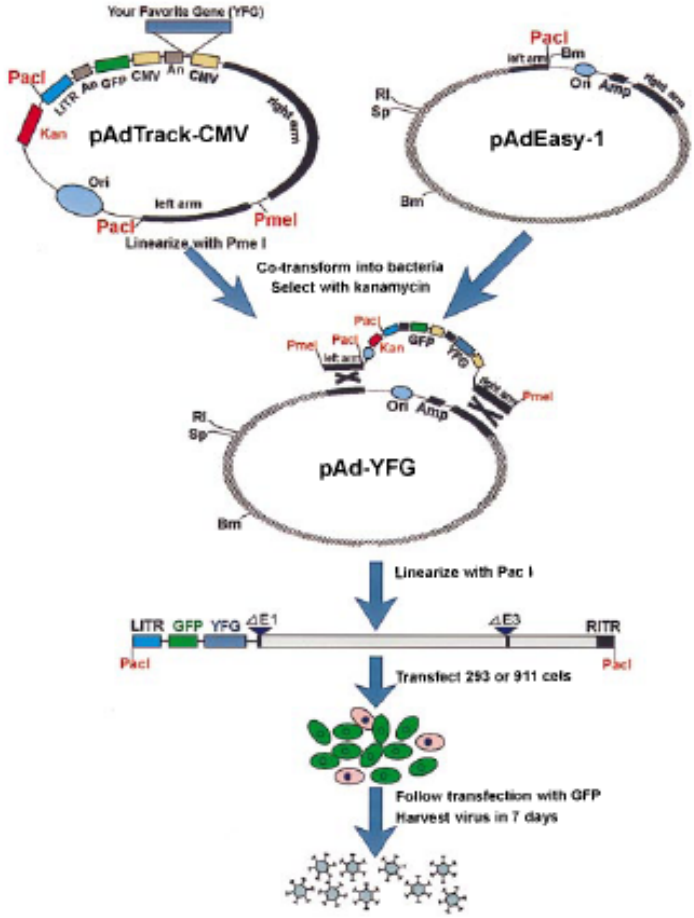
**Πίνακας 1:** Τα ζευγάρια των εκκινητών που κατασκευάστηκαν για την αντιδράσεις RT-PCR και την ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου BCAR3.

**Απομόνωση πρωτεϊνών με τη χρήση του Trizol**

Κατά την απομόνωση mRNA και μετά την απομάκρυνση της ανόργανης φάσης, μπορούμε να κρατήσουμε την οργανική φάση για να απομονώσουμε πρωτεΐνες. Η διαδικασία πραγματοποιείται βάση του πρωτοκόλλου που προτείνει το εγχειρίδιο του αντιδραστηρίου του Trizol.

**Παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοικών πλασμιδίων σε κύτταρα *E.coli***

Για την παραγωγή των αδενοικών πλασμιδίων η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ακόλουθη: 1) Ένθεση του κάθε γονιδίου στο φορέα pAdTrack-CMV, 2) Έλεγχος της έκφρασης του κάθε γονιδίου με κυτταρική επιμόλυνση και Western blotting, 3) Ευθυγράμμιση του pAdTrack-CMV-γονίδιο με PmeI, 4) Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BJ που φέρουν το φορέα pAdEasy με το pAdTrack-CMV-γονίδιο, ώστε να επιτευχθεί ομόλογος ανασυνδυασμός των δύο πλασμιδίων, 5) Οι θετικοί κλώνοι (pAd-γονίδιο) έχουν αντίσταση στην καναμυκίνη και ανιχνεύονται με πέψη με PacI. Μετά την πέψη προκύπτει χαρακτηριστική ζώνη 3kb ή 4.5kb, 6) Ευθυγράμμιση του pAd-γονίδιο με PacI, 7) Επιμόλυνση κυττάρων HEK293T ή 911, 8) Συλλογή του ιικού διαλύματος. (Εικόνα 15).




**Εικόνα 15 : Σχηματική αναπαράσταση του AdEasy συστήματος.** (He at al., 1997).

**<u>Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών</u>**

Περίπου $1.5x10^6$ κύτταρα (HEK293 ή 911) τοποθετούνται 24 ώρες πριν την επιμόλυνση σε τρυβλίο p-100 ή φλάσκα των $25cm^2$. Για κάθε επιμόλυνση χρειάζονται 4μg από τον ανασυνδυασμένο αδενοιικό φορέα (κομμένο με PacI και καθαρισμένο). Το μείγμα της επιμόλυνσης περιέχει 4μg από τον ανασυνδυασμένο αδενοιικό φορέα και 20μl λιποφεκταμίνης (Life technologies), σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας. Μετά την επώαση του μείγματος για 15-20min σε θερμοκρασία δωματίου, το μείγμα επιμόλυνσης προστίθεται στα κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται στους $37^0C$ και την επόμενη μέρα ελέγχονται σε ανάστροφο μικροσκόπιο για έκφραση GFP πρωτείνης. Τα κύτταρα μαζεύονται μετά από 7-10 μέρες όποτε και θα έχοπθν λυθεί πλήρως. Τα λυμένα

κύτταρα φυγοκεντρούνται στις 30.000rpm, για 10min, στους $4^0$C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και υφίσταται τρείς κύκλους παγώματος-ξεπαγώματος (freeze-and-thaw). Κατά τη διαδικασία αυτή, παγώνουμε το υπεκείμενο στους $-80^0$C και στη συνέχεια το ξεπαγώνουμε γρήγορα τοποθετώντας το σε υδατόλουτρο των $37^0$C. Στη συνέχεια, με 1ml από το ιικό υπερκείμενο μολύνουμε φλάσκα των 175cm$^2$. Η αποτελεσματικότητα αυτών των μολύνσεων μπορεί κάθε φορά εύκολα να ελεγχθεί με τη χρήση του ανάστροφου μικροσκοπίου και έλεγχο για έκφραση GFP πρωτείνης. Δύο ημέρες μετά και αφού τα κύτταρα στη φλάσκα θα έχουν λυθεί πλήρως, μαζεύονται με το τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω. Στη συνέχεια, μολύνουμε 4 φλάσκες των175cm$^2$ με το ιικό υπερκείμενο. Στο σημείο αυτό μαζεύουμε τα κύτταρα όταν δεν έχουν λυθεί πλήρως, αλλά έχει αλλάξει η μορφολογία τους λόγω της μόλυνσης. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 16.000-18.000rpm, για 10min, στους $4^0$C. Κρατούμε το ίζημα από την κάθε φλάσκα (που περιέχει τα κύτταρα με το ιό) και επαναδιαλύουμε σε τελικό όγκο 1ml DMEM 2%HS (DMEM High Glucose, 2% Horse Serum, 1% Penicillin /Streptomycin). Ακολουθούν τρεις κύκλοι παγώματος-ξεπαγώματος και φυγοκέντρηση στις 30.000rpm, για 10min, στους $4^0$C. Κρατούμε το ιικό υπερκείμενο και το μοιράζουμε σε aliquots, τα οποία φυλάσσουμε στους $-80^0$C.

**Μέτρηση σχηματισμού ιικών πλακών (plaque assay)**

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του ιικού τίτλου και βασίζεται στη μέτρηση της ικανότητας ενός μολυσματικού ιού να σχηματίζει μια πλάκα σε κορεσμένη μονοστιβάδα καλλιέργεια κυττάρων. Η πλάκα είναι το αποτέλεσμα της μόλυνσης ενός κυττάρου από ένα ιικό μόριο και στη συνέχεια πολλαπλασιασμού του ιού αυτού με τελική θανάτου του κυττάρου. Η μέτρηση της ικανότητας του ιού να μολύνει μετριέται σε pfu (plaque- forming unit, ο αριθμός των πλακών που σχηματίζονται από 1 μονάδα ιού).

Για κάθε ιό που θέλουμε να τιτλοδοτήσουμε, βάζουμε ένα 6-well με κύτταρα HEK293T ή HEK911, μία μέρα πριν την εφαρμογή της τεχνικής. Τοποθετούμε συνήθως 7x$10^5$ κύτταρα ανά well. Την επόμενη μέρα, ετοιμάζουμε διάλυμα αγαρόζης και το τοποθετούμε σε υδατόλουτρο των $55^0$C. Ετοιμάζουμε 10ml μείγματος θρεπτικού

(medium mix) για κάθε ιό που θέλουμε να τιτλοδοτήσουμε και το τοποθετούμε σε υδατόλουτρο των $55^0$C. Στη συνέχεια, ετοιμάζουμε τις ιικές αραιώσεις σε θρεπτικό μέσο DMEM 2% HS. Κάνουμε πέντε αραιώσεις: $1^η$ αραίωση: τοποθετούμε 50μl ιού σε 950μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, $2^η$ αραίωση: τοποθετούμε 10μl από την$1^η$ αραίωση σε 990μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, $3^η$ αραίωση: τοποθετούμε 10μl από την$2^η$ αραίωση σε 990μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, $4^η$ αραίωση: τοποθετούμε 300μl από την$3^η$ αραίωση σε 2700μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, $5^η$ αραίωση: τοποθετούμε 300μl από την $4^η$ αραίωση σε 2700μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε. Για το πείραμα θα χρησιμοποίησουμε μόνο τις δύο τελευταίες αραιώσεις. Για κάθε αραίωση θα χρησιμοποιήσουμε 2 wells (2 wells για την $4^η$ και 2 wells για την $5^η$ αραίωση). Αφαιρούμε το θρεπτικό από το 6-well και τοποθετούμε 1ml ανά well από την $4^η$ και $5^η$ αραίωση. Χρησιμοποιούμε 2 wells ως τυφλό (blank) τοποθετώντας από1ml θρεπτικού DMEM 2% HS. Επωάζουμε τα κύτταρα για 15min στους $37^0$C. Στο μεταξύ, αναμιγνύουμε 10ml από το μείγμα θρεπτικού και 10ml από το διάλυμα αγαρόζης και τοποθετούμε πάλι (μείγμα αγαρόζης-θρεπτικού) στους $55^0$C. Μετά το πέρας των 15min, αφαιρούμε τις αραιώσεις και το θρεπτικό (blank) και τοποθετούμε 3ml ανά well από το μείγμα αγαρόζης-θρεπτικού. Τα κύτταρα επωάζονται στους $37^0$C, σε συνθήκες 5% $CO_2$. Μετά από 8-10 μέρες, είναι δυνατή η παρατήρηση και μέτρηση των πλακών στο ανάστροφο μικροσκόπιο.

Ο τίτλος του ιού σε pfu/ml= πλάκες που μετρήθηκαν x $10^6$/50 (50μl ήταν η αρχική ποσότητα ιού που χρησιμοποιήσαμε για τις αραιώσεις.

<u>*Διαλύματα*</u>

- *10ml μείγμα θρεπτικού (medium mix): 250μl $MgCl_2$, 400μl HS, 9.35ml 2xMEM.*
- *1.5% διάλυμα αγαρόζης: για 100ml,προσθέτουμε σε 96ml $H_2O$, 1.5g αγαρόζης, 4ml Hepes 1M pH 7.4. Αποστειρώνουμε το διάλυμα και το διατηρούμε στους $4^0$C.*

**Μέθοδος μέτρησης σχηματισμού φθορίζοντων ικών στιγμάτων (fluorescence forming assay)**

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για την τιτλοδότηση ενός ιού. Έχει την ίδια χρήση με την παραπάνω τεχνική (plaque assay), είναι όμως πιο σύντομη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για ιούς που δεν εκφράζουν την GFP πρωτείνη. Στη τεχνική αυτή δε μετρούμε πλάκες αλλά στίγματα (spots) που έχει σχηματίσει ο ιός. Η μέτρηση της ικανότητας του ιού να μολύνει μετριέται σε ffu (fluorescent- forming unit, ο αριθμός των φθορίζοντων στιγμάτων που σχηματίζονται από 1 μονάδα ιού).

Η τεχνική έχει διάρκεια 4 μέρες και μπορούμε να μετρήσουμε τα φθορίζοντα στίγματα και κατά συνέπεια, τον τίτλο του ιού, την $4^{η}$ μέρα. Πρώτη μέρα: Για κάθε ιό που θέλουμε να τιτλοδοτήσουμε, χρησιμοποιούμε τρία ειδικά τρυβλία p-60. Καλύπτουμε το κάθε τρυβλίο με 1ml (25μg/ml) κολλαγόνου και αφήνουμε τα τρυβλία στην απαγωγό για 30min. Στη συνέχεια, απομακρύνουμε το κολλαγόνο και το φυλλάσουμε στους $4^0$C. Αφήνουμε τα τρυβλία ανοιχτά στη απαγωγό για 1h. Λίγο πρίν το πέρας της μιας ώρας, φτιάχνουμε διάλυμα από HEK911 κύτταρα σε θρεπτικό μέσο DMEM 10% FBS [50ml=44ml DMEM (4500 Glucose), 1ml Penicillin /Streptomycin, 5ml FBS]. Μια κορεσμένη φλάσκα των 75$cm^2$ είναι αρκετή για 10 τρυβλία. Με το πέρας της μιας ώρας, μεταφέρουμε 1ml από το διάλυμα κυττάρων και 1ml θρεπτικού μέσου DMEM 10% FBS ανά τρυβλίο. Τα κύτταρα επωάζονται στους $37^0$C και συνθήκες 5% $CO_2$. Δεύτερη μέρα: Ετοιμάζουμε ικές αραιώσεις σε θρεπτικό μέσο DMEM 10% FBS. Φτιάχνουμε αραιώσεις $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$ και θα χρησιμοποιήσουμε τις τρεις τελευταίες. Αραίωση $10^{-2}$ : τοποθετούμε 10μl ιού σε 990μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, αραίωση$10^{-3}$ : τοποθετούμε 120μl από την αραίωση$10^{-2}$ σε 1080μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, αραίωση$10^{-4}$ : τοποθετούμε 120μl από την αραίωση$10^{-3}$ σε 1080μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, αραίωση$10^{-5}$ : τοποθετούμε 120μl από την αραίωση$10^{-4}$ σε 1080μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε, αραίωση$10^{-6}$ : τοποθετούμε 120μl από την αραίωση$10^{-5}$ σε 1080μl θρεπτικού μέσου και αναμιγνύουμε. Στη συνέχεια, αφαιρούμε το θρεπτικό μέσο από τα τρυβλία p-60 και προσθέτουμε 1ml σε κάθε τρυβλίο από την κάθε αραίωση $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$. Επωάζουμε τα κύτταρα στους $37^0$C και συνθήκες 5% $CO_2$ για 2h. Μετά το πέρας των δύο ωρών, αφαιρούμε το ικό διάλυμα από κάθε τρυβλίο και ξεπλένουμε με 1ml θρεπτικού μέσου. Τέλος, προσθέτουμε 2ml

θρεπτικού μέσου ανά τρυβλίο. Τα κύτταρα επωάζωνται για 48h στους $37^0$C, σε συνθήκες 5% $CO_2$. Τέταρτη μέρα: Απομακρύνουμε το θρεπτικό από τα τρυβλία. Ξεπλένουμε με 1ml 1x PBS και αφήνουμε τα τρυβλία ανοιχτά στην απαγωγό για 15-25mins. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 1ml 4% Paraformaldehyde (PFA) ανά τρυβλίο και αφήνουμε στην απαγωγό για 2mins. Ξεπλένουμε με 1ml 1x PBS. Στο σημείο αυτό, εάν ο ιός που θέλουμε να τιτλοδοτήσουμε εκφράζει τη GFP πρωτείνη, μπορούμε να μετρήσουμε τις φθορίζοντες κηλίδες στον ανάστροφο μικρόσκοπιο και να υπολογίσουμε το ffu του ιού. Σε αντίθετη περίπτωση συνεχίζουμε τη διαδικασία. Ξεπλένουμε με 1ml 1x PBS Tween 0.05%. Προσθέτουμε σε κάθε τρυβλίο 650μl από το αντίσωμα Adhexon5 antibody (mouse) και επωάζουμε για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ξεπλένουμε δύο φορές με 1ml 1x PBS και μία φορά με 1ml 1x PBS Tween 0.05%. Προσθέτουμε σε κάθε τρυβλίο 50μl από το anti-mouse FITC (1:50 αραίωση). Καλύπτουμε τα τρυβλία με αλουμινόχαρτο και επωάζουμε για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της μιας ώρας, ξελπένουμε δύο φορές με 1ml 1x PBS και αφήνουμε το PBS στα τρυβλία. Μετρούμε τις φθορίζουσες κηλίδες στο ανάστροφο μικροσκόπιο.

Ο τίτλος του ιού σε ffu/ml= φθορίζοντες κηλίδες που μετρήθηκαν x 200 (εμβαδόν του κάθε τετραγώνου είναι 0.04$cm^2$ και το εμβαδόν του τρυβλίου είναι 8$cm^2$) x $10^6$

*Διαλύματα*

- *Κολλαγόνο: αραίωση, από αρχικό stock 2mg/ml, 25μg/ml σε οξικό οξύ (αραιωμένο σε WFI)*

## ***Πλασμιδιακές κατασκευές***

**pAdTrackCMV-P229ASmad3-6myc**

Για τη κατασκευή του ανασυνδυασμένου αδενοιικού φορέα χρειάστηκε να πάρουμε το ένθεμα P229ASmad3-6myc από το φορέα pCDNAIII (Μάνος Σιδεράκης). Το ένθεμα απομονώθηκε μετά τη πέψη του φορέα pCDNAIII με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και NotI. Με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήσαμε και τις διαδοχικές πέψεις για τον φορέα pAdTrackCMV. Ακολούθησε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος-φορέα, επιλογή των

θετικών αποικιών βάσει του πρωτοκόλλου που έχουμε περιγράψει παράπανω και συνέχεια της διαδικασίας «Παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοικών πλασμιδίων σε κύτταρα *E.coli*» (ευθυγράμμιση του θετικού κλώνου με το ένζυμο PmeI, μετασχηματισμός σε κύτταρα BJ, επιλογή των θετικών κλώνων μετά από πέψη με το ένζυμο PacI, ευθυγράμμιση με το ένζυμο PacI).

**pAdTrackCMV-Q222ASmad3-6myc**

Για τη κατασκευή του ανασυνδυασμένου αδενοιικού φορέα χρειάστηκε να πάρουμε το ένθεμα Q229ASmad3-6myc από το φορέα pCDNAIII (Μάνος Σιδεράκης). Το ένθεμα απομονώθηκε μετά τη πέψη του φορέα pCDNAIII με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και NotI. Με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήσαμε και τις διαδοχικές πέψεις για τον φορέα pAdTrackCMV. Ακολούθησε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος-φορέα, επιλογή των θετικών αποικιών σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία.

**pAdTrackCMV-Smad3-6myc**

Για τη κατασκευή του ανασυνδυασμένου αδενοιικού φορέα χρειάστηκε να πάρουμε το ένθεμα Smad3-6myc από το φορέα pDEF3. Το ένθεμα απομονώθηκε μετά τη πέψη του φορέα pDEF3 με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και SlaI. Με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήσαμε και τις διαδοχικές πέψεις για τον φορέα pAdTrackCMV. Ακολούθησε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος-φορέα, επιλογή των θετικών αποικιών σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία.

**pAdTrackCMV-bioSmad3**

Για τη κατασκευή του ανασυνδυασμένου αδενοιικού φορέα χρειάστηκε να πάρουμε το ένθεμα bioSmad3 από το φορέα pCDNAIII. Το ένθεμα απομονώθηκε μετά τη πέψη του φορέα pCDNAIII με τα περιοριστικά ένζυμα KpnI και NotI. Με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήσαμε και τις διαδοχικές πέψεις για τον φορέα pAdTrackCMV.

Ακολούθησε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος-φορέα, επιλογή των θετικών αποικιών σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία.

**pAdTrackCMV-BirA**

Το ένθεμα της κατασκευής αυτής είχε ήδη απομονωθεί από γενωμικό DNA και έτσι, εμείς πραγματοποιήσαμε διαδοχικές πέψεις με τα ένζυμα KpnI και NotI. Με τα ίδια ένζυμα πραγματοποιήσαμε και τις διαδοχικές πέψεις για τον φορέα pAdTrackCMV. Ακολούθησε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος-φορέα, επιλογή των θετικών αποικιών σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία.

**pAdTrackCMV-GFP**

Ο φορέας αυτός δεν κατασκευάστηκε από εμάς από την αρχή. Μας δόθηκε στο στάδιο (2) της διαδικασίας «Παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοικών πλασμιδίων σε κύτταρα *E.coli*», και επομένως χρειάστηκε να κάνουμε ευθυγράμμιση του αδενοϊκού φορέα με το ένζυμο PmeI, να τον μετασχηματίσουμε σε κύτταρα BJ, να επιλέξουμε τους θετικούς κλώνους μετά από πέψη με το ένζυμο PacI, και τέλος να ευθυγραμμίσουμε το φορέα με το ένζυμο PacI.

**pGL3basic-BCAR3 (-1100/-29)-luc**

Για τη κατασκευή του πλασμιδίου αναφοράς που φέρει μέρος της περιοχή του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου του BCAR3 χρησιμοποιηθήκαν οι εκκινητές που φαίνονται παρακάτω

**KpnI -1100**

5' primer: **CGGGGTACC**cctgaccaaaatggtgaacccgtct

**HindIII -29**

3' primer:**CCCAAGCTT**ggagctggggacgctcatggt

Με τη χρήση γενομικού DNA από κύτταρα HepG2, που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR και το προϊόν απομονώθηκε βάσει των πρωτοκόλλων που περιγράφηκαν προηγουμένως. Ακολούθησαν οι πέψεις του προϊόντος, αλλά και του φορέα pGL3-basic με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα. (KpnI και HindIII). Πραγματοποιήθηκε αντίδραση ligation μεταξύ ενθέματος και φορέα. Οι θετικές κατασκευές επιλέχτηκαν βάση μίας διαγνωστικής πέψης με KpnI και HindIII.

# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Ερευνητικός στόχος 1: Μελέτη της σημασίας των μεταλλαγμένων μορφών (P229A, Q222A) στην περιοχή του linker της Smad3 πρωτείνης *in vivo* μέσω χρήσης ανασυνδυασμένων αδενοϊών.**

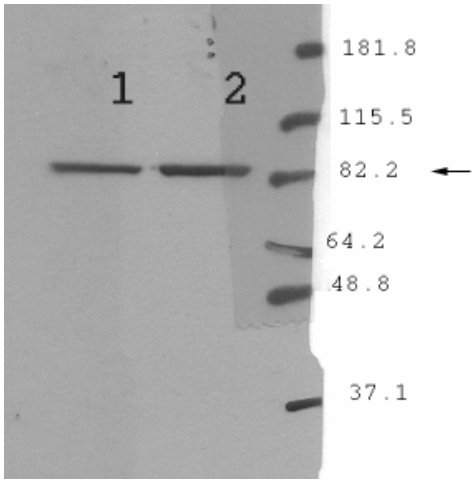
**Μέρος 1$^{ο}$: Παραγωγή, τιτλοδότηση και έλεγχος έκφρασης των ανασυνδυασμένων ιών AdSmad3(P229A)-6myc, AdSmad3(Q222A)-6myc, AdSmad3-6myc, AdbioSmad3, AdGFP, AdALK5 και AdlacZ**

Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί AdSmad3(P229A)-6myc και AdSmad3(Q222A)-6myc παρήχθησαν όπως περιγράφεται στην ενότητα: «Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών». Και οι δύο ιοί εκφράζουν την πρωτείνη GFP και έτσι, η τιτλοδότησή τους έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο «Μέτρηση σχηματισμού ιικών πλακών (plaque assay)». Ο τίτλος του ιού AdSmad3(P229A)-6myc σε pfu (plaque forming units)/ml ήταν $10^5$. Ο τίτλος του ιού AdSmad3(Q222A)-6myc σε pfu/ml ήταν $1.2*10^5$. Τα πειράματα που διεξάγαμε έγιναν κατά κύριο λόγο σε κερατινοκύτταρα HaCaT. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι τα κύτταρα HaCaT μολύνονται από αδενοιούς με MOI (Multiplicity Of Infection, ο λόγος του ιού προς το στόχο της μόλυνσης, το κύτταρο) 50-200. Γνωρίζοντας τον τίτλο του κάθε ιού και το MOI, ήμασταν σε θέση να υπολογίσουμε πόση ποσότητα από κάθε ιό θα χρησιμοποίησουμε σε κάθε πείραμα, κάνοντας χρήση του τύπου:

| |
|---|
| Για MOI=100 -> 100(MOI)*300000 (αριθμός κυττάρων που θα μολύνουμε)/ pfu/ml=ποσότητα που θα χρησιμοποίησουμε από κάθε ιό σε ml. |

Για να επιβεβαιώσουμε την έκφραση της κάθε πρωτείνης από τους αντίστοιχους ανασυνδυασμένους αδενοϊούς, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot), κάνοντας χρήση μονοκλωνικού αντισώματος που αναγνωρίζει τον επίτοπο 6myc με τον οποίο είναι σημασμένες όλες οι Smad πρωτεϊνες στο N-

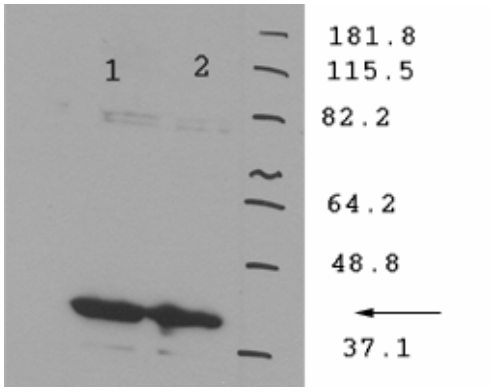
τερματικό τους άκρο . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16, η πρωτείνη **Smad3(P229A)-6myc** εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα όταν κύτταρα HaCaT μολύνθηκαν με τον αντίστοιχο αδενοϊό με MOI=50 και MOI=100. Επομένως, για τα πειράματά μας, επιλέξαμε να μολύνουμε κύτταρα HaCaT με τον ιό AdSmad3(P229A)-6myc με MOI=50.




**Εικόνα 16**: **Ανάλυση της έκφρασης της πρωτείνης Smad3(P229A)-6myc** με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα α-myc**.** Κύτταρα HaCaT μολύνθηκαν με τον ιό AdSmad3(P229A)-6myc με MOI=50 (1) και MOI=100 (2). Η θέση της πρωτείνης **Smad3(P229A)-6myc** δείχνεται με το βέλος.

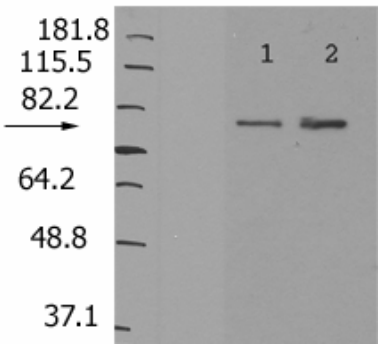
Οπως έχει περιγραφή στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι», όλοι οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που δημιουργούνται με το σύστημα AdEasy φέρουν στο γονιδίωμά τους και το γονίδιο GFP (Εικόνα 15). Η έκφραση της πρωτεϊνης GFP από τον ιό βοηθά στην επιβεβαίωση της μόλυνσης των κυττάρων χρησιμοποιώντας μικροσκοπία φθορισμού. Ελέγξαμε την έκφραση της πρωτείνης GFP που παράγεται από τον αδενοϊό **AdSmad3(P229A)-6myc**, χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-GFP. Όπως φαίνεται στην

Εικόνα 17, η πρωτείνη GFP εκφράζεται εξίσου καλά σε κύτταρα HaCaT τα οποία είχαν μολυνθεί τόσο με MOI=50 όσο και με MOI=100 από τον αδενοϊό **AdSmad3(P229A)-6myc**.

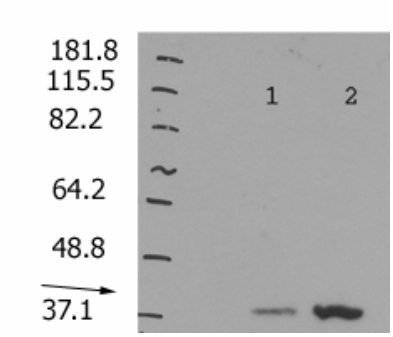



**Εικόνα 17**: **Ανάλυση της έκφρασης της GFP σε κύτταρα HaCaT που μολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdSmad3(P229A)- 6myc** με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας α-GFP. Η πρωτείνη GFP εκφράζεται στα κύτταρα και όπως φαίνεται, δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση ανάμεσα στις δύο διαφορετικές ποσότητες του ιού, με MOI=50 (2) και MOI=100 (1). Με βέλος δείχνεται η θέση της πρωτείνης GFP.

Η ίδια διαδικασία έγινε και για τον ιό **AdSmad3(Q222A)-6myc** όπου μελετήθηκε η έκφραση τόσο της πρωτείνης Smad3(Q222A) (Εικόνα 18) όσο και της GFP (Εικόνα 19).



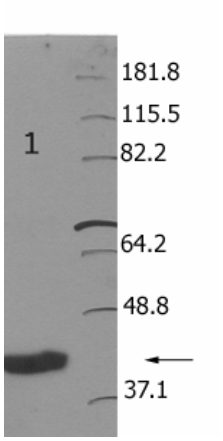

**Εικόνα 18**: **Ανάλυση της έκφρασης της πρωτείνης Smad3(Q222A)-6myc** με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα α-myc. Κύτταρα HaCaT μολύνθηκαν με τον ιό AdSmad3(Q229A)-6myc με MOI=50 (1) και MOI=100 (2). Ο ιός εκφράζεται στα κύτταρα σε διαφορετικά επίπεδα στις δύο συγκεντρώσεις. Το βέλος δείχνει την θέση της πρωτεϊνης Smad3(Q222A)-6myc.




**Εικόνα 19**: **Ανάλυση της έκφρασης της GFP σε κύτταρα HaCaT που μολύνθηκαν με τον ιό AdSmad3(Q222A)-6myc** με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-GFP. Η μόλυνση έγινε με MOI=50 (1) και MOI=100 (2). Το βέλος δείχνει την θέση της πρωτεΐνης GFP.

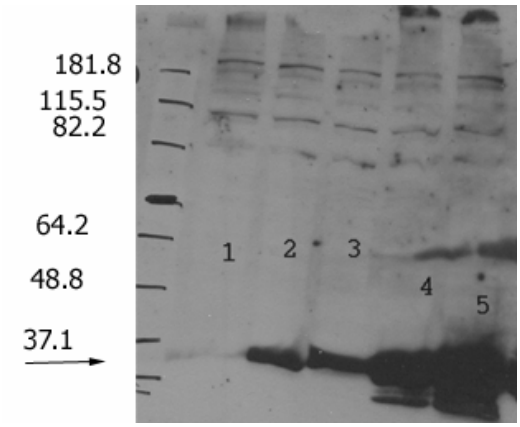
Στα πειράματα που θα περιγραφούν παρακάτω, ως αγρίου τύπο Smad3 χρησιμοποιήσαμε μια Smad3 πρωτεΐνη η οποία ήταν σημασμένη με τον επίτοπο Bio. Ο αδενοϊός AdbioSmad3(wt) δημιουργήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία «Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών». Ο τίτλος του ιού AdbioSmad3 σε pfu/ml ήταν $1.1*10^5$ και υπολογίστηκε σύμφωνα με τη διαδικασία «Μέτρηση σχηματισμού ιικών πλακών (plaque assay)». Πειράματα που θα περιγραφούν παρακάτω έδειξαν ότι η πρωτείνη AdbioSmad3 εκφράστηκε σε επαρκή ποσότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μόλυνση κυττάρων HaCaT με τον ιό AdbioSmad3(wt) έγινε με MOI=100.

Το ίδιο επαρκώς εκφράζεται και η πρωτείνη GFP που εκφράζει ο ιός AdbioSmad3 (Εικόνα 20). Η πρωτείνη GFP εκφράζεται κανονικά όταν κύτταρα HaCaT μολυνθούν με MOI=100. Για τα πειράματά μας, θα μολύνουμε κύτταρα HaCaT με τον ιό AdbioSmad3 με MOI=100.




**Εικόνα 20**: **Ανάλυση της έκφρασης της GFP σε κύτταρα HaCaT που μολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdbioSmad3** με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-GFP. Η μόλυνση έγινε με MOI=100. Το βέλος δείχνει την θέση της πρωτεΐνης GFP.

Ως αδενοιό αρνητικού ελέγχου (negative control) στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ο αδενοϊός **AdGFP** ο οποίος εκφράζει μόνο την πράσινη φθορίζουσα πρωτεϊνη. Όπως αναφέρθηκε και στην ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι-Πλασμιδιακές κατασκευές», μεγαλώσαμε τον ιό AdGFP σε κύτταρα 911 και υπολογίσαμε τον τίτλο του. Η τιτλοδότησή του έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο «Μέτρηση σχηματισμού ιικών πλακών (plaque assay)» και μετρήθηκε ως $4.5*10^5$ pfu/ml. Στη συνέχεια, για να δούμε την έκφραση της πρωτείνης GFP σε διαφορετικά MOI: 0, 7.5, 15, 32.5, 65 κάναμε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα α-GFP (Εικόνα 21 ). Για τα πειράματα μας, επιλέξαμε να μολύνουμε κύτταρα με τον ιό AdGFP με MOI=15. Επιλέξαμε μικρό MOI για τον ιό αυτό, καθώς είναι αρκετά ισχυρότερος έναντι των υπόλοιπων ιών AdSmad3(P222A)-6myc, AdSmad3(Q222A)-6myc, AdbioSmad3 και προκειμένου να έχουμε εξισορροπημένες ποσότητες ιων για τα πειράματά μας.

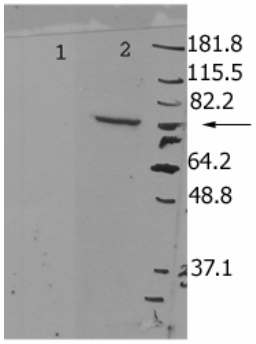



**Εικόνα 21**: **Ανάλυση της έκφρασης της πρωτεϊνης GFP σε κύτταρα HaCaT που μολύνθηκαν με τον ιό AdGFP** με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-GFP. Μολύναμε κύτταρα HaCaT με τον αδενοϊό σε MOI, 0 (1), 7.5 (2), 15 (3), 32.5 (4), 65 (5). Το βέλος δείχνει την θέση της πρωτεϊνης GFP.

Τα πειράματα μελέτης της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του μονοπατιού του TGF-β, που θα περιγραφούν και θα σχολιαστούν στη συνέχεια, περιέχουν δύο τρόπους ενεργοποίησης του μονοπατιού: είτε χορήγηση του αυξητικού παράγοντα TGF-β για διάφορες χρονικές περιόδους, είτε μόλυνση κυττάρων με τον ιό **AdALK5ca**, ο οποίος εκφράζει την συστατικά ενεργή μορφή του υποδοχέα τύπου Ι του TGF-β. Επομένως, για

τα πειράματά μας κρίθηκε απαραίτητη η παραγωγή του αδενοϊού AdALK5ca. Ο ιός ήταν μια ευγενική δωρεά του Δρα Αριστείδη Μουστάκα (Ινστιτούτο Ludwig, Ουψάλα Σουηδίας) και παρήχθη σε κύτταρα 911 σύμφωνα με τη διαδικασία «Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών». Η τιτλοδότησή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία «Μέθοδος μέτρησης σχηματισμού φθορίζοντων ιικών στιγμάτων (fluorescence forming assay)», αφού δεν εκφράζει την πρωτείνη GFP, και υπολογίστηκε σε $1.2*10^5$ σε ffu/ml.

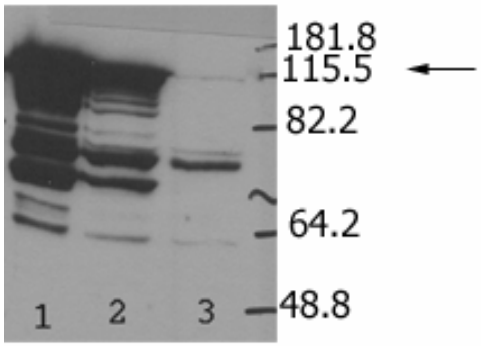
Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος της έκφρασης της πρωτείνης HA-ALK5ca (Εικόνα 22), χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-HA. Για τα πειράματά μας, χρησιμοποιήσαμε τον ιό AdALK5ca με MOI=60.




**Εικόνα 22**: **Ανάλυση της έκφρασης της αδενοϊκής πρωτείνης HA-ALK5ca** του ιού AdALK5ca με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-HA. Μολύναμε κύτταρα HaCaT με διαφορετικές MOI: 0 (1), 60 (2). Το βέλος δείχνει την θέση της πρωτεΐνης HA-ALK5ca.

Ο ιός **AdlacZ** παρήχθη για να χρησιμοποιηθεί ως ιός αρνητικού ελέγχου εκτός του ιού AdGFP. Ο ιός αυτός ήταν μια ευγενική δωρεά του Δρα Αριστείδη Μουστάκα. Ο ιός παρήχθη σε κύτταρα 911 σύμφωνα με τη διαδικασία «Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών». Η τιτλοδότησή του έγινε σύμφωνα με τη διαδικασία «Μέθοδος μέτρησης σχηματισμού φθορίζοντων ιικών στιγμάτων (fluorescence forming assay)», αφού δεν εκφράζει την πρωτείνη GFP, και υπολογίστηκε σε $10^6$ σε pfu/ml. Για τον έλεγχο της έκφρασης της πρωτείνης του, χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα που

αναγνωρίζει την β γαλακτοσιδάση (a-lacZ). Η πρωτείνη εκφράζεται κανονικά σε κύτταρα HaCaT που μολύνθηκαν με τον ιό AdlacZ με MOI: 0, 80 και 160 (Εικόνα 23). Ο ιός AdlacZ δε χρησιμοποιήθηκε τελικά στα πειράματά μας.

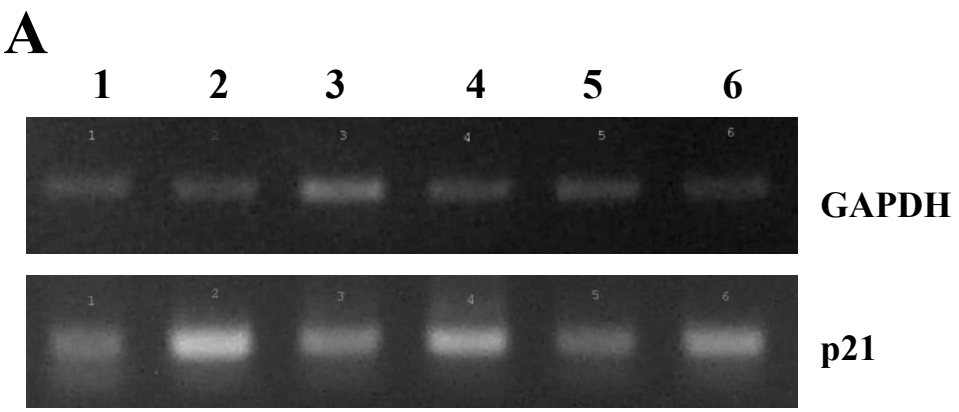


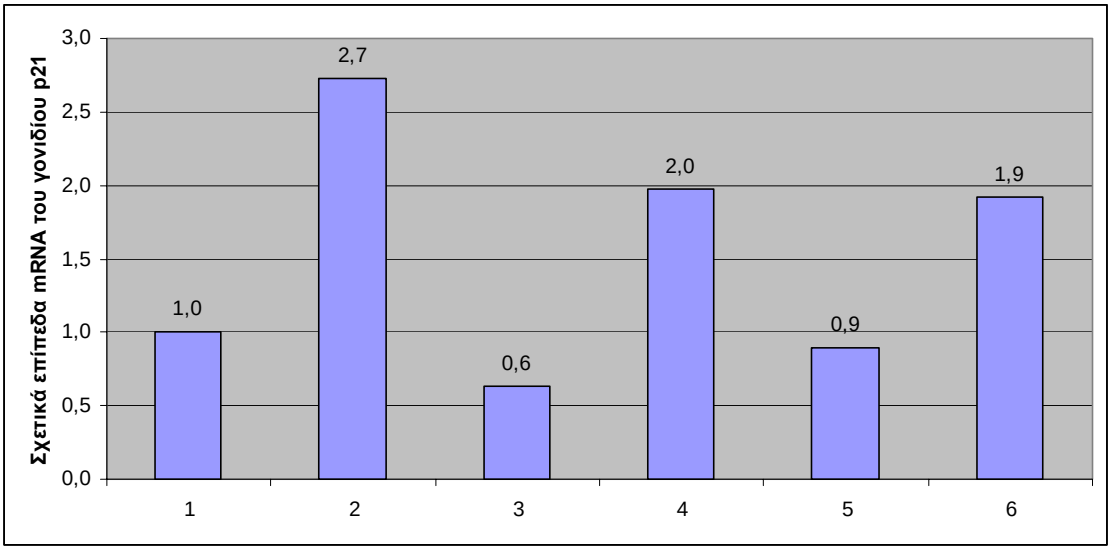

**Εικόνα 23**: **Ανάλυση της έκφρασης της αδενοϊκής πρωτείνης lacZ** του ιού AdlacZ με το πρωτόκολλο Western και χρησιμοποιώντας αντίσωμα α-lacZ. Μολύναμε κύτταρα HaCaT με διαφορετικά MOI: 0 (1), 80 (2), 160 (3). Το βέλος δείχνει την θέση της πρωτεϊνης lacZ.

**Μέρος 2$^{ο}$: Μελέτη της μεταγραφής γονιδίων-στόχων του μονοπατιού του TGF-β, PAI-1 και p21, υπό την επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτείνης, AdSmad3(P229A)-6myc και AdSmad3(Q222A)-6myc.**

Στο δεύτερο μέρος αυτής της ενότητας, θα παρουσιάσουμε τα αποτελέσματα των μολύνσεων κυττάρων HaCaT τους ιούς AdSmad3(P229A)-6myc (MOI=50), AdSmad3(Q222A)-6myc (MOI=100) και AdGFP (MOI=15) (Εικόνες 24 και 25) που έγιναν με σκοπό να μελετήσουμε την μεταγραφή γονιδίων-στόχων του μονοπατιού του TGF-β, PAI-1 και p21, υπό την επίδραση των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3. Ο ιός AdGFP χρησιμοποιήθηκε ως ιός αρνητικού ελέγχου στα πειράματα αυτά. Η πειραματική διαδικασία ήταν ως ακολούθως: Κύτταρα HaCaT μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς και την επόμενη μέρα της μόλυνσης, αλλάξαμε το θρεπτικό των κυττάρων σε 0.2% FBS και τα επωάσαμε για άλλες 24h σε 37$^{o}$C υποβάλοντας με τον τρόπο αυτό τα κύτταρα σε συνθήκη πείνας (starvation). Την επόμενη, μετά το πέρας των 24h, έγινε χορήγηση του αυξητικού παράγοντα του TGF-β για 1h και απομονώθηκε mRNA κάνοντας χρηση του πρωτοκόλου Trizol. Στη συνέχεια, έγιναν αναλύσεις RT-PCRs και μετρήθηκαν οι διαφορές στη μεταγραφή των γονιδίων στόχων του μονοπατιού, απουσία και παρουσία TGF-β, όταν έχουμε τις μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτείνης σε σύγκριση με το αρνητικό control (Εικόνα 24, Εικόνα 25). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (Glycerarldehyde-Phosphate Dehydrogonase), οποίο εκφράζεται συστατικά σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιούμε (housekeeping gene).

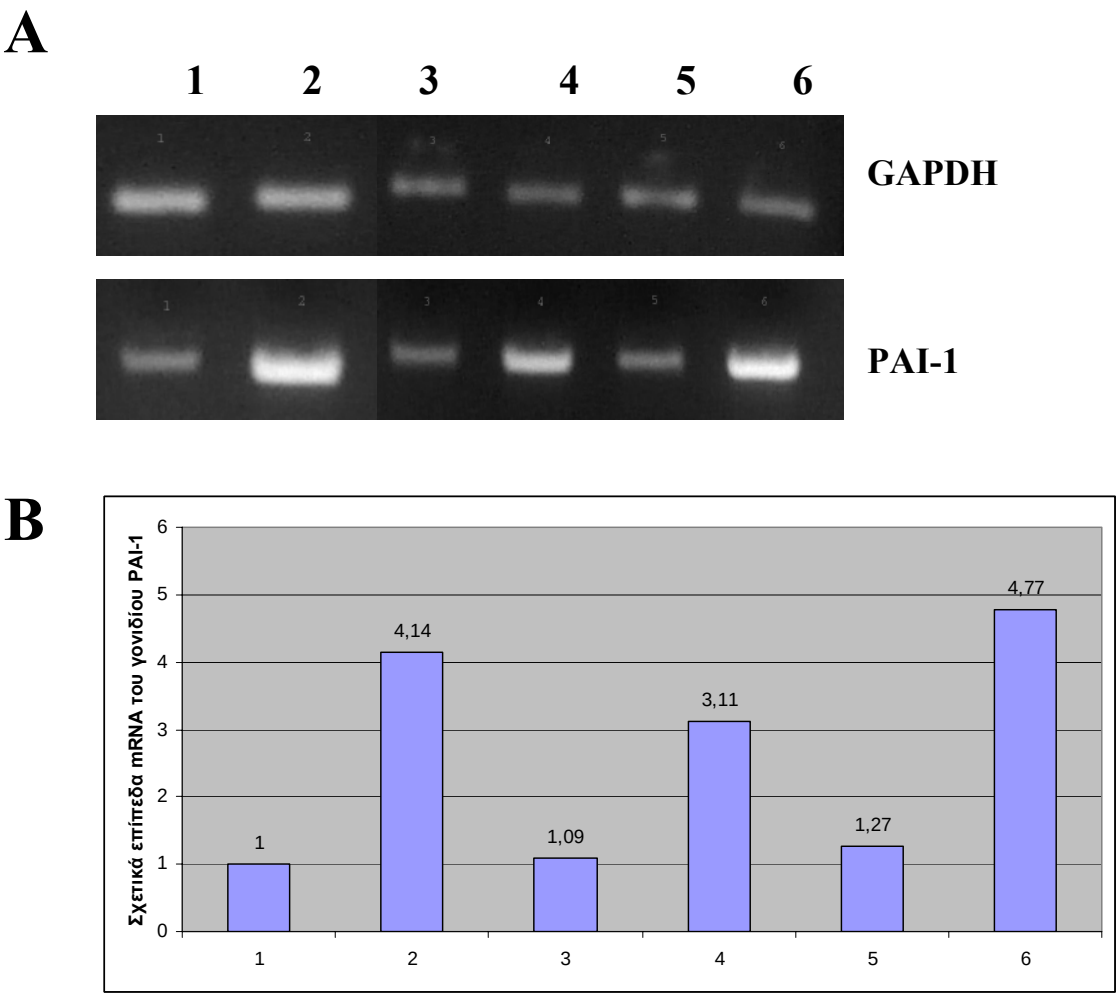
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση της μεταγραφής του γονιδίου p21 όταν κύτταρα HaCaT μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς που εκφράζουν τις μεταλλαγμένες μορφές Smad3(P229A) και Smad3(Q222A). Η μειώση αυτή ήταν πιο εμφανής όταν είχαμε συνθήκη επαγωγής (προσθήκη TGF-β για 1h).




**Εικόνα 24: Μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίου p21** σε κύτταρα HaCaT παρουσία των ιών AdGFP, AdSmad3(P229A)-6myc, AdSmad3(Q222A)-6myc απουσία και παρουσία του TGF-β. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα στην RT-PCR (A) και στο γράφημα (B) παρουσιάζονται ως εξής: (1) AdGFP, (2) AdGFP +TGF-β 1h, (3) AdSmad3(P229A)-6myc, (4) AdSmad3(P229A)-6myc +TGF-β 1h, (5) AdSmad3(Q222A)-myc, (6) AdSmad3(Q222A)-6myc +TGF-β 1h.

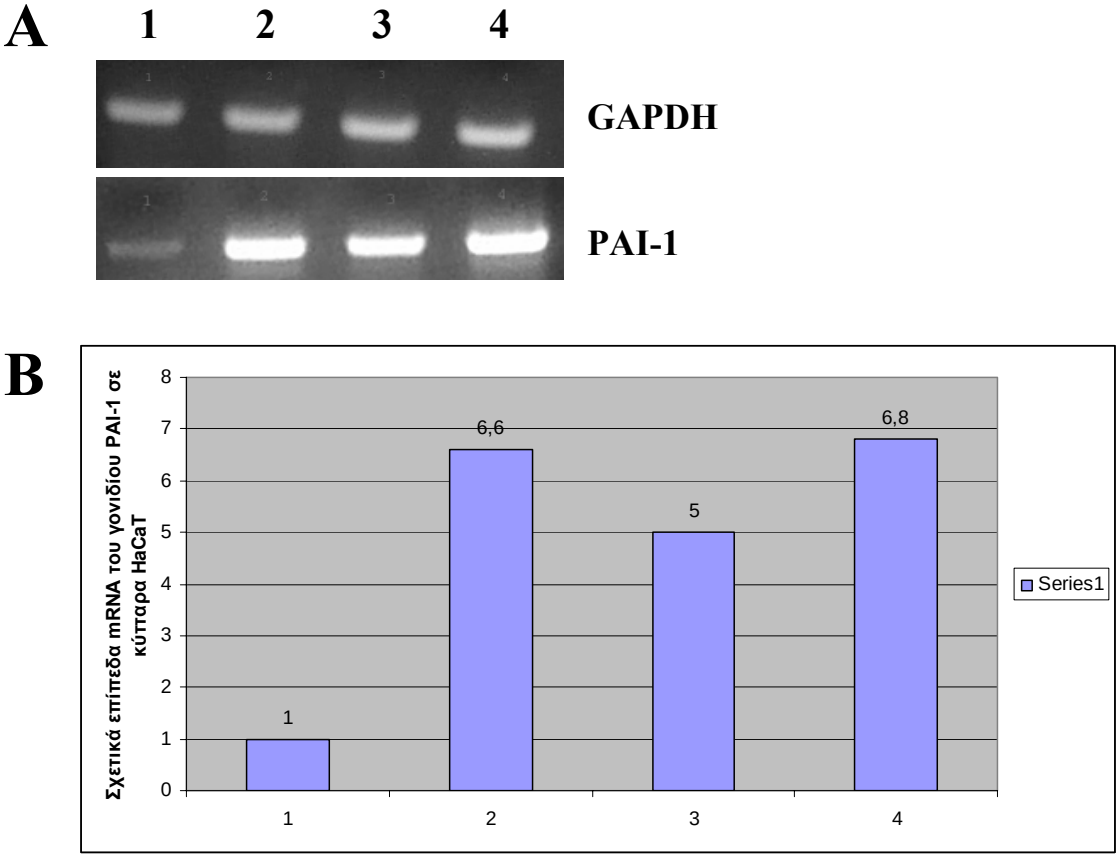
Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση των μεταλλαγμένων πρωτεινών Smad3(P229A) και Smad3(Q222A) στην έκφραση του γονιδίου PAI-1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25, παρατηρήθηκε ελαφρά μείωση της μεταγραφής του γονιδίου PAI-1 όταν είχαμε τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτείνης Smad3, Smad3(P229A) και καμία επίδραση όταν είχαμε τη μεταλλαγμένη μορφή Smad3(Q222A). Η αλλαγή ήταν πιο εμφανής όταν είχαμε συνθήκη επαγωγής (προσθήκη TGF-β για 1h).




**Εικόνα 25: Μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίου PAI-1** σε κύτταρα HaCaT παρουσία των ιών AdGFP, AdSmad3(P229A)-6myc, AdSmad3(Q222A)-6myc απουσία και παρουσία TGF-β. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα στην RT-PCR (A) και στο γράφημα (B) παρουσιάζονται ως εξής: (1) AdGFP, (2) AdGFP +TGF-β 1h, (3) AdSmad3(P229A)-6myc, (4) AdSmad3(P229A)-6myc +TGF-β 1h, (5) AdSmad3(Q222A)-myc, (6) AdSmad3(Q222A)-6myc +TGF-β 1h.

Η επόμενη σειρά πειραμάτων (Εικόνες 26 και 27) έγινε παρουσία του ιού AdALK5ca ως ενεργοποιητή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β. Παρουσία του υποδοχέα ALK5ca το σύστημα ενεργοποιείται σε υψηλά επίπεδα και έτσι, θέλαμε να δούμε εάν οι μεταλλαγμένες μορφές της πρωτείνης Smad3, και κυρίως η Smad3(P229A), είναι σε θέση να μειώσουν την ενεργοποίηση αυτή. Πρώτα, όμως κρίθηκε απαραίτητο να ελέγξουμε τον ιό AdALK5ca που έχουμε παραγάγει, βλέποντας εάν από μόνος του ενεργοποιεί μεταγραφικά το γονίδιο PAI-1 (Εικόνα 26). Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH.

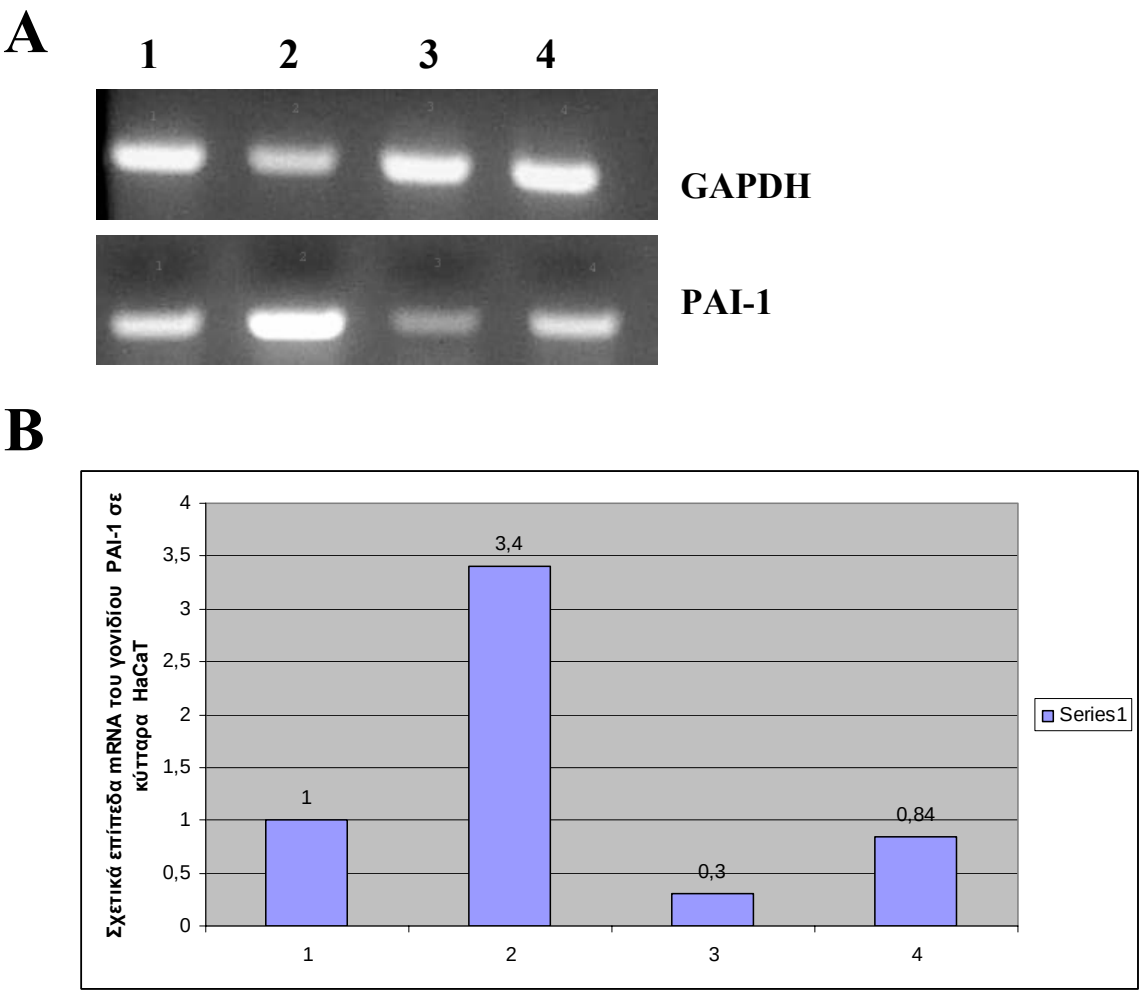
Η μόλυνση κυττάρων HaCaT με τον ιό AdALK5ca έγινε με διαφορετικά MOI: 30, 45, 60. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26, παρατηρήθηκε πολύ σημαντική ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου PAI-1 με προσθήκη του ιού AdALK5ca σε σχέση με την κατάσταση αρνητικού ελέγχου (παρουσία του ιού AdALK5ca). Η ενεργοποίηση αυτή είναι υψηλότερη όταν η μόλυνση έγινε με MOI=60.




**Εικόνα 26: Μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1** σε κύτταρα HaCaT παρουσία του ιού AdALK5ca σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα στην RT-PCR (A) και στο γράφημα (B) παρουσιάζονται ως εξής: (1) απουσία AdALK5 (2) προσθήκη AdALK5 με MOI=30, (3) προσθήκη AdALK5 με MOI=45, (4) προσθήκη AdALK5 με MOI=60.

Στη συνέχεια, πραγματοποίηθηκε πείραμα μόλυνσης κυττάρων HaCaT με τους ιούς AdGFP και AdSmad3(P229A)-6myc απουσία και παρουσία του ιού AdALK5ca για να διαπιστωθεί εάν η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτείνης Smad3, Smad3(P229A) επηρεάζει τη μεταγραφή του γονιδίου PAI-1. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με τον ιό AdGFP με MOI=15, με τον ιό AdSmad3(P229A)-6myc με MOI=50 και με τον ιό AdALK5ca με MOI=60. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 27, παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφής του γονιδίου PAI-1 όταν είχαμε τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτείνης Smad3,

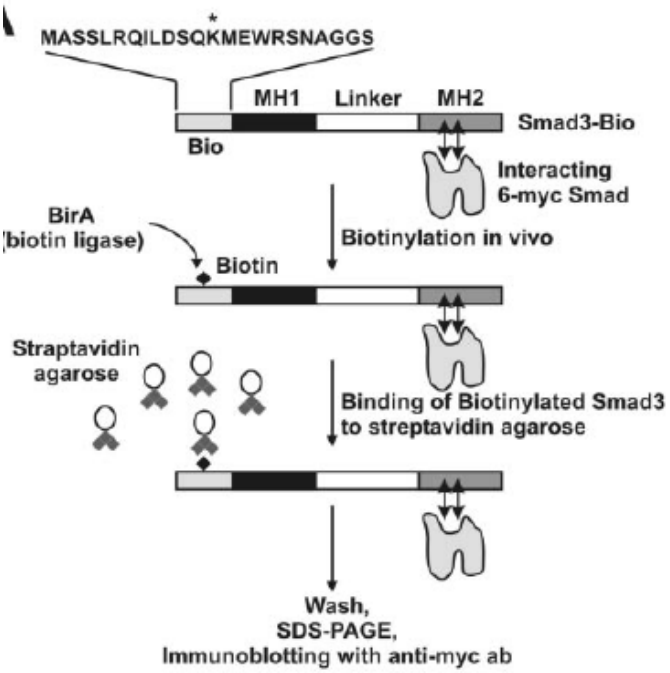
Smad3(P229A) παρουσία αλλά και απουσία του ιού AdALK5ca. Η αλλαγή ήταν πολύ πιο εμφανής παρουσία του ιού AdALK5ca.




**Εικόνα 27: Μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA του γονιδίου PAI-1** σε κύτταρα HaCaT παρουσία των ιών AdGFP, AdSmad3(P229A)-6myc απουσία και παρουσία του ιού AdALK5. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα στην RT-PCR (A) και στο γράφημα (B) παρουσιάζονται ως εξής: : (1) AdGFP, (2) AdGFP + AdALK5 , (3) AdSmad3(P229A)-6myc, (4) AdSmad3(P229A)-6myc + AdALK5.

**Ερευνητικός στόχος 2: Πείραμα *in vivo* βιοτινυλίωσης σε κύτταρα HaCaT μέσω χρήσης των ανασυνδυασμένων αδενοϊών AdbioSmad3 και AdBirA.**

Πρωτεΐνες που εκφράζονται σε σύντηξη με τον επίτοπο bio βιοτινυλιώνονται *in vivo* από τη βακτηριακή λιγάση βιοτίνης BirA και μπορούν να απομονωθούν μέσω σφαιριδίων στρεπταβιδίνης-αγαρόζης, τα οποία αναγνωρίζουν το βιοτινυλιωμένο επίτοπο (de Boer et al., 2003). Το σύστημα αυτό είναι πολύ πιο ειδικό και ευαίσθητο από το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα συνανοσοκατακρήμνισης (co-Immunoprecipitation), λόγω της εξαιρετικά υψηλής συνάφειας και ειδικότητας της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη. Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 28. Το πεπτίδιο bio αποτελείται από 23 αμινοξέα, βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των Smads και μπορεί να βιοτινυλιωθεί στην κεντρική του λυσίνη, όταν στα κύτταρα εκφράζεται παράλληλα με τη bio-Smad3, η βακτηριακή λιγάση BirA.




**Εικόνα 28: Το σύστημα της *in vivo* βιοτινυλίωσης.** Βασική αρχή του συστήματος *in vivo* βιοτινυλίωσης, Στην συγκεκριμένη περίπτωση, η πρωτείνη bio-Smad3 βιοτινυλιώνεται από την βακτηριακή λιγάση BirA και μπορεί κατόπιν να προσδεθεί σε αγαρόζη επικαλυμμένη με στρεπταβιδίνη. Οποιαδήποτε πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την Smad3 συν-κατακρημνίζεται με την αγαρόζη στρεπταβιδίνη στην οποία έχει προσδεθεί η bio-Smad3.

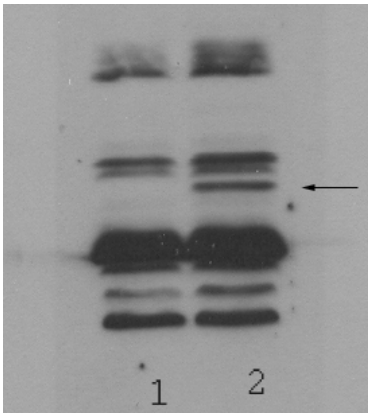
Σκοπός μας ήταν να δημιουργήσουμε το σύστημα αυτό κάνοντας χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Οι εφαρμογές της κατασκευής αυτής θα είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς θα μπορούμε να εισάγουμε το σύστημα αυτό σε πειραματόζωα και επομένως να βιοτινυλιώνουμε πρωτείνες *in vivo*. Για το σκοπό αυτό, ήταν απαραίτητο να κατασκευάσουμε, να καλλιεργήσουμε και να τιτλοδοτήσουμε τους ιούς AdbioSmad3 και AdBirA και στη συνέχεια να εφαρμόσουμε πείραμα βιοτινυλίωσης σε κύτταρα HaCaT.

**Παραγωγή και τιτλοδότηση των ανασυνδυασμένων ιών AdbioSmad3 και AdBirA**

Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί AdbioSmad3 και AdBirA παρήχθησαν σύμφωνα με τη διαδικασία «Παραγωγή και καλλιέργεια αδενοιών σε κύτταρα θηλαστικών». Και οι δύο ιοί εκφράζουν την πρωτείνη GFP και έτσι, η τιτλοδότησή τους έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο «Μέτρηση σχηματισμού ιικών πλακών (plaque assay)». Ο τίτλος του ιού AdbioSmad3 σε pfu/ml ήταν $1.1*10^5$. Ο τίτλος του ιού AdBirA σε pfu/ml ήταν $1.1*10^5$. Το πείραμα διεξήχθη σε κύτταρα HaCaT μολύνοντάς τα με MOI=100 από τον κάθε ιό.

**Πείραμα βιοτινυλίωσης της πρωτείνης AdbioSmad3 σε κύτταρα HaCaT κάνοντας χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών**

Η βιοτινυλίωση της AdbioSmad3 *in vivo* μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP και ακολουθώντας το πρωτόκολλο Western. Στο ανοσοαποτύπωμα της Εικόνας 29, η πρωτεΐνη bioSmad3 γίνεται ορατή μόνο κατά την συνέκφραση της BirA, η οποία και την βιοτινυλιώνει (στήλη 2), ενώ δεν είναι ορατή κατά την απουσία του αδενοϊού που εκφράζει τη λιγάση. Η βιοτινυλιώμενη Smad3 (bio-Smad3) έχει μέγεθος περίπου 52.5kDa.




**Εικόνα 29**: **Πείραμα βιοτινυλίωσης της αδενοϊκής πρωτείνης bioSmad3 κάνοντας χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών σε κύτταρα HaCaT.** Η μόλυνση των κυττάρων με τους ιούς έγινε με MOI=100 και για τους δύο ιούς. Η μόλυνση κυττάρων HaCaT με τον ιό AdbioSmad3 πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του ιού της λιγάσης AdBirA. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα ελέγχθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στην bioSmad3. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Το βέλος δείχνει τη θέση της βιοτινυλιωμένης πρωτείνης bioSmad3.

**Συμπέρασμα:** Επιτεύχθηκε πείραμα βιοτινυλίωσης σε κύτταρα HaCaT κάνοντας χρήση των ανασυνδυασμέων αδενοϊών AdbioSmad3 και AdBirA. Η παραγωγή των εργαλείων αυτών μπορεί να έχει πολύ σημαντικές εφαρμογές καθώς ανοίγει το δρόμο για βιοτινυλίωση πρωτεινών σε ζώα.

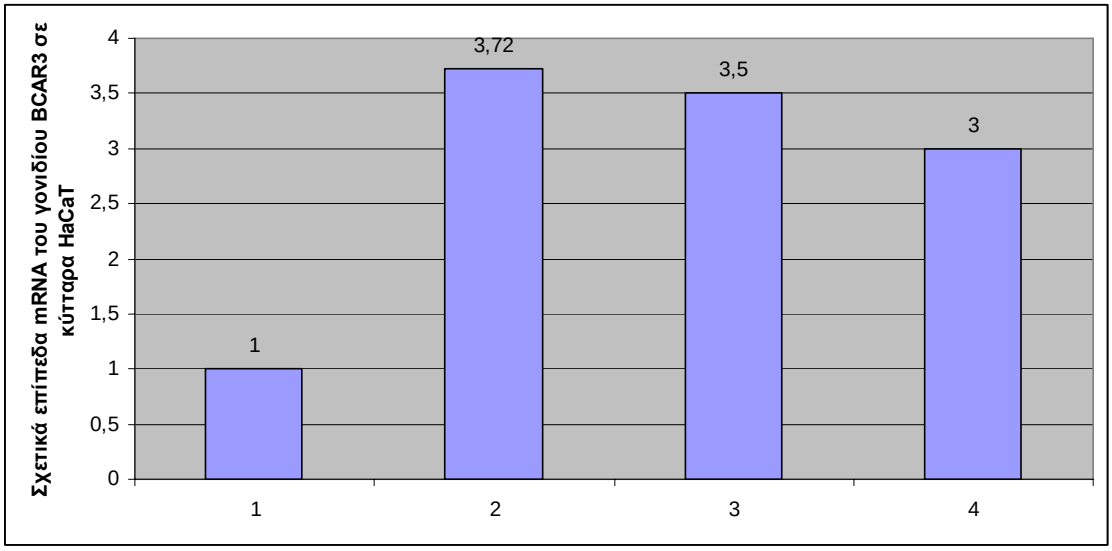
**Ερευνητικός στόχος 3: Μελέτη της ρύθμισης και λειτουργίας του ανθρώπινου γονιδίου BCAR3, ενός καινούριου γονιδίου-στόχου του μονοπατιού του TGF-β, καθώς και του ρόλου του στην ανάπτυξη και τον καρκίνο.**

**Μέρος 1$^{ο}$: Μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 σε συνθήκη προσθήκης TGF-β, και σύγκριση με τη συμπεριφορά του PAI-1, ενός γνωστού γονιδίου-στόχου του μονοπατιού**

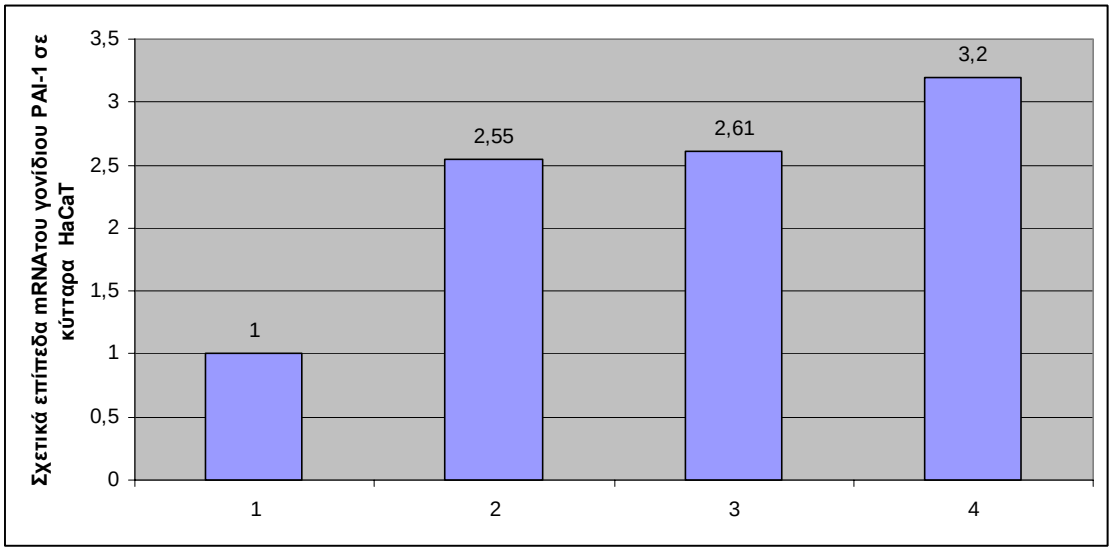
Οπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, το γονίδιο BCAR3 βρέθηκε ότι είναι ένας καινούριος άμεσος στόχος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β (Δρ. Βάσω Επισκόπου, Medical Research Council, Λονδίνο, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Για να μελετήσουμε τη μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 από τον TGF-β πραγματοποιήσαμε αναλύσεις RT-PCR στις οποίες μετρήσαμε τα επίπεδα mRNA του γονιδίου BCAR3 σε κύτταρα HaCaT, στα οποία έγινε χορήγηση TGF-β για διάφορα χρονικά διαστήματα (3-24h). Σε κάθε πείραμα, μετρήσαμε τη μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 απουσία και παρουσία του TGF-β, καθώς και τη μεταγραφή του γνωστού γονιδίου PAI-1. Με τον τρόπο αυτό, έχοντας ως μέτρο σύγκρισης ένα γνωστό και καλά μελετημένο γονίδιο, ήμασταν σε θέση να ερμηνεύσουμε τις αλλαγές στη μεταγραφή που βλέπουμε για το BCAR3. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH, οποίο εκφράζεται συστατικά σε όλες τις συνθήκες που χρησιμοποιούμε (housekeeping gene).

Η Εικόνα 30 περιλαμβάνει συγκεντρωτικά αποτελέσματα μέτρησης σχετικών επιπέδων mRNA των γονίδιων BCAR3 και PAI-1από τρία ανεξάρτητα πειράματα. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 30, η μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 ενεργοποιήθηκε σημαντικά υπό την επίδραση του TGF-β για 3, 6 και 24 ώρες. Η αύξηση αυτή ήταν εντονότερη όταν ο TGF-β προστέθηκε για 3 ώρες (3,72 fold). Αύξηση παρατηρήθηκε, όπως ήταν ανεμενόμενο, και στη μεταγραφή του γονιδίου PAI-1 μετά από προσθήκη TGF-β.

**A**




**B**

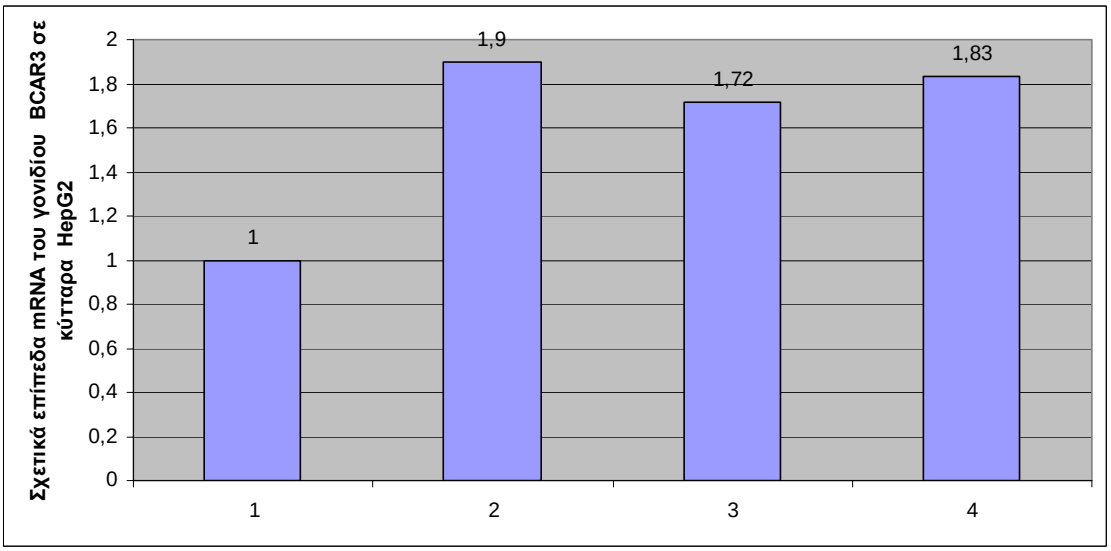



**Εικόνα 30: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μέτρησεων των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων BCAR3 (A) και PAI-1 (B)** σε κύτταρα HaCaT απουσία και παρουσία TGF-β (3h, 6h, 24h) από τρία διαφορετικά πειράματα. Οι τιμές Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) απουσία TGF-β (2) πρσοθήκη TGF-β για 3h , (3) πρσθήκη TGF-β για 6h (4) προσθήκη TGF-β για 24h..

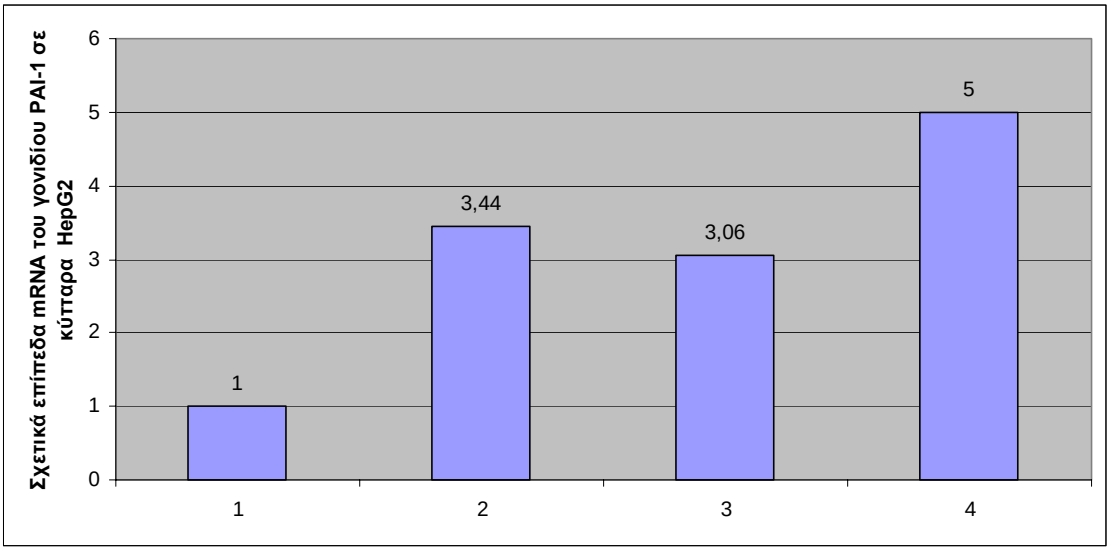
Στη συνέχεια, θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν το φαινόμενο που παρατηρήσαμε-ενεργοποίηση της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 σε απόκριση προσθήκης του TGF-β- είναι ιστοειδικό (για το συγκεκριμένο τύπο κυττάρων δηλαδή) ή όχι. Η απάντηση αυτή θα μπορούσε να μας βοηθήσει στην κατανόηση της λειτουργίας του γονιδίου BCAR3, να μας απαντήσει δηλαδή το ερώτημα για ποιο λόγο ενεργοποιείται από τον TGF-β. Για το σκοπό αυτό, αποφασίσαμε να εκτελέσουμε το ίδιο ακριβώς πείραμα, αλλά σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος, HepG2 (Εικόνα 31).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, παρατηρήθηκε ελαφρά αύξηση (1,9 fold) της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 υπό την επίδραση του TGF-β για 3, 6 και 24 ώρες. Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση (5 folds) της μεταγραφής του γονιδίου PAI-1 μετά από προσθήκη TGF-β.

**A**




**B**



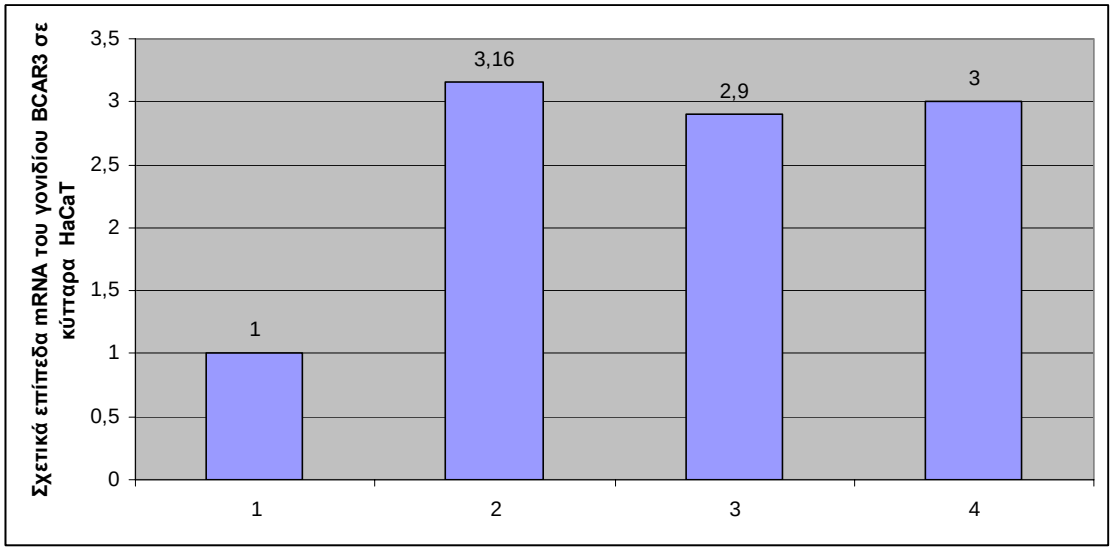

**Εικόνα 31: Μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων BCAR3 (A) και PAI-1 (B) σε κύτταρα HepG2** απουσία και παρουσία TGF-β (3h, 6h, 24h) . Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) απουσία TGF-β (2) προσθήκη TGF-β για 3h , (3) προσθήκη TGF-β για 6h, (4) προσθήκη TGF-β για 24h.

**Μέρος 2$^{ο}$: Μελέτη της μεταγραφής του γονιδίου BCAR3 μετά από προσθήκη του ανασυνδυασμένου αδενοϊού AdALK5, και σύγκριση με τη συμπεριφορά του γονιδίου PAI-1**

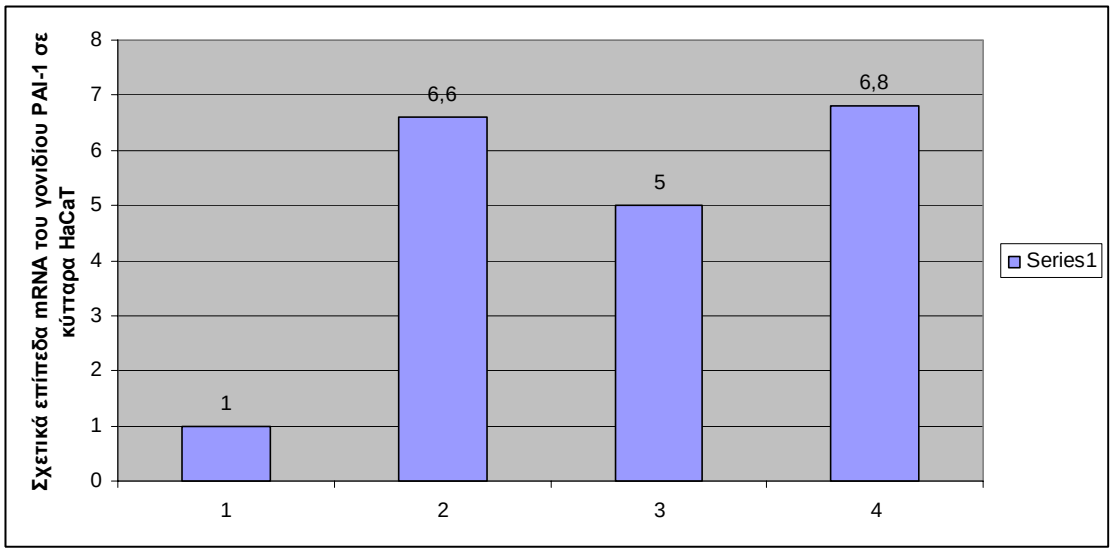
Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω, το μονοπάτι του TGF-β ενεργοποιείται σημαντικά εάν στο σύστημα προστεθεί ο συστατικά ενεργός υποδοχέας τύπου Ι του TGF-β (ALK5ca). Έχοντας κατασκευάσει τον ιό AdALK5ca αποφασίσαμε να ελέγξουμε τις αλλαγές στη μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 μετά από προσθήκη του AdALK5ca (Εικόνα 32). Το πείραμα έγινε σε κύτταρα HaCaT και η μόλυνση έγινε παρουσία του ιού με MOI: 30, 45, 60.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 31, τα επίπεδα mRNA του γονιδίου BCAR3 αυξήθηκαν 3 φορές παρουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα τύπου Ι του TGF-β (ALK5ca) σε MOI=60, ενώ δεν παρατηρήθηκε παραιτέρω αύξηση παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων του ιού. Στα ίδια κύτταρα, η έκφραση του γονιδίου PAI-1 αυξήθηκε 6,5 φορές παρουσία του ιού AdALK5ca (Εικόνα 32Β) επιβεβαιώνοντας την ενεργότητα της πρωτείνης ALK5ca.

**A**




**B**




**Εικόνα 32: Μέτρηση των σχετικών επιπέδων mRNA των γονιδίων BCAR3 (A) και PAI-1 (B)** σε κύτταρα HaCaT παρουσία του ιού AdALK5ca σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την ποσότητα cDNA του γονιδίου GAPDH (αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης), το οποίο εκφράζεται συστατικά. Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) απουσία AdALK5ca (2) προσθήκη AdALK5ca με MOI=30, (3) προσθήκη AdALK5ca με MOI=45, (4) προσθήκη AdALK5 με MOI=60.

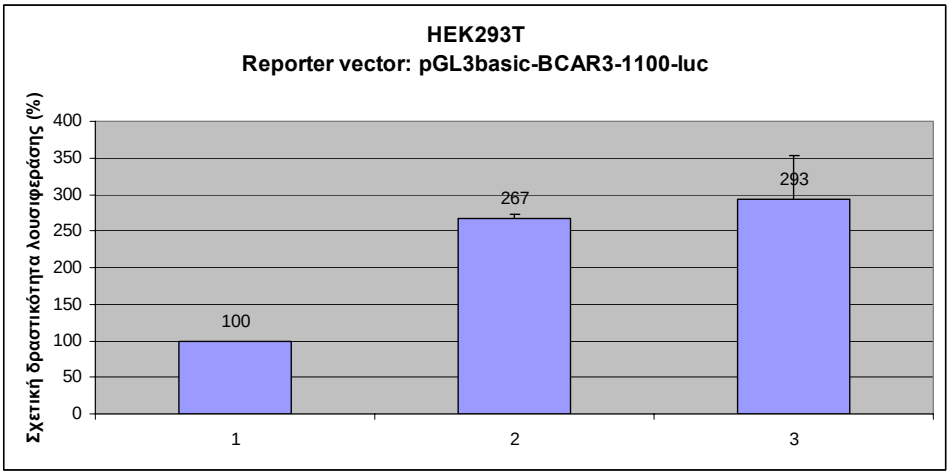
**Μέρος 3$^{ο}$: Μελέτη της επίδρασης του υποδοχέα ALK5 και των πρωτεϊνών Smad3 και Smad4 στη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή του γονιδίου BCAR3.**

Στη συνέχεια θελήσαμε να δούμε κατά πόσο ενεργοποιείται ο υποκινητής του γονιδίου BCAR3 παρουσία του υποδοχέα ALK5 όταν αυτός είναι συστατικά ενεργός (ca-ALK5) και παρουσία των πρωτεινών Smad3 και Smad4. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3basic-BCAR3 -1100-luc, το οποίο περιλαμβάνει τον υποκινητή του γονιδίου BCAR3 του ανθρώπου μεταξύ των θέσεων -1100 και -29 σε σύντηξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης απουσία και παρουσία των πρωτεινών ALK5, Smad3 και Smad4 (Εικόνα 33). Παράλληλα, σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήσαμε ως δείγμα ελέγχου τον συνθετικό υποκινητή $(CAGA)_{12}$ , ο οποίος περιλαμβάνει 12 θέσεις πρόσδεσης των πρωτεινών Smad (CAGA) μπροστά από το γονίδιο της λουσιφεράσης και είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται ισχυρά παρουσία του συστατικού ενεργού υποδοχέα ALK5 και των πρωτεινών Smad3 και Smad4. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 33, παρατηρήθηκε αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου BCAR3 παρουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5 και των πρωτεινών Smad3 και Smad4. Η αύξηση αυτή ήταν περίπου η ίδια (2,7 fold) είτε παρουσία του υποδοχέα είτε παρουσία των Smad3 και Smad4.

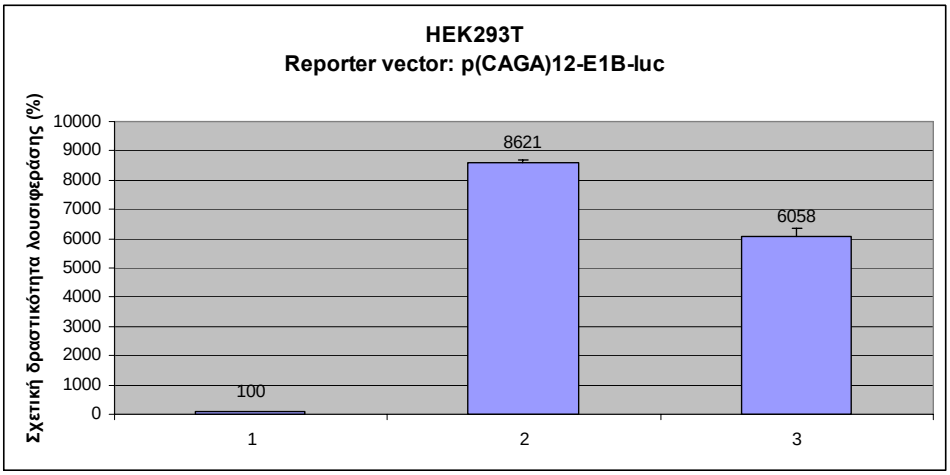
Στη συνέχεια, θελήσαμε να επαναλάβουμε τα πειράματα αυτά αλλά σε κύτταρα HepG2. Με δεδομένο ότι είδαμε ελαφρά αύξηση της μεταγραφής σε κύτταρα HepG2 του γονιδίου BCAR3 μετά από χορήγηση του αυξητικού παράγοντα TGF-β (Εικόνα 31), θελήσαμε να διαπιστώσουμε εάν ο υποκινητής του BCAR3 επηρεάζεται μεταγραφικά παρουσία του υποδοχέα ALK5 και των πρωτεινών Smad3 και Smad4 στα κύτταρα αυτά. Έτσι, επαναλάβαμε τα παραπάνω πειράματα επιμολύνοντας παροδικά κύτταρα HepG2. Χρησιμοποιήσαμε και πάλι τον συνθετικό υποκινητή $(CAGA)_{12}$ E1B ως υποκινητή ελέγχου.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 34, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου BCAR3 παρουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5 (3 φορές) και των πρωτεινών Smad3 και Smad4 (3.4 φορές).

**A**

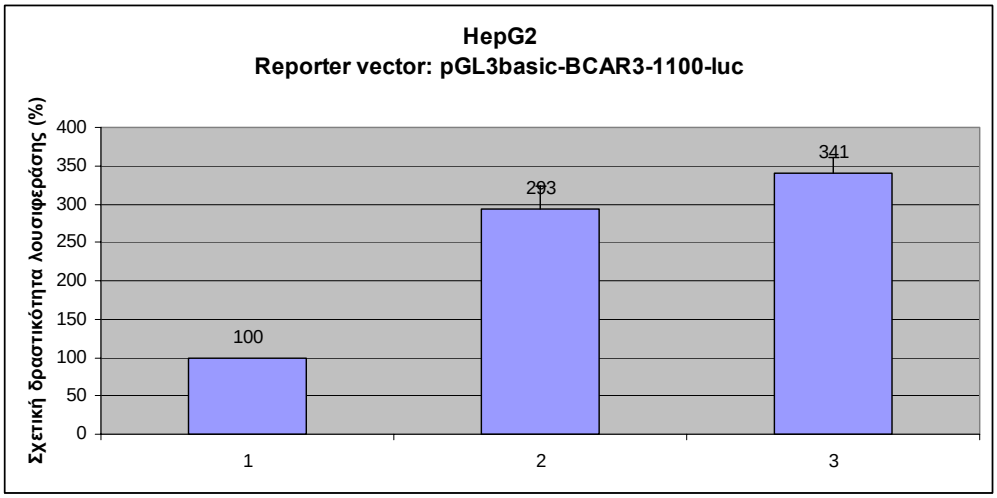



**B**

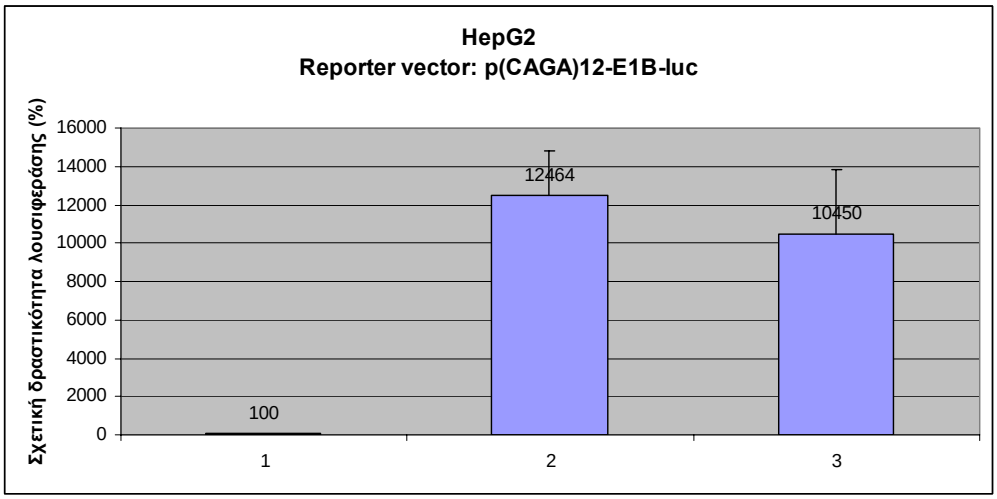



**Εικόνα 33: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μέτρησης της επίδρασης του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5 και των πρωτεινών Smad3 και Smad4 στη μεταγραφική ενεργότητα υποκινητή του γονιδίου BCAR3 (A)** Κύτταρα HEK-293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pGL3basic-BCAR3-1100 -luc (2μg) παρουσία ή απουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5ca (2μg) και των πρωτεινών Smad3 και Smad4 (pIREsSmad3/Smad4) (4μg). Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) pGL3basic-BCAR3-1100 –luc, (2) pGL3basic-BCAR3-1100 –luc + φορέας έκφρασης caALK5, (3) pGL3basic-BCAR3-1100 –luc + φορέας έκφρασης pIREsSmad3/Smad4. Η % δραστικότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (2μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. (B) Επίδραση του υποδοχέα ALK5ca στη μεταγραφική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή $(CAGA)_{12}$ (πλασμίδιο αναφοράς $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc) ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως υποκινητής ελέγχου (control). Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) πλασμίδιο αναφοράς $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc, (2) $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc + φορέας έκφρασης caALK5, (3) $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc + φορέας έκφρασης pIREsSmad3/Smad4.

**A**




**B**




**Εικόνα 34: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα μέτρησης της επίδρασης του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5 και των πρωτεινών Smad3 και Smad4 στη μεταγραφική ικανότητα υποκινητή του γονιδίου BCAR3 σε κύτταρα HepG2 (A)** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς pGL3basic-BCAR3-1100 -luc (2μg), Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία ή απουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5 (2μg) και των πρωτεινών Smad3 και Smad4 (pIREsSmad3/Smad4) (4μg). Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) pGL3basic-BCAR3-1100 –luc, (2) pGL3basic-BCAR3-1100 –luc + φορέας έκφρασης caALK5, (3) pGL3basic-BCAR3-1100 –luc + φορέας έκφρασης pIREsSmad3/Smad4. (B) Επίδραση του υποδοχέα ALK5ca στη μεταγραφική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή $(CAGA)_{12}$ (πλασμίδιο αναφοράς $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc) ο οποίος χρησιμοποιήθηκε ως υποκινητής ελέγχου (control). Τα δείγματα παρουσιάζονται ως εξής: (1) πλασμίδιο αναφοράς $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc, (2) $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc + φορέας έκφρασης caALK5, (3) $p(CAGA)_{12}$ –E1B-luc + φορέας έκφρασης pIREsSmad3/Smad4.

Από τα δεδομένα των Εικόνων 33 και 34 συμπεραίνουμε ότι ο υποκινητής του γονιδίου BCAR3 ενεργοποιείται σημαντικά παρουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα ALK5ca και των μεταγραφικών παραγόντων Smad3 και Smad4 σε κύτταρα HEK293T και HepG2. Η ενεργοποίηση αυτή φαίνεται να μην παρουσιάζει ιδιαίτερες διαφορές ανάμεσα στις δύο κυτταρικές σειρές.

# ΣΥΖΗΤΗΣΗ

**Ο ιός που φέρει τη μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 πρωτείνης, στην περιοχή του linker, AdSmad3(P229A)-6myc καταστέλλει την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων του μονοπατιού του TGF-β.**

Ο ρόλος της πρωτείνης Smad3 στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β είναι καλά μελετημένος. Η κατασκευή και ταυτοποίηση μεταλλαγών, στην περιοχή του linker της Smad3, σε συγκεκριμένα συντηρημένα κατάλοιπα γεννά το ερώτημα της λειτουργίας αυτών των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 στο μονοπάτι του TGF-β και κατά συνέπεια, στην ανάπτυξη και την ομοιόσταση των ενήλικων ιστών.

Η προλίνη P229 είναι ένα συντηρημένο αμινοξύ που βρίσκεται στην εύκαμπτη περιοχή του linker. Σύμφωνα με τα πειράματα αλληλεπίδρασης και μεταγραφικής ενεργοποίησης του συνθετικού υποκινητή $(CAGA)_{12}$ αλλά και του υποκινητή του γονιδίου PAI-1 (Μάνος Σιδεράκης ΜΔΕ, Πανεπιστήμιο Κρήτης), η μορφή της πρωτείνης Smad3 που εμπεριέχει τη μεταλλαγή P229A (η προλίνη 229 αντικαθίσταται από αλανίνη) παρουσιάζει ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον προφίλ.

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτείνη Smad3(P229A) δε μπορούσε να αλληλεπιδράσει με την αγρίου τύπου Smad3, αλλά αλληλεπιδρούσε με τις πρωτείνες Smad2 και Smad4, καθώς και με τον εαυτό της. Σε πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης, η GAL4-Smad3P229A εμφάνισε μειωμένη μεταγραφική λειτουργία (1/8 της wt GAL4-Smad3). Στο πλασμίδιο αναφοράς $p(CAGA)_{12}$–E1B-luc, η ενεργοποίηση ήταν 30 φορές χαμηλότερη, όταν συνεκφράστηκαν οι P229ASmad3, Smad4 και ο υποδοχέας caALK5 σε σχέση με την περίπτωση της wt Smad3. Η αρνητική επίδραση της μεταλλαγής P229A επιβεβαιώθηκε και με το φυσικό υποκινητή του γονιδίου PAI-1.

Ένα πιθανό μοντέλο επεξήγησης της συμπεριφοράς της μεταλλαγμένης μορφής της πρωτείνης Smad3 υποστηρίζει ότι η πρωτείνη Smad3(P229A) δρα ως αρνητικά επικρατής πρωτείνη, η οποία αλληλεπιδρά με τις Smad4 και Smad2 διατηρώντας τες στο κυτταρόπλασμα και εμποδίζοντάς τες να λειτουργήσουν. Η προλίνη 229 είναι πιθανόν να σχετίζεται με τον ετεροδιμερισμό και όχι με τον ομοδιμερισμό του μορίου, από τη στιγμή που η συγκεκριμένη μεταλλαγή (P229A) φαίνεται να επηρεάζει τη στερεοδιαμόρφωση

του μορίου που του επιτρέπει την αλληλεπίδραση με τον εαυτό του, αλλά όχι με την wt Smad3 (Μάνος Σιδεράκης, ΜΔΕ, Πανεπιστήμιο Κρήτης).

Η δεύτερη μεταλλαγή στην περιοχή του linker της Smad3 αφορά την αλλαγή της (Gln)Q222 σε Ala. Οι παρατηρήσεις ήταν και σε αυτή την περίπτωση ενδιαφέρουσες: Μελετώντας τη μεταγραφική ενεργοποίηση της Smad3, διαπιστώθηκε ότι το μετάλλαγμα Q222A μειώνει δραστικά τη βασική ενεργότητα και αναστέλλει τη μεταγραφική λειτουργία της Smad3. Μελετώντας τον ολιγομερισμό (ομο-και ετερο-) των Smad, το μετάλλαγμα Q222A εμποδίζει τόσο τον ομο- όσο και τον ετερο-πολυμερισμό. Τέλος, μελετώντας την τοποθέτηση στον πυρήνα, το μετάλλαγμα Q222A εμποδίζει την τοποθέτηση στον πυρήνα και συναντάται στο κυτταρόπλασμα.

Το προτεινόμενο μοντέλο συμπεριφοράς για το μετάλλαγμα Smad3 Q222A είναι ότι πιθανόν είτε δεν φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα TβRI και έτσι, οι R-Smads δεν ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα, είτε δεσμεύει στο κυτταρόπλασμα τους συνενεργοποιητές p/CAF και CBP/p300.

Τα παραπάνω πειράματα είχαν γίνει σε νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου (HEK293T), κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος (HepG2) και κύτταρα ανθρώπινου καρκινώματος του μαστού (MDA-MB468-τα κύτταρα αυτά δεν εκφράζουν ενδογενώς την πρωτείνη Smad4). Στην παρούσα μελέτη, θέλοντας να επιβεβαιώσουμε τα πειράματα αυτά *in vivo*, αποφασίσουμε να χρησιμοποίησουμε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (HaCaT). Στα κύτταρα αυτά, τα επίπεδα mRNA γονιδίων στόχων του μονοπατιού TGF-β, όπως τα γονίδια PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) και p21, αλλά και η ενεργοποίηση των υποκινητών τους (luciferase constructs), είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμα εάν δεν έχει γίνει χορήγηση TGF-β, σε αντίθεση με τα κύτταρα HepG2 (Moustakas et al.,1998; Shen et al.,1998). Τα κύτταρα HepG2 περιλαμβάνουν σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία είναι συνεχώς ενεργά, τα κύτταρα HaCaT, από την άλλη, είναι κύτταρα που χρειάζονται ερεθίσματα από τον TGF-β (Shen et al., 1998). Από τα παραπάνω, γίνεται σαφές ότι παρόλο που η λειτουργία των πρωτεϊνών Smads ως ενδιάμεσα μόρια στη TGF-β σηματοδότηση είναι απαραίτητη για ποικίλα μονοπάτια, ο τρόπος της εμπλοκής τους στη μεταγραφική ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων -στόχων μπορεί μηχανιστικά να διαφέρει ανάμεσα σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους.

Τα κύτταρα HaCaT, λοιπόν, είναι κύτταρα που επάγονται από τον TGF-β και για αυτό θελήσαμε να εκπονήσουμε πειράματα μελέτης της μεταγραφής γονιδίων-στόχων (κάνοντας χρήση της RT-PCR) στα κύτταρα αυτά. Ένα πρόβλημα που είχαμε να αντιμετωπίσουμε είναι ότι στα κύτταρα HaCaT, η επιμόλυνση γίνεται δύσκολα. Για το λόγο αυτό, καταφύγαμε στη χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών που έφεραν τις μεταλλαγμένες μορφές της Smad3, Smad3(P229A) και Smad3(Q222A), αλλά και την wt Smad3.

Τα πειράματα RT-PCR έγιναν για να μελετήσουμε τη μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του μονοπατιού του TGF-β, PAI-1 και p21 παρουσία του αδενοϊού που φέρει την μεταλλαγμένη μορφή Smad3(P229A), ή παρουσία του αδενοϊού που φέρει την μεταλλαγμένη μορφή Smad3(Q222A), σε συνθήκες απουσίας και παρουσίας του αυξητικού παράγοντα TGF-β. Το αποτέλεσμα ήταν ότι ο αδενοϊός που φέρει τη μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 πρωτείνης, Smad3(P229A), κατέστειλε την ενεργοποίηση της μεταγραφής των PAI-1 και p21, σε συνθήκη προσθήκης TGF-β για 1h (Εικόνες 24 και 25) και παρουσία του ιού AdALK5ca (Εικόνα 27). Φαίνεται μάλιστα ότι η καταστολή αυτή ήταν ισχυρότερη σε συνθήκη παρουσίας του ιού AdALK5ca. Στα πειράματα αυτά, βλέπουμε ότι η μεταγραφή του γονιδίου PAI-1 ενεργοποιείται περισσότερο με τη χορήγηση TGF-β από ότι η μεταγραφή του γονιδίου p21. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με τις παρατηρήσεις ότι σε κύτταρα HaCaT, η υπερέκφραση και μόνο των Smad πρωτεινών είναι ικανή να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή του γονιδίου PAI-1, αλλά όχι τη μεταγραφή του γονιδίου p21 (Shen et al.,1998). Το εύρημα ότι μια μεταλλαγή στο συντηρημένο αμινοξύ P229 στην περιοχή του linker, μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή γονιδίων-στόχων του σηματοδοτικού μονοπατιού έχει πολύ ενδιαφέρουσες προεκτάσεις.

Οι επιδράσεις του TGF-β είναι ποικίλες και αφορούν σχεδόν κάθε κυτταρικό τύπο. Ο διπλός ρόλος του TGF-β, όσον αφορά στην βιολογία του καρκίνου, είναι πολύπλοκος. Αρχικά, ο TGF-β δρα ως σημαντικός αναστολέας της ανάπτυξης. Παρόλα αυτά, καθώς ο όγκος προχωρά, ο TGF-β αλλάζει και γίνεται προ-ογκογονικός παράγοντας που ενισχύει τη μετάσταση, αγγειογένεση και την τοπική ανοσο-καταστολή (Pardali et al., 2007; Bierie et al., 2006; Reiss, 1999). Η χρήση αντι-TGF-β στρατηγικών για τη θεραπεία του καρκίνου προσεγγίστηκε αρχικά με ιδιαίτερη προσοχή λόγω της

διττής δράσης του TGF-β (Oft et al., 2002; Arteaga 2006; Yang et al., 2002). Σήμερα, υπάρχουν τρεις βασικές στρατηγικές που ακολουθώνται για να παρεμποδιστούν οι δράσεις του TGF-β: μόρια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση του προσδέτη με τον υποδοχέα, φάρμακα που μπλοκάρουν την ενδοκυττάρια σηματοδότηση και χρήση antisense ολιγονουκλεοτιδίων (Arteaga 2006; Yang et al., 2002; Yingling et al., 2004). Ο TGF-β έχει την ικανότητα να σηματοδοτεί μέσω Smad-εξαρτώμενων και Smad-μη εξαρτώμενων μονοπατιών. Το ερώτημα ποιο από τα δύο αυτά μονοπάτια ρυθμίζει την προ-ογκογονική δράση του TGF-β εξακολουθεί να μένει αναπάντητο, παρόλο που ίσως θα ήταν σημαντικό για το σχεδιασμό συγκεκριμένων μορίων που καταστέλλουν τα αποτελέσματα της σηματοδότησης μέσω TGF-β. Μια μελέτη των Kang et al. υποστηρίζει ότι οι πρωτείνες Smads παίζουν πολύ σπουδαίο ρόλο στο σχηματισμό της οστεολυτικής μετάστασης, και επομένως δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην ιδέα της καταστολής της Smad-σηματοδότησης με σκοπό την αποφυγή των προ-μεταστατικών συνεπειών του TGF-β (Kang et al., 2005)

Τα ευρήματά μας, τα οποία ταυτοποιούν ένα καινούριο ανταγωνιστικό μόριο της Smad3 που καταστέλλει την σηματοδότηση από τον TGF-β, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη αντι-καρκινικών θεραπειών που θα στοχεύουν αποκλειστικά και μόνο στα Smad-εξαρτώμενα σηματοδοτικά μονοπάτια.

**Η βιοτινυλίωση πρωτεινών σε κύτταρα HaCaT κάνοντας χρήση των ανασυνδυασμέων αδενοϊών AdbioSmad3 και AdBirA ανοίγει το δρόμο για πειράματα βιοτινυλίωσης σε πειραματόζωα.**

Στα πλαίσια αυτής της εργασίας, δείξαμε ότι μπορεί να επιτευχθεί στοχευμένη βιοτινυλίωση πρωτεινών σε κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιώντας το σύστημα της γονιδιακής μεταφοράς μέσω ανασυνδυασμένων αδενοϊών. Οι εφαρμογές των αδενοϊών αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς θα μπορούμε να εισάγουμε το σύστημα αυτό σε πειραματόζωα και επομένως να βιοτινυλιώνουμε πρωτείνες *in vivo* και να μελετούμε τις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτείνες ή με την χρωματίνη. Ένα τέτοιο εγχείρημα θα είναι πολύ ελπιδοφόρο, από τη στιγμή που υπάρχει το πρόβλημα της κακής λειτουργίας ορισμένων αντισωμάτων.

Τα προβλήματα που δημιουργούνται από τη χρήση διαφόρων αντισωμάτων είναι ποικίλα: πρώτον, διαφορετικό σήμα από κάθε αντίσωμα και αυτό μπορεί να ιδιαίτερα προβληματικό σε πειράματα που η ποσοτική διαφορά των αποτελεσμάτων είναι σημαντική, δεύτερον, διαφορετική ποιότητα των αντισωμάτων σε κάθε παρτίδα παραλαβής, τρίτον, όχι υψηλή συνάφεια μεταξύ πρωτείνης-αντισώματος ή μεταξύ επιτόπου-αντισώματος. Πειράματα συνανοσοκατακρήμνισης (co-IP) απαιτούν χρήση αντισωμάτων ειδικών για την κάθε πρωτείνη ή ειδικών για κάθε αντιγονικό επίτοπο με τον οποίο έχει συντηχθεί η πρωτείνη. Σε αντίθεση περίπτωση, κακή λειτουργία των αντισωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε κακή επεξήγηση των αποτελεσμάτων και κατά συνέπεια σε λανθασμένο συμπέρασμα. Το σύστημα της βιοτινυλίωσης είναι πολύ πιο ειδικό και ευαίσθητο από το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα συνανοσοκατακρήμνισης λόγω της εξαιρετικά υψηλής συνάφειας και ειδικότητας της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.

Έτσι, κατασκευάζοντας τον ιό που φέρει τη βακτηριακή λιγάση BirA, και αποδεικνύοντας ότι δουλεύει αποτελεσματικά βιοτινυλίωντας της αδενοϊκή πρωτείνη bioSmad3 (Εικόνα 29) σε κύτταρα HaCaT, ανοίγουμε το δρόμο για χρήση του ιού αυτού σε ποντίκια και βιοτινυλιώνοντας με τον τρόπο αυτό άλλες πρωτείνες.

**Μελέτη της ρύθμισης και λειτουργίας του ανθρώπινου γονιδίου BCAR3, ενός καινούριου γονιδίου-στόχου του μονοπατιού του TGF-β, καθώς και του ρόλου του στην ανάπτυξη και τον καρκίνο.**

Η ενότητα αυτή εστιάζει στη μελέτη της ρύθμισης και της λειτουργίας του γονιδίου BCAR3 που βρέθηκε ότι είναι καινούριος άμεσος στόχος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGF-β (Δρ. Βάσω Επισκόπου, αδημοσίευτα αποτελέσματα) και στο ρόλο του στην ανάπτυξη και τον καρκίνο. Ο απώτερος σκοπός της δουλειάς αυτής είναι η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών εργαλείων για τη θεραπεία του καρκίνου.

Ο TGF-β παίζει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης. Όπως έχει αναφερθεί στην Εισαγωγή, ο ρόλος του είναι διττός, καθώς δρα κατασταλτικά στην ογκογένεση σε φυσιολογικούς ιστούς και ενισχυτικά κατά την ογκογένεση (ενισχύει την αγγειογένεση, την ανοσο-καταστολή, και την EMT- μετάβαση επιθηλιακών

κυττάρων σε μεσεγχυματικά, epithylial to mesenchymal transition) (Siegel and Massague, 2003; Wakefield and Roberts, 2002). Ο TGF-β παίζει έναν εξίσου σημαντικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Μέλη της οικογένειας του TGF-β εμπλέκονται στη δέσμευση της «τύχης» των βλαστικών κυττάρων (stem cell fate commitment) (Kitisin et al., 2007).

Με σκοπό να ταυτοποιηθούν καινούρια γονίδια που ρυθμίζονται από τις Smad πρωτείνες, χρησιμοποιήθηκε ένα καινούριο σύστημα γονιδιακής έκφρασης που επιτρέπει τον αυστηρό χειρισμό της ισχύος και της διάρκειας του σηματοδοτικού μονοπατιού TGF-β/activin σε βλαστικά κύτταρα ποντικού (Δρ. Βάσω Επισκόπου, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το σύστημα βασίζεται στην tet-επαγώμενη έκφραση του συστατικά ενεργού υποδοχέα τύπου Ι της ακτιβίνης (ALK4) σε ES κύτταρα. Η ενεργότητα του υποδοχέα αυτού μπορεί να μπλοκάρεται χρησιμοποιώντας τον SB-431542 (SB) αναστολέα, ο οποίος αναστέλλει ειδικά τη Smad2/3 φωσφορυλίωση, μπλοκάροντας τους ενδογενείς Alk4/5/7 και  (ALK4ca) υποδοχείς. Χρησιμοποιώντας το σύστημα αυτό, ταυτοποιήθηκαν 56 καινούρια γονίδια που επηρέαζονται από τη δράση των Smad πρωτεινών, τα οποία ενεργοποιούνταν όταν ο ALK4 επάγονταν και απενεργοποιούνταν όταν γινόταν χορήγηση SB στα κύτταρα. Για να ταυτοποιηθούν τα γονίδια που ενεργοποιούνται άμεσα από τις Smad πρωτείνες χωρίς τη σύνθεση ενδιάμεσων παραγόντων και συμπαραγόντων, χορηγήθηκε κυκλοεξαμίδιο (CHX) στα κύτταρα ώστε να ανασταλεί η πρωτεϊνοσύνθεση και να εξεταστεί ποια γονίδια επάγονται με επαγωγή του ALK4. Τελικά, 28 από τα 56 γονίδια ήταν άμεσοι στόχοι των Smad πρωτεινών (Δρ. Βάσω Επισκόπου, αδημοσίευτα αποτελέσματα).

Το γονίδιο BCAR3 ήταν το γονίδιο που επιλέξαμε για περαιτέρω μελέτη. Το BCAR3 είναι μικρή GTPase και έχει δράση παράγοντα ανταλλαγής γουανυλ-νουκλεοτιδίου. Κάνοντας, αρχικά, πειράματα RT-PCR για να μελετήσουμε τη μεταγραφή του γονιδίου αυτού παρουσία του TGF-β για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (3h, 6h, 24h) σε κύτταρα HaCaT, διαπιστώσαμε ότι η μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 αυξάνεται σημαντικά (2-4 φορές) μετά από προσθήκη του TGF-β. Η ενεργοποίηση αυτή ήταν υψηλότερη όταν ο TGF-β προστέθηκε για 3h (Εικόνα 30).  Το πείραμα αυτό έγινε και σε κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2, προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν το φαινόμενο που παρατηρούμε-ενεργοποίηση της μεταγραφής του

γονιδίου BCAR3 σε απόκριση προσθήκης του TGF-β- είναι ιστοειδικό. Ο σκοπός μας ήταν να διερευνήσουμε και να κατανοήσουμε για ποιο λόγο ενεργοποιείται το γονίδιο BCAR3 σε απόκριση προσθήκης του TGF-β. Το αποτελέσμα ήταν ότι η μεταγραφή του γονιδίου BCAR3 αυξάνεται ελαφρώς (1.8 φορές) μετά από προσθήκη του TGF-β σε κύτταρα HepG2 (Εικόνα 31), αλλά η αύξηση αυτή ήταν πολύ υψηλότερη όταν το πείραμα διεξήχθη σε κύτταρα HaCaT. Μια εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι ότι η πρωτείνη BCAR3 παίζει ρόλο στη μετάβαση επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (epithylial to mesenchymal transition-EMT) και για αυτό, το φαινόμενο της ενεργοποίησης του γονιδίου είναι πολύ πιο ισχυρό σε κύτταρα HaCaT που υπόκεινται σε αυτή τη διαδικασία ως απόκριση στον TGF-β .

Πείραμα RT-PCR για τη μελέτη της ενεργοποίησης της μεταγραφής του BCAR3 έγινε και παρουσία του αδενοϊού AdALK5ca. Το γονίδιο ενεργοποιήθηκε σημαντικά (3.2 φορές) παρουσία του ιού που φέρει τον υποδοχέα (Εικόνα 32A).

Προκειμένου να διαπιστώσουμε εάν ο υποκινητής του γονιδίου BCAR3 ενεργοποιείται παρουσία του ALK5 υποδοχέα και των πρωτεινών Smad3/4, πρώτα κλωνοποιήσαμε τον υποκινητή του γονιδίου BCAR3 από ανθρώπινο γενωμικό DNA και στη συνέχεια εκτελέσαμε πειράματα ενεργοποίησης του υποκινητή αυτού (transactivation experiments). Διαπιστώσαμε ότι ο υποκινητής του γονιδίου BCAR3 ενεργοποιείται σημαντικά παρουσία του συστατικά ενεργού υποδοχέα caALK5 και των μεταγραφικών παραγόντων Smad3 και Smad4 σε κύτταρα HEK293T και HepG2. Μελλοντικά, θα ήταν πολύ σημαντικό, να γίνουν 5’ αφαιρέσεις από τον υποκινητή έτσι ώστε να ταυτοποιηθούν τα στοιχεία που αποκρίνονται στον TGF-β (TGF-β-responsive elements). Έπειτα, κάνοντας πειράματα ενεργοποίησης του υποκινητή χρησιμοποιώντας ως πλασμίδια αναφοράς τις κατασκευές αυτές και ως φορείς έκφρασης τον ALK5 υποδοχέα και τις πρωτείνες Smad3/4, θα είναι δυνατή η χαρτογράφηση των στοιχείων αυτών που αποκρίνονται στις Smad (Smad Binding Elements-SBE). Η σπουδαιότητα των ταυτοποιημένων SBE για τη ρύθμιση του γονιδίου BCAR3 από τις Smad πρωτείνες μπορεί να επιβεβαιωθεί κάνοντας μεταλλαξιγένεση των στοιχείων αυτών. Τα πειράματα αυτά θα ήταν καλό να διεξαχθούν και σε καρκινικές σειρές αλλά και βλαστοκύτταρα, με σκοπό να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Επιπρόσθετα μελλοντικά πειράματα που θα μπορούσαν να γίνουν για να μελετηθεί και να ταυτοποιηθεί ο ρόλος και η λειτουργία του BCAR3, είναι τα ακόλουθα: Κάνοντας χρήση ενός αντισώματος ειδικού για την BCAR3 πρωτείνη, θα μπορούσαμε να μετρήσουμε εάν παρουσία του TGF-β, έχουμε και αύξηση της πρωτείνης εκτός από αύξηση του mRNA. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP) θα ήταν σημαντικό να γίνουν για να επιβεβαιώσουν την πρόσδεση των Smad πρωτεινών στον υποκινητή του BCAR3 *in vivo*. Επίσης πειράματα ChIP θα μπορούσαν να γίνουν σε ποντικίσια βλαστοκύτταρα χρησιμοποιώντας το σύστημα της τετρακυκλίνης που περιγράφηκε παραπάνω με σκοπό να επιτευχθεί αυστηρός έλεγχος της ισχύος και της διάρκειας της ενεργοποίησης μέσω των Smad πρωτεινών. Ακόμη, θα μπορούσε να γίνει πείραμα DNAP (DNA Affinity Precipitation) χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα από κύτταρα στα οποία χορηγείται TGF-β και από κύτταρα χωρίς TGF-β, έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η άμεση πρόσδεση των Smad πρωτεινών στο DNA. Για να ταυτοποιηθεί ο ρόλος του BCAR3 στη TGF-β σηματοδότηση σε φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες, θα μπορούσαν να γίνουν πειράματα αναστολής της ενδογενούς γονιδιακής έκφρασης και πειράματα υπερέκφρασης. Πειράματα αναστολής θα μπορούσαν να γίνουν κάνοντας χρήση της τεχνολογίας του siRNA που θα σιωπούσε ειδικά την έκφραση του BCAR3. Πειράματα υπερέκφρασης θα μπορούσαν να γίνουν κάνοντας χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών που θα υπερέκφραζαν το γονίδιο BCAR3. Τα δύο παραπάνω είδη πειραμάτων θα μπορούσαν να συνδυαστούν με γνωστά πειράματα που χρησιμοποιούνται για το μονοπάτι του TGF-β, όπως πειράματα μέτρησης απόπτωσης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού, κυτταρικής μετανάστευσης και EMT. Με τον τρόπο αυτό, θα είμαστε σε θέση να εντοπίσουμε το ρόλο του γονιδίου BCAR3 στις κυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται από τον TGF-β.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΊΑ


Afrakhte, M., Moren, A., Jossan, S., Itoh, S., Sampath, K., Westermark, B., Heldin, C.H., Heldin, N.E., and ten Dijke, P. 1998. Induction of inhibitory Smad6 and Smad7 mRNA by TGF- family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249:** 505–511.

Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., and Kawabata, M. 1999. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- signaling through interaction with Smads. *J. Biol. Chem.* **274:** 35269–35277.

Attisano, L. and Wrana, J.L. 2002. Signal transduction by the TGF-superfamily. *Science* **296:** 1646–1647.

Aubin, J., Davy, A., and Soriano, P. 2004. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: Impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes & Dev.* **18:** 1482–1494.

Bannister, A.J. and Kouzarides, T. 1996. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* **384:** 641–643.

Brinkman A, Van der Flier S, Kok EM, Dorssers LCJ 2000. BCAR1, a human homologue of the adapter protein p130Cas and antiestrogen resistance in breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. **92:**112-120.

Cai D, Iyer A, Felekkis KN, et al. 2003 AND-34/BCAR3, a GDP exchange factor whose overexpression confers antiestrogen resistance, activates Rac, PAK1, and the cyclin D1 promoter. *Cancer Res* **63**: 6802–8.

Chacko, B.M., Qin, B., Correia, J.J., Lam, S.S., de Caestecker, M.P., and Lin, K. 2001. The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nat. Struct. Biol.* **8:** 248–253.

Chacko, B.M., Qin, B.Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L.J., De Caestecker, M., and Lin, K. 2004. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-signaling. *Mol.Cell* **15:** 813–823.

Charpentier AH, Bednarek AK, Daniel RL, Hawkins KA, Laflin KJ, Gaddis S, MacLeod MC, Aldaz CM 2000. Effects of estrogen on global gene expression: identification of novel targets of estrogen action. *Cancer Res* **60:**5977-5983.

Chen, C.R., Kang, Y., and Massagué, J. 2001. Defective repression of c-myc in breast cancer cells: A loss at the core of the transforming growth factor growth arrest program. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98:** 992–1009.

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

Clarke, R, Leonessa, F, Welch, JN, Skaar, TC 2001 Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol Rev* 2001, **53:**25-71.

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

de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F. and Strouboulis, J. 2003. Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**: 7480–7485.

Derynck, R. and Zhang, Y.E. 2003. Smad-dependent and Smad independent pathways in TGF-family signalling. *Nature* **425:** 577–584.

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

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

Dorssers LCJ, Van der Flier S, Brinkman A, Van Agthoven T, Veldscholte J, Berns EMJJ, Klijn JGM, Beex LVAM, Foekens JA 2001. Tamoxifen resistance in breast cancer: elucidating mechanisms. *Drugs* **61:**1721-1733.

Dorssers LCJ, Van Agthoven T, Dekker A, Van Agthoven TLA, Kok EM. 1993 Induction of antiestrogen resistance in human breast cancer cells by random insertional mutagenesis using defective retroviruses: identification of bcar-1, a common integration site. *Mol Endocrinol* **7:**870-878.

Dorssers LCJ ,van Agthoven T, Brinkman A, Veldscholte J, Smid M and Dechering KJ 2004. Breast cancer oestrogen independence mediated by *BCAR1* or *BCAR3* genes is transmitted through mechanisms distinct from the oestrogen receptor signalling pathway or the epidermal growth factor receptor signalling pathway. *Breast Cancer Res* **7**:82-92

Dorssers LCJ, Grebenchtchikov N, Brinkman A, Look MP, Van Broekhoven SPJ, De Jong D, Peters HA, Portengen H, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JGM, *et al.* 2004. The prognostic value of BCAR1 in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res* **10:**6194-6202.

Felekkis KN, Narsimhan RP, Near R, et al. 2005 AND-34 activates phosphatidylinositol 3-kinase and induces anti-estrogen resistance in a SH2 and GDP exchange factor-like domain-dependent manner. *Mol Cancer Res* **3**: 32–41.

Feng XH and Derynck R 2005. Specificity and Versatility in TGF-β Signalling Through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. **21**: 659-693.

Frederick, J.P., Liberati, N.R., Waddell, D.S., Shi, Y., and Wang, X.F. 2004. Transforming growth factor-mediated transcriptional repression of c-myc is dependent on direct binding of Smad3 to a novel repressive Smad binding element. *Mol.Cell. Biol.* **24:** 2546–2559.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, *et al.* 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286:**531-537.

Gorlich, D. and Kutay, U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15:** 607–660.

Gotoh T, Cai D, Tian X, Feig LA, Lerner A. 2000. p130Cas regulates the activity of AND-34, a novel Ral, Rap1, and R-Ras guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* **275**: 30118–23.

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

He, TC, Zhou, S, da Costa, L, Yu, J , Kinzler, K.W, and Vogelstein, B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 2509–2514.

Hiscox S, Morgan L, Barrow D, et al. 2004. Tamoxifen resistance in breast cancer cells is accompanied by an enhanced motile and invasive phenotype: inhibition by gefitinib (‘‘Iressa’’, ZD1839). *Clin Exp Metastasis* **21**: 201–12.

Inman, G.J. and Hill, C.S. 2002. Stoichiometry of actives Smad– transcription factor complexes on DNA. *J. Biol. Chem.* **277:** 51008–51016.

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

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

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

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. 1997. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* **390**: 632–6.

Klemke RL, Leng J, Molander R, et al. 1998 CAS/Crk coupling serves as a ‘‘molecular switch’’ for induction of cell migration. *J Cell Biol* **140**: 961–72.

Klijn, JGM, Berns, PMJJ, Schmitz, PIM, and Foekens, JA 1992. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocr Rev* **13:**3-17.

Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massagué, J. 1999. A mechanism of repression of TGF/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & Dev.* **13:** 804–816.

Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H., and Moustakas, A. 2001. Transforming growth factor-induces nuclear import of Smad3 in an importin-1 and Ran-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* **12:** 1079–1091.

Lacroix M, Leclercq G. 2004 Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* **83**: 249–89.

Letterio, J.J. and Roberts, A.B. 1998. Regulation of immune responses by TGF. *Annu. Rev. Immunol.* **16:** 137–161.

Liu, F., Pouponnot, C., and Massagué, J. 1997. Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF-inducible transcriptional complexes. *Genes & Dev.* **11:** 3157–3167.

Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R.M., and Massagué, J. 1996. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* **381:** 620–623.

Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., and Zhou, Q. 1999. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF signaling. *Genes & Dev.* **13:** 2196–2206.

Lu Y, Brush J, Stewart TA. 1999. NSP1 defines a novel family of adaptor proteins linking integrin and tyrosine kinase receptors to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* **274**: 10047–52.

Massagué, J. and Chen, Y.G. 2000. Controlling TGF-signaling. *Genes & Dev.* **14:** 627–644.

Massagué, J. and Wotton, D. 2000. Transcriptional control by the TGF/Smad signaling system. *EMBO J.* **19:** 1745–1754.

Massagué, J., Blain, S.W., and Lo, R.S. 2000. TGF-signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* **103:** 295–309.

Massagué, J. 1998. TGF signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* **67:** 753–791.

Massague´, J. and Wotton, D. 2000. Transcriptional control by the TGF-b/Smad signaling system. *EMBO J.,* **19**: 1745–1754.

Massagué, J, Seoane, J and Wotton D (2005). Smad transcription factors. *Genes & Dev.* **19**: 2783-2810

Massagué, J. 2000. How cells read TGF-signals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1:** 169–178.

Massagué, J. 2000. Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes & Dev*. **17**: 2993–2997.

McDonnell, DP and Norris, JD 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* **296**:1642-1644.

Moustakas, A and Heldin CH 2008. Dymanic control of TGF-β signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Letters*. **582**: 2051-2065.

Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. and Heldin, C. 2001. Smad regulation in TGF-b signal transduction. *J. Cell Sci*., **114**: 4359–4369.

O'Regan, RM, and Jordan, VC 2002. The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators anddown regulators. *Lancet Oncol* **3:** 207-214.

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87:** 953 959.

Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. 2000. Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor *J. Biol. Chem.* **275:** 29244–29256.

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

Pouponnot, C., Jayaraman, L., and Massagué, J. 1998. Physical and functional interactions of Smads and p300/CBP. *J. Biol. Chem.* **273:** 22865–22868.

Ring A, Dowsett M. 2004. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* **11**: 643–58.

Roymans D, Slegers H. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinases in tumor progression. *Eur J Biochem* **268**: 487–98.

Samuels Y, Ericson K. 2006. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* **18**: 77–82.

Sakakibara A, Hattori S. 2004 Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways. *J Biol Chem* **275**: 6404–10.

Schrecengost RS, Riggins RB, Thomas KS, Guerrero MS, and Bouton MH 2007. Breast Cancer Antiestrogen Resistance-3 Expression Regulates Breast Cancer Cell Migration through Promotion of p130Cas Membrane Localization and Membrane Ruffling. *Cancer Res* **67**: 6174–82.

Shen, X., Hu, P.P., Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., and Wang, X.F. 1998. TGF-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Mol. Biol. Cell* **9:** 3309–3319.

Shi, Y. and Massagué, J. 2003. Mechanisms of TGF-signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113:** 685–700.

Shi, Y., Wang, Y.-F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague´ ,J. and Pavletich ,N.-P. 1998 Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-b signaling. *Cell*, **94**: 585–594.

Siegel, P.M. and Massagué, J. 2003. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3:** 807–821.

Speirs V. 2002. Oestrogen receptor beta in breast cancer: good, bad or still too early to tell? *J Pathol* . **197:**143-147.

Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., and Luo, K. 1999. Negative feedback regulation of TGF-signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* **286:** 771–774.

Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. 1999a. Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-signaling. *Mol. Cell* **4:** 499–509.

Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. 1999b. SnoN and ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96:** 12442–12447.

ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C.-H. 2000. Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-b signaling. *Trends Biochem. Sci.,* **25**: 64–70.

van Agthoven, T, Timmermans, M, Foekens, JA, Dorssers, LCJ, and Henzen-Logmans, SC 1994. Differential expression of estrogen, progesterone, and epidermal growth factor receptors in normal, benign, and malignant human breast tissues using dual staining immunohistochemistry. *Am J Pathol.* **144:**1238-1246.

van Agthoven T, Van Agthoven TLA, Dekker A, Van der Spek PJ, Vreede L, Dorssers LCJ: Identification of BCAR3 by a random search for genes involved in antiestrogen resistance of human breast cancer cells**.** *EMBO J* **17:**2799-2808.

van Agthoven T, Van Agthoven TLA, Dekker A, Foekens JA, Dorssers LCJ 1994. Induction of estrogen independence of ZR-75-1 human breast cancer cells by epigenetic alterations. *Mol Endocrinol* **8:** 1474-1483.

van der Flier S, Brinkman A, Look MP, Kok EM, Meijer-Van Gelder ME, Klijn JGM, Dorssers LCJ, Foekens JA. 2000. Bcar1/p130Cas protein and primary breast cancer: prognosis and response to tamoxifen treatment. *J Natl Cancer Inst* , **92:**120-127.

van Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, *et al.* 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415:**530-536.

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

Whitman, M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGF superfamily. *Genes & Dev.* **12:** 2445–2462.

Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massagué, J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-receptor. *Nature* **370:** 341–347.

Wu, J.W., Fairman, R., Penry, J., and Shi, Y. 2001a. Formation of a stable heterodimer between Smad2 and Smad4. *J. Biol. Chem.* **276:** 20688–20694.

Xu, L., Alarcσn, C., Hφl, S., and Massagué, J. 2003. Distinct domain utilization by smad3 and smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J. Biol. Chem.* **278:** 42569–42577.

Yu Y, Feig LA. 2002 Involvement of R-Ras and Ral GTPases in estrogen-independent proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* **21**: 7557–68.