

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Διδακτορική Διατριβή

**Σχέση δομής-λειτουργίας και μηχανισμοί μεταγραφικής
ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Smad του ανθρώπου**

ΠΡΟΚΟΒΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Ιούνιος 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Διδακτορική Διατριβή

**Σχέση δομής-λειτουργίας και μηχανισμοί μεταγραφικής
ενεργοποίησης των πρωτεϊνών Smad του ανθρώπου**

ΠΡΟΚΟΒΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

ΜΕΛΗ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Δ. ΚΑΡΔΑΣΗΣ
Χ. ΣΤΟΥΡΝΑΡΑΣ
Α. ΓΡΑΒΑΝΗΣ
Β. ΖΑΧΑΡΙΟΥ
Δ. ΜΠΟΥΜΠΑΣ
Χ. ΤΣΑΤΣΑΝΗΣ
Γ. ΧΑΛΕΠΑΚΗΣ

Ιούνιος 2004

**Στον πατέρα μου,
Θανάση**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
SUMMARY	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TGFβ	17
Ποικιλότητα στις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων και στην πρόσδεση του συνδέτη TGFβ	18
Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούν μια συντηρημένη οικογένεια μεταγωγέων σηματοδότησης	19
Ρύθμιση της λειτουργίας των Smads μέσω φωσφορυλίωσης	24
Ολιγομερισμός και ενεργοποίηση των Smads	27
Οργάνωση των σηματοδοτικών κέντρων TGFβ	29
Πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση των Smads	33
Πυρηνική σηματοδότηση	36
Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Smad με πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA	41
Οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές p/CAF και CBP/p300	42
Οι μεταγραφικοί συν-καταστολείς c-Ski και SnoN	44
Ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των Smad πρωτεϊνών και συμμετοχή τους σε μονοπάτια ουμπικιτινίωσης	48
Άλλες λειτουργίες των υποδοχέων του TGFβ	52
Smad-ανεξάρτητη σηματοδότηση του TGFβ μέσω MAPK μονοπατιών.	53

Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τον TGFβ	54
ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ TGFβ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ	57
Ο Epstein-Barr (EBV) ιός και η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1)	57
Η πρωτεΐνη LMP1 χρησιμοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB	58
Δομική και λειτουργική ανάλυση του μορίου της πρωτεΐνης LMP1	60
Η έκφραση της LMP1 αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση	66
Διαφορές μεταξύ της LMP1 - και TNFR - επαγόμενης σηματοδότησης	66
Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGFβ και της LMP1	67
Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGFβ και του TNFα	68
Σύγκλιση και συνεργασία των TGFβ και NF-κB μονοπατιών	69
ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ TGFβ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΜΕ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ	70
Δομή και λειτουργίες των NRs	70
Συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς των NRs	72
Ο ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4 (Hepatic Nuclear Factor 4, HNF4)	73
Αλληλεπίδραση των NRs με τις Smads	75
ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TGFβ ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ	79
Έλεγχος της κυτταρικής αύξησης από τον TGFβ	79
Το κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ	81
Αποπτωτικοί μηχανισμοί που επάγονται από τον TGFβ	84

Απώλεια της TGFβ επαγόμενης κυτταροστατικής δράσης στον καρκίνο	86
Προ-διεσδυτικές και μεταστατικές λειτουργίες του TGFβ	91
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	94
Υλικά	94
ΜΕΘΟΔΟΙ	96
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)	96
Απομόνωση τμημάτων DNA	96
Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)	97
Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B, DH5a, BL21 της E.coli (transformation)	97
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (miniprep procedure - micro screening)	97
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale preparation)	98
Πλασμιδιακές κατασκευές (plasmid constructions)	98
Κυτταροκαλλιέργειες	106
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)	106
Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal	107
Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)	108
Μέτρηση της αντίδρασης της ακετυλοτρανσφεράσης γλωραμφαινικόλης (CAT assay)	108
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot)	109
Καθαρισμός πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST, από κύτταρα E.coli	110

In vitro αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down)	111
Το σύστημα της in vivo βιοτινιλίωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμνιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (in vivo biotinylation)	112
Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)	113
Άμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών συζευγμένων με την GFP πρωτεΐνη (Green Fluorescence Protein) (Direct Immunofluorescence)	114
Έκφραση της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης σε κύτταρα σακχαρομύκητα	114
Πίνακας I: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCRs)	116
Πίνακας II: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCRs)	117
Πίνακας III: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCRs)	118
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	119
ΕΝΟΤΗΤΑ I. Καταστολή της TGFβ σηματοδότησης από την Λανθάνουσα Μembranική Πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr	120
Η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλλει την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των υποκινητών p21/WAF1 και Smad7	121
Μια μεταλλαγμένη, μη αποικοδομήσιμη μορφή του IκB αναστέλλει την κατασταλτική δράση της LMP1 πρωτεΐνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ	125
Μία από τις CTAR1/TES1 και CTAR2/TES2 περιοχές αρκεί για την LMP1 επαγόμενη καταστολή της TGFβ σηματοδότησης	127
Καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της Smad-επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφής από τους μεταγωγείς της LMP1 σηματοδότησης	130
Η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της Smad μεταγραφικής ενεργότητας από τον NF-κB αναστέλλεται από την απαλοιφή της C-τερματικής περιοχής της υπομονάδας p65 (αμινοξέα 496-551)	131
Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης GAL4-Smad3 από τις LMP1 και p65	132
Η LMP1 πρωτεΐνη δεν επηρεάζει τον πυρηνικό εντοπισμό των Smad πρωτεϊνών	133
Ο συνενεργοποιητής p300 ενισχύει την μεταγραφική ενεργοποίηση που επάγεται από την TGFβ και την LMP1 σηματοδότηση και εξουδετερώνει την κατασταλτική δράση της LMP1 στο μονοπάτι του TGFβ	139
Έλλειψη συνεργασιακής δράσης των Smad3 και p65 πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση συνθετικού υποκινητή που φέρει θέσεις πρόσδεσης και των δύο πρωτεϊνών	140

Έλεγχος φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NF-kB και Smad3 μεταγραφικών παραγόντων	141
ΕΝΟΤΗΤΑ II. Οι Smad λειτουργούν ως συνενεργοποιητές HNF4	146
Μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης Smad3 δεν επηρεάζουν την ικανότητά της να αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με τον HNF4	148
Οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν λειτουργικά με την περιοχή 1-128 του HNF4, που περιλαμβάνει την AF-1 (Activation Function- 1) και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA.	152
Οι υδρόφοβες θέσεις της AF-1 περιοχής του HNF4 είναι απαραίτητες για την λειτουργική αλληλεπίδραση του παράγοντα αυτού με τις Smad πρωτεΐνες	156
Επίδραση συνενεργοποιητών στην μεταγραφική δραστηριότητα της υβριδικής GAL4-HNF4 πρωτεΐνης	159
Επίδραση των συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGFβ	166
ΕΝΟΤΗΤΑ III. Περιοχές της TGFβ-ρυθμιζόμενης Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστηριότητα	168
Η μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3 1-248 είναι ανεξάρτητη της Smad4 πρωτεΐνης	175
Οι μεταγραφικώς ανενεργές GAL4-Smad3 230-290 και GAL4-Smad3 230-374 στερούνται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4	177
Λειτουργικότητα της αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνης και της μεταλλαγμένης Smad3 143-248 σε κύτταρα σακχαρομύκητα	179
Εσωτερικές απαλοιφές της Smad3 πρωτεΐνης στην περιοχή 200-248 μειώνουν ή αναστέλλουν την μεταγραφική της δραστηριότητα	181
Η 6myc-Smad3 Δ228-249 στερείται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη	186
Πυρηνικός εντοπισμός των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που φέρουν εσωτερικές απαλοιφές των περιοχών 200-230 και 228-249	189
Η GAL4-Smad3 Δ228-249 στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη	191
Η GAL4-Smad3 Δ228-249 στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη	195
Η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 της πρωτεΐνης Smad3 καταστέλλει τον ομοπολυμερισμό και τον ετεροπολυμερισμό της	197
Η ελάχιστη περιοχή 201-248 της Smad3 πρωτεΐνης αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με τον συνενεργοποιητή CBP, και η απαλοιφή της περιοχής 228-249 καταστέλλει αυτή την αλληλεπίδραση	203

Ανάλυση των περιοχών της Smad3 πρωτεΐνης που αλληλεπιδρούν με τον συνενεργοποιητή p/CAF	212
Ανάλυση της ικανότητας των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης να αλληλεπιδρούν φυσικά με τον συνκαταστολέα c-Ski	215
Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην αμινοξική θέση 238 της Smad3 πρωτεΐνης αναστέλλει την μεταγραφική της ενεργότητα	217
Η υβριδική GAL4-Smad3 E238A στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη	223
Η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης E238A στην Smad3 πρωτεΐνη καταστέλλει τον ομοπολυμερισμό και τον ετεροπολυμερισμό της με την Smad4 πρωτεΐνη	228
Η Smad3 E238A πρωτεΐνη στερείται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή p/CAF	230
Η σημειακά μεταλλαγμένη Smad3 E238A διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον συνκαταστολέα c-Ski	232
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	234
ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ TGFβ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ LMP1 ΤΟΥ ΙΟΥ EPSTEIN-BARR	235
Η απώλεια της απόκρισης στον συνδέτη TGFβ οδηγεί στον μετασχηματισμό των κυττάρων και καρκινογένεση	235
Η LMP1 πρωτεΐνη αποτελεί καταστολέα της βασικής και TGFβ επαγόμενης ενεργότητας των υποκινητών των p21/WAF1/Cip1 και Smad7 γονιδίων	236
Ο κρίσιμος ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στην LMP1 επαγόμενη καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad πρωτεϊνών	238
Πιθανοί μηχανισμοί καταστολής της TGFβ σηματοδότησης από την LMP1 πρωτεΐνη	240
ΟΙ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΩΣ ΣΥΝΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ HNF4	242
Περιοχές των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών που απαιτούνται για την φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση με τον HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4)	242
Η περιοχή AF-1, η περιοχή C πρόσδεσης στο DNA και η καρβοξυ-τερματική περιοχή F του HNF4 συνεισφέρουν στις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad3 και HNF4 πρωτεϊνών	245
Ο ρόλος της C-τερματικής περιοχής F (αμινοξέα 388-455) του παράγοντα HNF4 στις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις του HNF4 με την Smad3 πρωτεΐνη	247
Επίδραση συνενεργοποιητών στη μεταγραφική ενεργότητα του HNF4 και στην λειτουργική αλληλεπίδραση του με τις Smads	247

Οι επιπτώσεις της αλληλεπίδρασης των Smads και HNF4 πρωτεϊνών στην ηπατική γονιδιακή έκφραση	248
ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΕΩΣ ΔΟΜΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ SMAD3 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ	250
Περιοχές της Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστικότητα	250
Φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις της μεταγραφικά ενεργής περιοχής 143-248 της Smad3 με συνενεργοποιητές	251
Η περιοχή 143-248 της ανθρώπινης Smad3 είναι μεταγραφικά δραστική σε κύτταρα σακχαρομύκητα	252
Η χρήση του συστήματος της in vivo βιοτινυλίωσης στην μελέτη των φυσικών αλληλεπιδράσεων της Smad3 πρωτεΐνης	252
Η σημειακά μεταλλαγμένη Smad3 E238A στερείται μεταγραφικής δραστικότητας, ικανότητας ολιγομερισμού και αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή p/CAF	255
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	258
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	277

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο μετασηματιζών αυξητικός παράγοντας β (TGFβ) είναι μια πλειοτροπική κυτταροκίνη η οποία ρυθμίζει πληθώρα βιολογικών διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η απόπτωση, η διαφοροποίηση, κ.α. Ο TGFβ σηματοδοτεί μέσω των υποδοχέων του που έχουν δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης και μέσω μιας μικρής ομάδας κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που ονομάζονται Smads οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς και δρουν ως μεταγραφικοί ενεργοποιητές. Η απόκριση των κυττάρων στον TGFβ εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των διαμεσολαβητών του με παράγοντες άλλων μονοπατιών (signaling cross talk) και η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να έχει θετική ή αρνητική επίδραση στο TGFβ μονοπάτι και την μεταγραφική δραστηριότητα των Smad πρωτεϊνών.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν: α) η μελέτη μηχανισμών θετικής και αρνητικής αλληλεπίδρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια και β) ο χαρακτηρισμός λειτουργικών περιοχών στην Smad3 που απαιτούνται για την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων. Στην 1^η ενότητα μελετήσαμε τον μηχανισμό καταστολής της TGFβ σηματοδότησης από την λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr που είναι υπεύθυνη για την ογκογόνο δράση του ιού σε διάφορους τύπους κυττάρων. Οι μελέτες μας έδειξαν ότι η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλλει την TGFβ σηματοδότηση χρησιμοποιώντας το μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB. Προτείνουμε δυο εναλλακτικούς μηχανισμούς για την καταστολή από τον NF-κB: Συναγωνισμός για συνενεργοποιητές όπως ο p300 και άμεση πρόσδεση του NF-κB στην Smad3 με αποτέλεσμα την καταστολή της δράσης της τελευταίας στον πυρήνα. Φυσικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην Smad3 και τον NF-κB γίνονται μέσω της περιοχής 122-290 της Smad3 πρωτεΐνης και της RHD (Rel Homology Domain) περιοχής των υπομονάδων p65 και p50 του NF-κB. Στην 2^η Ενότητα μελετήσαμε τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της Smad3 και του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα HNF4, οι οποίες οδηγούν σε TGFβ-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων που εκφράζονται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ όπως τα γονίδια των απολιποπρωτεϊνών. Η ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF4 από τις Smads επιτελείται μέσω της περιοχής AF1 του πρώτου (αμονοξέα 1-25) ενώ μεταλλάξεις σε υδρόφοβα αμινοξέα αυτής της περιοχής κατέστειλαν την ενεργοποιητική δράση των Smads. Βρέθηκε ότι οι πυρηνικοί

υποδοχείς χρησιμοποιούν και πιθανά μοιράζονται κοινούς συνενεργοποιητές με τον HNF4 όπως τα μέλη της οικογένειας των p160 συνενεργοποιητών (TIF2, SRC-1, Rac3) και ο PGC1. Τέλος, στην 3^η Ενότητα εκπονήσαμε μια ενδελεχή λειτουργική χαρτογράφηση των μεταγραφικά ενεργών περιοχών της πρωτεΐνης Smad3 και βρήκαμε ότι, εκτός της MH2 περιοχής, μια δεύτερη περιοχή που εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 200-248 και περικλείει τμήμα του linker και τα 18 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής, είναι απαραίτητη για την μεταγραφική δράση των Smads και την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες. Χρησιμοποιώντας μια νέα μέθοδο πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην βιοτινυλίωση *in vivo*, δείξαμε ότι η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 230-248 καθώς μια σημειακή μετάλλαξη στην θέση 238 (E238A) η οποία στην περίπτωση της Smad4 σχετίζεται με καρκίνο, κατέστειλαν πλήρως την μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης και την ικανότητα της να σχηματίζει ομοπολυμερή και ετεροπολυμερή με την Smad4. Αντίθετα, η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 200-230 του linker δεν επηρέασε την ικανότητα πολυμερισμού της πρωτεΐνης αλλά κατέστειλε την αλληλεπίδρασή της με τον συνενεργοποιητή p/CAF.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν την σημασία της αντιπολλαπλασιαστικής δράσης (growth arrest) του TGFβ (μέσω ενεργοποίησης αναστολέων του κυτταρικού κύκλου) καθώς αποτελεί στόχο της ιικής πρωτεΐνης LMP1 σε επιθηλιακά κύτταρα. Επίσης, υποδηλώνεται ο ρόλος της TGFβ σηματοδότησης στην έκφραση ηπατοειδικών γονιδίων και συνεπώς σε διεργασίες όπως ο ενεργειακός μεταβολισμός, η ομοιόσταση λιπιδίων, η μείωση της χοληστερόλης, μέσω συνεργασιακής αλληλεπίδρασης των Smads με τον HNF-4. Η συνομιλία του TGFβ μονοπατιού με πυρηνικούς υποδοχείς ορμονών (μέσω λειτουργικής αλληλεπίδρασης με τους συνενεργοποιητές τους), εμπλέκει τον TGFβ σε διεργασίες όπως η λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος, ή η ομοιόσταση γλυκογόνου. Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των περιοχών που ευθύνονται για την συνεργασιακή αλληλεπίδραση μεταξύ Smads και HNF-4, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο σε περιπτώσεις απορύθμισης είτε της TGFβ σηματοδότησης (ίνωση και καρκίνος του ήπατος, λόγω υπερλειτουργίας του TGFβ), είτε της HNF-4 λειτουργίας (σύνδρομο MODY I, λόγω σημειακής μετάλλαξης του HNF-4). Η χαρτογράφηση των περιοχών της Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστηριότητα και την αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες θα αποτελέσει χρήσιμη γνώση για την κατασκευή μορίων που θα επάγουν την TGFβ σηματοδότηση, (σε περιπτώσεις

μεταλλάξεων των Smad πρωτεϊνών όπως ο καρκίνος του γαστρεντερολογικού συστήματος και του πνεύμονα), ή θα την καταστέλλουν (σε περιπτώσεις υπερλειτουργίας του, όπως η ίνωση και οι μεταστάσεις). Η κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους ρυθμίζεται ή απορυθμίζεται το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ έχει μεγάλη βιοϊατρική σημασία και εφαρμογές στην γονιδιακή θεραπεία νοσημάτων όπως ο καρκίνος, η ίνωση, η αθηροσκλήρωση κ.α.

SUMMARY

Transforming growth factor β (TGF β) is a pleiotropic cytokine which regulates several biological processes such as cell proliferation, cell cycle regulation, apoptosis, differentiation and other developmental processes. TGF β is a member of a superfamily of cytokines encoded by 29 different genes in humans and signals via receptor serine/threonine kinases, termed type I and type II transmembrane receptors, that form complexes with the ligand on the cell surface resulting in activation of the dormant kinase activity of the type I receptor. This receptor then phosphorylates and activates members of the Smad family of tumour suppressors which act as transcriptional activators. The cellular response to TGF β depends on its negative or positive cross talk with other signaling pathways which influences the transcriptional activity of Smad proteins.

The purpose of this Thesis, was to a) study the mechanisms of positive and negative cross talk of TGF β with other signaling pathways and b) characterise regions of the Smad3 protein which are required for the transcriptional activation of gene expression. The first part of the Thesis was focused on the mechanisms of the TGF β signaling suppression by the Latent Membrane Protein 1 (LMP1) of the Epstein-Barr virus. LMP1 is responsible for the tumourigenic action of Epstein-Barr on various cell types. Our studies revealed that LMP1 suppresses TGF β signaling through activation of the transcriptional factor NF- κ B, which either antagonizes Smad3 for the interaction with common co-activators such as p300, or/and interacts directly with Smad3 preventing its transcriptional activity in the nucleus. We exhibited physical, *in vitro* interactions between the 122-90 region of Smad3 and the RHD (Rel Homology Domain) of the p65 and p50 subunits of NF- κ B. In the second part of the Thesis, we examined functional interactions between Smad3 and the orphan nuclear receptor HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor-4), that result in TGF β -mediated transcriptional activation of specific hepatic genes, such as those of apolipoproteins. Smad3/4 proteins enhance HNF-4 transcriptional activity through direct physical interactions with the AF-1 region (1-25 aa) of HNF-4. Mutagenesis of the hydrophobic aminoacids of the AF-1 region inhibited the Smad cooperative activity. Interestingly, not only HNF-4 but also Smad3/4 proteins are co-activated by members of the p160 family of coactivators (TIF2, SRC-1, RAC3) and by PGC1. In the third part of the

Thesis, we performed a detailed functional analysis of the transcriptional active regions of Smad3 protein, which revealed that besides MH2 domain, a second region located in aa 200-248, that includes part of the linker and the first 18 aa of the MH2 domain, is essential for the transcriptional activity of Smads and for their interactions with other proteins. By using a recently discovered method of protein interactions based on biotinylation *in vivo*, we showed that the internal deletion of the 230-248 region and point mutation of the 238 aminoacid to alanine (E238A) which in Smad4 is related with tumourigenesis, inhibited the transcriptional capacity of Smad3 and its ability to homo- and hetero-polymerise with Smad4. Oppositively, internal deletion of the 200-230 region of the linker did not affect the polymerizing ability of Smad3 but preneted its interaction with the coactivator p/CAF.

The above mentioned results indicate the importance of the anti-proliferative action of the TGF β cytokine (through activation of the inhibitors of cell cecele) which is the target of the viral protein LMP1 in epithelial cells. Also, the results underline that TGF β signaling is implicated in the expression of specific hepatic genes and consequently in biolofical processes such as metabolism, lipid homoeostasis, reduction of cholesterol, through synergistic interactions of Smads with HNF-4. Cross talk of TGF β signaling with hormone nuclear receptors (through functional interactions with their coactivators) indicates that TGF β is involved in processes such as the function of the human reproductive system, or/and glycogen homoeostasis. The detailed mapping of regions that are responsible for the synergistic cooperativity between Smads and HNF-4 will be a useful tool in cases that TGF β signaling is upregulated (fibrosis, hepatocyte tumourigenesis), or in cases where HNF-4 is malfunctioning (MODY I). Elucidation of the transcriptionaly active regions of Smad3 protein which are crucial for its interactions with other proteins could be important for construction of molecules that either enhance TGF β signaling (when Smad proteins are mutated in cancers of the lung or gastrointental cancers), or suppress TGF β signaling (when its function is upregulated in fibrosis and metastasis). These results are expected to provide new insights into the mechanisms of TGF β signaling regulation which will further facilitate to devise new strategies for gene therapy of severe disorders such as fibrosis, atherosclerosis and cancer.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΟΥ TGFβ

Τα μέλη της οικογένειας του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (Transforming Growth Factor β, TGFβ) ελέγχουν την ανάπτυξη, την διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Ο ανασταλτικός ρόλος της TGFβ σηματοδότησης στην ανάπτυξη των επιθηλιακών κυττάρων εξηγεί την ογκοκατασταλτική δράση αυτής της σηματοδότησης σε καρκινώματα, αν και είναι γνωστό ότι η έκφραση του TGFβ από καρκινικά κύτταρα επάγει την καρκινική ανάπτυξη (Moustakas et al., 2001).

Το ανθρώπινο γονιδίωμα εμπεριέχει 29 γονίδια που κωδικοποιούν μέλη αυτής της οικογένειας, συμπεριλαμβανομένων ισομορφών του TGFβ, ακτιβινών και πρωτεϊνών μορφογένεσης οστών (Bone Morphogenetic Proteins BMPs). Αυτές οι πρωτεΐνες σηματοδοτούν ενεργοποιώντας τον σχηματισμό συγκεκριμένων συμπλόκων ετερομερών τύπου I και τύπου II διαμεμβρανικών υποδοχέων. Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από ενεργότητα κίνησης σερίνης/θρεονίνης. Οι υποδοχείς τύπου II κωδικοποιούνται από πέντε γνωστά γονίδια θηλαστικών, ενώ οι υποδοχείς τύπου I από επτά γονίδια. Οι πληροφορίες που είναι γνωστές μέχρι σήμερα, υποστηρίζουν την άποψη ότι οι υποδοχείς τύπου I είναι υπεύθυνοι για την ειδικότητα της σηματοδότησης. Οι συνδέτες, οι υποδοχείς και οι ενδοκυτταρικοί τους επαγωγείς σηματοδότησης, οι Smad πρωτεΐνες είναι συντηρημένες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από τον *Caenorhabditis elegans* και την *Drosophila* μέχρι τα θηλαστικά (Moustakas et al., 2001).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχει μικρότερος αριθμός υποδοχέων και Smad πρωτεϊνών από ότι συνδετών, παρατηρείται πολύ μεγάλη ποικιλότητα στο αποτέλεσμα της σηματοδότησης. Αυτή η ποικιλότητα, που οδηγεί σε εξαρτημένη από την κυτταρική σύσταση μεταγραφική ρύθμιση, αποδίδεται σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας είναι οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων τύπου I και τύπου II στα ολιγομερή σύμπλοκα που σχηματίζουν, ενώ ο δεύτερος παράγοντας, αφορά στην ποικιλία των μεταγραφικών παραγόντων με τους οποίους αλληλεπιδρούν οι Smads. Επίσης είναι πλέον γνωστό ότι το TGFβ μονοπάτι αλληλεπιδρά με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια και η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί σε Smad-επαγόμενες και Smad-ανεξάρτητες αποκρίσεις (Derynck and Zhang, 2003).

Σύμφωνα με το κυρίαρχο μοντέλο, που περιγράφεται στην **Εικόνα 1**, μετά την πρόσδεση του TGFβ στους υποδοχείς του (τύπου I και II) παρατηρείται

φωσφορυλίωσή των υποδοχέων οι οποίοι με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις R-Smads (Receptor-associated Smads). Οι τελευταίες σχηματίζουν σύμπλοκα με την κοινή Smad4, τα οποία μεταβαίνουν στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με άλλους παράγοντες επάγουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων.

Ποικιλότητα στις αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων και στην πρόσδεση του συνδέτη TGFβ

Απουσία συνδέτη, οι υποδοχείς τύπου I και II σχηματίζουν ομοδιμερή πάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Οι TGFβ1, TGFβ3 και ακτιβίνες προσδένονται στους υποδοχείς τύπου II χωρίς να απαιτείται η παρουσία των υποδοχέων τύπου I, ενώ οι BMP2, BMP4 και BMP7 προσδένονται αρχικά στους υποδοχείς, τύπου I παρόλο που η παρουσία ετερομερών BMP συμπλόκων υποδοχέων προσφέρουν μεγαλύτερη συγγένεια στην πρόσδεση κάθε συνδέτη. Άλλοι TGFβ συνδέτες όπως ο TGFβ2 αλληλεπιδρά μόνο με συνδυασμό υποδοχέων τύπου I και τύπου II. Ωστόσο, ενώ η πρόσδεση του συνδέτη στα ομοδιμερή των υποδοχέων επάγει κυτταροπλασματική αυτοφωσφορυλίωση στους υποδοχείς τύπου II, δεν επαρκεί για να ενεργοποιήσει την σηματοδότηση απουσία των υποδοχέων τύπου I. Η ενεργοποίηση της σηματοδότησης απαιτεί την ενεργοποίηση των υποδοχέων τύπου I, η οποία πραγματοποιείται από την φωσφορυλίωσή τους στην περιοχή GS από τους υποδοχείς τύπου II στα πλαίσια του ετερομερούς συμπλόκου (Derynck et al., 1997).

Οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις στο τετραμερές σύμπλοκο υποδοχέων επιτρέπει την σύνδεση διαφορετικών συνδετών ή την διαφορετική σηματοδότηση ως απόκριση στον ίδιο συνδέτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο υποδοχέας τύπου II του BMP ο οποίος αλληλεπιδρά με τρεις διαφορετικούς υποδοχείς τύπου I, τον BMP-RIA, BMP-RIB ή τον ActRI/ALK2 και προσδένει διαφορετικές BMPs ώστε να επάγει την BMP σηματοδότηση. Επίσης, ο υποδοχέας τύπου II του TGFβ, TRβII, αλληλεπιδρά τόσο με τον κλασικό υποδοχέα τύπου I του TGFβ, τον TRI/ALK5 με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των Smad2 Smad3, όσο και με τον υποδοχέα τύπου I ALK1 για να ενεργοποιήσει τις Smad1 και Smad5. Η ενεργοποίηση διαφορετικών συμπλόκων υποδοχέων επάγει διαφορετικές αποκρίσεις στον TGFβ, υποδεικνύοντας ότι η ισορροπία στις διαφορετικές ενεργοποιήσεις ελέγχει την κατάσταση του ενδοθηλίου (Goumans et al., 2002). Επιπλέον, η ενεργοποίηση του

ActRI/ALK2 από τον TGFβ εμπλέκεται στην TGFβ-επαγόμενη επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (Miettinen et al., 1994, Lai et al., 2000).

Βοηθητικές πρωτεΐνες υποβοηθούν ή αλλάζουν την ειδικότητα πρόσδεσης του συνδέτη στους υποδοχείς του. Παράδειγμα αποτελούν οι β-γλυκάνη και ενδογλίνη που αυξάνουν την ειδικότητα παρουσίασης του TGFβ στο σηματοδοτικό σύμπλοκο των υποδοχέων. Επομένως, η έκφραση της β-γλυκάνης στην κυτταρική επιφάνεια ενδεχομένως ρυθμίζει την απόκριση των κυττάρων στον TGFβ (Blobe et al., 2001) και οι αγγειακές ανωμαλίες που προκαλούνται από δυσλειτουργία της ενδογλίνης πιθανότατα εξηγούνται από την ελλιπή σηματοδότηση του TGFβ στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Barbara N, et al., 1999).

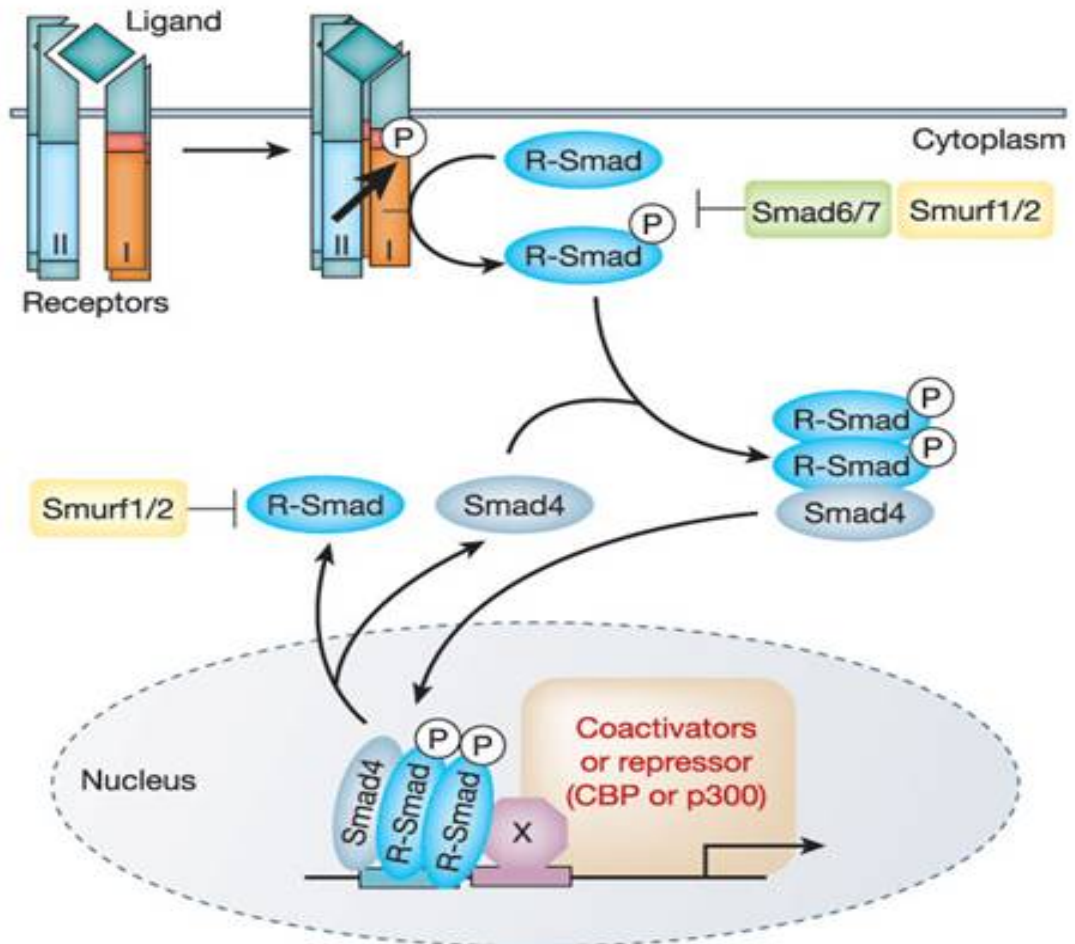
Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούν μια συντηρημένη οικογένεια μεταγωγέων σηματοδότησης

Οι Smad πρωτεΐνες αποτελούν τα μοναδικά γνωστά υποστρώματα των υποδοχέων τύπου I με λειτουργία σηματοδότησης. Αρχικά αναγνωρίστηκαν ως τα προϊόντα των γονιδίων Mad της *Drosophila* και Sma του *C.Elegans*. Οι πρωτεΐνες αυτές σηματοδοτούν από συστήματα συνδέτη – υποδοχέα ανάλογα του BMP σε αυτούς τους οργανισμούς. Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί οκτώ μέλη της οικογένειας των Smad (Mad-homologues (MADH)). Σχετικές πρωτεΐνες είναι γνωστές στον αρουραίο, τον ποντικό, στον *Xenopus*, στο zebrafish, στον πλατυέλμινθα *Schistosoma mansoni*, στην *Drosophila*, και τον *C. Elegans*. Οι *MADH2*, *MADH4* και *MADH7* χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 18q21-22, που αποτελεί γνωστή ογκοκατασταλτική περιοχή. Οι *MADH3* και *MADH6* χαρτογραφούνται στο χρωμόσωμα 15q21-22, και οι *MADH5*, *MADH1* και *MADH8* στα χρωμοσώματα 15q31, 4 και 13 αντίστοιχα. Οι Smad πρωτεΐνες εκφράζονται ευρέως καθόλη την διάρκεια της ανάπτυξης και σε όλους τους ενήλικους ιστούς και πολλές από αυτές (Smad2, Smad4, Smad5, Smad6 και Smad8) παράγονται από εναλλακτικό ομματισμό (splicing) των mRNAs (Moustakas et al., 2001).

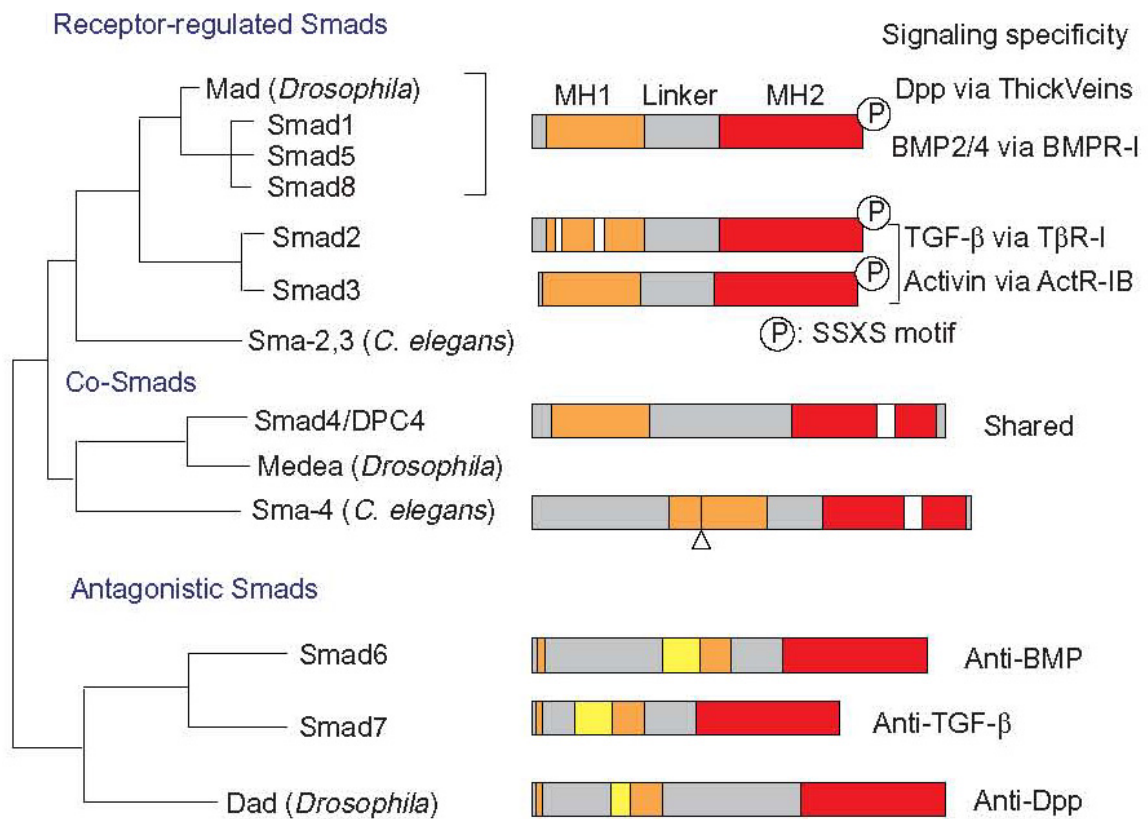
Λειτουργικά, οι Smads εμπίπτουν σε τρεις υπο-οικογένειες: α) τις Smads που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (Receptor-activated Smads, R-Smads: Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 Smad8) και συγκεκριμένα φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I, β) τις κοινές μεταγωγείς Smads (common mediator Smads Co-

Smads: Smad4) που σχηματίζουν ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-Smads, και γ) τις ανασταλτικές Smads (Inhibitory Smads I-Smads: Smad6 και Smad7) που επάγονται από μέλη της οικογένειας του TGFβ. Οι τελευταίες συμμετέχουν σε έναν αυτοανασταλτικό μηχανισμό, αφ' ενός ανταγωνιζόμενες τις R-Smads στην αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς και αφ'ετέρου προκαλώντας την αποικοδόμηση των υποδοχέων, μέσω συμπικτινίωσης (Derynck et al., 1997). Στην **Εικόνα 2** παριστάνονται οι τρεις κατηγορίες των Smad πρωτεϊνών στους διάφορους οργανισμούς.

Δομικά οι Smads χαρακτηρίζονται από δύο διακριτές συντηρημένες περιοχές, την αμινοτερματική (N-terminal) που παρουσιάζει Mad ομολογία 1 (Mad Homology 1, MH1) και την καρβόξυτερματική (C-terminal) που παρουσιάζει Mad ομολογία 2 (Mad Homology 2, MH2). Σχηματική απεικόνιση των περιοχών αυτών φαίνεται στην **Εικόνα 3**. Η MH1 περιοχή είναι εξαιρετικά συντηρημένη ανάμεσα στις R-Smads και τις Co-Smads. Ωστόσο, οι αμινοτερματικές περιοχές των I-Smads παρουσιάζουν πολύ μικρή ομοιότητα με τις MH1 περιοχές. Δομικές και αλληλουχικές αναλύσεις υποδεικνύουν ότι η MH1 περιοχή είναι ομόλογη της His-Me (histidine-metalion finger) οικογένειας ενδονουκλεασών. Η περιοχή αυτή είναι πιθανόν να έχει εξελιχθεί από μια αρχαία ενζυματική περιοχή που έχασε την ενζυμική της δραστηριότητα, αλλά διατήρησε την ικανότητα πρόσδεσης στο DNA (Grishin, 2001). Η MH1 περιοχή ρυθμίζει την είσοδο στον πυρήνα και την μεταγραφή μέσω πρόσδεσης στο DNA και την αλληλεπίδραση με πυρηνικές πρωτεΐνες (όπως μέλη των οικογενειών Sp1 και AP-1, ο πυρηνικός παράγοντας YY1, ο υποδοχέας της Βιταμίνης D, VitDR, οι HDACs, η φιλαμίνη η μπορτίνη β1). Η MH2 περιοχή είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ όλων των Smads. Η δομή της περιέχει πέντε α-έλικες και τρεις θηλιές (loops) που περικλείουν έναν β-sandwich πυρήνα που αποτελείται από επτά αντιπαράλληλες β πτυχωτές επιφάνειες. Η MH2 περιοχή θυμίζει μια FHA (ForkHead Associated) περιοχή, μια περιοχή πρόσδεσης σε φωσφοπεπτιδίο, κοινή σε μεταγραφικούς και σηματοδοτικούς παράγοντες (Li et al., 2000). Η MH2 περιοχή είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ολιγομερών Smad συμπλόκων, την αναγνώριση από τους υποδοχείς τύπου I και την αλληλεπίδραση με κυτταροπλασματικούς και μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 2) (Derynck R. and Zhang Y, 2003, Moustakas A. et al., 2001).

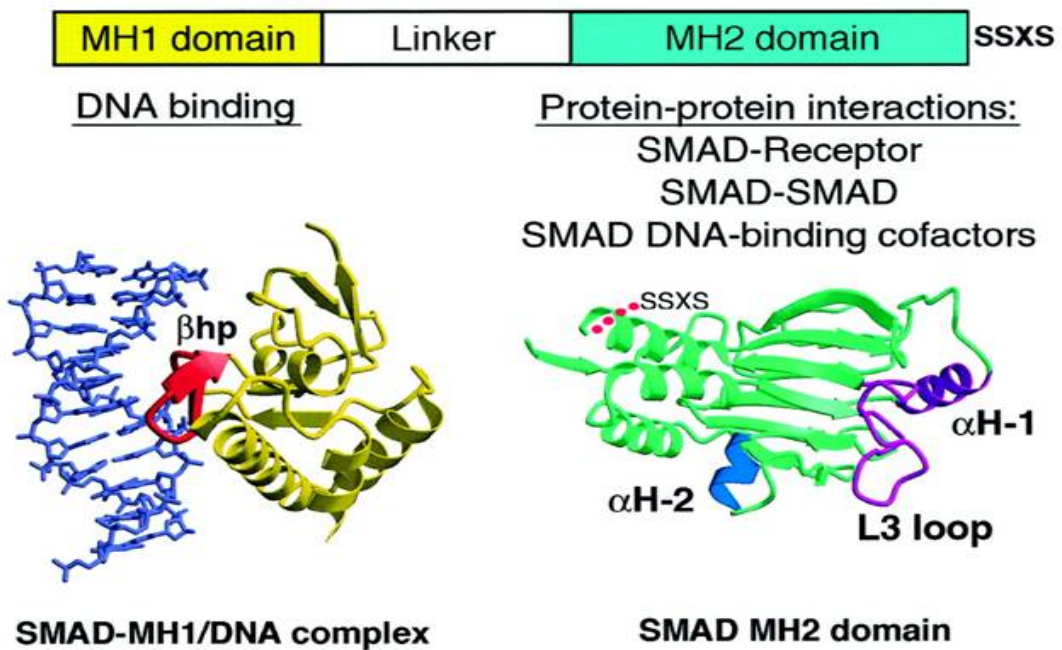


Εικόνα 1. Το μονοπάτι σηματοδότησης του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (Transforming Growth Factor β, TGFβ). Μετά την πρόσδεση του συνδέτη TGFβ στους διαμεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I και τύπου II παρατηρείται αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα II ο οποίος στην συνέχεια φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας τύπου I φωσφορυλιώνει τις R-Smads στην C-τελική περιοχή τους. Οι ενεργοποιημένες R-Smads σχηματίζουν σύμπλοκο με την Co-Smad4 το οποίο μεταβαίνει στον πυρήνα και ρυθμίζει την μεταγραφή γονιδίων στόχων μέσω φυσικών και λειτουργικών αλληλεπιδράσεων με DNA-προσδεδόμενους μεταγραφικούς παράγοντες και τους συνενεργοποιητές CBP/p300. Η ενεργοποίηση των R-Smads από τους υποδοχείς τύπου I αναστέλλεται από την Smad6 ή την Smad7. Οι R-Smads και η Smad4 εισέρχονται και εξέρχονται συνεχώς από τον πυρήνα. Οι E3 λιγάσες συμπικιουτίνης Smurf1 και Smurf2 αποικοδομούν τις R-Smads, καθώς και τους υποδοχείς τύπου I μέσω αλληλεπίδρασης με τις Smad6/7.



Εικόνα 2. Οι τρεις υπο-οικογένειες των Smad πρωτεϊνών. Οι R-Smads (Receptor-regulated Smads) υποδιαιρούνται σε δύο διαφορετικές ομάδες κάθε μία εκ των οποίων ενεργοποιείται από διαφορετικό συνδέτη (BMP ή TGFβ/activin). Η SSXS αλληλουχία φωσφορυλίωσης από τους υποδοχείς (P) εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο τους. Οι co-Smads περιλαμβάνουν την Medea της *Drosophila*, την Sma-4 του *Caenorhabditis elegans* και την Smad4 του ανθρώπου. Η Sma-4, όπως και η Smad2, περιέχει διάφορες μικρές ενθέσεις στην MH1 περιοχή και χαρακτηρίζεται από προέκταση του N-τελικού της άκρου. Οι ανασταλτικές (ή ανταγωνιστικές) I-Smads στερούνται του μεγαλύτερου μέρους της MH1 περιοχής και διαφέρουν ως προς την MH2 περιοχή από τα άλλα μέλη της Smad οικογένειας.

Δομή και λειτουργίες των Smad πρωτεϊνών



Εικόνα 3. Δομή και λειτουργίες των Smad πρωτεϊνών. Η MH1 περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση στο DNA των Smad πρωτεϊνών, για τον πυρηνικό εντοπισμό τους και για την αλληλεπίδραση με παράγοντες όπως ο HNF4, ο Sp1 και οι HDACs, ενώ η MH2 για την αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, όπως οι υποδοχείς, άλλες Smads και DNA προσδεδεμένοι συν-παράγοντες. Στο κάτω μέρος απεικονίζονται οι κρυσταλλογραφικές δομές των MH1 και MH2 περιοχών.

Ρύθμιση της λειτουργίας των Smads μέσω φωσφορυλίωσης

Οι R-Smads φωσφορυλιώνονται στην καρβοξυτερματική τους περιοχή και συγκεκριμένα στις δύο πρώτες σερίνες του μοτίβου SSXS από τους υποδοχείς τύπου I του TGFβ (Abdollah et al., 1997). Η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με την R-Smad καθορίζεται από την θηλιά L45 εννέα αμινοξέων του υποδοχέα τύπου I και κυρίως από την θηλιά L3 της περιοχής MH2 της R-Smad (Massague et al., 2000, Huse et al., 2001). Έτσι, οι υποδοχείς του TGFβ και της ακτιβίνης φωσφορυλιώνουν τις Smad2 και Smad3, ενώ οι υποδοχείς του BMP φωσφορυλιώνουν τις Smad1, Smad5 και Smad8 (Chen et al., 1998). Η ενεργοποίηση των διαφόρων R-Smads από τους υποδοχείς των προαναφερθέντων συνδετών καταδεικνύεται στην **Εικόνα 4**. Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης των R-Smads είναι ο σχηματισμός ολιγομερών συμπλόκων με την Co-Smad, Smad4.

Εκτός από τους υποδοχείς των BMP και TGFβ/acivín, υπάρχουν και άλλες κινάσες που είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην φωσφορυλίωση των Smads. Οι Erk MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) φωσφορυλιώνουν σερίνες που εντοπίζονται στην περιοχή του συνδέτη των Smad1, Smad2 και Smad3 και στην MH1 περιοχή της Smad2. Η δράση αυτών των κινασών και της ογκογονικής Ras πρωτεΐνης αναστέλλει την μετατόπιση των Smads στον πυρήνα και συνεπώς τη σηματοδότηση (Kretzschmar et al., 1999, Funaba et al., 2002).

Η ενεργοποίηση της MAPK/Erk kinase kinase 1 (MEKK1) μπορεί επίσης να οδηγήσει στην φωσφορυλίωση της Smad2, στον ετεροπολυμερισμό της με την Smad4, την είσοδό της στον πυρήνα και τη μεταγραφική της ενεργοποίηση (Brown et al., 1999). Η ενεργοποίηση από στρες ή από την MEKK1 του SAPK/JNK (c-Jun N-terminal kinase) μονοπατιού μπορεί να οδηγήσει στην φωσφορυλίωση της Smad3 και συνεπώς σε πυρηνικό εντοπισμό και μεταγραφή (Engel et al., 1999). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σηματοδότηση των Erk MAPK και JNK μονοπατιών επάγεται και από τον ίδιο τον TGFβ.

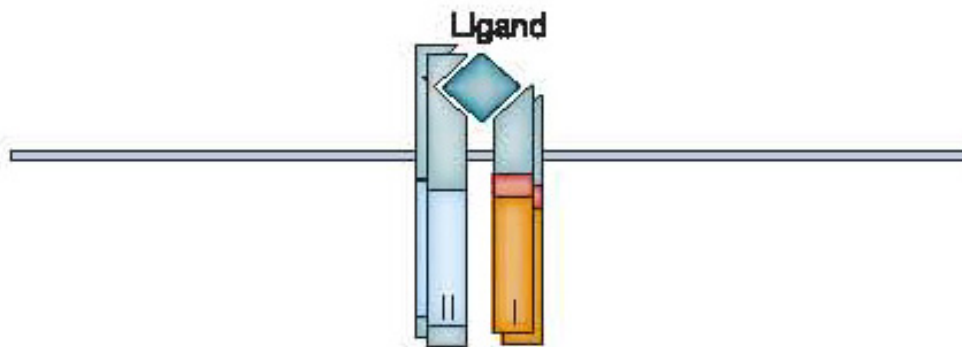
Ομοίως, η Ca^{2+} /calmodulin-εξαρτημένη πρωτεϊνική κινάση II (CamKII) φωσφορυλιώνει τις Smad2, Smad3 και Smad4. Συγκεκριμένα, η CamKII φωσφορυλιώνει *in vitro* την Smad2 στις Ser240 Ser260 του συνδέτη καθώς και στη Ser110 της MH1 περιοχής, γεγονός που επίσης αναστέλλει την μετακίνηση στον πυρήνα και τη σηματοδότηση (Wicks et al., 2000). Η φωσφορυλίωση στην Ser240

έχει παρατηρηθεί επίσης *in vivo*, μετά από επίδραση των παραγόντων epidermal growth factor (EGF) και platelet-derived growth factor (PDGF).

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) φωσφορυλιώνει την Smad2 *in vivo* και *in vitro* στις Ser47 και Ser110 καθώς και την Smad3 στις ανάλογες θέσεις Ser37 και Ser70. Η φωσφορυλίωση της Smad3 από την PKC εμποδίζει την πρόσδεσή της πρώτης στο DNA και συνεπώς τη μεταγραφική της δραστηριότητα. Το γεγονός αυτό, σε κυτταρικό επίπεδο, αναστέλλει την TGFβ επαγόμενη απόπτωση και καθιστά τα κύτταρα επιρρεπή σε απώλεια της αναστολής επαφής (loss of contact inhibition) (Yakymovych et al., 2001).

Δεν έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση της Co-Smad, Smad4, στα θηλαστικά. Στον *Xenopus* φωσφορυλιώνεται μία ισομορφή της Smad4, η Smad4β, ενώ στην Smad4α δεν έχει παρατηρηθεί φωσφορυλίωση (Howell et al., 1999, Masuyama et al., 1999). Οι θέσεις στις οποίες φωσφορυλιώνεται η Smad4β καθώς και η σημασία τους στη σηματοδότηση, δεν είναι γνωστές.

Οι ανασταλτικές I-Smads, Smad6 και Smad7, φωσφορυλιώνονται από άγνωστες μέχρι σήμερα κινάσες (Imamura et al., 1997, Pulaski et al., 2001). Η φωσφορυλίωση της Smad6 είναι πιθανόν να μην προκαλείται από τους υποδοχείς του TGFβ και του BMP. Η Smad7 φωσφορυλιώνεται στη Ser249, γεγονός που δεν εξαρτάται από τον TGFβ αλλά από την φάση πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Επομένως, η φωσφορυλίωση όχι μόνο ενεργοποιεί τις Smads αλλά ρυθμίζει και την δραστηριότητά τους, γεγονός που υποδεικνύει έναν μηχανισμό αλληλεπίδρασης του TGFβ μονοπατιού με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.



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

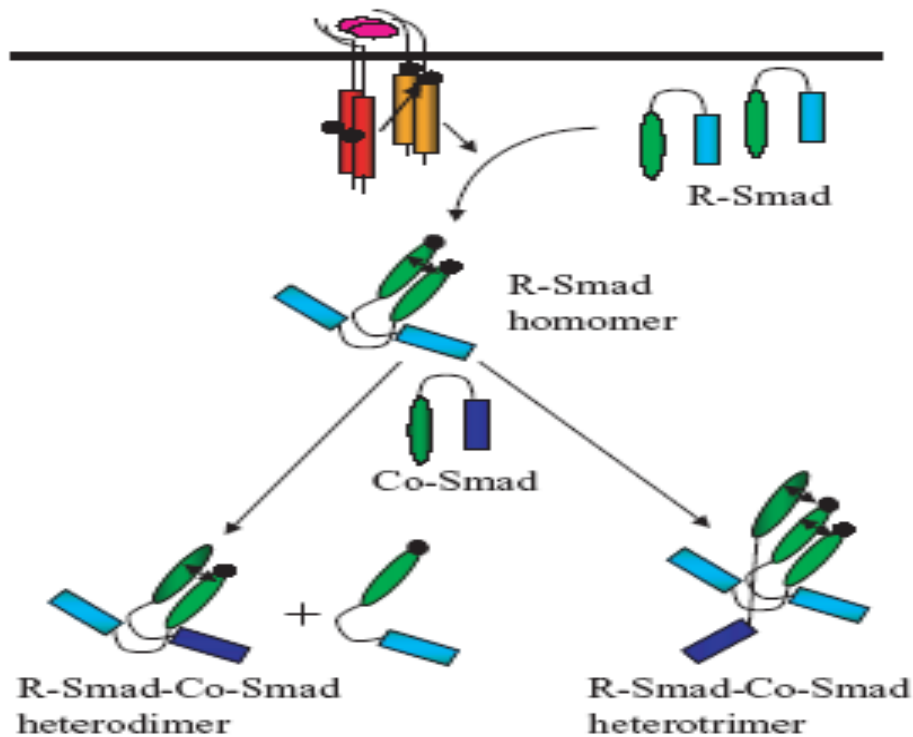
Εικόνα 4. Οι διάφορες R-Smads ενεργοποιούνται από διαφορετικούς υποδοχείς των κυτοκινών της οικογένειας του TGFβ. Οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις των υποδοχέων τύπου I και τύπου II καθορίζουν τις αποκρίσεις στην σηματοδότηση των κυταροκινών.

Ολιγομερισμός και ενεργοποίηση των Smads

Από βιοχημικές και δομικές αναλύσεις προκύπτει ότι η φωσφορυλιωμένη καρβοξυτερματική περιοχή των R-Smads αλληλεπιδρά ειδικά με την θηλιά L3 μιας άλλης Smad πρωτεΐνης (R-Smad ή Smad4), γεγονός που αρκεί για να προκαλέσει τον ολιγομερισμό τους (Correia et al., 2001). Οι μη φωσφορυλιωμένες Smad πρωτεΐνες υπάρχουν στα κύτταρα κυρίως ως μονομερή, τα οποία μετά την φωσφορυλίωσή τους σχηματίζουν ομο-ολιγομερή που με την σειρά τους, μετατρέπονται πολύ γρήγορα σε ετερο-ολιγομερή συμπεριλαμβάνοντας την Co-Smad, Smad4 (Correia et al., 2001, Kawabata et al., 1998), όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 5**. Ο ολιγομερισμός υποβοηθάται από εκτεταμένες επαφές μεταξύ της θηλιάς-έλικας (loop-helix) περιοχής της μιας υπομονάδας και την ομάδα τριών ελίκων (three-helix bundle) της άλλης υπομονάδας – περιοχές των Smads εξελικτικά συντηρημένες (Shi, 2001).

Οι κυτταροπλασματικές, μη ενεργές Smads, αυτο-καταστέλλονται ενδογενώς μέσω μιας ενδομοριακής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στις περιοχές MH1 και MH2 (Hata et al., 1997). Επίσης, η Smad4 περιέχει μια μοναδική θηλιά στην MH2 περιοχή της, η οποία αναστέλλει τον αυθόρμητο ολιγομερισμό απουσία σηματοδότησης (Tada et al., 1999). Η φωσφορυλίωση μέσω του υποδοχέα φαίνεται ότι επάγει αλλαγές στην διαμόρφωση των μορίων που αναστέλλουν την αυτο-καταστολή και πιθανότατα εκθέτουν στην επιφάνεια περιοχές των ενεργοποιημένων Smad οι οποίες ήταν θαμμένες και εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις-με άλλες πρωτεΐνες- σημαντικές για την πυρηνική είσοδο, την μεταγραφική ρύθμιση ή την αποικοδόμηση.

Οι αρχικές μελέτες υπέδειξαν ότι τα ολιγομερή των Smad είναι ουσιαστικά ετεροτριμερή που αποτελούνται από δύο R-Smads και μία Smad4 (Kawabata et al., 1998, Shi, 2001). Το γεγονός αυτό έχει επιβεβαιωθεί για την περίπτωση της Smad3 και με κρυσταλλογραφικές αναλύσεις (Correia et al., 2001). Ωστόσο, πρόσφατες αναλύσεις αναφέρουν διμερή διαμόρφωση για το σύμπλοκο των Smad2/Smad4 (Wu et al., 2001), και για το σύμπλοκο Smad3/Smad4 στον υποκινητή του c-Jun (Inman et al., 2002). Επίσης, μερικές αποκρίσεις στον TGFβ, όπως η επαγωγή της έκφρασης του p15^{Ink4B} απαιτεί ταυτόχρονη ενεργοποίηση των Smad2 και Smad3 και ταυτόχρονη αλληλεπίδρασή τους με την Smad4 (Feng et al., 2000). Το ετεροτριμερές μοντέλο (**Εικόνα 5**) επιτρέπει την αλληλεπίδραση δύο διαφορετικών μορίων R-Smad με την Smad4. Συνεπώς, είναι πιθανά διαφορετικά R-Smad-Co-Smad ολιγομερή με ποικίλες στοιχειομετρίες. (Jayaraman και Massague, 2000).



Εικόνα 5. Ολιγομερισμός των Smad πρωτεϊνών. Οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς φωσφορυλιώνουν τις R-Smads, οι οποίες συμβολίζονται με ανοικτό μπλε χρώμα, στο C-τελικό τους άκρο με αποτέλεσμα τον ομο-ολιγομερισμό τους. Ο ετερο-ολιγομερισμός τους με την Co-Smad, που συμβολίζεται με σκούρο μπλε χρώμα, οδηγεί στον σχηματισμό διμερών και τριμερών συμπλόκων. Οι μικροί μαύροι κύκλοι συμβολίζουν την φωσφορυλίωση της SSXS αλληλουχίας και τα διπλής κατεύθυνσης βέλη συμβολίζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του C-τελικού φωσφορυλιωμένου άκρου και της MH2 περιοχής.

Οργάνωση των σηματοδοτικών κέντρων TGFβ

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν βοηθητικές /scaffolding πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τύπου I και τύπου II και/ή με της Smads, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6**. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η SARA (Smad Anchor for Receptor Activation), μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά ειδικά με την μη-ενεργοποιημένη Smad2 και το σύμπλοκο των υποδοχέων, σχηματίζοντας έτσι μια γέφυρα ανάμεσα στους υποδοχείς και την Smad2, υποβοηθώντας με αυτόν τον τρόπο την φωσφορυλίωση της Smad2 από τον υποδοχέα τύπου I (Tsukazaki et al., 1998). Επίσης, η σταθερή αλληλεπίδραση της SARA με την Smad2 αναστέλλει την πυρηνική είσοδο της τελευταίας (Xu et al., 2000). Η SARA περιέχει την αμινοξική περιοχή FYVE, ένα μοτίβο που είναι γνωστό ότι προσδένει την 3-φωσφορική φωσφατίδιλο-ινοσιτόλη, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή αγκυροβόληση της Smad2 στο εσωτερικό της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή στα ενδοσώματα. Επομένως, η SARA αποτελεί το πρώτο παράδειγμα οργάνωσης κέντρων σηματοδότησης του TGFβ στην πλασματική μεμβράνη, παρόλο που δεν έχουν ακόμα αναφερθεί πρωτεΐνες υποδοχείς ανάλογες με την SARA σε BMP σηματοδοτικά μονοπάτια.

Καθώς η ίδια η SARA εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, μια πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει ότι και μόνο το FYVE μοτίβο της αρκεί για την επαγωγή της σηματοδότησης της ακτιβίνης A. Επιπλέον, η χρήση μιας αρνητικώς επικρατούσας μορφής της μικρής GTPase Rab5, μιας σημαντικής για την δυναμική των ενδοσωμάτων πρωτεΐνης, οδήγησε στην συστατική μεταγραφική ενεργοποίηση ενός Smad εξαρτημένου υποκινητή σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Panopoulou E., et al., 2002). Επίσης, σύμφωνα με μια άλλη μελέτη, ενώ η φωσφορυλίωση του TβRI υποδοχέα και ο σχηματισμός του Smad2/SARA/TGFR συμπλόκου δεν επηρεάζεται από τον σχηματισμό κυστιδίων κλαθρίνης, η Smad2/3 σηματοδότηση πραγματοποιείται μόνο μετά από ενδοκυττάρωση των υποδοχέων (Penheiter S.G., et al., 2002).

Μια άλλη πρωτεΐνη, η Hrs, που περιέχει επίσης το FYVE μοτίβο, επίσης υποβοηθά την Smad2 σηματοδότηση και συνεργάζεται με την SARA (Miura et al., 2000). Ακόμα, οι Dab2, 14-3-3ε και axin αποτελούν παραδείγματα πρωτεϊνών που συνδέουν το σύμπλοκο των υποδοχέων με τις Smad2 και Smad3, συμβάλλοντας έτσι στην επαγωγή της σηματοδότησης (Furuhashi et al., 2001, Hocevar et al., 2001, McGonigle et al., 2001). Ο μηχανισμός με τον οποίο οργανώνονται αυτά τα κέντρα

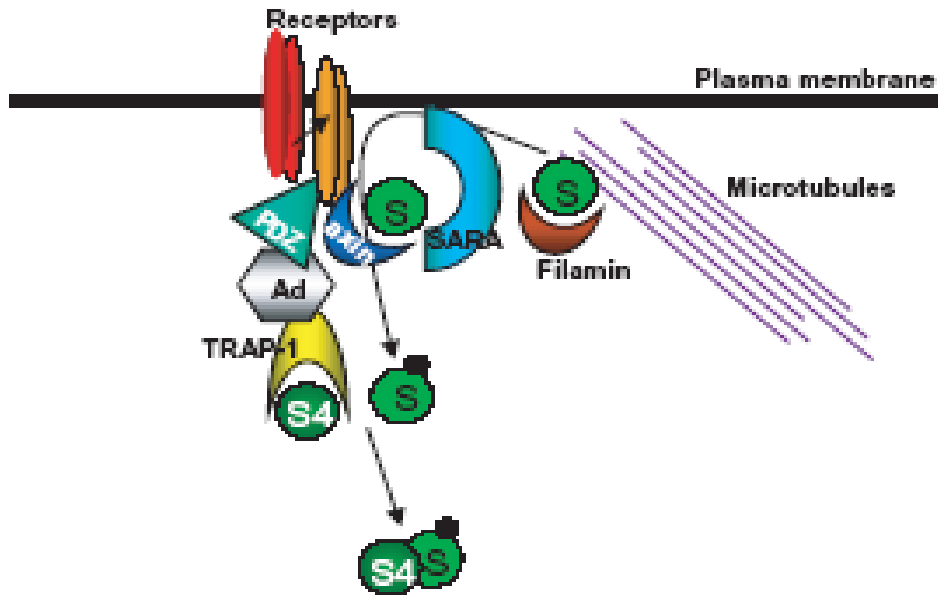
σηματοδότησης των Smad και η συσχέτισή του με την ενδοκύτταρωση (Dore et al., 2001) την αποικοδόμηση (Kavsak et al., 2000) ή την σηματοδότηση των υποδοχέων αποτελούν θέματα που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Ένα άλλο παράδειγμα πρωτεΐνης που αλληλεπιδρά με τις Smads και τους υποδοχείς είναι η καβεολίνη 1, η οποία αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα τύπου I και επάγει τον εντοπισμό των συμπλόκων των υποδοχέων στα caveolae, αναστέλλοντας με τον τρόπο αυτό την σηματοδότηση της Smad2 (Razani et al., 2001). Το κυτταρικό διαμέρισμα των caveolae απαιτείται για την αποικοδόμηση των υποδοχέων και συνεπώς ρυθμίζει την διαθεσιμότητα των υποδοχέων και την ενεργοποίηση των R-Smads (Di Guglielmo et al., 2003).

Πρόσφατα αναφέρθηκαν και άλλες πρωτεΐνες με πιθανούς ρόλους στην αγκυροβόληση των Smads. Οι μικροσωληνίσκοι μπορούν να αγκυροβολήσουν μη ενεργές Smads στο κυτταρόπλασμα (Dong et al., 2000). Η ενεργοποίηση των τελευταίων από τον συνδέτη οδηγεί σε αποδέσμευσή τους από το δίκτυο των μικροσωληνίσκων. Επιπλέον, η χρήση φαρμάκων, όπως η νοκοδαζόλη, που αποδιοργανώνουν τους μικροσωληνίσκους, προκαλεί την συνεχή ενεργοποίηση του Smad μονοπατιού. Είναι πιθανόν οι μικροσωληνίσκοι να λειτουργούν ως ράγες για την ενδοκυττάρια μετακίνηση των Smads. Η φιλαμίνη, ένας παράγοντας πρόσδεσης της ακτίνης, αλληλεπιδρά επίσης με τις Smads και επάγει τη σηματοδότησή τους (Sasaki et al., 2001). Ο TGFβ επάγει τη φωσφορυλίωση του παράγοντα ELF, μιας β-σπεκτρίνης, και την αλληλεπίδρασή του με τις Smad3 και Smad4. Έλλειψη του ELF οδηγεί σε απώλεια της TGFβ εξαρτημένης μεταγραφής (Tang et al., 2003).

Επίσης, πρωτεΐνες της οικογένειας sorting nexin (SNX) of vesicle-and trafficking adaptors αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα υποδοχέων του TGFβ (Parks et al., 2001). Ομοίως, οι ARIPs (activin receptor interacting proteins) αλληλεπιδρούν με την Smad2 και επάγουν την σηματοδότηση από την ακτιβίνη (Tsuchida et al., 2001). Η GIPC (GAIP-interacting protein, C-terminus) είναι μια πρωτεΐνη-σκαλωσιά για τις υπομονάδες Ga, η οποία σχετίζεται με τα οχήματα κλαθρίνης και αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα τύπου III του TGFβ (Blobe et al., 2001). Οι ARIPs και GIPC είναι πρωτεΐνες που περιέχουν το PDZ-domain και λειτουργούν ως κέντρα οργάνωσης πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων (Harris and Lim, 2001). Τέλος, η TRAP1 (TGF receptor type I associated protein 1) αλληλεπιδρά με την Smad4 και πιθανότατα αγκυροβολεί την Smad4 κοντά στο σύμπλοκο των υποδοχέων υποβοηθώντας τον σχηματισμό των R-Smad-Co-Smad ολιγομερών (Wurthner et al., 2001).

Τα στοιχεία που έχουν προκύψει από τις μέχρι σήμερα αναλύσεις, υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις της υπεροικογένειας των TGFβ υποδοχέων και των Smads με adaptor/scaffolding πρωτεΐνες αποτελούν σημαντικό ρυθμιστικό μηχανισμό. Ο κατάλληλος εντοπισμός των υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη ή σε ενδοκυτταρικά οχήματα, η κοντινή παρουσία κυτταροπλασματικών παραγόντων όπου αγκυροβολούν οι Smads και η ικανότητα αυτών των συμπλόκων να μεταφέρονται σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα, αποτελούν ενδιαφέροντες νέους τρόπους ρύθμισης της διάρκειας και της ενεργοποίησης της σηματοδότησης από τις Smads. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να προσφέρουν κυτταροειδική σηματοδότηση, επιτρέποντας διαφορετική ρύθμιση του βασικού Smad μονοπατιού.



Εικόνα 6. Σηματοδοτικά κέντρα του TGFβ. Στο μοντέλο αυτό, οι R-Smads που απεικονίζονται ως κύκλοι και συμβολίζονται με S, αγκυροβολούν στους μικροσωληνίσκους και τα ινίδια φιλαμίνης. Παρουσία του TGFβ μετακινούνται προς την SARA και τους υποδοχείς όπου σχηματίζονται πολυπρωτεϊνικά κέντρα με την βοήθεια πρωτεϊνών αγκυροβόλησης όπως είναι οι ARIPs που συμβολίζονται PDZ, οι ενεργοποιητές της αγκυροβόλησης των R-Smads και της Smad4 (S4) αξίνη και TRAP-1, και άγνωστες πρωτεΐνες ανάπτορες (AD). Το αποτέλεσμα είναι η φωσφορυλίωση των R-Smads (μαύρος κύκλος) και ο ολιγομερισμός των R-Smads-Smad4. Αντίστοιχο μοντέλο θα μπορούσε να ισχύει και στα πρώιμα ενδοσώματα, αμέσως μετά την ενδοκύττωση των υποδοχέων.

Πυρηνοκυτταροπλασματική μετακίνηση των Smads

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

Οι μηχανισμοί με τους οποίους πραγματοποιείται η πυρηνική είσοδος των Smad1, Smad2 και Smad3 έχουν μελετηθεί λεπτομερώς. Η MH1 περιοχή όλων των Smads περιέχει ένα μοτίβο πλούσιο σε λυσίνες, το οποίο στην περίπτωση των Smad1, Smad3 έχει δειχθεί ότι λειτουργεί ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal NLS) (Xiao et al., 2000, Xiao et al., 2001). Στην περίπτωση της Smad3, η C-τερματική φωσφορυλίωση οδηγεί σε αλλαγές στην διαμόρφωση του μορίου με αποτέλεσμα την έκθεση του NLS με τέτοιο τρόπο που επιτρέπει την πρόσδεση της ιμφορτίνης β1 και την επαγωγή της Rap-εξαρτημένης πυρηνικής εισόδου (Kurisaki et al., 2001, Xiao et al., 2000). Αντιθέτως, η Smad2, η οποία περιέχει επίσης την πλούσια σε λυσίνες αλληλουχία στην MH1 περιοχή της, απελευθερώνεται από την SARA μετά την C-τερματική της φωσφορυλίωση και μεταβαίνει στον πυρήνα με την αρωγή ενός κυτταροπλασματικού παράγοντα, ανεξάρτητου της ιμφορτίνης, ο οποίος απαιτεί την ακεραιότητα της MH2 περιοχής (Xu et al., 2000). Ο παράγοντας αυτός είναι ο CAN/Nup214 μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών του πυρηνικού πόρου (νουκλεοπορίνες) (Xu et al., 2002). Η διαφορά ανάμεσα στις δύο R-Smads, Smad3 και Smad2 που υπάγονται στο TGFβ μονοπάτι

και στο μονοπάτι της ακτιβίνης, έγκειται στην παρουσία του μοναδικού εξονίου 3 στην MH1 περιοχή της Smad2 (Kurisaki et al., 2001). Έτσι, ανεξάρτητα από την παρουσία της κοινής, πλούσιας σε λυσίνες, αλληλουχίας στην MH1 περιοχή, υπάρχουν μοναδικοί δομικοί καθοριστές της πυρηνικής εισόδου οι οποίοι είναι διαφορετικοί για τις διαφορετικές Smads.

Η αναγνώριση εναλλακτικών μορφών ομματισμού της Smad4 του *Xenopus* οδήγησε στην ανακάλυψη της συνεχούς εισόδου της Smad4 στον πυρήνα. Ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός της Smad4 σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα οφείλεται αφ' ενός στην παρουσία ενός συστατικά ενεργοποιημένου NLS στην περιοχή MH1 (Inman et al., 2002, Xiao et al., 2003, Oncogene) και αφ' ετέρου σε ενεργή έξοδο από τον πυρήνα (Pierreux et al., 2000, Watanabe et al., 2000). Αυτή η έξοδος επάγεται από ένα πλούσιο σε λυσίνες σήμα πυρηνικής εξόδου (nuclear export signal NES) το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή του linker της Smad4 όσο και στην MH1 περιοχή και καταλύεται από την εξπορτίνη Crm1. Συνεπώς, η Smad4 μεταφέρεται συνεχώς από και προς τον πυρήνα. Τα σύμπλοκα της Co-Smad με τις R-Smads μπορεί να σχηματίζονται στον πυρήνα ή στην πορεία προς τον πυρήνα, και ο σχηματισμός αυτός ενδεχομένως να καλύπτει το NES με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των συμπλόκων στον πυρήνα. Είναι χαρακτηριστικό ότι η Smad4β του *Xenopus* που στερείται του NES εντοπίζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ η Smad4α κυρίως στο κυτταρόπλασμα μη ενεργοποιημένων κυττάρων (Masuyama et al., 1999, Watanabe et al., 2000).

Έχει πρόσφατα δειχθεί ότι η Smad1 παρουσιάζει πυρηνική είσοδο εξαρτημένη από τον συνδέτη και συνεχή πυρηνική έξοδο (Xiao et al., 2001). Η τελευταία εξαρτάται από την παρουσία ενός NES, του NES1, στην MH2 περιοχή το οποίο εντοπίζεται N-τερματικά της L3 θηλιάς (Xiao et al., 2001). Μια ακόμα πιο πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει την παρουσία και δεύτερου NES, του NES2, στην περιοχή του linker της πρωτεΐνης Smad1. Το NES2 αποτελεί τον κύριο στόχο της Crm1, και είναι σημαντικό για την πυρηνική έξοδο και συνεπώς για την ενεργοποίηση της Smad1 από τους υποδοχείς. Το NES2, αν και συντηρημένο, δεν είναι λειτουργικό σε άλλες R-Smads, όπως η Smad3, καθώς η υπερέκφραση της Crm1 δεν στοχεύει την Smad3 στο κυτταρόπλασμα (Xiao et al., 2003). Το NES είναι συντηρημένο μεταξύ των Smads αλλά είναι ενεργό μόνο σε συγκεκριμένες Smads. Αρχικά θεωρήθηκε ότι οι Smad2 και Smad3 εξέρχονται από τον πυρήνα μετά από παρατεταμένη παρουσία του συνδέτη TGFβ (Pierreux et al., 2000). Στην συνέχεια αποκαλύφθηκε ότι αυτές οι

Smads αποφωσφορυλιώνονται συνεχώς, με αποτέλεσμα τον αποσχηματισμό των συμπλόκων και την έξοδο των ανενεργών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα (Inman et al., 2002). Δεν έχει αναγνωριστεί συγκεκριμένο ενεργό NES σήμα στις Smad2 και Smad3, ωστόσο είναι γνωστό ότι η Smad2 εξέρχεται από τον πυρήνα με την αρωγή της νουκλεοπορίνης Nup153 (Xu et al., 2002).

Πέρα όμως από την διαφορετικότητα των μηχανισμών που ελέγχουν τον πυρηνοκυταροπλασματικό εντοπισμό των Smads, φαίνεται ότι υπάρχουν και ομοιότητες. Μια πρόσφατη μελέτη επισημαίνει την δυνατότητα πυρηνικής εισόδου των Smad3 και Smad4 μέσω αλληλεπίδρασης αυτών με το σύμπλοκο νουκλεοπορινών CAN/Nup214, το οποίο ρυθμίζει την πυρηνική είσοδο της Smad2. Ενώ για την Smad3 αρκεί η MH2 περιοχή για την αλληλεπίδρασή της με το σύμπλοκο CAN/Nup214, στην περίπτωση της Smad4 απαιτείται ολόκληρη η πρωτεΐνη για την αλληλεπίδραση αυτή (Xu et al., 2003).

Τέλος, οι I-Smads παρουσιάζουν συνεχή είσοδο στον πυρήνα και εξέρχονται στο κυτταρόπλασμα μετά από σηματοδότηση του TGFβ ή του BMP (Itoh et al., 1998, Itoh et al., 2001, Hanyu et al., 2001). Η TGFβ επαγόμενη έξοδος της Smad7 από τον πυρήνα είναι πιθανόν να απαιτεί την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες Smurf1 ή Smurf2 του μονοπατιού συμπικτινίωσης (Hanyu et al., 2001), ενώ ο BMP επαγόμενος κυτταροπλασματικός εντοπισμός της Smad6 είναι πιθανόν να οφείλεται σε αλληλεπίδραση με κάποια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (Itoh et al., 2001). Δεν έχουν ακόμα αποσαφηνιστεί οι μηχανισμοί πυρηνοκυτταροπλασματικής μετακίνησης των I-Smads, ούτε συγκεκριμένα ενεργά NLSs και NESs σε αυτές τις πρωτεΐνες.

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

Πυρηνική σηματοδότηση

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

Οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες προσδένονται απευθείας αλλά με χαμηλή συνάφεια σε Smad-προσδενόμενα στοιχεία DNA (Smad-binding elements, SBEs), με το ελάχιστο μοτίβο αλληλουχίας 5' CAGAC3'. Η πρόσδεση αυτή επιτυγχάνεται μέσω μιας συντηρημένης θηλιάς με δομή β-φουρκέτας (β-hairpin) της MH1 περιοχής. Ειδικά για την Smad3 υπάρχουν πρόσθετες αλληλουχίες της MH1 περιοχής που συνεισφέρουν στην πρόσδεση της πρωτεΐνης στο DNA, όπως η α έλικα 2 (α-helix 2) (Kusanagi et al., 2001). Αντιθέτως, η Smad2 δεν προσδένεται σε SBE λόγω της ύπαρξης μιας επιπρόσθετης αλληλουχίας 20 αμινοξέων στην MH1 περιοχή της, η οποία κωδικοποιείται από το εξόνιο 3 και η οποία παρεμποδίζει τον σχηματισμό της δομής β-φουρκέτας (Yagi et al., 1999). Επίσης, οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες προσδένονται σε GC-πλούσια μοτίβα υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων, γεγονός που υποδεικνύει μια χαμηλή ειδικότητα πρόσδεσης της MH1 περιοχής στο DNA (Labbe et al., 1998).

Εκτός από τα προαναφερθέντα παραδείγματα Smad-επαγόμενης ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης, υπάρχουν πρόσφατα παραδείγματα Smad-επαγόμενης γονιδιακής καταστολής. Οι αλληλουχίες DNA που εμπλέκονται σε τέτοιες περιπτώσεις καταστολής της γονιδιακής έκφρασης είναι διαφορετικές από τα SBEs και τα GC-πλούσια μοτίβα (Alliston et al., 2001, Chen et al., 2001). Θα πρέπει ωστόσο να διερευνηθεί περαιτέρω αν οι Smads προσδένονται άμεσα ή έμμεσα σε αυτές τις διαφορετικές αλληλουχίες.

Το γεγονός ότι οι χμαιοϊκές GAL4-Smad πρωτεΐνες εμφανίζουν μεταγραφική δραστικότητα τόσο σε κύτταρα θηλαστικών όσο και σε κύτταρα σακχαρομύκητα υποδεικνύουν ότι οι Smads σχετίζονται και αλληλεπιδρούν με τη βασική μεταγραφική μηχανή (Liu et al., 1996). Η μεταγραφική ενεργότητα των Smads χαρτογραφείται στην MH2 περιοχή της πρωτεΐνης και είναι γνωστό ότι επάγεται μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης της MH2 περιοχής με συνενεργοποιητές όπως ο p300 και ο pCAF (p300-and CBP-associating factor) (**Εικόνα 7A**) (Itoh et al., 2000a, Itoh

et al., 2000b). Ειδικά η Smad4 εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad συμπλόκων στον πυρήνα, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση των R-Smads με το DNA και τους συνενεργοποιητές CBP/p300. Ο σημαντικός αυτός ρόλος της Smad4 οφείλεται στην παρουσία μιας μεταγραφικά ενεργής περιοχής που ονομάζεται SAD (Smad-activation domain). Η περιοχή SAD επιτρέπει ισχυρότερη πρόσδεση της Smad4 με τους CBP/p300 μέσω μιας μοναδικής διαμόρφωσης της MH2 περιοχής της Smad4 (Chacko et al., 2001, de Caestecker et al., 2000b).

Ο TGFβ αναστέλλει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου ρυθμίζοντας την μεταγραφή των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου, όπως η c-Myc και μέλη της οικογένειας Id που καταστέλλονται μεταγραφικά από τον TGFβ (Chen et al., 2002, Kang et al., 2003). Συγκεκριμένα, η Smad3 καταστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου c-Myc σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F4 και E2F5 και τον συν-καταστολέα p107. Το σύμπλοκο αυτό προσχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα και παρουσία της TGFβ ενεργοποίησης μεταβαίνει στον πυρήνα, όπου σε συνεργασία με την Smad4 προσδέεται στον υποκινητή του γονιδίου c-Myc και καταστέλλει την έκφρασή της (Chen et al., 2002). Επίσης, η TGFβ ενεργοποιημένη Smad3 επάγει άμεσα την έκφραση της ATF3, με την οποία σχηματίζει σύμπλοκο που καταστέλλει τον Id1 υποκινητή (Kang et al., 2003). Ομοίως, η TGFβ επαγόμενη SIP1 καταστέλλει την έκφραση της E-cadherin (Comijn et al., 2001).

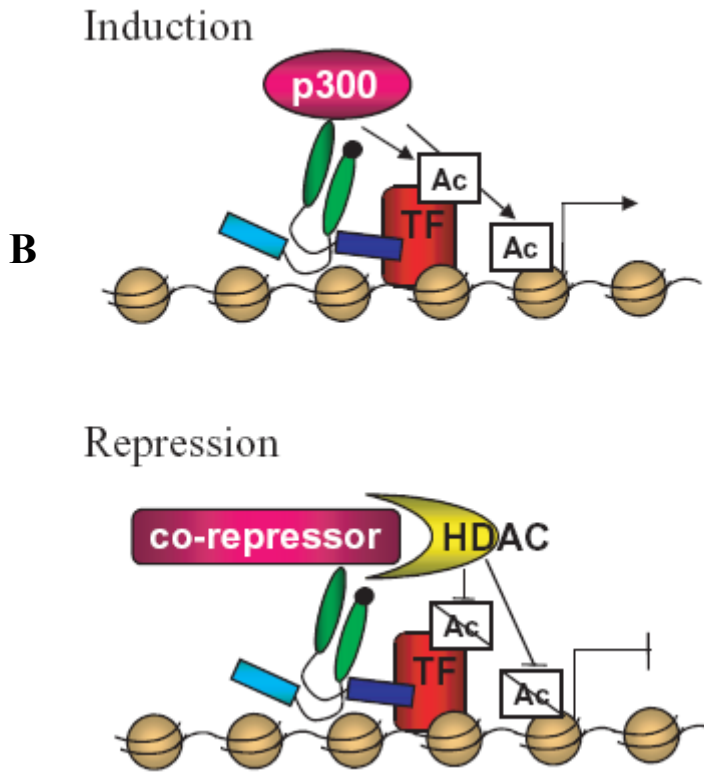
Είναι επίσης γνωστό ότι ο TGFβ αναστέλλει την διαφοροποίηση μυοβλαστών, οστεοβλαστών και αδιποκυττάρων μέσω λειτουργικής καταστολής μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν αυτά τα μονοπάτια διαφοροποίησης. Έτσι, η Smad3 καταστέλλει την μεταγραφική δράση του Runx2/CBFA1 (core-binding factor, runt domain, α -υπομονάδα) κατά την οστεοβλαστική διαφοροποίηση (Alliston et al., 2001). Επίσης, η Smad3 καταστέλλει την δράση της MyoD και άλλων μυογενετικών basic helix-loop-helix (bHLH) μεταγραφικών παραγόντων στους μυοβλάστες, αλληλεπιδρώντας με την HLH περιοχή τους και εμποδίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον διμερισμό αυτών των παραγόντων και την αποτελεσματική πρόσδεσή τους στο DNA (Liu et al., 2001). Τέλος, η Smad3 καταστέλλει την δράση των CCAAT/enhancer-binding πρωτεϊνών (C/EBPs) κατά την διαφοροποίηση των αδιποκυττάρων (Choy et al., 2003).

Όπως προαναφέρθηκε, η Smad σηματοδότηση μπορεί να οδηγήσει σε καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Ειδικά για την Smad3, είναι γνωστό ότι η MH1

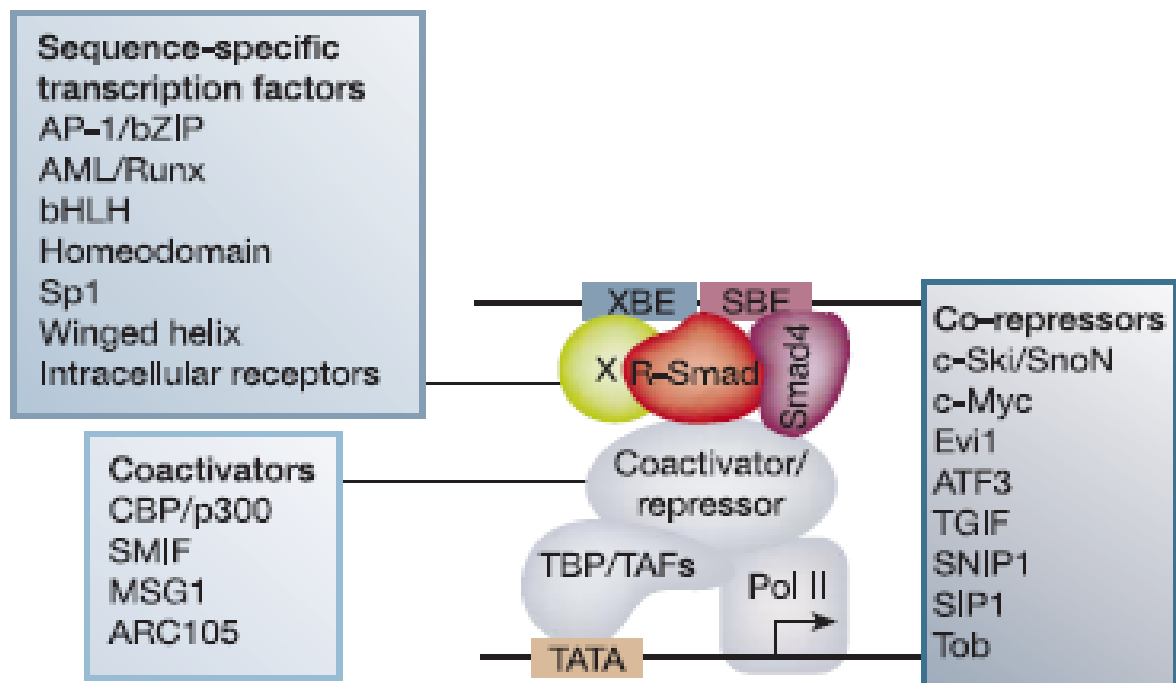
περιοχή της σχετίζεται με ενεργότητα απακετυλάσης ιστονών (HDAC), αλλά δεν είναι γνωστό αν υπάρχει άμεση αλληλεπίδραση των Smads με τις HDACs (Liberati et al., 2001). Εναλλακτικά, οι Smads αλληλεπιδρούν με συν-καταστολείς οι οποίοι με τη σειρά τους προσελκύουν HDACs (**Εικόνα 7B**). Τέτοιοι συν-καταστολείς είναι η homeodomain DNA-προσδεδόμενη πρωτεΐνη TGIF (Wotton et al., 1999) καθώς και τα προϊόντα των πρωτο-ογκογονιδίων Ski και SnoN (Liu, Sun et al., 2001). Αυτοί οι συν-καταστολείς αλλάζουν την πυρηνική ενεργότητα των Smads, και μάλιστα τα επίπεδα έκφρασης των συν-καταστολέων καθορίζουν το βαθμό της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smads.

Συνεπώς, η απαιτούμενη μεταγραφική δραστηριότητα του Smad μονοπατιού επιτυγχάνεται μέσω πολλαπλών SBE μοτίβων σε υποκινητές γονιδίων στόχων των Smad πρωτεϊνών, και μέσω πρόσθετων μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τις Smads. Η πληθώρα αυτών των μεταγραφικών παραγόντων και γενικότερα των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις Smads παρέχει επίσης μια μηχανιστική ερμηνεία της καταγεγραμμένης συνεργασίας του Smad μονοπατιού με πολλά άλλα σηματοδοτικά δίκτυα, τα οποία ποικίλουν από το Ras/MAPK μονοπάτι μέχρι το δίκτυο σηματοδότησης των πυρηνικών υποδοχέων (Itoh et al., 2000b, Massague 2000). Στην **Εικόνα 8** περιγράφονται κάποιες από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα των R-Smads/Smad4.

A



Εικόνα 7. Ρύθμιση της μεταγραφής από τις Smad πρωτεΐνες. Α. Ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης. Οι Smads που απεικονίζονται ως ετεροδιμερή, αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες (TF) που προσδέονται στο DNA, και προσελκύουν συνενεργοποιητές όπως ο εικονιζόμενος p300 ο οποίος ακετυλιώνει τον TF ή/και τις ιστόνες της χρωματίνης. Το βέλος που ξεκινά από την χρωματίνη, που εικονίζεται σε διαμόρφωση νουκλεοσωμάτων, συμβολίζει επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. **Β.** Γονιδιακή καταστολή. Τα ετερομερή των Smad πρωτεϊνών προσελκύουν συνκαταστολείς, όπως ο c-Ski, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με απακετυλάσες ιστονών (HDACs). Οι τελευταίες απακετυλιώνουν τον TF ή/και τις ιστόνες. Η κάθετη γραμμή που ξεκινά από την χρωματίνη υποδηλώνει καταστολή της μεταγραφικής ενεργότητας του υποκινητή και συνεπώς, της γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 8. Αλληλεπίδραση των R-Smad/Smad4 συμπλόκων με μεταγραφικούς παράγοντες, συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς. Το R-Smad/Smad4 σύμπλοκο συνεργάζεται με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες (X) που προσδένονται με μεγάλη ειδικότητα σε αλληλουχίες DNA (X Binding Element, XBE), αλλά και το ίδιο προσδένεται με μικρή συνάφεια σε αλληλουχίες DNA (Smad Binding Element, SBE), προκειμένου να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή γονιδίων στόχων. Οι R-Smads αλληλεπιδρούν άμεσα με τους συνενεργοποιητές CBP/p300, αλλά και η Smad4 λειτουργεί ως συνενεργοποιητής των R-Smads, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδρασή τους με τους CBP/p300. Οι συνενεργοποιητές SMIF, MSG1 και ARC105 ρυθμίζουν τον βαθμό της Smad επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους συνκαταστολείς καταστέλλει την μεταγραφική τους ενεργότητα. Οι συνκαταστολείς c-Ski, SnoN, c-Myc και Evi1 εκφράζονται από πρωτοογκογονίδια. Οι συνκαταστολείς TGIF (TGFβ induced factor) και SNIP1 (Smad nuclear interacting protein) καταστέλλουν και TGFβ-ανεξάρτητες μεταγραφικές αποκρίσεις. Η αλληλεπίδραση του συνκαταστολέα Tob με την Smad2 καταστέλλει την έκφραση της ιντερλευκίνης 2 σε T κύτταρα.

Αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Smad με πρωτεΐνες που προσδένονται στο DNA

Υπάρχει μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων στα οποία οι Smads συνεργάζονται με DNA προσδενόμενες πρωτεΐνες για την ρύθμιση της μεταγραφής. Η FAST-1 πρωτεΐνη προσδένεται στην αποκρινόμενη σε ακτιβίνη περιοχή του υποκινητή του Mix.2 γονιδίου, καθώς και σε αντίστοιχη περιοχή του υποκινητή του goosecoid γονιδίου. Απουσία σήματος, η FAST-1 προσδένεται στα προαναφερθέντα ρυθμιστικά στοιχεία, αλλά δεν ενεργοποιεί τη γονιδιακή μεταγραφή. Παρουσία TGF- β ή ακτιβίνης, στη ρυθμιστική περιοχή σχηματίζεται ένα σύμπλοκο που περιλαμβάνει την FAST-1 και τις Smad2 και Smad4, το οποίο και ενεργοποιεί την μεταγραφή. Μάλιστα, πρώτα προσδένεται στο DNA η FAST-1, με την οποία αλληλεπιδρά άμεσα η Smad2, ώστε να προσελκύσουν στο σύμπλοκο την Smad4. Η MH1 περιοχή της Smad4 προσδένεται στο DNA και η επαφή αυτή είναι σημαντική για την σταθεροποίηση της πρόσδεσης του συμπλόκου στο DNA (Liu et al., 1997). Έχει, εξάλλου, δειχθεί ότι οι πρωτεΐνες Smad2, Smad3 και ασθενέστερα η Smad4 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης της MH1 περιοχής τους με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1, μπορούν να ενεργοποιούν γονιδιακή μεταγραφή από τον υποκινητή του γονιδίου p21 (Moustakas et al., 1998, Pardali et al., 2000).

Οι Smad συνεργάζονται και με DNA-προσδενόμενες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος άλλων μονοπατιών. Πολλές θέσεις απόκρισης στον TGF- β περιέχουν γειτονικές θέσεις πρόσδεσης του AP1, οι οποίες ενεργοποιούνται από το ετεροδιμερές c-Jun/c-fos. Η Smad3 αλληλεπιδρά άμεσα με την φωσφορυλιωμένη μορφή της c-Jun μέσω της MH1 και της περιοχής σύνδεσης (linker), και έμμεσα με την c-fos μέσω της c-Jun. Απουσία του ετεροδιμερούς c-Jun/c-fos, ο TGF- β και η Smad3 επάγουν ασθενώς τη μεταγραφή από ρυθμιστικά στοιχεία στα οποία προσδένεται ο AP1, ενώ παρουσία ενεργού ετεροδιμερούς παρατηρείται έντονη μεταγραφική ενεργότητα. Η φωσφορυλίωση (ενεργοποίηση) της c-Jun προκύπτει από την ενεργοποίηση της κινάσης της c-Jun (c-Jun κινάση JNK) η οποία είναι μια MAP κινάση. Επομένως, παρατηρείται ένα σημαντικό σημείο συνάντησης των μονοπατιών σηματοδότησης των Smad και AP-1 (Liberati et al., 1999, Wong et al., 1999).

Πριν ακόμα αναγνωριστούν οι Smads, είχε αναφερθεί συνεργασιακή αλληλεπίδραση μεταξύ των TGF- β και της βιταμίνης D. Η ρυθμιστική περιοχή που αποκρίνεται στην βιταμίνη D (Vitam D Response Element, VDRE), ανταποκρινόταν

επίσης στον TGF- β , αλλά μόνο παρουσία της βιταμίνης D. Η Smad3 δρα ως συνενεργοποιητής του υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR) μέσω της ικανότητάς της να σχηματίζει σύμπλοκο με τον συνενεργοποιητή του υποδοχέα στεροειδών, το οποίο εξαρτάται από την παρουσία του TGF- β και της βιταμίνης D. Φαίνεται ότι η Smad3 επάγει μια συνομιλία μεταξύ των μονοπατιών σηματοδότησης του TGF- β και της βιταμίνης D (Yanagisawa et al., 1999). Στη συνομιλία αυτή εμπλέκεται και η Smad7, η οποία αναστέλλει το σχηματισμό του VDR-Smad3 συμπλόκου, ρυθμίζοντας αρνητικά τη σηματοδότηση από τον VDR (Yanagi et al., 1999).

Οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές p/CAF και CBP/p300

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι συνενεργοποιητές επάγουν την μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων, αφορά στην ικανότητά τους να ακετυλιώνουν τις N-τερματικές ουρές των ιστονών μέσω της ενεργότητας ακετυλο-τρανσφεράσης (Histone acetyltransferases, HATs) (Turner and O'Neill, 1995). Το γεγονός ότι το κύτταρο χρησιμοποιεί διαφορετικά τέτοια ένζυμα μπορεί να αποδοθεί στο ότι κάθε ένα από αυτά ακετυλιώνει διαφορετικές ιστόνες. Έτσι, οι GCN5 και pCAF ακετυλιώνουν τις H3 και H4 ιστόνες (Kuo et al., 1996, Yang et al., 1996), ενώ ο CBP (CREB Binding Protein) και τις τέσσερις ιστόνες (Bannister and Kouzarides, 1996). Το γεγονός ότι ο CBP ακετυλιώνει την p53 πρωτεΐνη, με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας πρόσδεσης της τελευταίας στο DNA, υποδεικνύει ότι αυτά τα ένζυμα μπορούν να ενεργοποιούν την μεταγραφή και με μηχανισμούς ανεξάρτητους των ιστονών (Gu and Roeder, 1997). Συνεπώς, οι συνενεργοποιητές εμφανίζουν γενικότερη ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης (AT).

Η περιοχή που ευθύνεται για την ενζυμική δραστηριότητα των ακετυλοτρανσφερασών, είναι αρκετά μεγάλη, της τάξεως αρκετών εκατοντάδων αμινοξέων. Ειδικά για τον CBP, η AT περιοχή (αμινοξέα 1099-1758) αποτελεί μέρος μιας ευρύτερης περιοχής μεταγραφικής ενεργοποίησης (αμινοξέα 1099-1877). Η μεταγραφική δραστηριότητα αυτής της περιοχής εξαρτάται από την AT ενεργότητα, αλλά υποβοηθάται από αλληλουχίες που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης άλλων παραγόντων. Έτσι, ο CBP ακετυλιώνει αφ' ενός τις ιστόνες αλλάζοντας την δομή του νουκλεοσώματος και κάνοντας την χρωματίνη προσιτή σε μεταγραφικούς

παράγοντες, αφ'ετέρου άλλες πρωτεΐνες όπως η p53 και οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες TFIIIE και TFIIIF και επιπλέον αλληλεπιδρά με άλλες AT πρωτεΐνες όπως οι pCAF και SRC1 (Martinez-Balbas et al., 1998). Το αποτέλεσμα των ακετυλιώσεων και των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι η επαγωγή της μεταγραφικής δραστηριότητας.

Τόσο οι R-Smads όσο και η Smad4 αλληλεπιδρούν με συνενεργοποιητές προκειμένου να αναπτύξουν περαιτέρω την μεταγραφική τους δραστηριότητα. Είναι γνωστό ότι οι R-Smads προσελκύουν τους γενικούς συνενεργοποιητές p300/CBP αλληλεπιδρώντας άμεσα με αυτούς μέσω της MH2 περιοχής τους. Η περιοχή των p300/CBP που αλληλεπιδρά με τις R-Smads χαρτογραφείται στην C-τερματική τους περιοχή με συνεισφορά και την N-τερματικής περιοχής (Feng et al., 1998, Janknecht et al., 1998, Rouponnot et al., 1998, Shen et al., 1998). Επίσης, έχει καταγραφεί άμεση αλληλεπίδραση της Smad4 και συγκεκριμένα μιας περιοχής που εντοπίζεται στην θάση σύνδεσης (linker) με την N-τερματικής περιοχή του p300 (de Caestecker et al., 2000b). Η MSG1 πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την εν λόγω περιοχή της Smad4 πιθανότατα συμμετέχει στον σχηματισμό του συμπλόκου με τον p300 (Shioda et al., 1998).

Ο συνενεργοποιητής p300 αλληλεπιδρά μέσω δύο παρακείμενων περιοχών του με τις Smads, παρουσία TGFβ ενεργοποίησης. Οι περιοχές αυτές του p300 ονομάζονται SID1 και SID2 (Smad Interaction Domain) και εντοπίζονται μεταξύ των αμινοξέων 1737-1855 και 1855-2023 αντίστοιχα, σύμφωνα με πειράματα συν-κατακρήμνισης. Η SID1 συμπίπτει με την C/H3 περιοχή του p300 και είναι συντηρημένη και στον CBP συνενεργοποιητή (Nishihara et al., 1999). Η E1A, μια αδενοϊκή πρωτεΐνη που προσδένεται στην C/H3 περιοχή των p300 και CBP καταστέλλοντας την HAT ενεργότητά τους (Chakravarti et al., 1999). Η E1A, μέσω της πρόσδεσης στην C/H3 περιοχή εμποδίζει την αλληλεπίδραση των Smad3 και p300. Ταυτόχρονα όμως, παρατηρήθηκε άμεση και ειδική αλληλεπίδραση της E1A με την MH2 περιοχή των R-Smads, τόσο απουσία όσο και παρουσία TGFβ ενεργοποίησης (Nishihara et al., 1999).

Ο συνενεργοποιητής p/CAF (p300/CBP activation factor), αναγνωρίστηκε αρχικά από την αλληλεπίδρασή του με τις p300/CBP. Χαρακτηρίζεται από HAT ενεργότητα και ακετυλιώνει όπως και ο CBP την p53 αλλά σε διαφορετικές λυσίνες. Είναι επίσης γνωστό ότι ο p/CAF αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι υποδοχείς πυρηνικών ορμονών (Chen et al., 1997, Blanco et al., 1998, Korzus et al., 1998), ο NF-Y (Currie et al., 1998) και η κυκλίνη D (McMahon et al., 1999). Παρουσία TGFβ

ο p/CAF αλληλεπιδρά μέσω της N-τερματικής περιοχής του (αμινοξέα 1-348) με την MH2 περιοχή της Smad3 και επάγει Smad3-εξαρτημένες αποκρίσεις. Οι τελευταίες ενισχύονται περαιτέρω με την συν-αλληλεπίδραση των p300 και Smad4 πρωτεϊνών (Itoh et al., 2000).

Πολλές από τις καταγεγραμμένες συνεργασιακές δράσεις των Smads με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να οφείλονται στην προσέλκυση συνενεργοποιητών. Είναι γνωστή η φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση της Smad3 με τον υποδοχέα της βιταμίνης D (Vitamin D Receptor, VDR) στην οποία παίζει σημαντικό ρόλο ο συνενεργοποιητής SRC1 (steroid receptor coactivator 1), οποίος χαρακτηρίζεται από ενδογενή HAT ενεργότητα (Yanagi et al., 1999).

Οι μεταγραφικοί συν-καταστολείς c-Ski και SnoN

Το DNA-προσδεδόμενο σύμπλοκο των Smad πρωτεϊνών έχει την δυνατότητα να προσελκύει εκτός από συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς. Τέτοιοι συνκαταστολείς είναι ο TGIF ο οποίος αλληλεπιδρά άμεσα με τις Smad2/Smad3, παρουσία του TGFβ, και με την σειρά του προσελκύει τις HDACs (Wotton et al., 1999a), καθώς και οι c-Ski SnoN συνκαταστολείς. Το Ski αναγνωρίστηκε αρχικά ως το ογκογονίδιο του ρετροϊού Sloan-Kettering. Η υπερέκφραση της v-Ski στους ινοβλάστες επάγει τον μετασηματισμό τους. Η v-Ski προκύπτει από την απαλοιφή περιοχής της c-Ski η οποία είναι πυρηνική πρωτεΐνη 728 αμινοξέων. Ομόλογες c-Ski πρωτεΐνες έχουν βρεθεί στο άνθρωπο, στον ποντικό, στην κότα στον *Xenopus* και στο *zebra fish*. Η SnoN χαρακτηρίστηκε ως ένα μόριο που σχετίζεται δομικά με την c-Ski με την οποία παρουσιάζει ομολογία κυρίως στην N-τερματική περιοχή. Έχουν βρεθεί δύο ισομορφές της SnoN στην κότα και δύο ισομορφές στον ποντικό, αλλά τουλάχιστον τέσσερις ισομορφές αυτής της πρωτεΐνης στον άνθρωπο. Οι c-Ski και SnoN, εκτός της αμινοτερματικής ομολογίας, χαρακτηρίζονται και από μια εξαιρετικά συντηρημένη καρβοξυ-τερματική περιοχή όπου παρατηρούνται ατελείς τυχαίες επαναλήψεις (TR) και το μοτίβο LZ (α helical leucine zipper). Η περιοχή αυτή είναι υπεύθυνη για τον ομο- και ετερο-πολυμερισμό των διαφόρων μελών της οικογένειας των Ski πρωτο-ογκο-πρωτεϊνών (Liu, Sun et al., 2001).

Οι c-Ski και SnoN ρυθμίζουν την TGFβ σηματοδότηση αλληλεπιδρώντας άμεσα με τις Smad2, Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες. Επίσης, αλληλεπιδρούν αλλά

πολύ ασθενέστερα με τις BMP-ενεργοποιημένες R-Smads. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση της c-Ski με την Smad4 είναι τόσο ισχυρή που πιθανότατα καταστέλλει και την BMP σηματοδότηση (Wang et al., 2000, Akiyoshi et al., 1999).

Οι περιοχές που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση της c-Ski με την Smad3 ή την Smad4 έχουν χαρακτηριστεί λεπτομερώς και απεικονίζονται σχηματικά στην **Εικόνα 9**. Η N-τερματική περιοχή της c-Ski (αμινοξέα 16-40) είναι η πιο σημαντική για την αλληλεπίδραση με την Smad3 (Qin et al., 2002), αλλά και μια άλλη περιοχή στο μέσο του c-Ski μορίου (αμινοξέα 338-490) συμμετέχει στην αλληλεπίδραση αυτή (Akiyoshi et al., 1999). Αντιθέτως, για την αλληλεπίδραση της c-Ski με την Smad4 σημαντικό ρόλο παίζει η I-θηλιά (αμινοξέα 260-281) (Wu et al., 2002). Συνεπώς, οι περιοχές της c-Ski που αλληλεπιδρούν με την Smad3 είναι διαφορετικές από εκείνες που αλληλεπιδρούν με την Smad4.

Είναι γνωστό ότι οι Smad2/3 και Smad4 αλληλεπιδρούν με την c-Ski μέσω της MH2 περιοχής τους. Οι μελέτες ανάλυσης της τρισδιάστατης δομής της Smad3, υποδεικνύουν ότι η c-Ski αλληλεπιδρά με την επάνω επιφάνεια του πυρήνα της β-sandwich δομής και συγκεκριμένα με την περιοχή μεταξύ των B2 και B3 πτυχωτών επιφανειών. Η αλληλεπίδραση αυτή δεν επηρεάζει τον σχηματισμό ολιγομερών της Smad3, ο οποίος, μάλιστα, υποβοηθά την αλληλεπίδραση. Αντιθέτως, η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να παρεμποδίζει την πρόσδεση της Smad3 στον p300/CBP, καθώς οι συν-ενεργοποιητές αυτοί προσδένονται επίσης στον πυρήνα της β-sandwich δομής της Smad3 (Qin et al., 2002, Mizuide et al., 2003, Akiyoshi et al., 1999).

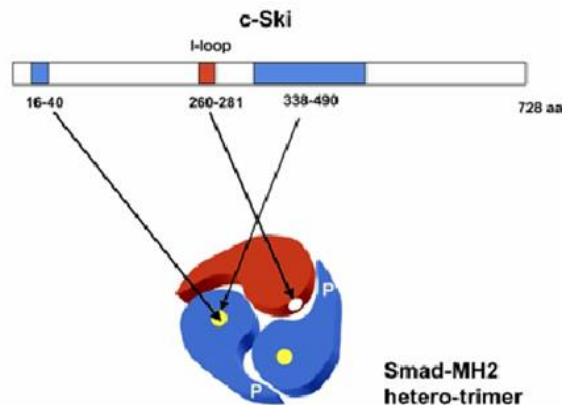
Σε αντίθεση με την Smad3, η περιοχή της Smad4 που αλληλεπιδρά με την c-Ski είναι η L3 θηλιά, η οποία είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό ετερομερών της Smad4 με την Smad3. Επομένως, η αλληλεπίδραση της c-Ski με την Smad4 μπορεί να αναστέλλει τον σχηματισμό ετερο-ολιγομερών μεταξύ των Smad3 και Smad4 (Wu et al., 2002).

Είναι γνωστό ότι η Ski πρωτεΐνη ρυθμίζει την μεταγραφή ενός αριθμού γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, αλλά η ίδια η Ski δεν έχει την ικανότητα άμεσης πρόσδεσης στο DNA (Nicol et al., 1998, Tarapore et al., 1997). Η Smad3 σχηματίζει σύμπλοκο με τις Ski/SnoN το οποίο, παρουσία του TGFβ προσδένεται στο DNA και καταστέλλει την μεταγραφή των Smad-αποκρινόμενων γονιδίων και την TGFβ-επαγόμενη καταστολή της κυτταρικής αύξησης. Ο μηχανισμός με τον οποίο η Ski προωθεί την κυτταρική αύξηση είναι

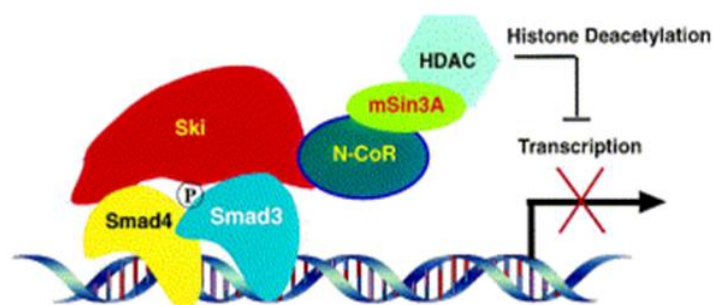
μέσω αναστολής της κατασταλτικής δράσης του TGFβ στην έκφραση της c-Myc. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί, εν μέρει, στην αναστολή σχηματισμού ετεροπολυμερών μεταξύ των Smad2/3 και Smad4 (Sun et al., 1999). Ο άλλος μηχανισμός αφορά στην προσέλκυση απακετυλασών ιστονών. Οι c-Ski και SnoN αλληλεπιδρούν με τις N-CoR/SMRT και mSin3A πρωτεΐνες και σχηματίζουν σύμπλοκα με τις απακετυλάσες ιστονών (HDACs), καταστέλλοντας έτσι την μεταγραφή γονιδίων στόχων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10** (Luo et al., 1999).

Η έκφραση της SnoN ρυθμίζεται με δύο τρόπους από τον TGFβ. Αμέσως μετά την επίδραση της κυτοκίνης, η έκφραση της SnoN καταστέλλεται, αλλά αργότερα επάγεται (Stroschein et al., 1999). Η αρχική καταστολή επιτελείται σε πρωτεϊνικό επίπεδο μέσω του σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ της SnoN και των Smad2 και Smurf2, με αποτέλεσμα την ουμπικιτινίωση και αποικοδόμηση της SnoN. Κατόπιν η έκφραση της SnoN επάγεται από τον TGFβ σε επίπεδο mRNA (Bonni et al., 2001). Το ίδιο συμβαίνει και με την c-Ski πρωτεΐνη, αν και λιγότερο έντονα από ότι με την SnoN πρωτεΐνη (Sun et al., 1999). Επομένως, οι c-Ski και SnoN, όπως και οι I-Smads, ρυθμίζουν την δράση του TGFβ μέσω μηχανισμού ανασταλτικής επανατροφοδότησης. Επιπλέον, από τα παραπάνω υποδεικνύεται ότι και οι ίδιες οι c-Ski και SnoN ρυθμίζονται από τον TGFβ (Miyazono et al., 2003), με μηχανισμούς που αναλύονται στην συνέχεια.

Μετά την επίδραση χημικού καρκινογόνου, τόσο τα c-Ski^{+/-} ποντίκια όσο και τα SnoN^{+/-} παρουσιάζουν υψηλότερο βαθμό σχηματισμού όγκων από τα αγρίου τύπου ποντίκια (Shinawaga et al., 2000, Shinawaga et al., 2001). Έτσι, οι c-Ski και SnoN συνκαταστολείς μπορεί να δρουν ογκοκατασταλτικά σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, γεγονός που ομοιάζει με την διπλή δράση του TGFβ κατά την καρκινογένεση (βλ. παρακάτω).



Εικόνα 9. Ο συνκαταστολέας c-Ski αλληλεπιδρά με τις Smad πρωτεΐνες και καταστέλλει την TGFβ σηματοδότηση. Απεικονίζεται σχηματικά η δομή του συνκαταστολέα c-Ski και των MH2 περιοχών του ετεροτριμερούς συμπλόκου δύο φωσφορυλιωμένων (P) R-Smads (μπλε χρώμα) με μια Co-Smad (κόκκινο χρώμα). Οι αμινοξικές περιοχές 16-40 και 338-490 του c-Ski που αλληλεπιδρούν με τις R-Smads απεικονίζονται με μπλε χρώμα. Η αμινοξική περιοχή 260-281 (I-loop) που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με την Smad4 απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα. Ο c-Ski αλληλεπιδρά με την επάνω επιφάνεια του R-Smad MH2 τριμερούς που συμβολίζεται με κίτρινο κύκλο και με την L3 θηλιά της Smad4 που συμβολίζεται με λευκό κύκλο.



Εικόνα 10. Σχηματικό μοντέλο καταστολής της TGFβ μεταγραφικής ενεργότητας από τον συνκαταστολέα c-Ski. Ο συνκαταστολέας c-Ski προσδένεται στο R-Smads/Smad4 σύμπλοκο, που έχει ενεργοποιηθεί από τον TGFβ, και προσελκύει την N-CoR που αλληλεπιδρά άμεσα με την mSin3A πρωτεΐνη. Το N-CoR/mSin3A σύμπλοκο αλληλεπιδρά με τις απακετυλάσες ιστονών (HDACs) με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής.

Ρύθμιση των επιπέδων έκφρασης των Smad πρωτεϊνών και συμμετοχή τους σε μονοπάτια ουμπικιτινίωσης

Παρά τον διαφορετικό έλεγχο που υφίστανται κατά την ανάπτυξη, οι R-Smads και η Smad4 εκφράζονται στα περισσότερα, αν όχι σε όλα, τα κύτταρα. Αντιθέτως, η έκφραση των I-Smads υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο εξωκυττάρων σημάτων. Η επαγωγή της έκφρασης των Smad6 και Smad7 από τους συνδέτες BMP και TGFβ αντίστοιχα, αποτελεί, όπως έχει ήδη αναφερθεί, έναν αυτοκατασταλτικό μηχανισμό της σηματοδότησης (Moustakas et al., 2001). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF) και άλλων υποδοχέων με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, η ενεργοποίηση της σηματοδότησης της ιντερφερόνης γ μέσω των πρωτεϊνών STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) καθώς και η ενεργοποίηση του NF- κ B από τον TNF α (Tumour Necrosis Factor α) επάγουν την έκφραση της Smad7 και συνεπώς καταστέλλουν την TGFβ σηματοδότηση (Massague et al., 2000, Itoh et al., 2000, Moustakas et al., 2001). Η ενεργοποίηση των ανασταλτικών Smad6/7 πρωτεϊνών από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια δείχνεται στην **Εικόνα 11**. Στην ίδια εικόνα φαίνονται τα σηματοδοτικά πολυπρωτεϊνικά κέντρα του TGFβ που προαναφέρθηκαν.

Η αποικοδόμηση μέσω ουμπικιουτίνης – πρωτεασωμάτων ελέγχει τα επίπεδα έκφρασης των Smad πρωτεϊνών μετα-μεταφραστικά. Πρόσφατα ανακαλύφθηκε η αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με μια καινούργια ομάδα λιγασών ουμπικιουτίνης τύπου E3 που περιέχουν το μοτίβο HECT (Homologous to the E6-AP Carboxy Terminus) και ονομάζονται Smurfs (Smad ubiquitination-regulatory factors). Συγκεκριμένα η Smurf1 ουμπικιτιώνει και συνεπώς ρυθμίζει τα επίπεδα της Smad1 και της Smad5 πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα μη ενεργοποιημένων κυττάρων (Zhu et al., 1999). Επίσης, η Smad2 μετά την C-τερματική της φωσφορυλίωση και την μεταγραφική της δράση, ουμπικιτιώνεται από την Smurf2 E3 λιγάση (Lin et al., 2000, Zhang et al., 2001) και αποικοδομείται στα πρωτεασώματα (Lo and Massague, 1999). Η Smurf2 αλληλεπιδρά με διάφορες Smads και συνεπώς εμπλέκεται και στην BMP και στην TGFβ σηματοδότηση (Agora et al., 2001, Zhang et al., 2001, Bonni et al., 2001). Μελέτες που έγιναν σε έμβρυα *Xenopus* υποδεικνύουν ότι οι Smurf1 και Smurf2 στοχεύουν κυρίως το BMP μονοπάτι (Zhu et al., 1999, Bonni et al., 2001).

Η αποικοδόμηση στα πρωτεασώματα ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης των R-Smads μετά την μετακίνησή τους στον πυρήνα. Η πυρηνική C-τερματικά φωσφορυλιωμένη Smad3 ουμπικιτιώνεται, μετά την περάτωση του μεταγραφικού της έργου, μέσω του συμπλόκου SCF/Roc1 E3 λιγασών. Το σύμπλοκο αυτό αποτελείται από την Ring finger πρωτεΐνη Roc1 και το SCF σύμπλοκο λιγασών ουμπικιουτίνης το οποίο περιέχει τις Skp1, Cullin1 βTRCP1/Fbw1α (β-transducin-repeat-containing protein 1). Στην περίπτωση της Smad3 η πρωτεϊνική αποικοδόμηση πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα. Η υπερέκφραση του συνενεργοποιητή p300 ενισχύει την ουμπικιτινίωση της φωσφορυλιωμένης Smad3, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ουμπικιτινίωση ακολουθεί την μεταγραφική δράση της Smad3 (Fukuchi et al., 2001). Ωστόσο, μόνο μια μικρή ποσότητα των Smad2 και Smad3 ουμπικιτιώνεται, απουσία ή παρουσία του TGFβ, και μάλιστα αυτές οι φωσφορυλιωμένες Smads μπορούν να σχηματίσουν σταθερά σύμπλοκα με την Smurf2 (Bonni et al., 2001). Ο κύριος όγκος των Smad2 και Smad3 δεν αποτελεί στόχο αποικοδόμησης αλλά αποφωσφορυλίωσης και επανατοποθέτησης στο κυτταρόπλασμα, μέσω ουμπικιτινίωσης (Inman et al., 2002, Xu et al., 2002). Δεν έχει όμως ακόμα διαλευκανθεί ο ρόλος των λιγασών ουμπικιουτίνης στην πυρηνική έξοδο των Smads.

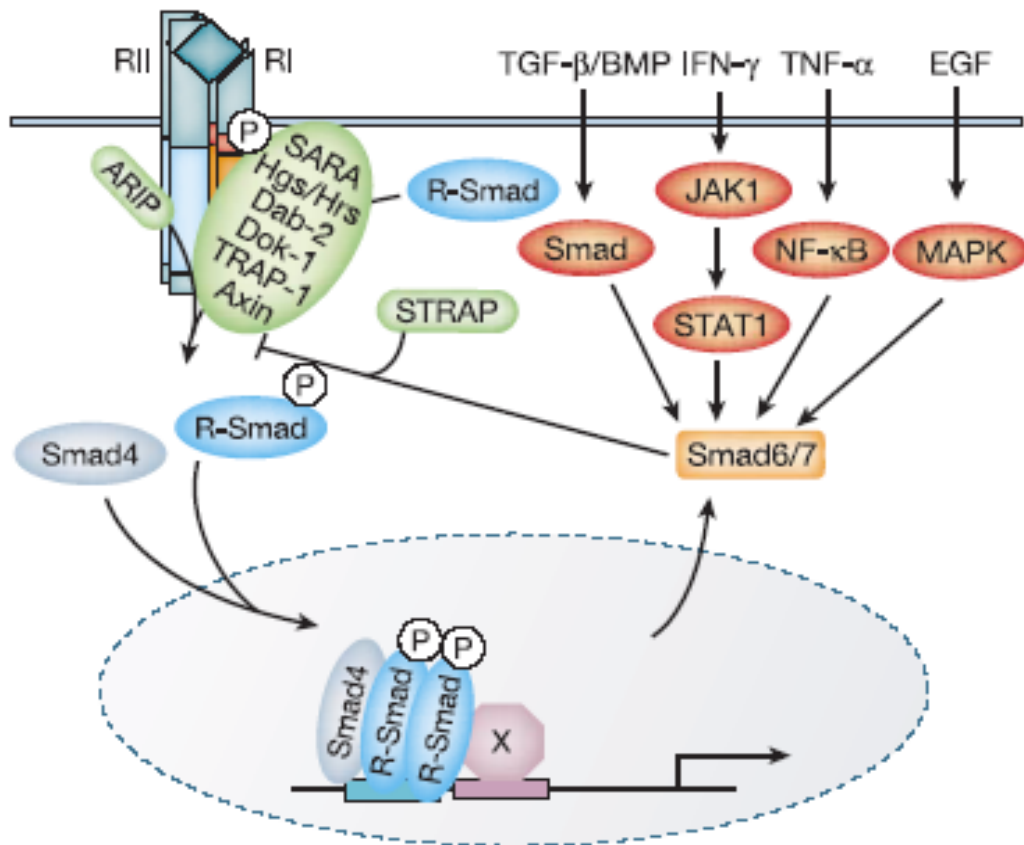
Τέλος, η πρωτεασωματική αποικοδόμηση της Smad4 έχει παρατηρηθεί σε καρκινικά κύτταρα, τα οποία είτε χαρακτηρίζονται από μεταλλάξεις στο γονίδιο *MADH4* είτε εκφράζουν ενεργές ογκοπρωτεΐνες όπως η Ras (Xu and Attisano, 2000). Ο μηχανισμός ουμπικιτινίωσης δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Η Jab1, μια πρωτεΐνη που αποτελεί την υπομονάδα CSN5 του συμπλόκου COP9 και αρχικά θεωρήθηκε ως συν-ενεργοποιητής του c-Jun, φαίνεται να εμπλέκεται στην ουμπικιτινίωση και αποικοδόμηση της Smad4 (Wan et al., 2002). Η τελική αποικοδόμηση των Smads, είτε αυτή επάγεται από τις Smurfs είτε από άλλες E3 λιγασές, έχει καθιερωθεί ως ένας μηχανισμός καταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smads μετά από παρατεταμένη ενεργοποίησή τους και περάτωση του έργου τους.

Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν πρόσθετους ρόλους της αποικοδόμησης μέσω πρωτεασωμάτων στον έλεγχο της Smad σηματοδότησης. Οι Smurfs ρυθμίζουν εκτός των άλλων την ουμπικιτινίωση και την αποικοδόμηση άλλων πρωτεϊνών στόχων του Smad μονοπατιού, όπως το σύμπλοκο υποδοχέων του TGFβ και ο μεταγραφικός συν-καταστολέας SnoN (Bonni et al., 2001, Ebisawa et al., 2001, Kavsak et al., 2000, Stroschein et al., 2001). Οι Smurf1 και Smurf2 αλληλεπιδρούν με την πυρηνική I-Smad Smad7 μετά από ενεργοποίηση από τον συνδέτη TGFβ (Ebisawa et al., 2001,

Kavsak et al., 2000). Το I-Smad-Smurf σύμπλοκο εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα και ουμπικιτιώνει τους υποδοχείς στην κυτταρική επιφάνεια ή σε μεμβράνες ενδοσωμάτων. Οι υποδοχείς στη συνέχεια αποικοδομούνται σε πρωτεασώματα και λυσοσώματα. Δεν είναι γνωστό αν τα παραπάνω ισχύουν και για την I-Smad Smad6.

Μια από τις πρωτεΐνες που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τις Smads είναι η HEF1 (human enhancer of filamentation 1), τα επίπεδα έκφρασης της οποίας ρυθμίζονται από πρωτεασωματική αποικοδόμηση που επάγεται από το Smad μονοπάτι (Liu et al., 2000). Εναλλακτικά, οι ενεργοποιημένες Smad2 και Smad3 εισέρχονται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με την Smurf2 και την APC (anaphase promoting complex) και προκαλούν ουμπικιτινίωση της SnoN με την οποία αλληλεπιδρούν οι Smads και Smurf2. Αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι η ραγδαία αποικοδόμηση της SnoN (Bonni et al., 2001, Stroschein et al., 2001) Επομένως και οι ίδιες οι Smads λειτουργούν ως μεταγωγείς ουμπικιτινίωσης κυτταρικών πρωτεϊνών.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους η TGFβ σηματοδότηση χρησιμοποιεί διαφορετικές Smurfs για την αποικοδόμηση των Smads ή άλλων πρωτεϊνών όπως η SnoN και οι υποδοχείς του TGFβ δεν είναι γνωστοί. Η αποσαφήνισή τους αναμένεται να αποκαλύψει καινούργιους τρόπους ρύθμισης της Smad σηματοδότησης.



Εικόνα 11. Η ενεργοποίηση των R-Smads ρυθμίζεται από πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς και από τις ανασταλτικές Smad6/7. Οι πρωτεΐνες με το πράσινο χρώμα αναφέρθηκαν προηγουμένως και συμμετέχουν στην συγκρότηση κέντρων σηματοδότησης του TGFβ. Η έκφραση των Smad6/7 επάγεται από διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένων αυτών των TGFβ/BMP και καταστέλλουν την ενεργοποίηση των R-Smads. Η STRAP πρωτεΐνη αλληλεπιδρά τόσο με τους υποδοχείς τύπου I και τύπου II, όσο και με την Smad7, σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση της τελευταίας με το σύμπλοκο των υποδοχέων.

Άλλες λειτουργίες των υποδοχέων του TGFβ

Τα σύμπλοκα των υποδοχέων του TGFβ αποτελούν σημεία πολυπρωτεϊνικών σχηματισμών που ρυθμίζουν τη λειτουργία των ίδιων των υποδοχέων, την πορεία των τελευταίων σε διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα καθώς και το Smad σηματοδοτικό μονοπάτι. Οι πολυπρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις πιθανότατα εξαρτώνται από την ενεργοποίηση ή μη των υποδοχέων και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους και ποικίλουν κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής των υποδοχέων.

Εκτός από τις πρωτεΐνες αγκυροβόλησης που συνδέουν τις Smads με τους υποδοχείς τους, υπάρχουν αρκετές πρωτεΐνες που περιέχουν WD-40 επαναλήψεις και αλληλεπιδρούν με του TGFβ υποδοχείς. Μια τέτοια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα τύπου II του TGFβ είναι η TRIP-1 (TGFβ-receptor-interacting protein 1), η οποία φωσφορυλιώνεται από αυτόν. Αυξημένα επίπεδα της TRIP-1 καταστέλλουν την TGFβ επαγόμενη μεταγραφή (Choy et al., 1998). Παρόμοια λειτουργία, μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα τύπου II, παρουσιάζει ο μεταφραστικός παράγοντας eIF2α (McGonigle et al., 2002). Η ρυθμιστική Βα υπομονάδα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2Α (protein phosphatase 2A, PP2A) αλληλεπιδρά άμεσα με τους υποδοχείς τύπου I του TGFβ και επάγει αντιμιτωτική σηματοδότηση (Griswold-Prenner et al., 1998). Η STRAP αποτελεί μια τρίτη πρωτεΐνη με WD-40 επαναλήψεις, που αλληλεπιδρά και με τους δύο τύπους υποδοχέων του TGFβ καθώς και με τις Smad2, Smad3 και Smad7. Η STRAP σταθεροποιεί το σύμπλοκο της Smad7 με τους TGFβ υποδοχείς, πιθανότατα παρεμποδίζοντας την πρόσδεση των Smad2 ή Smad3 στους υποδοχείς (Datta et al., 2000).

Οι TGFβ υποδοχείς αλληλεπιδρούν με την ανοσοφιλίνη FKBP12 μέσω του συντηρημένου Leu-Pro μοτίβου που βρίσκεται δίπλα στην GS περιοχή των μη ενεργοποιημένων υποδοχέων τύπου I. Η FKBP12 μειώνει την TGFβ σηματοδότηση αναστέλλοντας την φωσφορυλίωση των υποδοχέων τύπου I από τους υποδοχείς τύπου II (Huse et al., 1999), γεγονός που σχετίζεται με μειωμένη ενσωμάτωση των υποδοχέων σε κυστίδια και μειωμένη Smad φωσφορυλίωση (Yao et al., 2000). Ωστόσο, δεν υπάρχουν στοιχεία που να συνδέουν τον TGFβ με FKBP12 επαγόμενη σηματοδότηση (επαγωγή των calcineurin και NF-AT). Οι αλληλεπιδράσεις των

προαναφερθέντων πρωτεϊνών με τους υποδοχείς του TGFβ καταδεικνύονται στην **Εικόνα 12**.

Smad-ανεξάρτητη σηματοδότηση του TGFβ μέσω MAPK μονοπατιών.

Ο TGFβ, εκτός της Smad επαγόμενης μεταγραφής, ενεργοποιεί και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα μονοπάτια των MAP κινασών, όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 12**. Κάποια από τα μονοπάτια αυτά ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, όπως προαναφέρθηκε, ενώ άλλα επάγουν αποκρίσεις που δεν σχετίζονται με την μεταγραφή.

Ο TGFβ ενεργοποιεί τα Erk, JNK και p38 MAPK μονοπάτια κινασών. Η ενεργοποίηση αυτή σε κάποιες περιπτώσεις αποτελεί Smad εξαρτημένη μεταγραφική απόκριση, άλλα όταν συμβαίνει ταχύτατα υποδηλώνει μηχανισμούς ανεξάρτητους της μεταγραφής. Μελέτες με χρήση ελλειμματικών σε Smad4 κυττάρων ή αρνητικώς επικρατούντων μορφών των Smads υποστηρίζουν την Smad ανεξάρτητη ενεργοποίηση (Engel et al., 1999). Επιπλέον, μεταλλαγμένοι υποδοχείς τύπου I του TGFβ, που στερούνται της ικανότητας ενεργοποίησης των Smads, ενεργοποιούν την p38 MAPK σηματοδότηση παρουσία του TGFβ (Yu et al., 2002).

Η άμεση ενεργοποίηση της Ras από τον TGFβ σε επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να εμπλέκει την Ras σε TGFβ επαγόμενη Erk MAPK σηματοδότηση (Yue et al., 2000). Ο TGFβ ενεργοποιεί την TAK1 (TGFβ –activated kinase 1) καθώς και την MEKK1 οι οποίες είναι γνωστό ότι ενεργοποιούν τις MKK3/6 και MEKK4 αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση των JNK και p38 MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών (Yamaguchi et al., 1999). Καθώς η TAK1 ενεργοποιεί την IκB κινάση, ο TGFβ επάγει έμμεσα την σηματοδότηση του NF-κB μονοπατιού.

Η TGFβ επαγόμενη ενεργοποίηση των Erk και JNK μονοπατιών μπορεί να οδηγήσει σε φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, όπως έχει ήδη αναφερθεί. Επίσης, η TGFβ επαγόμενη ενεργοποίηση της Ras/Erk MAPK σηματοδότησης μπορεί να επάγει την έκφραση του TGFβ1, πολλαπλασιάζοντας έτσι τις TGFβ αποκρίσεις (Yue et al., 2000). Η ενεργοποίηση των c-Jun, που αποτελεί το υπόστρωμα της JNK, και ATF-2 (activating transcription factor 2), που αποτελεί υπόστρωμα της p38 MAPK, δηλαδή μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τις Smads, επιτρέπει την σύγκλιση των TGFβ επαγόμενων Smad και MAPK

μονοπατιών. Αυτή η διπλή δραστηριότητα του TGFβ παίζει ρόλο στην διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Bakin et al., 2002, Zavadil et al., 2001). Η προαναφερθείσα σύγκλιση οδηγεί συνήθως σε συνεργασία των δύο μονοπατιών, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις όπου τα δύο μονοπάτια ανταγωνίζονται μεταξύ τους. Μια τέτοια χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η καταστολή της Smad2 σηματοδότησης μέσω αλληλεπίδρασης της πρώτης με Smad συν-καταστολείς. Η αλληλεπίδραση αυτή ρυθμίζεται από την JNK σηματοδότηση (Pessah et al., 2002). Συνεπώς, η ισορροπία στην άμεση ενεργοποίηση των Smads και των MAPK μονοπατιών συχνά καθορίζει την κυτταρική απόκριση στον TGFβ.

Σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τον TGFβ.

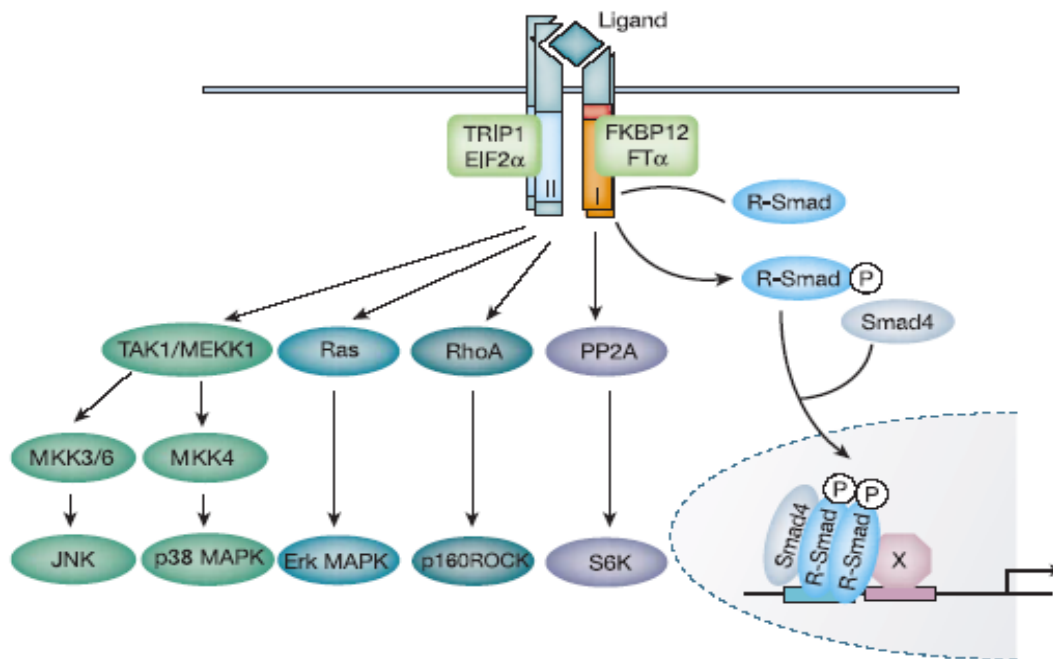
Ο TGFβ επάγει, σε κάποιες κυτταρικές σειρές, την ραγδαία ενεργοποίηση των μικρών Rho GTPασών, συμπεριλαμβανομένων των RhoA, Rac και Cdc42, αν και έχουν αναφερθεί περιπτώσεις καθυστερημένης ενεργοποίησης των RhoA και Cdc42 (Bhowmick et al., 2001, Edlund et al., 2002). Ο TGFβ ενισχύει επίσης την έκφραση της RhoB, πιθανότατα αναστέλλοντας την αποικοδόμηση της τελευταίας στα πρωτεασώματα, και στη συνέχεια η RhoB καταστέλλει την TGFβ επαγόμενη γονιδιακή έκφραση (Engel et al., 1998). Οι Rac και Cdc42 ρυθμίζουν την ενεργοποίηση των JNK και p38 MAPK μονοπατιών, πιθανότατα μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τις MAPKKs που αποτελούν μεταγωγείς των προαναφερθέντων μονοπατιών. Εκτός από τις Rac και Cdc42, η Rho-εξαρτημένη ενεργοποίηση της JNK σηματοδότησης συνεισφέρει επίσης στην ενεργοποίηση των Smads (Engel et al., 1999).

Οι παραπάνω GTPases εμπλέκονται επίσης σε TGFβ-επαγόμενες αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και στην διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά. Η ενεργοποίηση των RhoA, Rac1 και p38 MAPK που αποτελεί μεταγωγέα της Cdc42, απαιτείται για την αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης και τον σχηματισμό λαμελλιποδίων, παρουσία του TGFβ (Edlund et al., 2002). Η ενεργοποίηση της RhoA και του μεταγωγέα της p160^{ROCK} καθώς και των Cdc24, p38 MAPK και των Smad πρωτεϊνών που δείχνεται στην **Εικόνα 12**, εμπλέκεται στον TGFβ-επαγόμενο σχηματισμό ινιδίων του στρες και στην μεσεγχυματική διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων (Bhowmick et al., 2001, Edlund et al.,

2002, Bakin et al., 2002, Shen et al., 2001). Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε άμεση αλληλεπίδραση της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα BMP-RII με τον ρυθμιστή του κυτταροσκελετού LIM kinase 1. Η δραστηριότητα κινάσης της LIM 1 ρυθμίζεται από τον BMP με αποτέλεσμα την άμεση συσχέτιση της σηματοδότησης του BMP με τον κυτταροσκελετό (Foletta et al., 2003).

Ο TGFβ μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την φωσφατιδυλινοσιτόλη-3-κινάση (PI3K), όπως υποδεικνύεται από την φωσφορυλίωση του μεταγωγέα της Akt (Bakin et al., 2000, Vinals et al., 2001). Η ενεργοποίηση αυτή μπορεί να είναι είτε άμεση, με πιθανή εμπλοκή της RhoA (Bakin et al., 2000), είτε έμμεση μέσω TGFβ-επαγώμενης έκφρασης του TGFα και επακόλουθη ενεργοποίηση του EGF υποδοχέα (Vinals et al., 2001). Χημική καταστολή της PI3K ενεργότητας μειώνει την TGFβ-επαγώμενη φωσφορυλίωση της Smad2 και την διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Bakin et al., 2000). Η επίδραση αυτής της καταστολής στην προαναφερθείσα διαφοροποίηση φαίνεται να είναι δοσο-εξαρτημένη (Piek et al., 1999). Ο ρόλος της PI3K στην διαφοροποίηση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Έχει ήδη αναφερθεί και περιγραφεί στην **Εικόνα 12**, ότι ο TGFβ σηματοδοτεί μέσω της PP2A, η οποία αποτελείται από μια καταλυτική υπομονάδα και μια ρυθμιστική υπομονάδα A με την οποία αλληλεπιδρά η ρυθμιστική υπομονάδα B. Μετά την πρόσδεση του TGFβ, η Βα υπομονάδα της PP2A αλληλεπιδρά με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I (Griswold-Prenner et al., 1998). Όλες οι υπομονάδες της PP2A, μετά την TGFβ ενεργοποίηση, αλληλεπιδρούν με την p70^{S6K} κινάση που παίζει βασικό ρόλο στην ρύθμιση της μετάφρασης και της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Το αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η αποφωσφορυλίωση της p70^{S6K} και η μείωση της δραστηριότητάς της, γεγονός που συνεισφέρει στην παρατηρούμενη TGFβ-επαγώμενη καταστολή της κυτταρικής αύξησης (Petritsch et al., 2000).



Εικόνα 12. Ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγονται από τον TGFβ. Εκτός από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις Smads και τους υποδοχείς του TGFβ που προαναφέρθηκαν, είναι γνωστή πλέον η ύπαρξη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς τύπου I ή τύπου II ρυθμίζοντας την TGFβ σηματοδότηση χωρίς να ενεργοποιούν τις Smads. Αντιθέτως ενεργοποιούνται Smad-ανεξάρτητα σηματοδοτικά μονοπάτια όπως τα MAPK, PP2A, RhoA και TAK1/MEKK1.

ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ TGFβ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ

Ο TGFβ καταστέλλει την αύξηση διαφόρων τύπων κυττάρων. Η απώλεια αυτής της καταστολής έχει συνδεθεί με την καρκινογένεση (βλ. παρακάτω). Πρόσφατες μελέτες επισημαίνουν την δυνατότητα καταστολής της TGFβ-επαγώμενης αντιπολλαπλασιαστικής δράσης μέσω της πρωτεΐνης LMP1 (Latent Membrane Protein 1) του ιού Epstein-Barr (Προκόβα, ΜΔΕ, 2000).

Ο Epstein-Barr (EBV) ιός και η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1)

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) ανήκει στην οικογένεια των γ ερποϊών και είναι εξαιρετικά διαδεδομένος στον άνθρωπο. Οι περισσότερες πρωταρχικές μολύνσεις συμβαίνουν τα πρώτα χρόνια της ζωής του ανθρώπου και είτε δεν εμφανίζουν συμπτώματα, είτε σχετίζονται με ήπιες πυρετώδεις ασθένειες. Όταν η μόλυνση συμβεί κατά την εφηβεία, ή σε ενήλικους μπορεί να προκαλέσει μεταδοτική μονοπυρήνωση. Παρόλο που η πρωταρχική μόλυνση επιφέρει την ανοσοαπόκριση των T-λεμφοκυττάρων, ο EBV μπορεί να διατηρηθεί σε όλη τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου, προκαλώντας άδηλη μόλυνση των B-λεμφοκυττάρων μνήμης. Το αποτέλεσμα αυτής της λανθάνουσας μόλυνσης είναι η παραγωγή μη διαφοροποιημένων, συνεχώς πολλαπλασιαζόμενων λεμφοκυττάρων, ιδιαίτερα σε ανοκατεσταλμένα άτομα. Ο EBV προκαλεί πολλές κακοήθεις ασθένειες στους ανθρώπους, οι οποίες έχουν ομαδοποιηθεί με βάση εθνικά ή γεωγραφικά κριτήρια. Έτσι, ο EBV, στη Νότιο Κίνα σχετίζεται με ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, στην Αφρική με το λέμφωμα Burkitt, στην Ευρώπη και τη Βόρειο Αμερική με την ασθένεια Hodgkin, και στις βιομηχανικές περιοχές με καρκινώματα του εντέρου (MacFarland et al., 1999).

Η μόλυνση και ο μετασχηματισμός ανθρώπινων, ανενεργών πρωταρχικών B-λεμφοκυττάρων σε συνεχώς πολλαπλασιαζόμενες λεμφοβλαστοειδείς κυτταρικές σειρές (LCLs), αποτέλεσαν αντικείμενο γενετικών και βιοχημικών αναλύσεων, ώστε να αποσαφηνιστούν τα γονίδια και οι πρωτεΐνες του EBV που είναι απαραίτητα ή εμπλέκονται στον μετασχηματισμό των B-λεμφοκυττάρων. Η έκφραση του EBV γενώματος στις LCLs, περιορίζεται σε δύο μη πολυαδενυλιωμένα RNAs (EBERs), σε

μια οικογένεια δεξιόστροφων μεταγράφων (BARTs), σε έξι πυρηνικές αντιγονικές πρωτεΐνες, (τις EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C και -LP), καθώς και σε τρεις μεμβρανικές πρωτεΐνες λανθάνουσας μόλυνσης τις LMP1, -2A και -2B. Γενετικές αναλύσεις με ανασυνδυασμένο EBV αποκάλυψαν ότι για τον μετασχηματισμό και τη διατήρηση των LCLs χρειάζονται μόνο τα EBNA1, -2, -3A, -3C -LP και η LMP1 (MacFarland et al., 1999).

Η LMP1 (Latent Membrane Protein 1, λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1) αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη LMP1 είναι αναγκαία όχι μόνο για τον μετασχηματισμό των λεμφοκυττάρων σε LCLs, αλλά και για τον συνεχιζόμενο πολλαπλασιασμό τους (MacFarland et al., 1999). Επίσης, είναι η μόνη πρωτεΐνη του EBV που επιφέρει μετασχηματισμό σε μη λεμφικά κύτταρα (Mosialos et al., 1995). Σε κυτταρικές σειρές ινοβλαστών αρουραίων, η LMP1 προκαλεί αύξηση ανεξάρτητη της ακινητοποίησης των κυττάρων και της παρουσίας των αυξητικών παραγόντων, καθώς και απώλεια της αναστολής επαφής μεταξύ των κυττάρων. Σε καλλιεργούμενα επιθηλιακά κύτταρα, η έκφραση της LMP1 αναστέλλει την διαφοροποίηση. Επίσης, επάγει την έκφραση δεικτών ενεργοποίησης (CD23, CD30, CD39, CD40), μορίων κυτταρικής επαφής (ICAM1, LFA1, LFA3) καθώς και αντι-αποπτωτικών παραγόντων (A20, Bcl-2), ενώ σε διαγονιδιακά ποντίκια προκαλεί καρκινογένεση. Πολλές από τις κυτταρικές φαινοτυπικές αλλαγές που επιφέρει η LMP1, οφείλονται σε αλλαγές της μεταγραφικής ρύθμισης (Mosialos et al., 1997).

Η πρωτεΐνη LMP1 χρησιμοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του NF-κB

Η LMP1 είναι ένα συστατικά ενεργοποιημένο πρωτεϊνικό μόριο που μεταδίδει σήματα μετασχηματισμού από την πλασματική μεμβράνη, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και την αλλαγή στον ρυθμό αύξησης των μολυσμένων με τον ιό κυττάρων (MacFarland et al., 1999). Η σχηματική αναπαράσταση της δομής και λειτουργίας της LMP1 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 13**.

Ο NF-κB (ή Rel) είναι ένας εξαιρετικά διαδεδομένος μεταγραφικός παράγοντας που αποτελείται από τις πολυπεπτιδικές υπομονάδες p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50, και p52, οι οποίες συνθέτουν ομο- ή ετερο-διμερή. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν μια

κοινή περιοχή 300 αμινοξέων, που χαρακτηρίζεται ως Rel περιοχή ομολογίας και επάγει διμερισμό και πρόσδεση στο DNA. Το καλύτερα μελετημένο και συχνότερα απαντώμενο ετεροδιμερές, είναι το p50-p65. Ο NF-κB υπόκειται σε διάφορους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που περιλαμβάνουν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, φωσφορυλίωση, ουμπικιτινίωση, πρωτεολυτική αποικοδόμηση και πυρηνοκυτταροπλασματική μεταφορά. Καθώς εμπλέκεται σε ποικίλες κυτταρικές αποκρίσεις σε εξωκυττάρια ερεθίσματα, όπως ο πολλαπλασιασμός, η ανάπτυξη, η ανοσοαπόκριση, η κυτταρική επιβίωση και απόπτωση, θεωρείται ένας ομοιοστατικός διακόπτης. Το γεγονός αυτό τον καθιστά στόχο διαφόρων ιικών παθογόνων μορίων, που τον χρησιμοποιούν ώστε να διευκολύνουν τον διπλασιασμό τους, την επιβίωσή τους, και πιθανότατα, τη διαφυγή από την κυτταρική ανοσοαπόκριση (McKay et al., 1999, Sheppard et al., 1999, Vermeulen et al., 2002).

Η LMP1 για την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB χρησιμοποιεί ένα μονοπάτι σηματοδότησης, παρόμοιο με εκείνο που επάγεται από τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α , (Tumour Necrosis Factor α , TNF α) το οποίο παριστάνεται σχηματικά στην **Εικόνα 14**. Μετά την πρόσδεση του TNF α στον υποδοχέα TNF-R1 (σε επιθηλιακά κύτταρα), ο τελευταίος τριμερίζεται και προσελκύει την TRADD και μέσω αυτής τις RIP και TRAFs. Ο TNF-R2, που εκφράζεται κυρίως σε κύτταρα που προέρχονται από μυελό των οστών, επίσης τριμερίζεται και προσελκύει άμεσα τις TRAFs. Οι τελευταίες, ενεργοποιούν ένα μονοπάτι κινασών που αποτελείται από την κινάση που επάγει τον NF-κB (NF-κB Inducing Kinase, NIK, ομόλογη της κινάσης MEKK), και το σύμπλοκο κινασών της IκB που περιέχει τις IKK α και IKK β . Στα περισσότερα κύτταρα ο NF-κB βρίσκεται σε ανενεργό μορφή στο κυτταρόπλασμα, καθώς συνδέεται με μια ανασταλτική, για την ενεργοποίησή του, πρωτεΐνη, την IκB. Η φωσφορυλίωση της IκB στις σερίνες 32 και 36, από το ενεργοποιημένο σύμπλοκο των IKK α και IKK β έχει ως αποτέλεσμα την ουμπικιτινίωση και την αποικοδόμησή της στο 26S πρωτεόσωμα (Maniatis et al., 1997). Με τον τρόπο αυτό ο NF-κB απελευθερώνεται από το σύμπλοκο με την IκB α , και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου προσδέεται σε αλληλουχίες ρυθμιστικών περιοχών / υποκινητών πολλών γονιδίων.

Έχει αποδειχθεί ότι η LMP1 ενεργοποιεί τον NF-κB, μέσω του ίδιου μονοπατιού σηματοδότησης, καθώς αρνητικώς επικρατούσες μορφές των NIK, IKK α και IKK β κινασών μπλοκάρουν την ενεργοποίηση του NF-κB χωρίς να επηρεάζουν την έκφραση του LMP1 (Mosialos et al., 1997, Shepard et al., 1999).

Η υπερέκφραση των αγρίου τύπου κινασών ΙΚΚα ή ΙΚΚβ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της TNFα-επαγόμενης ενεργοποίησης του NF-κB. Δεδομένης της ομοιότητας του τρόπου δράσης της LMP1 με τις TNF-R1 και TNF-R2, η ανακάλυψη ότι η υπερέκφραση των αντίστοιχων κινασών αναστέλλει την LMP1 - επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, αποτέλεσε έκπληξη. Πιθανολογείται ότι η υπερέκφραση των κινασών αυτών αλλάζει την φυσιολογική στοιχειομετρία του μονοπατιού σηματοδότησης, απομονώνοντας ρυθμιστικούς παράγοντες, αναγκαίους για την ενεργοποίηση του NF-κB. Εναλλακτικά, είναι πιθανόν οι κινάσες ΙΚΚα και ΙΚΚβ να βρίσκονται ήδη σε πλεόνασμα, και η υπερέκφρασή τους να αυξάνει την αλληλεπίδρασή τους με άλλους στόχους ή ρυθμιστές τους, χωρίς να επιτρέπει την αποτελεσματική φωσφορύλιωση της IκBα (Sylla et al., 1998).

Δομική και λειτουργική ανάλυση του μορίου της πρωτεΐνης LMP1.

Η LMP1 είναι μια πρωτεΐνη 386 αμινοξέων, που αποτελείται από μια μικρή κυτταροπλασματική N-τερματική περιοχή, έξι διαμεμβρανικές περιοχές και μια μεγάλη κυτταροπλασματική περιοχή (C-terminal domain CTD), όπως περιγράφεται στην **Εικόνα 13** (Fennewald et al., 1984). Η κυτταροπλασματική N-τερματική περιοχή προσδένει την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή στο κυτταρόπλασμα, αλλά οι αλληλουχίες της δεν είναι σημαντικές για τον μετασχηματισμό από τον EBV (Izumi et al., 1994, Izumi et al., 1997). Οι έξι διαμεμβρανικές περιοχές προκαλούν την αυθόρμητη συνάθροιση μορίων LMP1 στην πλασματική μεμβράνη. Ανασυνδυασμένοι EBV που εκφράζουν μη συναθροιζόμενες μεταλλαγμένες μορφές της LMP1 που διαχέονται στην κυτταρική μεμβράνη δεν μετασχηματίζουν τα B λεμφοκύτταρα σε LCLs, ούτε επάγουν τον NF-κB (Sylla et al., 1998).

Η συνάθροιση μορίων LMP1 καθιστά δυνατή την αλληλεπίδραση δύο θέσεων της CTD περιοχής της με κυτταρικές πρωτεΐνες και, συνεπώς, τη μετάδοση σήματος. Γενετικές και βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι αυτές οι δύο θέσεις της CTD περιοχής είναι κρίσιμες για τον μετασχηματισμό των κυττάρων και την ενεργοποίηση του NF-κB (Izumi et al., 1997b).

Η πρώτη θέση εντοπίζεται στα αμινοξέα 187-231. Αυτά είναι τα πρώτα 45 αμινοξέα της CTD περιοχής και αποτελούν θέση πρόσδεσης παραγόντων που αλληλεπιδρούν, εκτός από την LMP1, και με τον υποδοχέα του TNFα τον TNFR, και

καλούνται TRAFs. Συγκεκριμένα, προσδένονται οι TRAF1, TRAF2, TRAF3 και TRAF5. Τα αμινοξέα αυτά ευθύνονται, κατά ένα ποσοστό 25% σε σχέση με την wt LMP1 (εφόσον υπάρχουν και το N-τερματικό άκρο και οι έξι διαμεμβρανικές περιοχές), για την LMP1- επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, και για το λόγο αυτό αναφέρονται ως η C-τερματική περιοχή ενεργοποίησης 1 (C-terminal activation region 1, CTAR1) (Mosialos et al., 1995). Έχει δειχθεί ότι έλλειμμα 27 κωδικονίων στην περιοχή CTAR1 καθιστά αδύνατο τον μετασχηματισμό των λεμφοκυττάρων από τον EBV (Izumi et al., 1997). Για τον λόγο αυτό η περιοχή CTAR1 ονομάζεται και θέση μετασχηματισμού 1 (Transforming effector site 1, TES 1) (Sylla et al., 1998).

Η δεύτερη θέση εντοπίζεται στα αμινοξέα 352-386 της περιοχής CTD, τα οποία αλληλεπιδρούν αφ' ενός με την TRADD και αφ' ετέρου με την RIP πρωτεΐνη (TNF Receptor-Interacting Protein) (Izumi et al., 1997b). Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν και με τον TNFR. Τα αμινοξέα αυτά ευθύνονται, κατά ένα ποσοστό 75% σε σχέση με την wt LMP1 (εφόσον υπάρχουν και το N-τερματικό άκρο και οι έξι διαμεμβρανικές περιοχές), για την LMP1- επαγόμενη ενεργοποίηση του NF-κB, και για το λόγο αυτό αναφέρονται ως η C-τερματική περιοχή ενεργοποίησης 2 (C-terminal activation region 2, CTAR2) (Mosialos et al., 1995). Έλλειμμα στην περιοχή CTAR2, έχει ως αποτέλεσμα, ο ανασυνδυασμένος EBV να μη μετασχηματίζει τα Β-λεμφοκύτταρα. Έτσι, η CTAR2 περιοχή καλείται και θέση μετασχηματισμού 2 (TES 2) (Izumi et al., 1997b).

Προφανώς, η περιοχή TES1 ταυτίζεται με την περιοχή CTAR1, ενώ η TES2 με την CTAR2. Συνοπτικά, η πρόσδεση των TRAFs στην TES1 επάγει ενεργοποίηση του NF-κB από την CTAR1, ενώ η πρόσδεση της TRADD και RIP στην TES2 επάγει ενεργοποίηση του NF-κB από την CTAR2 (MacFarland et al., 1999).

Στην περιοχή CTAR1, τα αμινοξέα 204-208 συνθέτουν το μοτίβο PXQXT/S, το οποίο συναντάται και στην περιοχή με την οποία αλληλεπιδρούν μελη της οικογένειας TNFR με τις TRAFs. Μεταλλάξεις της P204 ή της Q206 σε αλανίνη, αποτρέπουν την πρόσδεση των TRAFs και μειώνουν την ενεργοποίηση του NF-κB, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι TRAFs αποτελούν τους επαγωγείς σηματοδότησης για αυτή την ενεργοποίηση (MacFarland et al., 1999). Η ενεργοποίηση του NF-κB αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της έκφρασης των TRAF1, EB13, EGFR, CD40, LFA-3 και ICAM-1 (Kaye et al., 1999, Devergne et al., 1998). Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου της TRAF1 από τον NF-κB υποδηλώνει μηχανισμό

επανατροφοδότησης, με τον οποίο η LMP1 (μέσω του NF-κB) ενεργοποιεί την έκφραση πρωτεϊνών που επάγουν τη μετάδοση του σήματος από την ίδια.

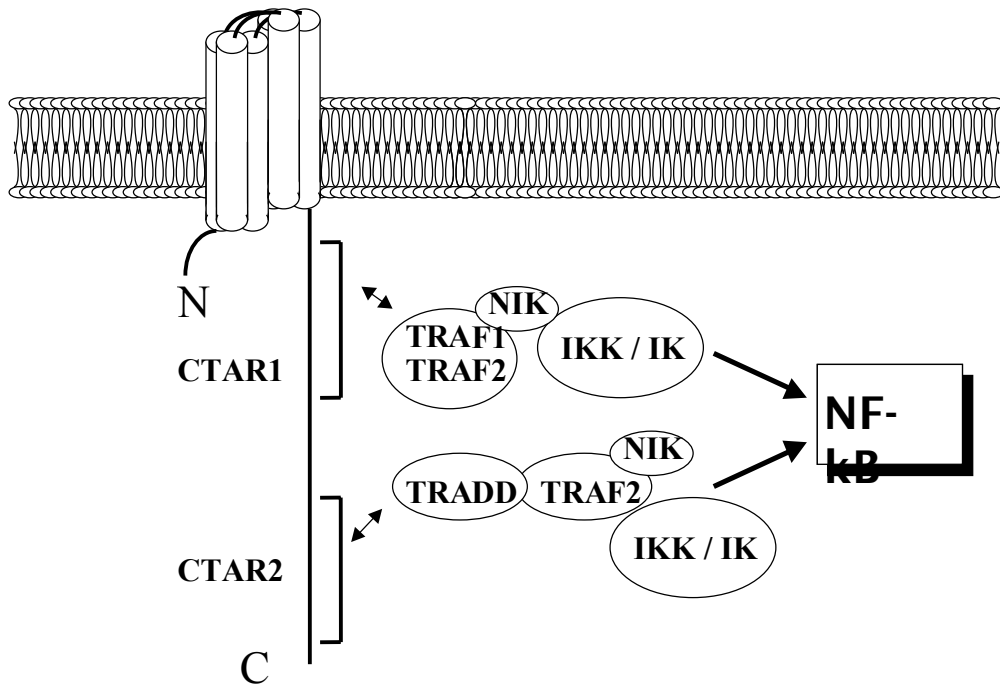
Στην περιοχή CTAR2 τα αμινοξέα 379-384 είναι κρίσιμα για την ενεργοποίηση του NF-κB, ενώ, σε κύτταρα 293 (Human Embryonic Kidney cells, HEK), τα αμινοξέα 376-386 επαρκούν για τη εν λόγω ενεργοποίηση, όπως αποκάλυψαν μελέτες με χρήση μεταλλάξεων. Μάλιστα, η περιοχή αυτή ευθύνεται σχεδόν εξ ολοκλήρου για την LMP1-επαγόμενη ενεργοποίηση της c-jun N-τερματικής κινάσης (JNK) σε 293HEK κύτταρα (Devergne et al., 1996). Η TRADD, μετά την πρόσδεσή της στην CTAR2, ενεργοποιεί τον NF-κB μέσω συνάθροισης μορίων TRAF2. Αυτό αποδεικνύεται από το γεγονός ότι μεταλλάξεις της TRADD στην περιοχή αλληλεπίδρασης με την TRAF2 ή χρήση αρνητικών επικρατούντων μορφών της TRAF2, αναστέλλουν μερικώς την μέσω LMP1 TES2/CTAR2 ενεργοποίηση του NF-κB (Izumi et al., 1997b). Η περιοχή της LMP1 TES2/CTAR2 που αλληλεπιδρά με την RIP είναι η ίδια με την περιοχή που αλληλεπιδρά με την TRADD, ωστόσο ο βαθμός της αλληλεπίδρασης είναι ασθενέστερος στην περίπτωση της RIP. Σε αντίθεση με τον TNF-R1, η LMP1 δεν απαιτεί την RIP για την ενεργοποίηση του NF-κB σε κύτταρα Jurkat (MacFarland et al., 1999, Ting et al., 1996). Επομένως η RIP δεν φαίνεται να αποτελεί κρίσιμο επαγωγέα της ενεργοποίησης του NF-κB (Izumi et al., 1999).

Έλλειμμα των αμινοξέων 185-211 της TES1/CTAR1, αποτρέπει την πρόσδεση των TRAFs και μειώνει την ενεργοποίηση του NF-κB, αλλά δεν επηρεάζει την ενεργοποίησή του από την TES2/CTAR2, μέσω της TRADD. Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι ανασυνδυασμένοι EBV, που εκφράζουν το N-τερματικό άκρο, τις έξι διαμεμβρανικές περιοχές και την περιοχή TES1/CTAR1, είναι ικανοί για αρχικό μετασχηματισμό των μολυσμένων κυττάρων, αλλά αλληλουχίες εκτός της TES1/CTAR1, και συγκεκριμένα οι αλληλουχίες της TES2/CTAR2 είναι εκείνες που εμπλέκονται σε αποτελεσματικό και μακροπρόθεσμο μετασχηματισμό για τη δημιουργία LCLs (Izumi et al., 1997b). Από τα προαναφερθέντα προκύπτει, επίσης, ότι μόνο η ενεργοποίηση του NF-κB δεν επαρκεί για τον κυτταρικό μετασχηματισμό, καθώς και οι δύο θέσεις ενεργοποίησης του LMP1 είναι κρίσιμες για το μετασχηματισμό των B-λεμφοκυττάρων. Συνεπώς, κάθε μία από τις TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 έχει ξεχωριστές, απαραίτητες και αλληλοσυμπληρούμενες ιδιότητες (MacFarland et al., 1999). Τα παρόμοια αποτελέσματα των αρνητικώς επικρατούντων μορφών των NIK, IKKα και IKKβ στην ενεργοποίηση του NF-κB που επάγεται είτε από την TES1/CTAR1, είτε από την

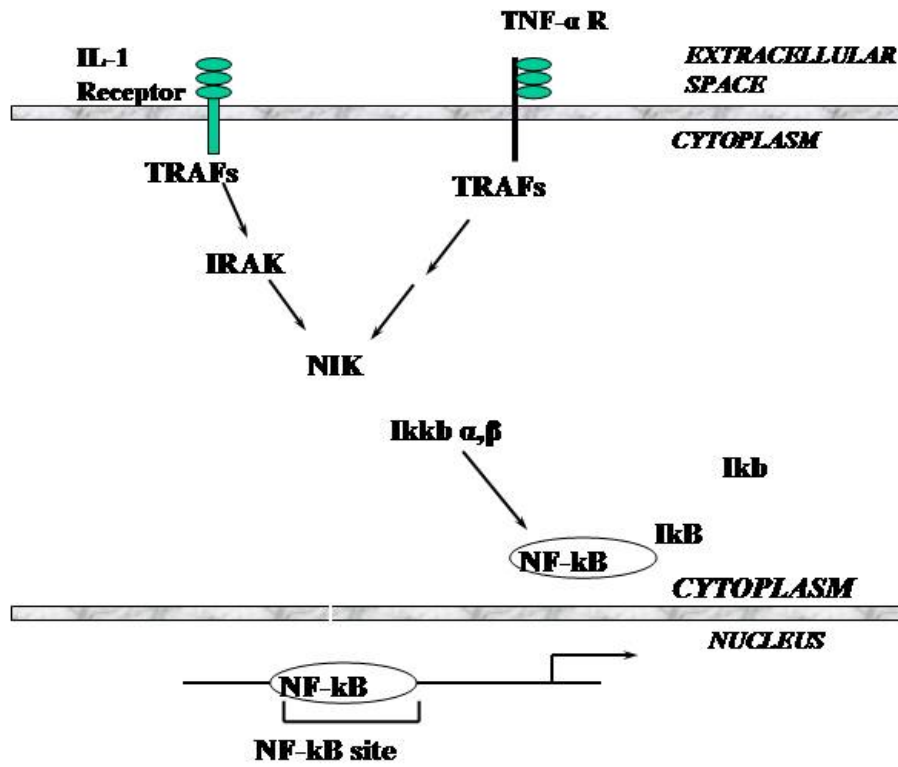
TES2/CTAR2, έρχονται να ενισχύσουν την υπόθεση ότι οι βασικές διαφορές των επιπτώσεων των TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την γονιδιακή ρύθμιση, οφείλονται σε διαφορές βιοχημικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν σε στάδιο προηγούμενο της ενεργοποίησης των NIK, IKKα και IKKβ (Mosialos et al., 1997, Sylla et al., 1998, Izumi et al., 1997b).

Η περιοχή TES2/CTAR2 είναι γνωστό ότι ενεργοποιεί τον AP1 μέσω των JNK και p38 (Eliopoulos et al., 1999), ενώ η περιοχή TES1/CTAR1 ενεργοποιεί τον AP1 μέσω της p38 (Kieser et al., 1999, Eliopoulos et al., 1999).

Η περιοχή ανάμεσα στις TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 αποτελεί το 60% της συνολικής CTD περιοχής και περιλαμβάνει τα αμινοξέα 232-351. Στην περιοχή αυτή περιλαμβάνονται 4 ατελείς επαναλήψεις μιας συντηρημένης αλληλουχίας (αμινοξέα 253-301), μια αλληλουχία PPQLT (αμινοξέα 320-324), μια θέση δράσης πρωτεάσης που παίζει ρόλο στον καταβολισμό της LMP1, και 19 θέσεις πιθανής φωσφορυλίωσης σε σερίνες και θρεονίνες. *In vitro* μελέτες αποκάλυψαν ότι πλασμίδια που έκφράζουν την μορφή LMP1 Δ232-351, επάγουν το ίδιο αποτελεσματικά την ενεργοποίηση του NF-κB και του JNK, όπως και η αγρίου τύπου LMP1. Επομένως, είτε η περιοχή αυτή δεν είναι σημαντική για τον πρωταρχικό μετασχηματισμό των Β-λεμφοκυττάρων, είτε υπάρχουν θέσεις με θετική και αρνητική δράση, η συνολική απομάκρυνση των οποίων δεν επιφέρει δραματικές αλλαγές. Η περιοχή αυτή ίσως παίζει ρόλο ρυθμιστή της δράσης των TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2, καθιστώντας τις προσιτές σε πρωτεΐνες. Ίσως, όμως, έχει άλλη δράση, ανεξάρτητη από εκείνη των TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 (Izumi et al., 1999b). Μια πρόσφατη μελέτη υποδεικνύει ότι η περιοχή ανάμεσα στις TES1/CTAR1 και TES2/CTAR2 περιέχει δύο πανομοιότυπες αλληλουχίες, πλούσιες σε προλίνη που συνθέτουν το μοτίβο PHDPLP (αμινοξέα 275-280 και 302-307 αμινοξέα αντίστοιχα). Αυτές οι δύο αλληλουχίες αποτελούν θέσεις πρόσδεσης της κινάσης Janus 3 (Janus Kinase 3, JAK3). Αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής είναι η αυτοφωσφορυλίωση της JAK3 και η ενεργοποίηση των STAT μεταγραφικών παραγόντων του JAK/STAT σηματοδοτικού μονοπατιού (Gires et al., 1999).



Εικόνα 13. Σχηματική αναπαράσταση της δομής και λειτουργίας της LMP1 πρωτεΐνης.



Εικόνα 14. Ενεργοποίηση του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα από τα σηματοδοτικά μονοπάτια της ιντερλευκίνης 1 (IL-1) και του παράγοντα νέκρωσης α (Tumour Necrosis Factor α, TNFα).

Η έκφραση της LMP1 αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση.

Η έκφραση της LMP1 σε LCLs επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής των κυττάρων αυτών, αυξάνοντας την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2, Mcl-1, A20 και TRAF1. Τα γονίδια των δύο τελευταίων αποτελούν στόχους του NF-κB. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του NF-κB από την LMP1 επάγει την έκφραση πρωτεϊνών που αναστέλλουν τον θάνατο των μολυσμένων με τον ιό EBV, λεμφοκυττάρων (MacFarland et al., 1999) (βλ. παρακάτω).

Διαφορές μεταξύ της LMP1 - και TNFR - επαγόμενης σηματοδότησης.

Η ανακάλυψη δύο νέων πρωτεϊνών έδωσε νέα στοιχεία συσχέτισης των μονοπατιών δράσης του LMP1 και του TNFR. Οι LAP1 και EB16 είναι ανθρώπινες πρωτεΐνες ομόλογες των TRAF2 και TRAF1, αντίστοιχα. Πρόκειται για πρωτεΐνες που προσδέονται στον p80 TNFR, αλλά που βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν και συνεντοπίζονται και με την LMP1 στην κυτταρική μεμβράνη. Τα παραπάνω συνδέουν τον LMP1-επαγόμενο μετασχηματισμό με τη μετάδοση σήματος από την οικογένεια των TNFR. Η διαφορά ανάμεσα σε TNFR και LMP1 είναι ότι ο δεύτερος επάγει σήματα αύξησης και ενεργοποίησης του NF-κB, συνεχώς, ακόμα και απουσία εξωκυττάρου ερεθίσματος.

Προτείνεται επίσης ένα μοντέλο, σύμφωνα με το οποίο, η συνάθροιση LMP1-TRAFs βοηθά στο σχηματισμό μεγαλύτερων και σταθερότερων συμπλόκων TNFR-TRAFs, μέσω αλληλεπιδράσεων των coiled-coils των TRAFs. Η CTD περιοχή του LMP1 και μέλη της οικογένειας TNFR μπορεί να αλληλεπιδρούν ακόμα και με διαφορετικές περιοχές του ίδιου LAP1 μορίου. Η αλληλεπίδραση των μονοπατιών σηματοδότησης του LMP1 και του TNFR, είναι σημαντική για τον EBV. Η NF-κB ενεργοποίηση από τους LMP1 και TNFR ενισχύει τη μεταγραφή, ενώ η πρόσδεση της LAP1 στην LMP1, είναι πιθανό να ανταγωνίζεται την πρόσδεσή της στον TNFR, μπλοκάροντας είτε τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από τον υποδοχέα αυτόν, είτε άλλες λειτουργίες σημαντικές για την άμυνα του κυττάρου ξενιστή (Mosialos et al., 1995).

Πειράματα που έγιναν σε HEK293 κύτταρα, έδειξαν ότι η μετάδοση σήματος από την περιοχή TES2/CTAR2, μέσω της TRADD, δεν είναι ικανή να επάγει

απόπτωση, σε αντίθεση με την αντίστοιχη σηματοδότηση από τον TNF-R1 η οποία μετά την προσέλευση της FADD οδηγεί στον κυτταρικό θάνατο. Επομένως, είτε η περιοχή TES2/CTAR2 δεν είναι ικανή να μεταδώσει προαποπτωτικό σήμα, είτε ενεργοποιεί ένα αντιαποπτωτικό μονοπάτι ανεξάρτητο του NF-κB (Izumi et al., 1999). Ανεξάρτητα όμως από το τί από τα δύο ισχύει, το αποτέλεσμα είναι η επιβίωση του μολυσμένου με EBV κυττάρου.

Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGFβ και της LMP1.

Η πλειοτροπική κυτοκίνη TGFβ είναι μέλος μιας μεγάλης οικογένειας παραγόντων που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, και της απόπτωσης. Από διάφορες μελέτες προκύπτουν στοιχεία που συσχετίζουν την πρωτεΐνη LMP1 με το μονοπάτι σηματοδότησης του TGFβ.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε κυτταρικές σειρές με λέμφωμα του Burkitt, οι οποίες περιλαμβάνουν EBV-αρνητικά κύτταρα, κύτταρα στα οποία εκφράζονται κάποια γονίδια λανθάνουσας μόλυνσης του EBV (ομάδα I), κύτταρα που εκφράζουν όλα τα γονίδια λανθάνουσας μόλυνσης του EBV (ομάδα III), καθώς και EBV-μετασχηματισμένες LCLs. Τα περισσότερα EBV-αρνητικά κύτταρα, καθώς και τα κύτταρα της ομάδας I, οδηγούνταν σε απόπτωση ή G1 arrest παρουσία του TGFβ1. Οι κυτταρικές σειρές της ομάδας III και τα LCLs ανέστειλλαν πλήρως αυτή τη δράση του TGF-β1. Όλες οι κυτταρικές σειρές εξέφραζαν τις πρωτεΐνες Smads και τον υποδοχέα TβRI, αλλά εκείνες που δεν ανταποκρίνονταν στην αποπτωτική δράση του TGFβ χαρακτηρίζονται από μειωμένη έκφραση του TβRII. Ωστόσο, στη μελέτη αυτή, η πρωτεΐνη LMP1 δεν αποδείχθηκε αναγκαία ή επαρκής για το μπλοκάρισμα της απόκρισης στον TGFβ, καθώς αυτό το μπλοκάρισμα παρατηρήθηκε και σε κύτταρα που δεν εξέφραζαν την LMP1. Ίσως άλλες πρωτεΐνες λανθάνουσας μόλυνσης του EBV, να προκαλούν τη μειωμένη έκφραση των TβRII (Inman et al., 2000).

Ωστόσο, η μείωση του αριθμού των TGF-β υποδοχέων, δεν φαίνεται να αποτελεί τον πιο κοινό μηχανισμό με τον οποίο τα EBV μολυσμένα κύτταρα ξεφεύγουν του ελέγχου του πολλαπλασιασμού που επιφέρει ο παράγοντας αυτός. Πειράματα σε EBV-θετικά B-λεμφοκύτταρα έδειξαν ότι ο ιός προκαλεί και διατηρεί τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους, εκφράζοντας την LMP1 που αποτρέπει την

TGFβ επαγόμενη αναστολή της κυτταρικής αύξησης (G1 arrest), χωρίς να επηρεάζει το μονοπάτι ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης. Επίσης, η LMP1 αναστέλλει την TGFβ επαγόμενη κυτταρική απόπτωση, επάγοντας την έκφραση της D2 κυκλίνης η οποία, σε συνδυασμό με την συνεχή έκφραση της cdk4, διατηρεί την pRb στην υπερφωσφορυλιωμένη (μη λειτουργική) της μορφή. Έτσι, το EBV μολυσμένο κύτταρο συνεχίζει να διαιρείται και επιβιώνει, ανεξάρτητα από την παρουσία και σηματοδότηση του TGFβ. Ο μηχανισμός με τον οποίο η LMP1 επάγει την έκφραση της D2 κυκλίνης δεν είναι γνωστός, αλλά ερευνάται ο ρόλος μεταγραφικών παραγόντων τύπου NF-κB (Arvanitakis et al., 1995). Μια πρόσφατη μελέτη επισημαίνει την ικανότητα της LMP1 να καταστέλλει την TGFβ-επαγόμενη έκφραση της p15 και για την καταστολή αυτή απαιτείται η C-τερματική περιοχή της LMP1 που ευθύνεται για την ενεργοποίηση του NF-κB (Mori et al., 2003).

Με τα προαναφερθέντα συμφωνούν και τα αποτελέσματα πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού BALB/c 3T3 μολυσμένων με τον EBV. Τα πειράματα αυτά έδειξαν ότι η μέτρια έκφραση της LMP1 οδηγεί, αφ' ενός σε μη ανταπόκριση στην TGFβ επαγόμενη αναστολή της κυτταρικής αύξησης και αφ' ετέρου στο σχηματισμό όγκων σε SCID ποντίκια. Αντιθέτως, μεταλλαγμένες μορφές της LMP1 ή έκφρασή της σε χαμηλότερα επίπεδα, επιτρέπουν την ανταπόκριση των κυττάρων στα αποπτωτικά σήματα του TGFβ (Takanashi et al., 1999).

Ανταγωνιστική δράση των μονοπατιών σηματοδότησης του TGFβ και του TNFα

Ο παράγοντας αύξησης συνδετικού ιστού (CTGF) είναι μια πρωτεΐνη που επάγεται από τον TGFβ αποκλειστικά και μόνο σε κύτταρα συνδετικού ιστού. Ο TNFα βρέθηκε ότι καταστέλλει την TGFβ επαγόμενη έκφραση της CTGF, σε καλλιέργειες φυσιολογικών ινοβλαστών. Πιθανολογείται ότι η ενεργοποίηση του NF-κB από τον TNFα, οδηγεί στην πρόσδεση του πρώτου στον υποκινητή του γονιδίου της CTGF ή στην επαγωγή γονιδίων που εμπλέκονται στην καταστολή της έκφρασης της CTGF. Αντιθέτως, σε ινοβλάστες σκληροδέρματος, ο TNFα δεν καταστέλλει την έκφραση της CTGF, με αποτέλεσμα τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την παραγωγή κολλαγόνου (Abraham et al., 2000). Επίσης, είναι γνωστό ότι ο TNFα

μέσω του NF-κB επάγει την έκφραση της ανασταλτικής Smad7 και στυπώς καταστέλλει την TGFβ σηματοδότηση (Bitzer et al., 1999).

Σύγκλιση και συνεργασία των TGFβ και NF-κB μονοπατιών

Στον υποκινητή του πρώτου εκφραζόμενου γονιδίου JunB κυττάρων Mv1Lu, βρέθηκε μια θέση πρόσδεσης για Smads (Smad binding element SBE) και μια θέση πρόσδεσης του NF-κB. Παραδόξως, μεταλλάξεις στην SBE δεν εμπόδισαν την σηματοδότηση του TGFβ για την ενεργοποίηση του γονιδίου JunB. Αντιθέτως μεταλλάξεις στην NF-κB θέση ανέστειλλαν πλήρως τη μεταγωγή σήματος, υποδηλώνοντας ότι αυτή είναι αναγκαία για την TGFβ επαγόμενη ενεργοποίηση του JunB. Η ενεργοποίηση αυτή απαιτεί την ακεραιότητα του NF-κB μονοπατιού. Ωστόσο, η TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω NF-κB θέσεων δεν προκαλεί αύξηση της έκφρασης των υπομονάδων του NF-κB, ούτε άμεση φωσφορυλίωση και αποικοδόμηση της IκB, ούτε άμεση αύξηση της μετατόπισης των NF-κB υπομονάδων στον πυρήνα. Πιθανόν, οι ήδη ενεργοποιημένες, πυρηνικές υπομονάδες του NF-κB είναι προσιτές στο σήμα που επάγει ο TGFβ για την αύξηση της μεταγραφικής του ενεργότητας. Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, το μονοπάτι σηματοδότησης του TGFβ συναντάται με το μονοπάτι του NF-κB στο επίπεδο του πυρήνα (Προκόβα, ΜΔΕ, 2000).

Μελέτες, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* υποδεικνύουν ότι διαφορετικά διμερή του NF-κB έχουν διαφορετικές ιδιότητες μεταγραφικής ενεργοποίησης. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του NF-κB και άλλων μεταγραφικών παραγόντων ευθύνονται για την επιλεκτική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης από τον NF-κB. Η συνέκφραση της υπομονάδας p52 ή p65 του NF-κB με τον μεταγραφικό παράγοντα Smad3, και μάλιστα παρουσία συνεχώς ενεργού TβRI, αυξάνει την ενεργοποίηση του γονιδίου JunB. Η φωσφορυλίωση της Smad3 φαίνεται να είναι σημαντική για την αλληλεπίδρασή της με την p52, είτε αυξάνοντας την συγγένεια πρόσδεσής τους, είτε επιτρέποντας την είσοδο της Smad3 στον πυρήνα όπου είναι εφικτή η αλληλεπίδραση. Η MH2 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά με την C-τερματική περιοχή των p300/CBP. Η N-τερματική περιοχή των p300/CBP προσδένεται στην ενεργό περιοχή της p65. Συνεπώς, οι p300/CBP θα μπορούσαν να

δρούν ως συνδετικά μόρια που φέρνουν σε επαφή τους δύο μεταγραφικούς παράγοντες (Προκόβα, ΜΔΕ, 2000).

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις Smads και τις υπομονάδες του NF-κB μπορεί να είναι σημαντική για τον έλεγχο διαφόρων υποκινητών. Το αποτέλεσμα, ωστόσο της αλληλεπίδρασης αυτής στην μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή συγκεκριμένων γονιδίων στόχων, εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Τα στοιχεία αυτά ενισχύουν την άποψη για αλληλεπίδραση των Smad με μεταγραφικούς παράγοντες, καθώς και για το ρόλο που διαδραματίζουν οι Smad ως μεταγραφικοί συνενεργοποιητές (Lopez-Rovira et al., 2000).

Εξάλλου, πειράματα που έγιναν σε Mv1Lu κύτταρα, έδειξαν ότι μετά την ενεργοποίηση της JNK από τον TGF-β, η πρώτη φωσφορυλιώνει την Smad3 σε περιοχή εκτός του μοτίβου -SSXS. Η φωσφορυλίωση αυτή διευκολύνει την ενεργοποίηση (φωσφορυλίωση) της Smad3 από το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGFβ και συνεπώς και τη μεταφορά της στον πυρήνα. Η παρουσία των ενεργοποιημένων, από TGFβ, Smad3 και JNK έχει ως αποτέλεσμα την συνεργασιακή ενεργοποίηση του PAI-1 υποκινητή (Engel et al., 1999).

ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ TGFβ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΜΕ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΟΡΜΟΝΩΝ

Έχει καταγραφεί θετική και αρνητική επικοινωνία των Smad πρωτεϊνών με μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων (Nuclear Receptors, NRs). Οι NRs αποτελούν μια υπεροικογένεια πυρηνικών πρωτεϊνών που ανταποκρίνονται σε πλήθος ορμονικών και μεταβολικών σημάτων και εμπλέκονται σε διαδικασίες εμβρυογένεσης, ομοιόστασης, αναπαραγωγής, κυτταρικής αύξησης ή απόπτωσης (Moras et al., 1998, Glass et al., 2000). Ανωμαλίες στην έκφραση των NRs αποτελούν την αιτία για διάφορες ασθένειες που ποικίλουν από διαβήτη και παχυσαρκία μέχρι καρκίνο του μαστού και του προστάτη (McKenna N. Et al., 2002).

Δομή και λειτουργίες των NRs

Οι NRs έχουν κατηγοριοποιηθεί σε τρεις διαφορετικούς τύπους. Οι NRs τύπου I, που περιλαμβάνουν τους κλασσικούς υποδοχείς στεροειδών, υφίστανται πυρηνική μετακίνηση μετά την πρόσδεση του συνδέτη και προσδένονται ως ομοδιμερή σε ανεστραμμένες επαναλήψεις του DNA. Οι υποδοχείς τύπου II, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται οι υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών (TR) και του ρετινοϊκού οξέος (RAR), οι οποίοι συχνά παραμένουν στον πυρήνα ανεξάρτητα από την παρουσία συνδέτη και προσδένονται ως ετεροδιμερή με τον RXR σε άμεσες επαναλήψεις του DNA. Οι υποδοχείς τύπου III ανακαλύφθηκαν τελευταίοι, από μη χαρακτηρισμένα cDNAs που κωδικοποιούν πρωτεΐνες με περιοχές όμοιες με αυτές των χαρακτηρισμένων NRs. Καθώς αρχικά δεν είχαν αναγνωρισθεί συγκεκριμένοι συνδέτες, αυτοί οι NRs ονομάστηκαν ορφανοί NRs (ONRs). Χαρακτηριστικό μέλος των ONRs αποτελεί ο ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4 (Hepatic Nuclear Gactor 4, HNF4) (McKenna et al., 2002). Σχηματική αναπαράσταση της δομής του HNF4 δείχνεται στην **Εικόνα 15**.

Δομικά οι NRs χαρακτηρίζονται από πέντε περιοχές. Η N-τερματική A/B περιοχή λειτουργεί ως περιοχή αυτόνομης μεταγραφικής ενεργοποίησης (Activation Function 1, AF-1). Η σύζευξη αυτής της περιοχής σε ετερόλογη αλληλουχία που προσδένεται στο DNA επάγει συνεχή μεταγραφική ενεργοποίηση. Η A/B περιοχή υφίσταται φωσφορυλίωση (Shao et al., 1999) και προσδένει παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής, όπως ο TF-IIIB, καθώς και τον συνενεργοποιητή CBP (Dell et al., 1999, Kistanova et al., 2001). Η περιοχή C είναι συντηρημένη ανάμεσα στους NRs και είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και πρόσδεση των NRs σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA (DNA Binding Domain, DBD). Η περιοχή C του HNF4 ακετυλιώνεται από τον συνενεργοποιητή CBP (Soutoglou et al., 2000). Η περιοχή D είναι λιγότερο συντηρημένη και αποτελεί την γέφυρα που ενώνει τις συντηρημένες περιοχές C και E. Το μήκος της D περιοχής ποικίλει, και ειδικά για τον HNF4 το μήκος της είναι μεγάλο, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 15**, επιτρέποντας ευελιξία στην διαμόρφωση του μορίου και στις επαφές των περιοχών C και E. Στην περιοχή E εντοπίζεται η αλληλουχία πρόσδεσης του συνδέτη (Ligand Binding Domain, LBD), η επιφάνεια διμερισμού των NRs, αλλά και η δεύτερη περιοχή μεταγραφικής ενεργοποίησης AF-2 η δραστηριότητα της οποίας εξαρτάται από τον συνδέτη (Tsai et al., 1994, Moras et al., 1998, Shao et al., 1999, Glass et al., 2000). Σε

κάποιους NRs, μεταξύ των οποίων και ο HNF4, υπάρχει και η C-τερματική περιοχή F (Εικόνα 15), η οποία έχει δειχθεί ότι παραμποδίζει την πρόσδεση των συνενεργοποιητών GRIP-1 και SRC-1 (Sladek et al., 1999).

Συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς των NRs

Οι ευρέως εκφραζόμενοι CBP και p300 συνενεργοποιητές παρουσιάζουν δραστικότητα ακετυλοτρανσφεράσης και για τους NRs. Άλλοι συνενεργοποιητές που επάγουν τη μεταγραφική δραστικότητα των NRs αποτελούν μέλη του συμπλόκου TRAP/DRIP, η λιγάση ουμπικιουτίνης E6AP, το ATP-συζευγμένο SWI/SNF σύμπλοκο αναδιοργάνωσης της χρωματίνης, οι CARM-1 και PRMT-1 μεθυλάσες, και μέλη της βασικής μεταγραφικής μηχανής όπως η TBP και οι TAFs (McKenna et al., 2002). Ο PGC-1 αποτελεί μεταγωγέα ηπατικής γλυκονεογένεσης, καθώς αποτελεί συνενεργοποιητή του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Yoon et al., 2001). Επίσης, σε συνδυασμό με την CREB πρωτεΐνη, ο PGC-1 δρα ως συνενεργοποιητής του HNF4 κατά την μεταγραφική ενεργοποίηση του L-CPT1 (Liver-Carnitine Palmitoyltransferase 1) υποκινητή, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση των λιπιδίων και την μείωση της χοληστερόλης (Lowet et al., 2002).

Η οικογένεια των SRC/p160 συνενεργοποιητών αποτελείται, μεταξύ άλλων από τις SRC-1/NCoA-1, GRIP-1/TIF2/SRC-2 και p/CIP/RAC3/ACTR/AIB-1/TRAM-1/SRC-3 πρωτεΐνες. Αυτά τα τρία μέλη της SRC/p160 οικογένειας χαρακτηρίζονται ως συνενεργοποιητές των NRs λόγω της ικανότητάς τους να αλληλεπιδρούν και να πολλαπλασιάζουν τις λειτουργίες των NRs, και λόγω του πυρηνικού τους εντοπισμού (Onate et al., 1995). Επίσης, χαρακτηρίζονται από ενεργότητα ακετυλτρανσφεράσης και από την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τους CBP/p300 και p/CAF συνενεργοποιητές (Chen et al., 1997).

Ένα κοινό δομικό χαρακτηριστικό των συνενεργοποιητών των NRs είναι το α-ελικοειδές LXXLL μοτίβο, ή αλλιώς NR box, σε ένα ή πολλά αντίγραφα, το οποίο αλληλεπιδρά με την AF-2 περιοχή του LBD των NRs (Heery et al., 1997). Αντίστοιχο μοτίβο, που καλείται CoRNR box, χαρακτηρίζει τους συνκαταστολείς των NRs N-CoR (Horlein et al., 1995) και SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors) (McKenna et al., 2002). Ο N-CoR, αν και ο ίδιος στερείται περιοχών με δραστικότητα απακετυλάσης, απακετυλιώνει τις ιστόνες και καταστέλλει την

μεταγραφική δραστικότητα των NRs, μέσω προσέλκυσης παραγόντων όπως η Sin3 και οι HDACs (Heinzel et al., 1997, Nagy et al., 1997). Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου ανάλογα με τον υποκινητή, οι συνκαταστολείς λειτουργούν ως συνενεργοποιητές (Jepsen et al., 2000) και το αντίστροφο (Rogatsky et al., 2001). Επίσης, η δυνατότητα προσέλκυσης διαφορετικών συνενεργοποιητών και/ή απομάκρυνσης διαφορετικών συνκαταστολέων, ανάλογα με τον συνδέτη που προσδένεται στους NRs, προσδίδει ακόμα μεγαλύτερη ευελιξία στην μεταγραφική ενεργοποίηση NR-επαγόμενων υποκινητών (Katzenellenbogen et al., 2000). Τέλος, στοχευμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των συν-ρυθμιστών (συν-ενεργοποιητών και συν-καταστολέων), όπως ακετυλίωση, ουμπικιτινίωση, φωσφορυλίωση ή μεθυλίωση, μπορεί να χρησιμοποιούνται για την ευαισθητοποίηση συγκεκριμένων υποκινητών ή/και κυτταρικών τύπων σε συγκεκριμένες μεταγραφικές αποκρίσεις (McKenna et al., 2002).

Ο ηπατικός πυρηνικός παράγοντας 4 (Hepatic Nuclear Factor 4, HNF4).

Η διαφοροποίηση των ηπατικών κυττάρων και η λειτουργία του ήπατος απαιτεί την συγχρονισμένη έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων, η οποία ελέγχεται από μεταγραφικούς παράγοντες του ήπατος όπως οι HNF1, HNF3, HNF6, η CEBP οικογένεια (CCAAT/Enhancer Binding Protein) και ο HNF4. Η επιλεκτική μεταλλαξιγένεση κάποιων από τους παραπάνω παράγοντες αποκάλυψε ότι η δράση των παραγόντων αυτών είναι αλληλοεπικαλυπτόμενη, με εξαίρεση εκείνης του HNF4. Η γονιδιακή καταστολή του HNF4 ανέστειλε την έκφραση διαφόρων γονιδίων σημαντικών για την λειτουργία του ήπατος, υποδεικνύοντας ότι ο παράγοντας αυτός είναι απαραίτητος σε διεργασίες ενεργιακού μεταβολισμού, αποτοξίνωσης του οργανισμού, σύνθεσης χολικών οξέων και παραγωγής πρωτεϊνών του ορρού (Watt et al., 2003).

Ο HNF4 προσδένεται στο DNA ως ομοδιμερές και ενώ αρχικά κατηγοριοποιήθηκε ως ορφανός πυρηνικός υποδοχέας (Sladek et al., 1990), στη συνέχεια βρέθηκε ότι η ενεργότητά του ρυθμίζεται από την πρόσδεση λιπαρών θειοεστέρων του ακετυλο-συνενζύμου A (acety-Co-A) (Hertz et al., 1998). Ο HNF4, όπως και άλλοι NRs φωσφορυλιώνεται σε Ser/Thr (Jiang et al., 1997), και η φωσφορυλίωση από συγκεκριμένες κινάσες όπως η PKA επηρεάζει την ικανότητα

πρόσδεσής του στο DNA (Viollet et al., 1997). Επίσης, ακτυλιώνεται από τον συνενεργοποιητή CBP και αυτή η τροποποίηση επάγει την πρόσδεση του HNF4 στο DNA, τον πυρηνικό εντοπισμό του, καθώς και την προσέλκυση άλλων συνενεργοποιητών (Soutoglou et al., 2000).

Γενικά ο HNF4 λειτουργεί ως θετικός μεταγραφικός ρυθμιστής γονιδίων των ηπατικών κυττάρων. Κατά την εμβρυογένεση ο HNF4 εκφράζεται στην ηπατική και εντερική έκφυση (Duncan et al., 1994), κατά την εμβρυική ανάπτυξη εκφράζεται επιπλέον στο πάγκρεας και τους νεφρούς (Taraviras et al., 1994) και στον ενήλικα οργανισμό, στο ήπαρ, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στο πάγκρεας και τους νεφρούς (Sladek et al., 1990). Η σημαντική λειτουργία του HNF4 κατά την εμβρυική ανάπτυξη και την γονιδιακή έκφραση σε ηπατοκύτταρα υποδεικνύεται από μελέτες όπου απενεργοποιήθηκε ο HNF4 με ομόλογο ανασυνδυασμό είτε σε έμβρυα ποντικού (Li et al., 2000) είτε σε ήπαρ ενήλικα ποντικού (Hayhurst et al., 2001).

Ο HNF4 προσδένεται σε ορμονικά αποκρινώμενα στοιχεία (Hormone Response Elements, HREs) τα οποία υπάρχουν στους υποκινητές πολλών γονιδίων που εκφράζονται κυρίως ή αποκλειστικά στο ήπαρ. Τέτοιος είναι ο υποκινητής του γονιδίου της $\alpha 1$ -αντιτρυψίνης, της τρανσθυρετίνης, του HNF1, των απολιποπρωτεϊνών και άλλων γονιδίων (Sladek et al., 1993).

HREs υπάρχουν στον υποκινητή του γονιδίου της apoA-I, της apoC-III και της apoA-IV, υποδεικνύοντας έναν κοινό ρυθμιστικό μηχανισμό της έκφρασης των απολιποπρωτεϊνών. Σε αυτά τα HREs προσδένονται ορφανοί υποδοχείς, όπως ο HNF4 και υποδοχείς που εξαρτώνται από συνδέτες, με διαφορετική εξειδίκευση (Tzamelis et al., 1996, Papazafiri et al., 1991, Lavrediadou et al., 1998, Ktistaki et al., 1994). Η απομακρυσμένη περιοχή του apoC-III υποκινητή δρά ως κοινός ενισχυτής (enhancer) της μεταγραφής των γονιδίων των apoA-I, apoC-III και apoA-IV απολιποπρωτεϊνών. Στον ενισχυτή υπάρχουν 2 HREs όπου προσδένεται ο HNF4 και 3 θέσεις πρόσδεσης του Sp1. Μεταλλάξεις των HREs ή/και μεταλλάξεις των θέσεων πρόσδεσης του Sp1 αναστέλλουν την μεταγραφική δραστηριότητα των προαναφερθέντων υποκινητών σε κυτταρικές σειρές. Η ηπατική μεταγραφή του apoC-III γονιδίου ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση του συμπλόκου που σχηματίζεται στην κοντινή περιοχή του υποκινητή από την πρόσδεση του HNF4 και πιθανώς και άλλων NRs και του συμπλόκου που σχηματίζεται στην απομακρυσμένη περιοχή του ενισχυτή από την πρόσδεση του HNF4 και του Sp1 (Lavrediadou et al., 1998, Ktistaki et al., 1994, Talianidis et al., 1995, Kardassis et al., 1997).

Αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης υποδεικνύουν ότι ο HNF4 μέσω των HREs και οι θέσεις πρόσδεσης του Sp1 ελέγχουν την εντερική έκφραση της apoC-III και της apoA-I και συνεισφέρουν στην ηπατική έκφραση των δύο γονιδίων *in vivo* (Kan et al., 2000, Georgopoulos et al., 2000, Zannis et al., 2001). Η συνεργασιακή μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή επιτυγχάνεται με την άμεση αλληλεπίδραση της N-τερματικής περιοχής του HNF4 και της N- και C-τερματικής περιοχής του Sp1 (Kardassis et al., 2002).

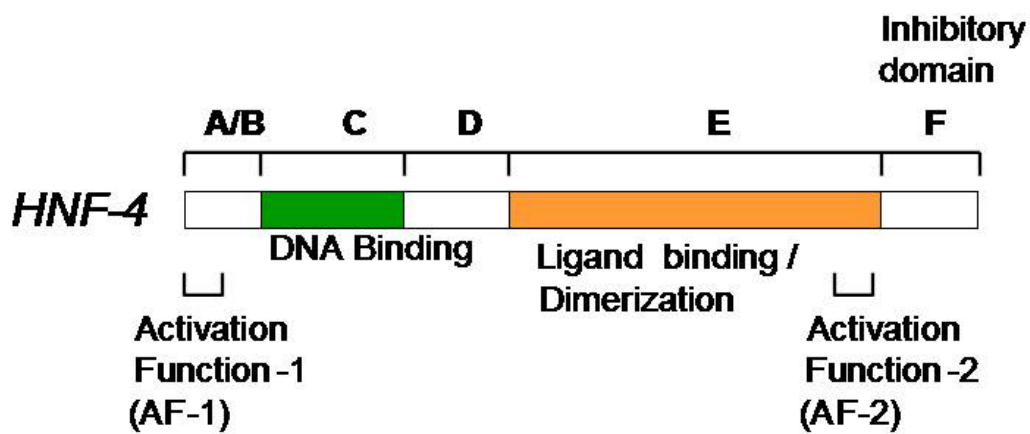
Τέλος, οι μεταγωγείς της TGFβ σηματοδότησης, Smad3 και Smad4 επάγουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του apoC-III, apoA-IV, apoB και HNF1 υποκινητή, μέσω συνεργασιακής αλληλεπίδρασης με τον HNF4, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 16**. Αντίθετα παρατηρείται κατασταλτική δράση των Smad πρωτεϊνών στην μεταγραφική ενεργοποίηση των apoA-I apoA-II υποκινητών που επάγεται από τον HNF4, όπως δείχνει η **Εικόνα 16**. Η MH1 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά άμεσα με τον HNF4 (Kardassis et al., 2000). Οι ακριβείς περιοχές των πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτήν την αλληλεπίδραση καθώς και ο μηχανισμός συνεργασιακής ενεργοποίησης του apoC-III υποκινητή από τις Smads και τον HNF4, αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης αυτής της διατριβής.

Αλληλεπίδραση των NRs με τις Smads

Έχει καταγραφεί η αλληλεπίδραση πέντε NRs με τους επαγωγείς της TGFβ σηματοδότησης: του υποδοχέα της Βιταμίνης D (Vitamin D Receptor) VitDR, του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (Glycocorticoid Receptor) GR, του υποδοχέα των ανδρογόνων (Androgen Receptor) AR, του υποδοχέα των οιστρογόνων (Estrogen Receptor) EG και του ηπατικού πυρηνικού παράγοντα 4 (Hepatic Nuclear Factor 4) HNF4. Η MH1 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά άμεσα με την περιοχή LBD του VitDR, ενώ στο σύμπλοκο συμμετέχει και ο συνενεργοποιητής Src-1 (Yanagi et al., 1999, Yanagisawa et al., 1999). Η MH2 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά με την LBD περιοχή του GR και αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η καταστολή της TGFβ επαγόμενης ενεργοποίησης του PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor- 1) υποκινητή (Song et al., 1999). Επίσης, η MH2 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά με την περιοχή μεταγραφικής ενεργότητας του AR υποδοχέα, γεγονός που οδηγεί στην καταστολή της AR λειτουργίας σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (Hayes et al., 2001,

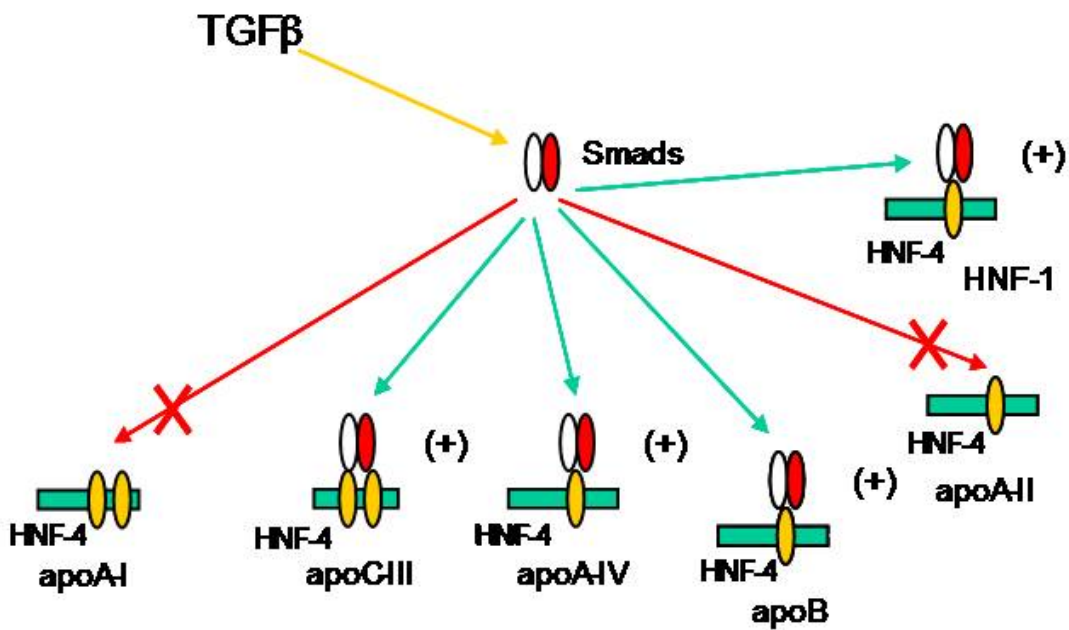
Chiruk et al., 2002). Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά (Human Embryonic Kidney, HEK) κύτταρα υποδεικνύουν την διττή δράση της αλληλεπίδρασης της Smad3 με τον ER υποδοχέα. Παρουσία οιστρογόνων, η αλληλεπίδραση της MH2 περιοχής της Smad3 με μια μη χαρακτηρισμένη, ακόμα, περιοχή του ER υποδοχέα, καταστέλλει τη μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση οδηγεί σε TGFβ-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή των οιστρογόνων, στα HEK κύτταρα (Matsuda et al., 2001). Η αλληλεπίδραση της Smad3 με τον HNF4 αναφέρεται, και διερευνάται λεπτομερώς, στην συνέχεια.

Δομή και λειτουργία του HNF-4



Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση της δομής και των λειτουργιών του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα HNF4. Με πράσινο χρώμα συμβολίζεται η περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding), ενώ με πορτοκαλί η περιοχή πρόσδεσης του συνδέτη που ευθύνεται και για τον διμερισμό του μορίου (Ligand binding/Dimerization). Inhibitory domain: κατασταλτική, για την μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης, περιοχή

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ, μέσω των Smads, επηρεάζει ένα συγκεκριμένο δίκτυο HNF-4 αποκρινόμενων γονιδίων στο ήπαρ



Εικόνα 16. Λειτουργικές αλληλεπιδράσεις των Smad πρωτεϊνών με τον ηπατικό πυρηνικό παράγοντα HNF4. Τα ετερομερή των Smad πρωτεϊνών ενεργοποιούνται από τον TGFβ και ενισχύουν την μεταγραφική ενεργοποίηση (πράσινα βέλη) των apoC-III, apoA-IV, apoB και HNF1 υποκινητών που επάγεται από τον HNF4 (κίτρινες ελλείψεις), ενώ καταστέλλουν την HNF4-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των apoA-I και apoA-II υποκινητών (κόκκινα βέλη).

ΚΥΤΤΑΡΟΣΤΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ TGFβ ΣΤΗΝ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ.

Έλεγχος της κυτταρικής αύξησης από τον TGFβ

Οι κυτταροστατικές και αποπτωτικές λειτουργίες του TGFβ βοηθούν την καταστολή της αύξησης των ιστών των θηλαστικών. Απώλεια αυτών των λειτουργιών οδηγεί σε υπερπολλαπλασιαστικές ανωμαλίες και είναι κοινό φαινόμενο σε περιπτώσεις καρκίνου. Ωστόσο, καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν υφίστανται την TGFβ επαγόμενη καταστολή της κυτταρικής αύξησης, υπερπαράγουν αυτήν την κυτοκίνη δημιουργώντας ένα τοπικό ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον που προάγει την καρκινογένεση και την μεταστατική συμπεριφορά των ίδιων των καρκινικών κυττάρων. Εξάλλου και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η καταστολή της κυτταρικής αύξησης αποτελεί μια μόνο από τις πολλές λειτουργίες του TGFβ. Η TGFβ σηματοδότηση αποτελεί σημαντικό επαγωγέα μορφογένεσης και αγγειογένεσης κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Γενετικές αναλύσεις της TGFβ σηματοδότησης δεν υποδεικνύουν κατασταλτικό ρόλο του TGFβ στην ανάπτυξη κατά την εμβρυογένεση. Αργότερα, κατά την ωρίμανση των ιστών, πολλοί τύποι κυττάρων αποκτούν την ικανότητα να ανταποκρίνονται στην TGFβ επαγόμενη καταστολή της αύξησης ή στον TGFβ επαγόμενο κυτταρικό θάνατο. Έτσι, η φύση και η φάση ενός κυττάρου φαίνεται να καθορίζει την απόκριση στον TGFβ, περισσότερο από τον ίδιο τον παράγοντα (Siegel and Massague, 2003).

Υπάρχει πληθώρα παραδειγμάτων TGFβ επαγόμενου ελέγχου της κυτταρικής αύξησης σε επιθηλιακά συστήματα. Ο έλεγχος αυτός ασκείται στα επιθηλιακά κύτταρα του θηλαστικού αδένου, του δέρματος, του ορθού, του παγκρέατος, του ήπατος και του προστάτη (Siegel and Massague, 2003). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το σύστημα του δέρματος, καθώς διαγονιδιακές μελέτες αποκαλύπτουν αντικρουόμενα αποτελέσματα της δράσης του TGFβ στον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των κερατινοκυττάρων, γεγονός που ενδεχομένως αντανακλά τον βαθμό της κυτταρικής διαφοροποίησης, τα επίπεδα έκφρασης του TGFβ και την διάρκεια της σηματοδότησης. Έτσι, η έκφραση του TGFβ στα διαφοροποιημένα υπερβασικά στρώματα οδηγεί σε αύξηση του μιτωτικού ρυθμού (Cui et al., 1995), ενώ έκφραση της κυτταροκίνης στο πολλαπλασιαζόμενο βασικό στρώμα οδηγεί σε καταστολή της

αύξησης (Wang et al., 1999, Liu et al., 2001). Επίσης, ο TGFβ επιδρά αρνητικά στην επούλωση πληγών περιορίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων στην περιοχή του τραύματος, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει θετικά την διαδικασία επούλωσης ενισχύοντας την μετανάστευση των κερατινοκυττάρων και την εναπόθεση εξωκυττάρου υλικού (extracellular matrix, ECM) (Wang et al., 2001).

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

Η παρατήρηση ότι τα $Tgf\beta 1^{-/-}$ νεογνά ποντίκια πεθαίνουν λίγο μετά την γέννησή τους από οξεία φλεγμονώδη αντίδραση που επηρεάζει πολλά συστήματα οργάνων, υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο του TGFβ στην ομοίωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Shull et al., 1992). Διαγονιδιακές μελέτες παρέχουν ισχυρά στοιχεία για την TGFβ επαγόμενη καταστολή της αύξησης των T λεμφοκυττάρων. Η καταστολή αυτή επιτυγχάνεται μέσω αναστολής της παραγωγής της ιντερλευκίνης-2 και συνεπώς της ενεργοποίησης των T-κυττάρων (Brabletz et al., 1993), μέσω επαγωγής της απόπτωσης των περιφερειακών T-κυττάρων (Sillett et al., 2001) και μέσω καταστολής των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων (CTL) και της διαφοροποίησης των T-κυττάρων βοηθών (Corelik et al., 2002). Η TGFβ επαγόμενη ανοσοκαταστολή σχετίζεται με την καρκινογένεση, καθώς ο TGFβ που προέρχεται από όγκους καταστέλλει την αναγνώριση του καρκίνου και την εξουδετέρωσή του από τα CTLs.

Το κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ

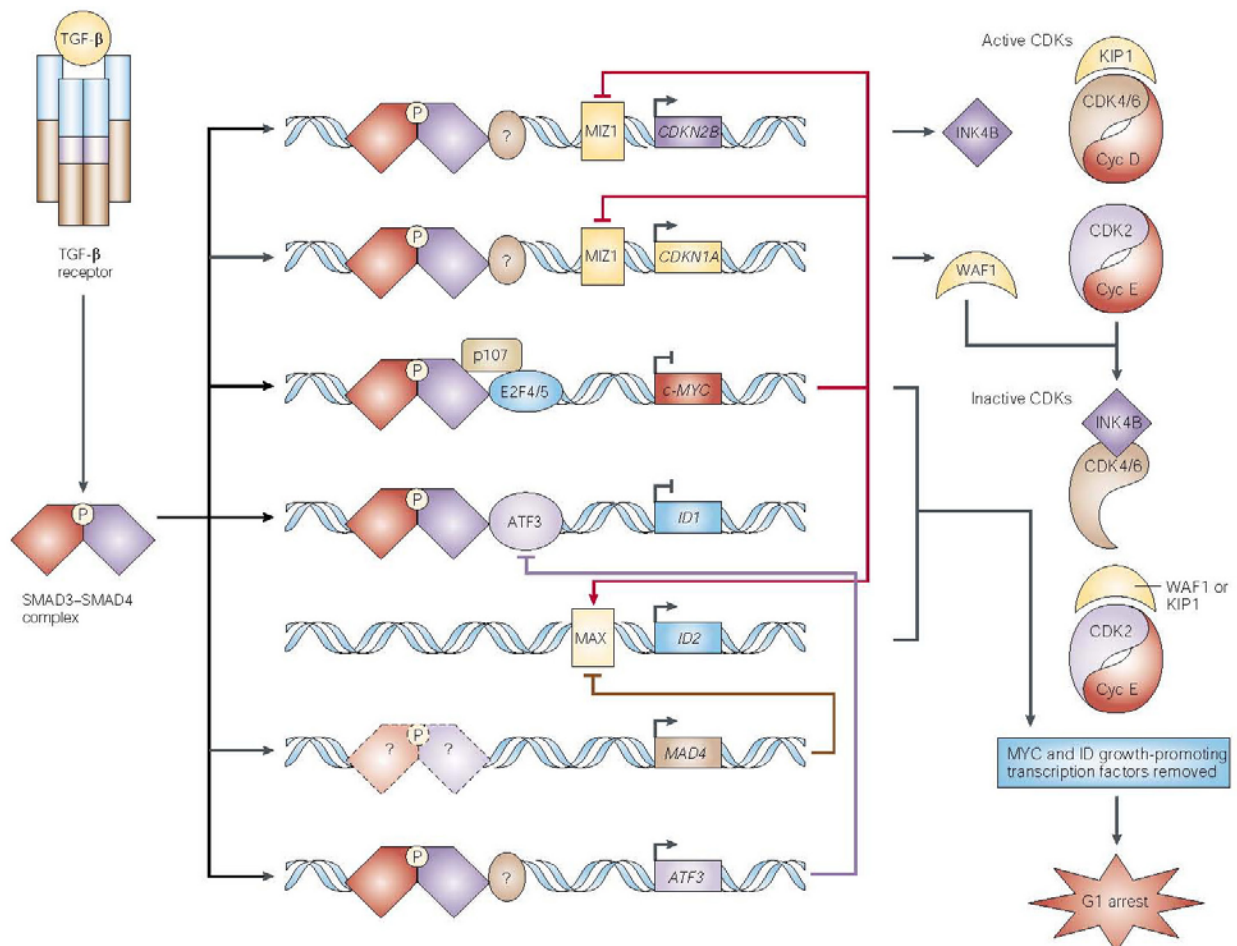
Ο TGFβ επάγει την μεταγραφή κυτταροστατικών γονιδίων σε οποιαδήποτε από τις φάσεις G1, S ή G2 του κυτταρικού κύκλου, αλλά οι αποκρίσεις στον παράγοντα αυτό στοχεύουν κυρίως τα γεγονότα της φάσης G1 ((Laiho et al., 1990). Προσθήκη του TGFβ σε κύτταρα τα οποία έχουν ήδη δεσμευτεί να εισέλθουν στην φάση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

Οι CDK2, CDK4 και CDK6 προάγουν τον κυτταρικό κύκλο μέσω της φάσης G1 και η απορύθμισή τους παρατηρείται συχνά σε περιπτώσεις καρκίνου. Στην G1 φάση για την ενεργοποίηση των CDK4/6 απαιτείται πρόσδεση των κυκλινών τύπου D, ενώ για την ενεργοποίηση της CDK2 απαιτείται η πρόσδεση της κυκλίνης E. Τα μέλη της οικογένειας CIP/KIP αποτελούν αναστολείς που προσδένονται και απενεργοποιούν τα σύμπλοκα κυκλινών – CDKs. Τα μέλη p21, p27 και p57 προσδένονται στην υπομονάδα της κυκλίνης και εισάγουν μια εκτεταμένη περιοχή στην καταλυτική θέση της με αποτέλεσμα την καταστολή της ενεργότητας κινάσης. Τα μέλη της οικογένειας p15 καταστέλλουν ειδικά τις CDK4 και CDK6 μέσω άμεσης πρόσδεσης σε αυτές και αναστολής της πρόσδεσης κυκλινών (Siegel and Massague, 2003).

Ο TGFβ επάγει την έκφραση των p15 (Reynisdottir et al., 1995, Hannon et al., 1994) και p21 (Reynisdottir et al., 1995, Datto et al., 1995) σε επιθηλιακά κύτταρα. Οι ενεργοποιημένες Smad2/3, σε συνεργασία με άγνωστους συν-παράγοντες, προσδένονται στην απομακρυσμένη περιοχή των υποκινητών p15 και p21 επάγοντας την μεταγραφική δραστηριότητά τους (Seoane et al., 2001, Seoane et al., 2002). Οι Smad3/4 συνεργάζονται με τους μεταγραφικούς παράγοντες Sp1 για την πρόσδεση και μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή (Feng et al., 2000, Kardassis et al., 2000). Εκτός όμως από την μεταγραφική ενεργοποίηση, ο μηχανισμός ενεργοποίησης των p15 και p21 περιλαμβάνει και αναστολή μεταγραφικής καταστολής. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα, ο παράγοντας c-

Myc μέσω της MIZ1 πρωτεΐνης προσδένεται στην κοντινή περιοχή των p15 και p21 υποκινητών καταστέλλοντας την μεταγραφική τους δραστηριότητα (Staller et al., 2001, Seoane et al., 2001). Η TGFβ επαγόμενη καταστολή της έκφρασης της c-Myc, μέσω σχηματισμού του συμπλόκου Smad3/4 E2F4/5 και p107 αναστέλλει την προαναφερθείσα καταστολή (Chen et al., 2002). Η καταστολή της έκφρασης της c-Myc εξυπηρετεί δύο σκοπούς: αφ' ενός να στερήσει το κύτταρο από παράγοντες που προάγουν την αύξηση και αφ' ετέρου να επάγει την μεταγραφική δραστηριότητα των p15 και p21 υποκινητών με απώτερο στόχο την καταστολή της δράσης των συμπλόκων της G1 φάσης. Το τελικό αποτέλεσμα αυτής της καταστολής είναι η αναστολή της υπερφωσφορύλιωσης της RB και άλλων υποστρωμάτων, έτσι ώστε να μην ενεργοποιηθούν γονίδια που είναι σημαντικά για την είσοδο στην S φάση.

Ο TGFβ, όπως έχει προαναφερθεί, καταστέλλει την έκφραση των ID1, ID2 και ID3 (Inhibitors of Differentiation), οι οποίες λειτουργούν ως αρνητικοί ρυθμιστές των μεταγραφικών παραγόντων bHLH κατά την κυτταρική διαφοροποίηση (Norton et al., 2000). Επίσης, οι πρωτεΐνες ID επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω αλληλεπίδρασης με την RB (Lasorella et al., 2000). Ο TGFβ επάγει την ραγδαία έκφραση του ATF3 (activating transcription factor-3), μέσω ενός μεταγραφικού συμπλόκου που περιέχει την Smad3. Ο ATF3 αλληλεπιδρά στην συνέχεια με τις Smad3/4 και καταστέλλει την μεταγραφή του ID1. Ο τελευταίος ενεργοποιείται επίσης από τον TNFα, μέσω της p38 MAPK (Kang et al., 2003). Είναι επίσης γνωστό ότι η c-Myc σε συνεργασία με την MAX επάγει την έκφραση της ID2. Συνεπώς, η καταστολή της c-Myc από τον TGFβ μπορεί δευτερευόντως να οδηγήσει σε καταστολή της ID2 σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων (Lasorella et al., 2000). Επιπλέον, ο TGFβ επάγει την έκφραση των MXI1/MAD2 και MAD4 που ανταγωνιζόμενες την MAX καταστέλουν την μεταγραφή (Siegel and Massague, 2003). Τα παραπάνω συνοψίζονται στην **Εικόνα 17**.



Εικόνα 17. Το κυτταροστατικό πρόγραμμα του TGFβ σε επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος, του πνεύμονα και του μαστού. Ο TGFβ επάγει την έκφραση των αναστολέων των CDKs (Cyclin-dependent kinases), p15 και WAF1, ενώ καταστέλλει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων c-Myc, ID-1 και ID-2 (Inhibitor of DNA binding) που επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο c-Myc καταστέλλει την έκφραση των p15 και WAF1, μέσω συνεργασίας με την MIZ1 (Myc interacting zinc finger protein 1), και επάγει την έκφραση της ID-2 σε συνεργασία με την MAX. Τα σύμπλοκα των Smad3/4 πρωτεϊνών προσδένονται στους υποκινητές γονιδίων στόχων και προκαλούν μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή ανάλογα με τους συν-παραγόντες με τους οποίους αλληλεπιδρούν. Οι Smad3/4 επάγουν την έκφραση της ATF3 (Activating transcription factor 3) η οποία καταστέλλει την έκφραση της ID-1. Η καταστολή της έκφρασης της ID-2 προκαλείται είτε μέσω καταστολής της έκφρασης της c-Myc, είτε μέσω επαγωγής της έκφρασης της MAD4. Η καταστολή της έκφρασης των MYC και ID παραγόντων καταστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ η επαγωγή της έκφρασης των p15 και WAF1 απενεργοποιεί τις CDKs της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου.

Αποπτωτικοί μηχανισμοί που επάγονται από τον TGFβ

Οι μηχανισμοί με τους οποίους ο TGFβ απάγει την κυτταρική απόπτωση δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Η TIEG1 (TGFβ –inducible –early –response-gene 1) πρωτεΐνη αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό και επάγει την απόπτωση σε διάφορους τύπους επιθηλιακών κυττάρων (Tachibana et al., 1997).

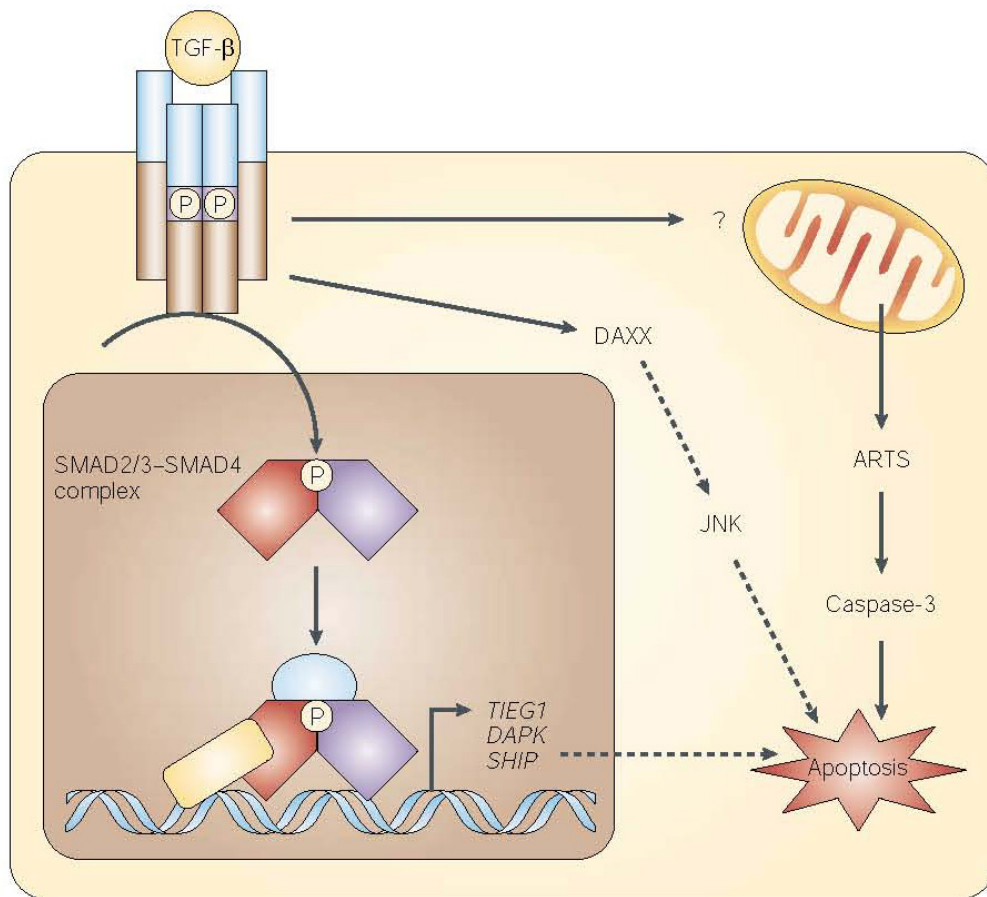
Ο TGFβ αυξάνει, μέσω των Smads, την έκφραση της DAPK πρωτεΐνης (death-associated-protein-kinase), με αποτέλεσμα την ευαισθητοποίηση των ηπατικών κυττάρων στην TGFβ-επαγόμενη απόπτωση (Jang et al., 2002).

Η TGFβ-επαγόμενη απόπτωση των αιμοποιητικών κυττάρων βασίζεται στην Smad εξαρτημένη, αύξηση της έκφρασης της SHIP (SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase) πρωτεΐνης. Η SHIP αναστέλλει την σηματοδότηση της πρωτεΐνης επιβίωσης AKT (Valderrama-Carvajal et al., 2002). Η AKT πρωτεΐνη εμπλέκεται και σε μηχανισμούς TGFβ-επαγόμενης επιβίωσης επιθηλιακών κυττάρων (Shin et al., 2001).

Η χρήση καρκινικών κυττάρων από προστάτη αρουραίων, τα οποία είναι ανθεκτικά στην TGFβ επαγόμενη απόπτωση, οδήγησε στην ανακάλυψη της πρωτεΐνης Arts. Η Arts οδηγεί, μέσω της κασπάσης 3, σε απόπτωση κύτταρα τα οποία αντιστέκονται στον TGFβ επαγόμενο κυτταρικό θάνατο. Μείωση των επιπέδων έκφρασης της Arts αναστέλλει την απόπτωση (Larisch et al., 2000).

Τέλος, η πρωτεΐνη Daxx εμπλέκεται στην μεταγωγή TGFβ αποπτωτικών σημάτων κυρίως λόγω της αλληλεπίδρασής της με τον TβRII. Η TGFβ-επαγόμενη απόπτωση μέσω της Daxx πραγματοποιείται με ενεργοποίηση της JNK (Perlman et al., 2001).

Γενικά, ο TGFβ-επαγόμενος θάνατος διαφόρων κυτταρικών τύπων σχετίζεται με αλλαγές στην έκφραση, τον εντοπισμό και την ενεργοποίηση είτε προ- είτε αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας των Bcl2 πρωτεϊνών, καθώς και με την ενεργοποίηση των κασπασών (Schuster and Krieglstein, 2002). Τα παραπάνω συνοψίζονται στην **Εικόνα 18**.



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της β επαγόμενης κυτταρικής απόπτωσης. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν πιθανές έμμεσες αλληλεπιδράσεις. ARTS: apoptosis-related protein in the TGFβ signaling pathway, DAPK: death-associated protein kinase, DAXX: death-associated protein, JNK: c-Jun amino-terminal kinase, SHIP: SH2-containing inositol-5-phosphatase, TIEG1: TGFβ-inducible early response gene 1.

Απώλεια της TGFβ επαγόμενης κυτταροστατικής δράσης στον καρκίνο

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

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

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

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

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την Smad2 εντοπίζεται επίσης στο χρωμόσωμα 18q21, και αποτελεί επίσης στόχο μεταλλάξεων σε περιπτώσεις καρκίνων του εντέρου (Eppert et al., 1996) και των πνευμόνων (Ushida et al., 1996).

Εκτός από μεγάλες απαλοιφές σε ολόκληρη την περιοχή που κωδικοποιεί την Smad4, οι μεταλλάξεις που απενεργοποιούν τις Smad2 και Smad4 σε καρκίνους περιλαμβάνουν μικρές απαλοιφές, και μεταλλάξεις χωρίς νόημα, με λάθος νόημα ή μετατόπισης αναγνωστικού πλαισίου. Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις επηρεάζουν κυρίως την MH2 περιοχή, περιγράφονται στην **Εικόνα 19** και εμπίπτουν σε τέσσερις διακριτές ομάδες ανάλογα με το πώς επηρεάζουν την διαμόρφωση της MH2 περιοχής και την λειτουργία της πρωτεΐνης (**Εικόνα 20**).

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει μεταλλάξεις που προέρχονται από όγκους και επηρεάζουν περιοχές που εμπλέκονται στην διατήρηση της δομής του πυρήνα του β-sandwich (**Εικόνα 20**). Τέτοιες μεταλλάξεις είναι οι αντικαταστάσεις Leu440Arg και Pro445His στην Smad2 και η Arg441Pro στην Smad4 πρωτεΐνη. Οι μεταλλάξεις αυτές προβλέπεται, από κρυσταλλογραφικές αναλύσεις, να επηρεάζουν την διαμόρφωση της MH2 περιοχής, και όπως αναμενόταν, μειώνουν την σταθερότητα αυτών των πρωτεϊνών (Shi et al., 1997, Eppert et al., 1996).

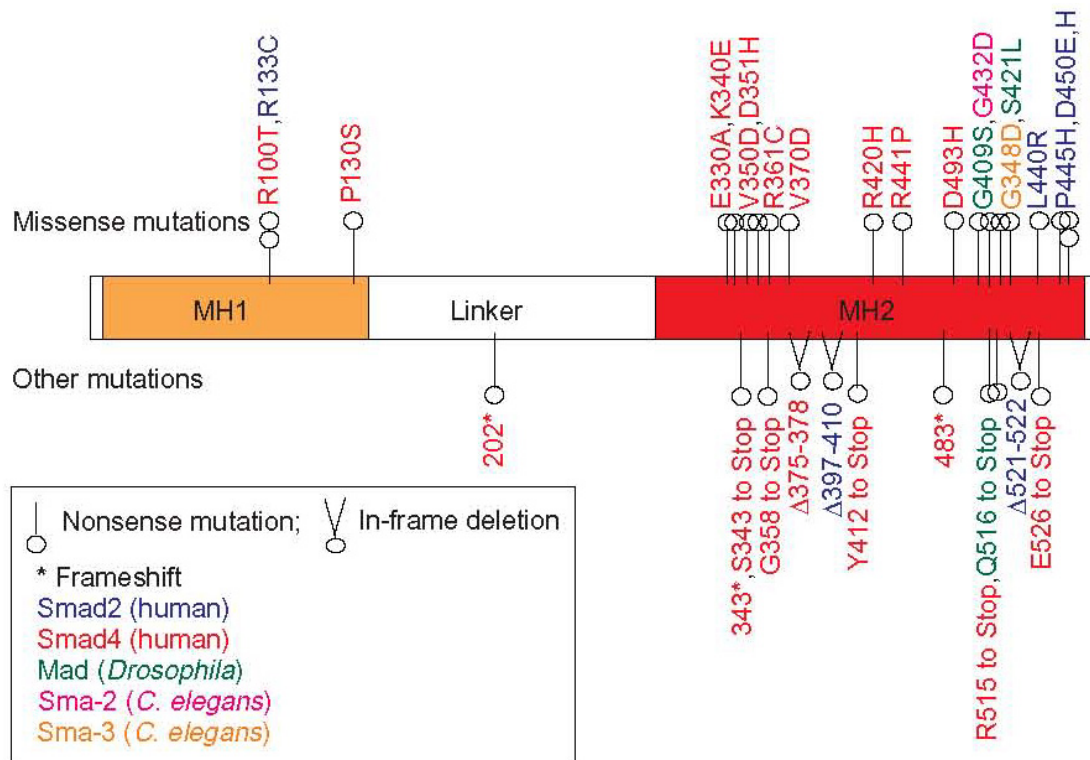
Η δεύτερη ομάδα αφορά μεταλλάξεις οι οποίες επηρεάζουν τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης των μονομερών που σχηματίζουν το MH2 ομοτριμερές (**Εικόνα 20**). Σχεδόν οι μισές από τις ογκογονικές μεταλλάξεις του γονιδίου Smad4 εμπίπτουν σε αυτήν την κατηγορία. Οι μεταλλάξεις αυτές επηρεάζουν την loop/helix περιοχή (Val350Asp, Asp351His, Arg361Cys και Val370Asp στην Smad4) ή την three-helix

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

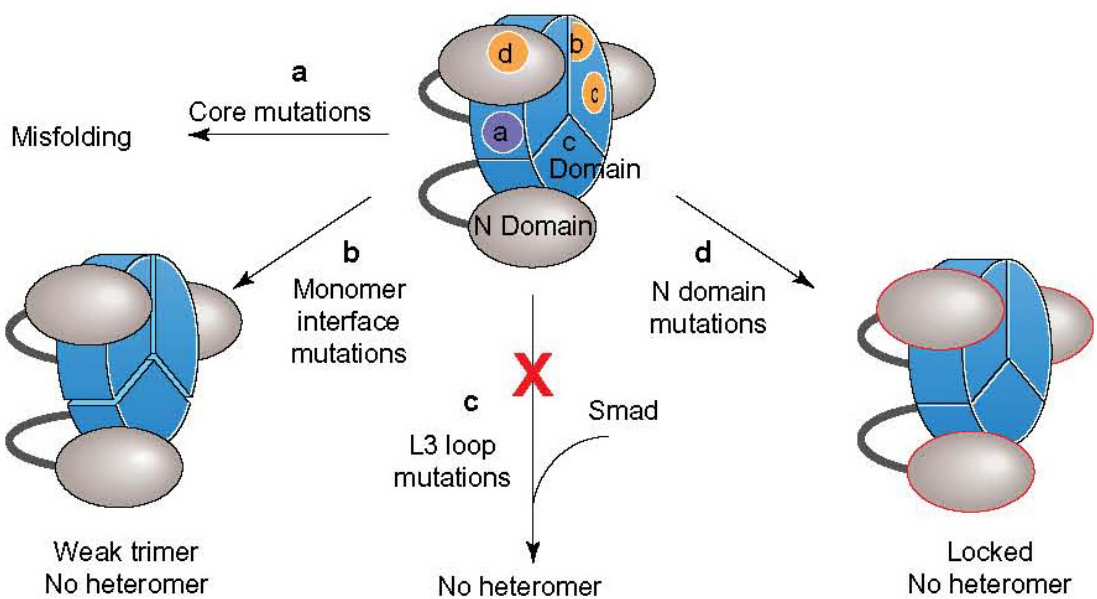
Η τρίτη ομάδα μεταλλάξεων αντικατάστασης χαρτογραφούνται στην περιοχή που καλείται θηλιά L3 (**Εικόνα 20**). Η δομή αυτή προεξέχει από κάθε μονομερές στην C-τερματική πλευρά του τριμερούς δίσκου (Shi et al., 1997). Η L3 θηλιά δεν συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μονομερών αλλά, καθώς είναι εκτεθειμένη στην επιφάνεια, μπορεί να συμμετέχει στις αλληλεπιδράσεις των Smads με άλλες πρωτεΐνες. Πράγματι, μεταλλάξεις στην L3 θηλιά της Smad2 (Gly421Ser) ή της Smad4 (Gly508Ser) δεν επηρεάζουν τον ομο-ολιγομερισμό τους. Ωστόσο, μεταλλάξεις στην L3 θηλιά της Smad2 αποτρέπουν την αλληλεπίδραση της τελευταίας με τον TGFβ υποδοχέα (Macias-Silva et al., 1996, Lo et al., 1998). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η L3 θηλιά όχι μόνο είναι σημαντική για την αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους υποδοχείς αλλά και ότι δρα καθοριστικά για την ειδικότητα αυτής της αλληλεπίδρασης (Lo et al., 1998). Είναι αξιοσημείωτο ότι στην Smad4, η οποία δεν αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς, η θηλιά L3 απαιτείται για την αλληλεπίδρασή της με τις R-Smads (Shi et al., 1997).

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

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



Εικόνα 19. Μεταλλάξεις των Smad γονιδίων που σχετίζονται με καρκινογένεση. Η Smad4 πρωτεΐνη είναι σημειοκά μεταλλαγμένη ή ελλειμματική σε μεγάλο αριθμό καρκίνων του παγκρέατος. Οι Smad2 και Smad4 πρωτεΐνες είναι μεταλλαγμένες σε μικρό αριθμό καρκινωμάτων άλλης προέλευσης. Οι περισσότερες σημειοκάς μεταλλάξεις χαρτογραφούνται στις συντηρημένες MH1 και MH2 περιοχές.



Εικόνα 20. Οι τέσσερις ομάδες μεταλλάξεων των Smad πρωτεϊνών που σχετίζονται με καρκινογένεση. Οι ογκογόνες μεταλλάξεις των Smad πρωτεϊνών κατηγοριοποιούνται σε τέσσερις διακριτές ομάδες (a-d), ανάλογα με την θέση τους και τις επιπτώσεις τους στη λειτουργία των Smad. **(a)** Αυτή η ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζει περιοχές της δομής β-sandwich και μειώνουν την σταθερότητα των πρωτεϊνών. **(b)** Η δεύτερη ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζει τις επιφάνειες αλληλεπίδρασης μονομερών και συνεπώς παρεμποδίζουν τον σχηματισμό ομοπολυμερών και αναστέλλουν τον σχηματισμό ετεροπολυμερών. **(c)** Η Τρίτη ομάδα μεταλλάξεων επηρεάζουν την περιοχή της θηλιάς L3 και αναστέλλουν τον σχηματισμό ετεροπολυμερών μεταξύ των R-Smads και της Smad4. **(d)** Συγκεκριμένες μεταλλάξεις στην MH1 περιοχή αυξάνουν την συνάφεια μεταξύ των MH1 και MH2 περιοχών, με αποτέλεσμα την ανενεργή διαμόρφωση του Smad μορίου.

Προ-διεισδυτικές και μεταστατικές λειτουργίες του TGFβ.

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

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

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

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

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

Επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT). Η μεταναστευτική ικανότητα των επιθηλιακών κυττάρων βασίζεται στην απώλεια των επαφών μεταξύ των κυττάρων και στην απόκτηση ινοβλαστικών χαρακτηριστικών, διαδικασία που συχνά αναφέρεται ως επιθηλιακή σε μεσεγχυματική διαφοροποίηση (epithelial-mesenchymal transition, EMT). Η διαδικασία αυτή, η οποία συμβαίνει συχνά κατά την ανάπτυξη αλλά και κατά την πρόοδο της καρκινογένεσης, επηρεάζεται από μέλη της TGFβ οικογένειας (Moustakas et al., 2002). Διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια εμπλέκονται στην TGFβ-επαγόμενη EMT, συμπεριλαμβανομένων των RhoA, p38 MAPK και PIP3K-AKT, με αποτέλεσμα την προώθηση των διεισδυτικών και μεταστατικών ιδιοτήτων των καρκινικών κυττάρων (Derynck et al., 2001). Ένας από τους κύριους στόχους απενεργοποίησης κατά την EMT είναι ο ασβεστο-εξαρτώμενος υποδοχέας κυτταρικών επαφών E-cadherin που συχνά καταστέλλεται σε περιπτώσεις καρκίνων από τον TGFβ (Oft et al., 1996, Miettinen et al., 1994, Thiery et al., 2002).

Επαγωγή ιστοειδικής μετάστασης. Οι προ-μεταστατικές λειτουργίες του TGFβ επηρεάζουν βασικές διαδικασίες που καθιστούν εφικτή την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Επιπλέον, η δράση του TGFβ μπορεί να κατευθύνει την μετάσταση σε συγκεκριμένους ιστούς. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η TGFβ-επαγόμενη μετάσταση ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων από τον μαστό στα

οστά, μέσω καταστολής της c-Myc (Yin et al., 1999, Chen et al., 2001). Μελέτες σε καρκινικά κύτταρα μαστού ποντικού υποδεικνύουν την υπερέκφραση μιας ομάδας γονιδίων που υποβοηθούν τη διείσδυση, την αγγειογένεση και την οστεόλυση. Η έκφραση του γονιδίου του αγγειογενετικού παράγοντα CTGF και του παράγοντα διαφοροποίησης οστεοκλαστών ιντερλευκίνη 11 (IL11), αυξάνεται περαιτέρω από τον TGFβ, μέσω πρόσδεσης του Smad συμπλόκου στους υποκινητές αυτών των γονιδίων (Kang et al., 2002). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν τα οστά ως επιρρεπή ιστό για μεταστάσεις, ως αποτέλεσμα της ογκογονικής δράσης του TGFβ.

Είναι προφανές ότι η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης θα μπορούσε να οδηγήσει σε καταστολή της καρκινογένεσης και το ενδεχόμενο αυτό καθιστά το TGFβ μονοπάτι ελκυστικό στόχο θεραπευτικών παρεμβάσεων. Έτσι, έχουν πλέον κατασκευαστεί μικρά μόρια αναστολέων, όπως ο SB-431542 που καταλύει την ενεργότητα κίνησης του TβRI (Laping et al., 2002, Inman et al., 2002), καθώς και άλλα μέσα που μπλοκάρουν την TGFβ σηματοδότηση, τα οποία βρίσκονται σε διάφορα προκλινικά και κλινικά στάδια (Dumont et al., 2003). Ωστόσο, το γεγονός ότι ο TGFβ δρά ογκοκατασταλτικά στην αρχή της καρκινογένεσης και η ενδεχόμενη δηλητηριώδης επίδραση της καταστολής του σε φυσιολογικά κύτταρα, δημιουργεί ανησυχίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα αυτών των χημικών μέσων. Έχει κατασκευαστεί μια υβριδική διαλυτή πρωτεΐνη που αποτελείται από την περιοχή Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης και τον TβRII (Fc-TβRII). Η πρωτεΐνη αυτή ανταγωνίστηκε την TGFβ σηματοδότηση και κατατέστειλε την μετάσταση των όγκων του θηλαστικού αδένα στον πνεύμονα, όταν χρησιμοποιήθηκε ως ενέσιμο φάρμακο ή σε διαγονιδιακά ποντίκια (Muraoka et al., 2002, Yang et al., 2002). Η χρόνια έκφραση της Fc-TβRII δεν προκάλεσε φλεγμονώδεις ή αυτοάνοσες αντιδράσεις σε διαγονιδιακά ποντίκια (Yang et al., 2002). Τα αποτελέσματα αυτά είναι ενθαρρυντικά, αν και απαιτείται μεγαλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που μετατρέπουν τον TGFβ σε παράγοντα καρκινογένεσης, ώστε να επιτευχθούν ασφαλείς και αποτελεσματικές παρεμβάσεις (Siegel and Massague, 2003).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΥΛΙΚΑ

Τα ένζυμα περιορισμού, τα ρυθμιστικά τους διαλύματα και οι DNA πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν στην κατασκευή των πλασμιδίων, αγοράστηκαν από τις εταιρείες Gibco-BRL, New England Biolabs και Minotech. Τα δεόξυνουκλεοτίδια (dNTPs) που χρησιμοποιήθηκαν στις αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCRs) αγοράστηκαν από την Pharmacia, ενώ τα ολιγονουκλεοτίδια (βλ. Πίνακα I, II και III) από το εργαστήριο Μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) την Gibco-BRL ή την Invitrogen. Για την κλωνοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών Smad χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA1amp της Invitrogen, ο pcDNA3amp της Invitrogen. Η Rnase A και η λυσοζύμη αγοράστηκαν από τη Sigma. Ο δείκτης μοριακού βάρους λBstEII κατασκευάστηκε ύστερα από πέψη του DNA του λ βακτηριοφάγου που αγοράστηκε από τη New England Biolabs. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε στις καλλιέργειες βακτηρίων LB περιείχε bacto-agar, bacto-tryptone yeast extract της εταιρείας Difco. Η αгарόζη αγοράστηκε από την εταιρεία EMS, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και διάφορα χημικά των εταιρειών Merck και Sigma καθώς και άλλων εμπορικών πηγών.

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μεγάλης κλίμακας βακτηριακή καλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Kit της εταιρείας Qiagen. Για την απομόνωση τμημάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel Extraction kit της ίδιας εταιρείας. Ο ο-νιτροφαινυλογαλακτοπυρανοζίτης (ONPG), που χρησιμοποιήθηκε στη δοκιμασία β-γαλακτοσιδάσης, αγοράστηκε από τη Sigma. Το υπόστρωμα για την μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης αγοράστηκε από την εταιρεία Promega, ενώ ο μετασηματίζων αυξητικός παράγοντας β1 (TGF-β1), που αποτελεί τον συνδέτη (ligand) των αντίστοιχων υποδοχέων TGF-βRI και TGF-βRII, αγοράστηκε από την εταιρεία R & D Systems. Το συζευγμένο με fluorescein isothiocyanate goat anti-mouse IgG αντίσωμα (FITC) καθώς και το συζευγμένο με horseradish peroxidase goat anti-mouse αντίσωμα (HRP) από την Chemicon. Το μονοκλωνικό mouse anti-GAL4 (DBD) από την Santa Cruz, ενώ τα μονοκλωνικά mouse anti-Flag M5 και M2 καθώς και το mouse anti-myc (9E10) αντισώματα αγοράστηκαν από την Sigma. Στα πειράματα βιοτυνιλίωσης χρησιμοποιήθηκαν αгарόζη στρεπταβιδίνης και στρεπταβιδίνη ομοιοπολικά συζευγμένα με HRP που αγοράστηκαν από την Sigma. Οι μεμβράνες

νιτροκυτταρίνης Protran αγοράστηκαν από την εταιρεία Schleicher & Schuell. Για την ανίχνευση πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) και υπερευαίσθητο σύστημα ανοσοαποτύπωσης (ECL-hyperfilm) της εταιρείας Amersham Pharmacia Biotech και της Pierce. Το TNT kit από την Promega, η L-[³⁵S]- Methionine από την Pharmacia και την NEN. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης (Glutathione Sepharose, GST beads) αγοράστηκαν από την Amersham Biosciences Inc, ενώ οι αναστολείς πρωτεασών από την Sigma. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις καλλιέργειες κυτταρικών σειρών και συγκεκριμένα το θρεπτικό υλικό Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), ο ορός Fetal Bovine Serum (FBS), το ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate Buffered Saline (PBS), το ένζυμο Trypsin - EDTA καθώς και τα αντιβιοτικά Πενικιλίνη - Στρεπτομυκίνη αγοράστηκαν από την Gibco/BRL. Τα υπόλοιπα χημικά που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από κοινές εμπορικές πηγές στην μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel).

Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% και 0,5% (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.

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. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA του πλασμιδιακού φορέα και του ενθέματος, ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος.

Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B, DH5a, BL21 της *E.coli* (transformation).

Σε βακτηριολογικό σωλήνα φέρονται 100μl -200μl βακτηριακών κυττάρων DH10B (κύτταρα ικανά να μετασηματιστούν, competent cells) και τα 10 μl ή 20 μl της αντίδρασης σύνδεσης ή του πλασμιδίου που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μείγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν υφίσταται θερμικό σοκ στους 42⁰ C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 900 μl θρεπτικού LB (LB : 1% bacto tryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1% NaCl). Το τρυβλίο Pertl με θρεπτικό LB -άγαρ και αντιβιοτικό αμικικιλίνη (50 μg/ml), όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37⁰ C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Τα 100 μl καλλιέργειας απλώνονται στο τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 16 - 18 ώρες (overnight).

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 37⁰ 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 προαναφερθείσας 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 -20°C , για 30 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρωση 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.

Πλασμιδιακές κατασκευές (plasmid constructions).

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πλασμίδια :

Πλασμίδια αναφοράς (Reporter plasmids). Ο συνθετικός υποκινητής p(CAGA)₁₂ – E1B-luc προσφέρθηκε από τον Δρ. Μουστάκα Α. (LICR-Upsalla, Sweden). Ο ομοπολυμερικός υποκινητής p(3XkB-L) έχει περιγραφεί προηγουμένως (Mitchell et al., 1995). Ο συνθετικός υποκινητής pG₅-E1B-luc, που πριέχει 5 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 εκφράζεται από το πλασμίδιο pBXG1. Το πλασμίδιο αναφοράς (-2300/+8) p21-luc έχει περιγραφεί προηγουμένως (Moustakas & Kardassis, 1998). Το πλασμίδιο αναφοράς (-4200/+110)Smad7-luc προσφέρθηκε από τον Dr.R. Heuchel (LICR-Upsalla, Sweden). Το πλασμίδιο αναφοράς (-99/+24) apoCIII-CAT έχει περιγραφεί προηγουμένως (Ladías et al., 1992, Kardassis et al., 2000).

Πλασμίδια συμπλήρωσης (Fill-up plasmids, empty vectors). pBS (pBluescript SK+), Salmon sperm (New England Biolabs),

Πλασμίδια έκφρασης (Expression vectors). Τα πλασμίδια ca-ALK5, pcDNAIampSmad3 pcDNAIampSmad3myc, pcDNAIampSmad4myc, pcDNAIampSmad3Flag, pcDNAIampSmad4Flag έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Pardali et al., 2000). Τα πλασμίδια pSG5LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1-FLAG, pcDNA3LMP1(1-231)-FLAG, pcDNA3LMP1(Δ188-351)-FLAG, pSG5LMP1ΔC, pSG5LMP1D1, pcDNA3TRAF2-FLAG, pcDNA3TRAF2ΔRF, pCMVikBDN, pcDNA3NIK-FLAG, pcDNA3NIKDN, pcDNA3IKKβΔ9-FLAG (που εκφράζει την αγρίου τύπου IKKβ) pcDNA3IKKβΔ34-FLAG (που εκφράζει την αρνητικώς επικρατούσα μορφή του IKKβ) έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Devergne et al., 1996, Sylla et al., 1998). Το παλσμίδιο pSG5LMP1-(1-187) έχει περιγραφεί προηγουμένως (Floettmann et al., 1998). Ο φορέας έκφρασης pRC/CMV-p65 προσφέρθηκε από τον Δρ. Θάνο Δ. (Columbia University, New York, NY). Τα πλασμίδια pRC/CMVp65Δc και pRC/CMVp50 προσφέρθηκαν από το Δρ. Μαυροθαλασσίτη (Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο). Ο φορέας έκφρασης του pRC/CMVp50/p65, του pGEx2tp65ΔC και του pGEx2Tp50 έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Mitchell et al., 1995). Οι μεταλλαγμένες ελλειμματικές μορφές της Smad3, που φέορυν στο N-τελικό τους άκρο τον επίτοπο 6myc ή FLAG, και χρησιμοποιήθηκαν στις αναύσεις in vitro αλληλεπίδρασης με τις GEx2tp65ΔC και GEx2Tp50, κατασκευάστηκαν όπως περιφράφηκε σε προηγούμενη μελέτη (Προκόβα ΜΔΕ, 2000). Ο φορέας έκφρασης της pEGF-Smad3 προσφέρθηκε από τον Δρ. Μουστάκα Α. (LICR-Upsalla, Sweden). Το πλασμίδιο pBXG1-Smad3 που εκφράζει την ανθρώπινη Smad3 πρωτεΐνη σε σύζευξη στο N-τελικό άκρο της με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (αμινοξέα 1-147) του ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4, κατασκευάστηκε με κλωνοποίηση του Smad3 cDNA που απομονώθηκε από το πλασμίδιο pcDNAIamp Smad3 6myc με χρήση των περιοριστικών ενζύμων EcoRI/NotI στις αντίστοιχες θέσεις του φορέα pBX-G1 που φέρει την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του GAL4 υπό τον έλεγχο του CMV υποκινητή.

Το πλασμίδιο έκφρασης pMT2 HNF4 έχει αναφερθεί προηγουμένως (Ladiaz et al., 1992, Kardassis et al., 2000). Το πλασμίδιο έκφρασης pcDNA3/Flag-Smad3 (R74K/K81R) που εκφράζει μεταλλαγμένη Smad3 στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA έχει περιγραφεί προηγουμένως (Moren et al., 2000). Οι ελλειμματικές μορφές του HNF4 που εκφράζονται είτε από τον φορέα pcDNAIamp, είτε από τον φορέα

pBX-G1 (σε σύζευξη με το GAL4) έχουν περιγραφεί προηγουμένως (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997, Kistanova et al., 2001). Το πλασμίδιο pGEX-HNF4 (130-455) είναι ευγενική προσφορά του Δρ. Ταλιανίδη Ι. (Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Ηράκλειο Κρήτη). Οι φορείς έκφρασης των συνενεργοποιητών TIF2, Src-1a, RAC3 και PGC1 προσφέρθηκαν από τον Dr. Gronemeyer Hinrich (IGBMC).

Για τη δομική και λειτουργική ανάλυση του μεταγραφικού παράγοντα Smad3, ανεξάρτητα από την ικανότητα πρόσδεσής του στο DNA κατασκευάστηκαν αρχικά 15 μεταλλαγμένες, ελλειμματικές μορφές του. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκαν - με κλωνοποίηση ή/και εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) - 15 διαφορετικά πλασμίδια που χαρακτηρίζονται από ελλείμματα στο αμινοτερματικό, στο καρβοξυτελικό άκρο, ή και στα δύο άκρα της Smad3 πρωτεΐνης.

Τα τμήματα 1-424 (wt), 1-130 (MH1), 230-424 (MH2), 130-230 (Linker), 1-248, 248-424 του μορίου Smad3, ελήφθησαν μετά από πέψη των αντίστοιχων πλασμιδίων pcDNAIamp6myc (Προκόβα, ΜΔΕ, 2000) με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pBXG1, που εκφράζει την GAL4 DBD πρωτεΐνη, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής :

pBXG1 Smad3 (1-424),

pBXG1 Smad3 (1-130),

pBXG1 Smad3 (230-424),

pBXG1 Smad3 (130-230),

pBXG1 Smad3 (1-248),

pBXG1 Smad3 (248-424)

Τα τμήματα 1-230 (ΔMH2) και 130-424 (ΔMH1) της Smad3 ελήφθησαν μετά από πέψη των pGEX Smad3 ΔMH2 και pGEX Smad3 ΔMH1 πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και NotI. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pcDNAIamp6myc ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Ακολούθησε πέψη των πλασμιδίων pcDNAIamp6myc ΔMH2 και pcDNAIamp6myc ΔMH1 που προέκυψαν με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI και κλωνοποίηση των τμημάτων 1-230 και 130-424 στον φορέα pBXG1, που εκφράζει την GAL4 DBD πρωτεΐνη, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής :

pBXG1 Smad3 (1-230),

pBXG1 Smad3 (130-424)

Τα τμήματα 143-248, 172-248 και 201-248 ελήφθησαν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο pcDNAIamp 6myc Smad3 και τους εκκινητές 143N-Smad3-myc sense, 172N-Smad3-myc sense, 201N-Smad3-myc sense και 248C-Smad3 antisense που περιγράφονται στον Πίνακα Ι. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε τελικό όγκο 50 μl, όπου περιέχονταν 1 ng από το πλασμίδιο εκμαγείο, 50 pmol από κάθε εκκινητή, 2 mM δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs), 1 U Vent πολυμεράσης και 1x του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου. Το πρόγραμμα PCR που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο:

1. 94⁰ C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
2. 94⁰ C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
3. 62⁰ C για 1 λεπτό και 30 δευτερόλεπτα
4. 72 C για 2 λεπτά
5. 35 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 4⁰ C
7. Τέλος

Ακολούθησε πέψη των PCR προϊόντων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και Not I. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pcDNAIamp6xmyc, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pcDNAIampSmad3myc(143-248),

pcDNAIampSmad3myc(172-248),

pcDNAIampSmad3myc(201-248)

Ακολούθησε πέψη των προαναφερθέντων πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI και κλωνοποίηση των τμημάτων 143-248, 172-248 και 201-248 στον φορέα pBXG1, που εκφράζει την GAL4 DBD πρωτεΐνη, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pBXG1 Smad3 (143-248),

pBXG1 Smad3 (172-248),

pBXG1 Smad3 (201-248)

Τα τμήματα 230-248, 230-290 και 230-374 ελήφθησαν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο pBXG1 Smad3 230-424 (MH2) αντίστοιχα. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές GAL4 sense, 248C-Smad3 antisense, 290C-Smad3 antisense και 374C-Smad3 antisense που

περιγράφονται στον Πίνακα I. Το τμήμα 130-248 ελήφθηκε με αντίστοιχο τρόπο, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμίδιο pBXG1 Smad3 130-424 (ΔMH1) και τουε εκκινητές GAL4 sense και 248C-Smad3 antisense που επίσης περιγράφονται στον Πίνακα I. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον όγκο και το πρόγραμμα που περιγράφονται παραπάνω. Ακολούθησε πέψη των PCR προϊόντων με τα ένζυμα περιορισμού HindIII και NotI. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pBXG1 Smad3 (1-248), ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού, τα οποία απομακρύνουν τόσο το GAL4 DBD όσο και την Smad3 (1-248). Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pBXG1 Smad3 (130-248),

pBXG1 Smad3 (230-248),

pBXG1 Smad3 (230-290),

pBXG1 Smad3 (230-374)

Σχηματική αναπαράσταση όλων των υβριδικών GAL4 Smad3 μορφών που κατασκευάστηκαν απεικονίζεται στην Εικόνα των αποτελεσμάτων.

Η δομική-λειτουργική ανάλυση της Smad3 πρωτεΐνης συνεχίστηκε με την κατασκευή εσωτερικής απαλοιφής της περιοχής 200-230 και της περιοχής 228-249 του μορίου της. Για την απαλοιφή της περιοχής 200-230 πραγματοποιήθηκαν δυο PCR αντιδράσεις, έστω A και B, στον όγκο και το πρόγραμμα που περιγράφονται παραπάνω. Ως εκμαγείο για κάθε μία αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pcDNAIampSmad3myc. Στην αντίδραση A χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 1N-Smad3myc sense και 238C-Smad3 Δ200-230 antisense που περιγράφονται στον Πίνακα I. Στην αντίδραση B χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 192N-Smad3 Δ200-230 sense και 425C-Smad3 antisense που επίσης περιγράφονται στον Πίνακα I. Τα προϊόντα των αντιδράσεων A και B χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για τρίτη PCR αντίδραση (overlap extention PCR), χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους 1N-Smad3myc sense και 425C-Smad3 antisense.

Με αντίστοιχο τρόπο κατασκευάστηκε μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 που φέρει εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249. Ως εκμαγείο για κάθε μία αντίδραση χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pcDNAIampSmad3myc. Στην αντίδραση A χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 1N-Smad3myc sense και 254C-Smad3 antisense που περιγράφονται στον Πίνακα I. Στην αντίδραση B χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 224N-Smad3 sense και 425C-Smad3 antisense που επίσης περιγράφονται στον Πίνακα I. Τα προϊόντα των αντιδράσεων A και B χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για

overlap extention PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους 1N-Smad3myc sense και 425C-Smad3 antisense. Ακολούθησε πέψη των προϊόντων των overlap extention PCRs με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και Not I. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pcDNAIampbχmyc, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pcDNAIamp Smad3myc Δ200-230,

pcDNAIamp Smad3myc Δ228-249

Ακολούθησε πέψη των προαναφερθέντων πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI και κλωνοποίηση των τμημάτων της Smad3 που φέρουν τις εσωτερικές απαλοιφές στον φορέα pBXG1, που εκφράζει την GAL4 DBD πρωτεΐνη, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pBXG1 Smad3 Δ200-230,

pBXG1 Smad3 Δ228-249

Για την κατασκευή των σημειακά μεταλλαγμένων Smad3 E238A και Smad3 143-248 E238A μορφών της Smad3, χρησιμοποιήθηκε η ποαναφερθήσα μέθοδος της overlap extention PCR. Ως εκμαγείο για κάθε μία αντίδραση για την κατασκευή της Smad3 E238A χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο pcDNAIampSmad3myc. Στην αντίδραση A χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 1N-Smad3myc sense και 244C-Smad3 E239A antisense που περιγράφονται στον Πίνακα I. Στην αντίδραση B χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 234N-Smad3 E239A sense και 425C-Smad3 antisense που επίσης περιγράφονται στον Πίνακα I. Τα προϊόντα των αντιδράσεων A και B χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο για overlap extention PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους 1N-Smad3myc sense και 425C-Smad3 antisense. Για την κατασκευή της Smad3 143-248 E238A χρησιμοποιήθηκε το ίδιο εκμαγείο και τα ίδια ζεύγη εκκινητών. Όμως, στην overlap extention PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 143N-Smad3-myc sense και 248C-Smad3 antisense που περιγράφονται στον Πίνακα I. Ακολούθησε πέψη των προϊόντων των overlap extention PCRs με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και Not I. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν χωριστά στον φορέα pcDNAIampbχmyc, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pcDNAIamp Smad3myc E238A,

pcDNAIamp Smad3myc 143-248 E238A

Ακολούθησε πέψη των προαναφερθέντων πλασμιδίων με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και XbaI και κλωνοποίηση των τμημάτων της Smad3 που φέρουν τις εσωτερικές απαλοιφές στον φορέα pBXG1, που εκφράζει την GAL4 DBD πρωτεΐνη, ύστερα από την πέψη του με τα προαναφερθέντα ένζυμα περιορισμού. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pBXG1 Smad3 E238A,

pBXG1 Smad3 143-248 E238A

Για την κατασκευή μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που να μπορούν να βιοτινυλιωθούν *in vivo* χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3amp (Εικόνα 21) στον οποίο είχε κλωνοποιηθεί το 22 αμινοξέων πεπτίδιο Bio, στις θέσεις EcoRI και BamHI. Ο pcDNA3 Bio υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και Not I. Σε αυτές τις θέσεις εντέθηκαν τα cDNAs της Smad3, 1-424, 1-424 (Δ200-230), 1-424 (Δ228-249), 1-424 (E238A) και 143-248, που προέκυψαν μετά από πέψεις των αντίστοιχων pcDNA3amp Smad3myc πλασμιδίων με τα ένζυμα EcoRI και Not I, με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρουν στο N-τελικό τους άκρο το πεπτίδιο Bio. Τα πλασμίδια που προέκυψαν είναι τα εξής:

pcDNA3 Bio Smad3,

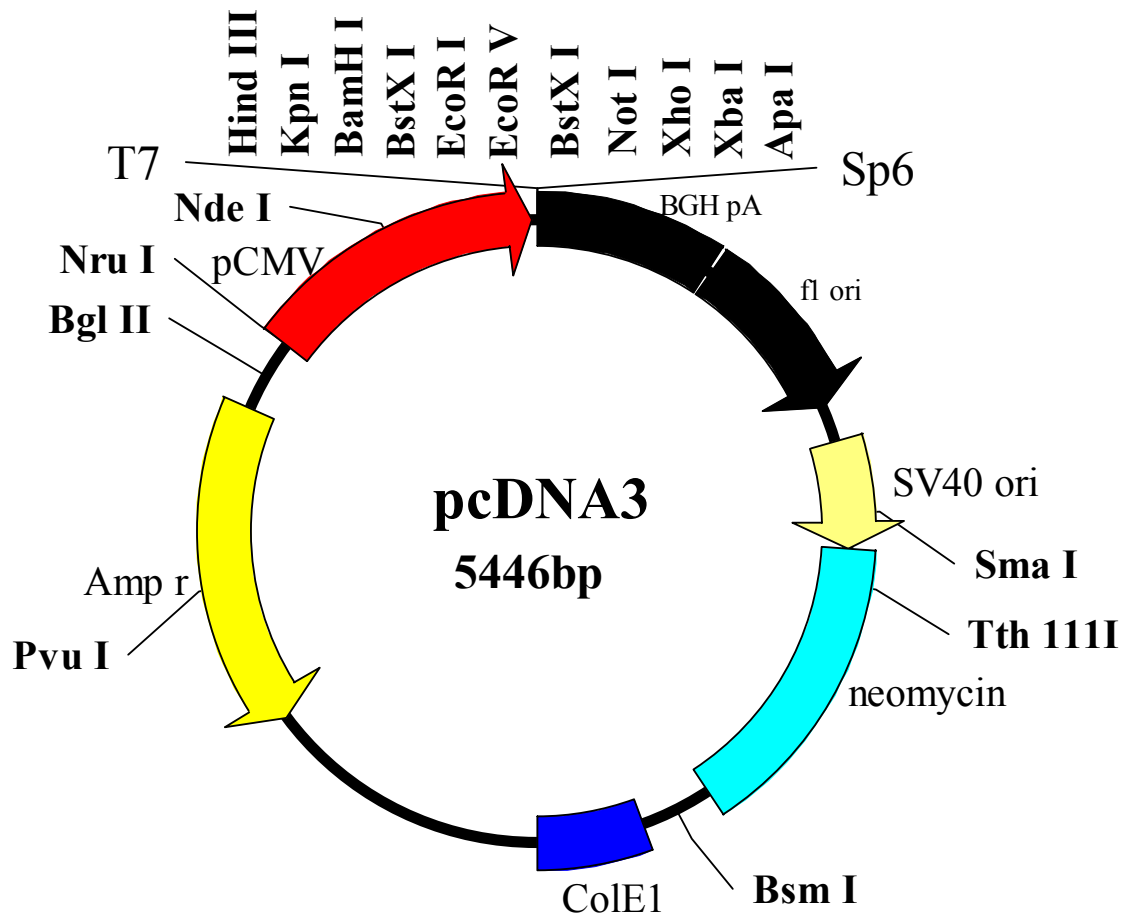
pcDNA3 Bio Smad3 Δ200-230,

pcDNA3 Bio Smad3 Δ228-249,

pcDNA3 Bio Smad3 E238A,

pcDNA3 Bio Smad3 143-248

Οι συνενεργοποιητές p/CAF p300 ήταν ευγενική προσφορά του Dr. ten Dijke P., ενώ ο συνκαταστολέας c-Ski προσφέρθηκε από Δρ. Μουστάκα.



Εικόνα 21. Ο πλασμιδιακός φορέας pcDNA3. Σε αυτόν τον φορέα κλωνοποιήθηκε το 22 αμινοξέων Bio πεπτίδιο, κατόπιν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και BamHI. Οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης κλωνοποιήθηκαν στον φορέα αυτό κατόπιν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και NotI, με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρουν το Bio πεπτίδιο στο N-τελικό τους άκρο.

Κυτταροκαλλιέργειες.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι κυτταρικές σειρές COS-7 και HepG2 που προέρχονται από νεφρικά κύτταρα πιθήκου και κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα JEG (Smad3^{-/-}) και MDA-MB-468 (Smad4^{-/-}) που είναι αντίστοιχα κύτταρα χοριοκαρκινώματος και καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα HEK 293T που είναι νεφρικά κύτταρα εμβρύου ανθρώπου. Οι καλλιέργειες πραγματοποιήθηκαν σε φλάσκες 75 cm² και σε τρυβλία 6-well, p-60 και p-100 (διαμέτρου 6, 60 και 100 mm αντίστοιχα), σε επωαστήρα 37 C⁰ και σε συνθήκες 5% CO₂. Αποθέματα καλλιεργειών (stocks) φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80⁰ C σε θρεπτικό DMEM με 10% FBS και 10% DMSO. Τα κυτταρικά δείγματα εμβαπτίζονται σε υδατόλουτρο ώστε να ξεπαγώσουν και μεταφέρονται σε φλάσκες με πλήρες θρεπτικό υλικό, το οποίο ανανεώνεται την επόμενη μέρα προκειμένου να αποφευχθούν τυχούσες βλαβερές επιπτώσεις του DMSO. Το θρεπτικό υλικό στις φλάσκες ανανεώνεται κάθε 48 - 72 ώρες. Τα κύτταρα αραιώνονται (split) όταν σχηματίσουν μονοστιβάδα, με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA), και στην κατάλληλη συγκέντρωση με προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού (τελική αραιώση στις φλάσκες 1 : 10).

Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).

Οι παροδικές επιμολύνσεις έγιναν με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης Ca₃(PO₄)₂ με τα εκάστοτε κατάλληλα και επιθυμητά πλασμίδια. Τα COS-7, NIH 3T3, MDA-MB-468, και 293T αραιώνονται σε 2.5x10⁵ κύτταρα ανά well και σε 5x10⁵ κύτταρα ανά τρυβλίο p60 και p100, ενώ τα HepG2 και JEG Smad3^{-/-} 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 CaCl₂ 2M και 195 μl ddH₂O (H₂O 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 CaCl₂ 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl.

Για την επιμόλυνση κυττάρων που καλλιεργούνται σε τρυβλίο p-60 (χρησιμοποιούνται για έλεγχο της πρωτεϊνικής έκφρασης και σε πειράματα ανοσοφθορισμού), το μείγμα περιέχει 2 μg κάθε πλασμιδίου έκφρασης και κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίου συμπλήρωσης, ώστε η συνολική ποσότητα DNA να μην υπερβαίνει τα 17 μg, 31μl CaCl₂ 2M και ποσότητα ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 250 μl.

Σε κάθε περίπτωση, το μείγμα προστίθεται στάγδην και υπό συνεχή ανάδευση σε ίσο όγκο HEPES Buffered Saline (HBS) (2x HBS: 42 mM HEPES pH 7.1, 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 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 37⁰ 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 4⁰ C, και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο PBS (100-200 μl). Σε κάθε περίπτωση, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -80⁰ C.

Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal.

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων κάθε τρυβλίου, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για τον σκοπό αυτό το μείγμα συγκατακρήμνισης (βλ. παραπάνω) περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (πλασμίδιο pCMVβ-gal) ή του γονιδίου PGK (Phospho-Glycerate Kinase) (πλασμίδιο pGKβ-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 MgCl₂, β-μερκαπτοαιθανόλη, dd H₂O, τελικός όγκος 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο 37⁰ 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 δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης, που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly), και συνεκφράζεται στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν, καθώς είναι σε σύζευξη με τον υποκινητή. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί στον παράγοντα κανονικοποίησης, και 100 μl υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε δείγματος δίνεται από το λουμινόμετρο (Luminometer).

Μέτρηση της αντίδρασης της ακετυλοτρανσφεράσης χλωραμφαινικόλης (CAT assay).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργότητας ενός υποκινητή. Η εκτίμηση αυτή γίνεται έμμεσα με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστηριότητα του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφαινικόλης (CAT). Το γονίδιο CAT βρίσκεται στο πλασμίδιο αναφοράς υπό τον μεταγραφικό έλεγχο του υποκινητή υπό μελέτη. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί στον παράγοντα κανονικοποίησης και διάλυμα Tris 250 mM συνολικού όγκου 43 μl. Επίσης, στην αντίδραση προστίθενται 5 μl ακετυλοσυνενζύμου A (Acetyl-CoA) και 2 μl ραδιενεργά σημασμένης με ^{14}C χλωραμφαινικόλης (^{14}C -Chloramphenicol). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μl. Ακολουθεί επώαση στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ για 1 h και κατόπιν προσθήκη 100 μl ethyl-acetate. Στην συνέχεια, τα δείγματα υφίστανται ισχυρή ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13500 rpm για 1 min. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf και αφήνεται να στεγνώσει υπό κενό για 15 min. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 15 μl ethyl-acetate με ισχυρή ανάδευση. Ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση και κάθε δείγμα μεταφέρεται

στάγδην σε πλάκα πυριτίου και υποβάλλεται σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) σε διάλυμα που περιέχει χλωροφόρμιο/μεθανόλη σε αναλογία 95:5 (v/v). Στην συνέχεια η πλάκα πυριτίου που περιέχει τα δείγματα εκτίθεται σε X-ray φωτογραφικό φιλμ. Η σχετική μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή υπολογίζεται από τις κρούσεις των δειγμάτων στον μετρητή ραδιενέργειας (β -scintillation counter).

Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης (Western Blot).

Ίσες ποσότητες πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων από κύτταρα που έχουν επιμολυνθεί, υπόκεινται σε SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση. Σε κάθε δείγμα προστίθεται κατάλληλη ποσότητα από το 4X SDS Loading Buffer [2.5 ml Tris-HCl, 1.6 ml β -mercaptoethanol, 8 ml 20% SDS, 4 ml glycerol, 8 mg bromophenol blue]. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 8.5%, 10.5% ή 12.5% [Stacking gel: ddH₂O 1.8 ml, 30% acrylamide 0.45 ml, stacking buffer (Tris 0.5 M, SDS 0.4%, pH 6.8) 0.75 ml, 10% APS 30 μ l, TEMED 3 μ l. Running gel: ddH₂O 2.3/1.8/1.6 ml, 30% acrylamide 1.4/1.8/2.1 ml, running buffer (Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8) 1.25 ml, 10% APS 80 μ l, TEMED 4 μ l]. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε 500 ml διαλύματος 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 gr Tris, 144.2 gr Glycine, 10 gr SDS, pH 8.3), στα 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 εκπλύσεις με διάλυμα TBB [1x TBS, 5% ημιαποβουτηρωμένο γάλα, 0.05% Tween-20] 3 φορές, 10 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επωάζονται για 1 ώρα με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο ή την πρωτεΐνη, σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα TBB. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 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 ECL-hyperfilm ή σε Fuji medical X-Ray film (Super RX) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Οι μεμβράνες μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν για εκ νέου ανίχνευση διαφορετικού επίτοπου, αφού υποβληθούν σε διαδικασία stripping, με χρήση κατάλληλου διαλύματος (Stripping buffer : 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7) και επώαση στους 50⁰ C για 30 λεπτά, με παροδική ανάδευση. Ακολουθούν εκπλύσεις και επωάσεις των μεμβρανών, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Καθαρισμός πρωτεϊνών που φέρουν τον επίτοπο GST, από κύτταρα E.coli.

Μετά τον μετασχηματισμό κυτταρών DH10B της E.coli με το πλασμίδιο έκφρασης GST-protein, επιμολύνονται, με μία μόνο αποικία, 25 ml καλλιέργειας LB/ampicillin. Η καλλιέργεια επωάζεται στους 37⁰ C overnight, και την επόμενη μέρα μεταφέρεται σε καλλιέργεια 200 ml LB/ampicillin. Ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD), που μετράται στα 600 nm, να φτάσει στο 0.6-0.8. Κατόπιν προστίθεται ο παράγοντας επαγωγής της πρωτεϊνικής έκφρασης IPTG σε τελική συγκέντρωση 0.1 mM, και η καλλιέργεια επωάζεται κατά προτίμηση στους 30⁰ C - ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση της εκφραζόμενης πρωτεΐνης - για 4-5 ώρες ακόμα. Στη συνέχεια, η φλάσκα με την καλλιέργεια παγώνεται για 5 λεπτά στους 4⁰ C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 3500 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰ C, και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 8 ml παγωμένου PBS. Το εναιώρημα υφίσταται sonication 6 φορές επί 15 δευτερόλεπτα, με ενδιάμεσα διαλλείματα των 30 δευτερολέπτων, μέχρι να καταστεί διαυγές, ενώ η όλη διεργασία γίνεται κρατώντας τα δείγματα σε πάγο. Κατόπιν προστίθενται 400 μl 20% Triton-X-100 (τελική συγκέντρωση 1%), τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται στους 4⁰ C για 30 λεπτά και φυγοκεντρώνονται στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰ C. Εφ' όσον η GST protein εκφράζεται στο πρώτο υπερκείμενο, προστίθενται σε αυτό 250 μl 50% σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, εξισορροπημένων σε PBS. Τα δείγματα αφήνονται σε περιστροφή, overnight στους 4⁰ C. Στην περίπτωση που η GST-protein παγιδεύεται σε σωματίδια και μεμβράνες, μετά την φυγοκέντρηση κάθε πελέτα επαναδιαλύεται σε 400 μl solubilization buffer (25 mM Triethanolamine 7.51M, 1.5% Sarcosyl, 1 mM EDTA). Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται στους 4⁰ C για 10 λεπτά και κατόπιν προστίθενται 8μl Triton X-100 1% και 4 μl CaCl₂ 0.1M. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰ C και στο υπερκείμενο προστίθενται τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, όπως παραπάνω.

Το επόμενο πρωί τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4⁰ C. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια υφίστανται για 3 φορές την ακόλουθη διαδικασία : έκπλυση με 1 ml παγωμένου PBS/1% Triton, περιστροφή για 5 λεπτά στους 4⁰ C, και φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 λεπτά, στους 4⁰ C. Μετά την τελευταία έκπλυση, στα σφαιρίδια προστίθεται 1000 μl PBS, και ύστερα από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απόρριψη του υπερκειμένου, στα σφαιρίδια προστίθενται 250μl PBS. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους 4⁰ C. Σε 10-20 μl δείγματος προστίθεται ίσος όγκος 4x SDS Loading Buffer, και μετά από βρασμό για 5 λεπτών, αναλύεται η έκφραση της GST-protein σε 8.5% ή 10.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα βάφεται με χρωστική Commasie, που καθιστά ορατές τις πρωτεΐνες.

***In vitro* αλληλεπίδραση πρωτεϊνών (pull-down).**

Μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας επιμόλυνσης COS-7 ή HEK 293T κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης A, την αλλαγή του θρεπτικού, τις εκπλύσεις με PBS, την αποκόλληση με ξύστρο και τη φυγοκέντρηση (βλ. παραπάνω), τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 200 μl WCE (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 400 mM KCl, 10% Glycerol, και 2 mM DTT και πρωτεϊνικοί αναστολείς που προστίθενται λίγο πριν τη χρήση). Ακολουθεί διαδικασία παγώματος στους - 80⁰ C και ξεπαγώματος σε πάγο (freeze and thaw) για 3 φορές, έτσι ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Μετά την φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 5 λεπτά και την απομάκρυνση του debris, το υπερκείμενο φυλάσσεται στους - 80⁰ C. Σε 100 μl αυτού του υπερκειμένου, προστίθενται 200 μl από GST-protein B (βλ. τρόπο παρασκευής παραπάνω) εξισορροπημένης σε 2x Interaction Buffer (40 mM Hepes pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 0.4% NP40, 0.4% BSA, 15% Glycerol, 4 mM PMSF και αναστολείς της πρωτεόλυσης). Εναλλακτικά, αντί για πρωτεϊνικά εκχυλίσματα επιμολυσμένων κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα της *in vitro* μεταγραφής και μετάφρασης, παρουσία ραδιενεργά σημασμένης με ³⁵S μεθειονίνης, πλασμιδίων έκφρασης. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας Sigma. Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 50 μl, εκ των οποίων χρησιμοποιούνται 20 μl για κάθε αλληλεπίδραση με 200 μl GST-protein B. Και στις δύο περιπτώσεις προστίθεται dd H₂O, ώστε ο τελικός όγκος να ανέρχεται στα 400 μl. Ακολουθεί περιστροφή για 1.5 ώρες στους 4⁰ C. Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, γίνεται δύο εκπλύσεις με διάλυμα 1 και μία με το διάλυμα 2 (Διαλύματα 1 και 2: 100 mM KCl και 250 mM KCl αντίστοιχα, 20 mM

Hepes pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 0.2% NP40, 4 mM PMSF, και αναστολείς της πρωτεόλυσης). Μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου, στα σφαιρίδια προστίθενται 100 μl 2x SDS Loading Buffer. Ακολουθεί βρασμός για 5 λεπτά και ανίχνευση της πρωτεΐνης A (ή του επιτόπου της, εάν φέρει) με ηλεκτροφόρηση σε 8.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης, και μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (βλ. παραπάνω).

Το σύστημα της *in vivo* βιοτινυλίωσης πρωτεϊνών και η συνκατακρήμνιση αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών (*in vivo* biotinylation).

Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακό φορέα έκφρασης έστω μιας πρωτεΐνης 1 σε σύζευξη με το πεπτίδιο Bio, 22 αμινοξέων, το οποίο υφίσταται βιοτινυλίωση με την συνέκφραση της λιγάσης BirA (βακτηριακής προέλευσης). Τα κύτταρα συνεπιμολύνθηκαν και με τον φορέα έκφρασης έστω της πρωτεΐνης 2. Περίπου 32 ώρες μετά την επιμόλυνση των κυττάρων, ακολουθεί έκπλυση με παγωμένο PBS διάλυμα, αναρρόφηση και προσθήκη 1 ml διαλύματος λύσης (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, 10 μl/ml 100 mM PMSF και 10 μl αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα τρυβλία αφήνονται σε ανακινούμενη πλατφόρμα για 20 λεπτά. Κατόπιν, τα κύτταρα αποκολλώνται με ξύστρο, φυγοκεντρώνται στις 13000 rpm για 3 λεπτά, στους 4⁰ C. Από το υπερκείμενο κρατείται ποσότητα 100 μl που θα χρησιμοποιηθεί στην πρωτεϊνική ανάλυση. Στη συνέχεια, σε κάθε δείγμα προστίθενται 40 μl 50% σφαιριδίων στρεπταβιδίνης που χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια και μεγάλη ειδικότητα πρόσδεσης σε βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες και που έχουν προηγουμένως εξισορροπηθεί με διάλυμα TBS-T 0.1%. Στα σφαιρίδια αυτά προσκολλάται η βιοτινυλιωμένη πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη 2 αν και εφ'όσον αυτή αλληλεπιδρά με την πρώτη. Τα δείγματα αφήνονται να περιστρέφονται overnight στους 4⁰ C. Το επόμενο πρωί ακολουθεί στιγμιαία φυγοκέντρηση και έκπλυση με 1 ml παγωμένου διαλύματος λύσης για κάθε δείγμα, με περιστροφή στους 4⁰ C και μετά από στιγμιαία φυγοκέντρηση η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές. Ακολουθεί προσθήκη 12.5 μl 4x SDS Loading Buffer. Μετά από βρασμό 5 λεπτών, αναλύεται η ηλεκτροφορητική ικανότητα των δειγμάτων σε 10.5% πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Ακολουθεί μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, και ανίχνευση της παρουσίας της πρωτεΐνης 2, με χρησιμοποίηση αντισώματος έναντι αυτής ή του επιτόπου της. Η ανίχνευση της πρωτεΐνης 2 υποδηλώνει την αλληλεπίδραση των

πρωτεϊνών 1 και 2. Η έκφραση των βιοτινιλιωμένων πρωτεϊνών ανιχνεύεται με χρήση ενός πολυμερούς που φέρει στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Η ανίχνευση αυτή επιτυγχάνεται με επώαση των μεμβρανών (μετά από stripping) με streptavidin-HRP σε αραιώση 1: 10000 TBS-T 0.1% για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 λεπτών η κάθε μία με TBS-T 0.1%, και 1 έκπλυση των 5 λεπτών σε TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL) όπως περιγράφεται παραπάνω.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)

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

Τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές, για 3 λεπτά τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου και αργά περιστρεφόμενη πλατφόρμα, με 1.5 ml/well PBS^{+/+} (PBS, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂). Ακολουθεί σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) με 1 ml/well διαλύματος 3% π-formaldehyde σε PBS^{+/+}, για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνεται το στάδιο της έκπλυσης για 2 ακόμα φορές με τον ίδιο τρόπο. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές, ώστε τα αντισώματα να περνούν στο εσωτερικό τους, με χρήση διαλύματος 1 ml/well 0.5% Triton-X-100 σε Buffer 1 (10x Buffer 1 : 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.1 mM Na₂HPO₄·2H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 5.5 mM glucose, 4 mM NaHCO₃, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 20 mM MES, pH 6.0-6.5). Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και χωρίς ανακίνηση. Επαναλαμβάνονται 2 εκπλύσεις όπως περιγράφονται παραπάνω, καθώς και 2 ακόμα με τον ίδιο τρόπο, αλλά σε διάλυμα 1.5 ml/well PBS^{+/+}/1.5% FBS (χρησιμοποιείται για μπλοκάρισμα μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης αντισωμάτων). Στη συνέχεια τα κύτταρα επωάζονται με 50 μ l πρωταρχικού αντισώματος, το οποίο αραιώνεται 1:200 σε διάλυμα PBS^{+/+}/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στους 4⁰ C, σε επίπεδη επιφάνεια για 30 λεπτά. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με τον τρόπο που έχει περιγραφεί και σε διάλυμα PBS^{+/+}/1.5% FBS. Κατόπιν τα κύτταρα επωάζονται με 50 μ l δευτερεύοντος αντισώματος IgG-FITC, το

οποίο αραιώνεται 1:50 σε διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS. Η επώαση γίνεται στο σκοτάδι (καθώς το IgG-FITC είναι φωτοευαίσθητο), στους 4⁰ C, σε επίπεδη επιφάνεια και για 30 λεπτά. Η περαιτέρω διεργασία πραγματοποιείται στο σκοτάδι. Γίνονται 2 εκπλύσεις με διάλυμα PBS+/-/1.5% FBS, και 2 ακόμα με διάλυμα PBS+/-/. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχουν προστεθεί 7 μl διαλύματος μονιμοποίησης (Glycerol/PBS 1:1). Τα όρια επαφής καλυπτρίδας-αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα διατηρούνται στους 4 C⁰ και σε σκοτάδι, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται είτε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Olympus BH-2) είτε σε μικροσκόπιο συνεστίασης Leica SP confocal fluorescent microscopy και η φωτογράφησή τους με 35 mm Olympus (C-35AD-4) camera.

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

Επαναλαμβάνεται η διαδικασία που περιγράφεται στον έμμεσο ανοσοφθορισμό, με την διαφορά ότι τα κύτταρα επιμολύνονται με υβριδική με την GFP πρωτεΐνη. Μετά την σταθεροποίηση των κυττάρων (fixing) και τις 2 εκπλύσεις με το διάλυμα PBS+/- (PBS, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂), η πρωτεΐνη που είναι συζευγμένη με την GFP μπορεί να παρατηρηθεί άμεσα σε μικροσκόπιο φθορισμού, χάρη στον πράσινο φθορισμό που εκπέμπει η GFP.

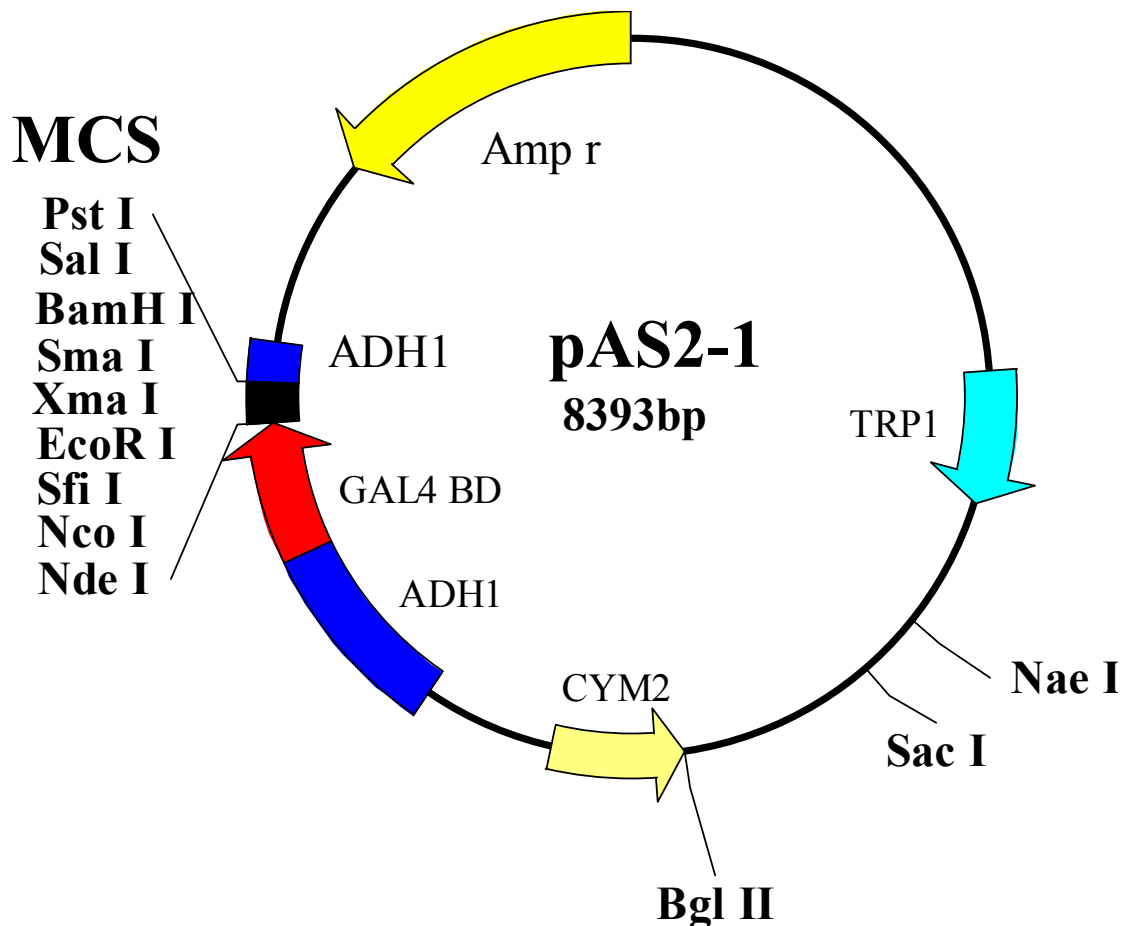
Έκφραση της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης σε κύτταρα σακχαρομύκητα.

Ο pAS2-1 πλασμιδιακός φορέας έκφρασης σε κύτταρα σακχαρομύκητα (**Εικόνα 22**) υπέστη πέψη με τα ένζυμα περιορισμού EcoR I/Sal I και ακολούθησε αντίδραση σύνδεσης (ligation) με τα αγρίου τύπου (wt) και 143-248 cDNAs της Smad3 που είχαν επίσης προέλθει με πέψεις από τα αντίστοιχα pcDNA3amp 6myc πλασμίδια, χρησιμοποιώντας τα περιοριστικά ένζυμα EcoR I/ Sla I (Xho I).

Το στέλεχος pJ694 του σακχαρομύκητα *S. cerevisiae* ήταν ευγενική προσφορά του Δρ. Δ. Τζαμαρία (IMBB, Ηράκλειο, Κρήτη). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό μέσο YPD που περιέχει 1% yeast extract, 2% Bacto-peptone και 2% glucose. Το στέλεχος pJ694 μετασχηματίστηκε (transformation) με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pAS2-1, ή pAS2-1-Smad3 wt, ή pas2-1-Smad3 (143-248), χρησιμοποιώντας οξικό λίθιο (lithium acetate) και heat shock. Τα μετασχηματισμένα στελέχη που φέρουν το επιθυμητό πλασμιδίο επιλέχθηκαν με βάση την ανάπτυξή

τους σε ελάχιστο θρεπτικό YNB που αποτελείται από 0.67% yeast nitrogen base (YNB) χωρίς αμινοξέα, καθώς και σε θρεπτικό 2% glucose (YNBD) που περιέχει 0.6% casamino acids, αδενίνη και ουρακίλη. Η ικανότητα μεταγραφικής δραστηριότητας αυτών των στελεχών ελέγχθηκε με βάση την ικανότητα ανάπτυξής τους στις ακόλουθες αναλύσεις :

- Ade (-) ανάλυση [ανάπτυξη σε θρεπτικό που δεν περιέχει αδενίνη],
- AT/His (-) ανάλυση [ανάπτυξη σε θρεπτικό που δεν περιέχει ιστιδίνη αλλά έχει 5, 10 ή 20 mM aminotriazol (AT) που καταστέλλει την αυξοτροφία σε ιστιδίνη την οποία προσδίδει η μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή από τις Smad πρωτεΐνες],
- X-gal ανάλυση [ανάπτυξη σε θρεπτικό που περιέχει 0.4% X-gal].



Εικόνα 22. Ο πλασμιδιακός φορέας pAS2-1. Ο φορέας αυτός εκφράζεται σε κύτταρα σακχαρομύκητα *S. Cerevisiae* και σε αυτόν κλωνοποιήθηκε τόσο η αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη, όσο και η ελλειμματική 143-248 Smad3, κατόπιν πέψης με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και SalI.

Πίνακας I: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCRs)

Όνομα ολιγονουκλεοτιδίου	Αλληλουχία	Σκοπός
1N-Smad3myc sense	5' CTGGAATTCATGTCGTCCATCCTGCCTTTCACTC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό των 1-227 και 250-424 περιοχών της Smad3myc, για την κατασκευή της Smad3 Δ228-249. (εκμαγείο: τα προϊόντα των 224S-425C και 1N -254AS αντιδράσεων.)
425C-SMAD3 antisense	5' AATGCGGCCGCCTAAGACACACTGGAACAGCGGAT 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό των 1-227 and 250-424 περιοχών της Smad3myc, για την κατασκευή της Smad3 Δ228-249. (εκμαγείο: τα προϊόντα των 224S-425C και 1N -254AS αντιδράσεων.)
Smad3 224 S sense	5' GTTACCTACTGCGAGCCGCACGCCTCGCAGCCATCC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 250-424 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 Δ228-249. (εκμαγείο: Smad3myc).
Smad3 254 AS Antisense	5' GGATGGCTGCGAGGCGTGCGGCTCGCAGTAGGTAAC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 1-227 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 Δ228-249. (εκμαγείο: Smad3myc).

Πίνακας II: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινήτες (primers) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCRs)

192N Smad3 Δ200-230 sense	5' AGTGACCACCAGATGAACCACAGCTTCTGGTGCTCCATCTCCTACTAC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 230-424 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 Δ200-230 (εκμαγείο: Smad3myc).
238C Smad3 Δ200-230 antisense	5' GTAGTAGGAGATGGAGCACCAGAAGCTGTGGTTCATCTGGTGGTCACT 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 1-200 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 Δ200-230 (εκμαγείο: Smad3myc).
234N Smad3 E239A sense	5' TCCATCTCCTACTACGCGCTGAACCAGCGCGTC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 234-424 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 E239A (εκμαγείο: Smad3myc).
244C Smad3 E239A antisense	5' GACGCGCTGGTTCAGCGCGTAGTAGGAGATGGA 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 1-244 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η Smad3 E239A (εκμαγείο: Smad3myc).
248C Smad3 E239A antisense	5' AATGCGGCCGCCTAGAATGTCTCCCCGACGCGCTGGTTCAGCGCGTAGTAGGA 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 143-248 της Smad3myc ώστε να κατασκευαστεί η 143-248 E239A Smad3 (εκμαγείο: Smad3myc).

Πίνακας III: ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές (primers) σε αλυσιδωτές αντιδράσεις της πολυμεράσης (PCRs)

GAL4 sense	5' GACTAAGCTTGCCATGAAGCTACTGTCTTCTATCGAAC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό των GAL4 130-248 (εκμαγείο: GAL4 130-424) και των GAL4 230-248, GAL4 230-290, GAL4 230-374 (εκμαγείο: GAL4 230-424) περιοχών της GAL4 Smad3.
248C-SMAD3 antisense	5' AATGCGGCCGCCTAGAAATGTCTCCCCGACGCGCTG 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό των GAL4 130-248 (εκμαγείο: GAL4 130-424), GAL4 230-248 (εκμαγείο: GAL4 230-424) και 143-248, 172-248, 201-248 (εκμαγείο: Smad3 myc) περιοχών της Smad3.
290C-SMAD3 antisense	5' AATGCGGCCGCCTAGATGTGTCTCCGTGTCAGCTC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της GAL4 230-290 (εκμαγείο: GAL4 230-424) περιοχής της GAL4 Smad3.
374C-SMAD3 antisense	5' AATGCGGCCGCCTACATGCGGATGGTGACATTTCG 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 3' primer για τον πολλαπλασιασμό της GAL4 230-374 (εκμαγείο: GAL4 230-424) της GAL4 Smad3.
143N-SMAD3-MYC sense	5' CTGGAATTCCACACAGAGATCCCGGCCGAGTTCCC 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της 143-248 (εκμαγείο: Smad3 myc) περιοχής της Smad3.
172N-SMAD3-MYC sense	5' CTGGAATTCCTCCAGAGCAATATTCCAGAGACCCCA 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της 172-248 (εκμαγείο: Smad3 myc) περιοχής της Smad3.
201N-SMAD3-MYC sense	5' CTGGAATTCGACGCAGGTTCTCCAAACCTATCCCCG 3'	Χρησιμοποιήθηκε ως 5' primer για τον πολλαπλασιασμό της 201-248 (εκμαγείο: Smad3 myc) περιοχής της Smad3.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΝΟΤΗΤΑ Ι

Καταστολή της TGFβ σηματοδότησης από την Λανθάνουσα Μembrανική Πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr

Ο ιός Epstein-Barr παρεμβαίνει στην ογκοκατασταλτική TGFβ σηματοδότηση και ο κύριος επαγωγέας αυτού του ανταγωνισμού, στα Β-λεμφοκύτταρα, είναι η LMP1 πρωτεΐνη (Arvanitakis et al., 1995). Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη αμφισβητεί τον κρίσιμο ρόλο της LMP1 πρωτεΐνης στην καταστολή της TGFβ επαγόμενης αύξησης των Β-λεμφοκυττάρων. Προκειμένου να καθορισθεί η αλληλεπίδραση των LMP1 και TGFβ σηματοδοτικών μονοπατιών σε μοριακό επίπεδο και να αναγνωρισθεί ο μηχανισμός της αλληλεπίδρασης σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 23Α** ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο αναφοράς το οποίο αποτελείται από το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (firefly luciferase) υπό τον έλεγχο ενός συνθετικού υποκινητή που αποτελείται από 12 θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Smad3, σε σύντηξη με την ελάχιστη περιοχή του E1B αδενικού υποκινητή. Σχηματική αναπαράσταση του συνθετικού υποκινητή p(CAGA)₁₂-E1B-luc φαίνεται στην **Εικόνα 23B**. Η μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή αυξήθηκε σημαντικά (κατά 17.4 φορές) στα κύτταρα HEK 293T όταν η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε παρουσία 200 pM TGFβ. Η TGFβ επαγόμενη ενεργοποίηση του υποκινητή μειώθηκε στις 3 φορές (μείωση κατά 83%) με την συνέκφραση της LMP1 πρωτεΐνης. Η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης από την LMP1 σε κύτταρα HEK 293T επιβεβαιώθηκε με την χρήση του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5, ή με χρήση των επαγωγέων της TGFβ σηματοδότησης, Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών. Ο ca-ALK5 ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή κατά 13.7 φορές ενώ η συνέκφραση της LMP1 μείωσε την ενεργοποίηση αυτή σε 1.8 φορές (μείωση κατά 87%). Ομοίως, οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες ενεργοποίησαν τον υποκινητή κατά 17.9 φορές και η συνέκφραση της LMP1 μείωσε την ενεργοποίηση αυτή σε 4.6 φορές (μείωση κατά 75%).

Στην συνέχεια ελέγχθηκε η επίδραση της LMP1 πρωτεΐνης στην TGFβ σηματοδότηση σε κύτταρα ινοβλαστών COS-7. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 24A**, ο ca-ALK5 και οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες ενεργοποιούν μεταγραφικά τον υποκινητή κατά 18 φορές περίπου, και η ενεργοποίηση αυτή μειώνεται στις 2.4 φορές (μείωση κατά 85%), με την υπερέκφραση της LMP1. Επιπλέον, η καταστολή της Smad3/4 επαγόμενης ενεργοποίησης του υποκινητή από την LMP1 πρωτεΐνη σε κύτταρα COS-7 είναι δοσο-εξαρτώμενη, όπως υποδεικνύει η **Εικόνα 24B**. Αρκούν 25 ng του φορέα έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης για να καταστείλουν αποτελεσματικά την μεταγραφική δραστηριότητα των Smad3/4 πρωτεϊνών.

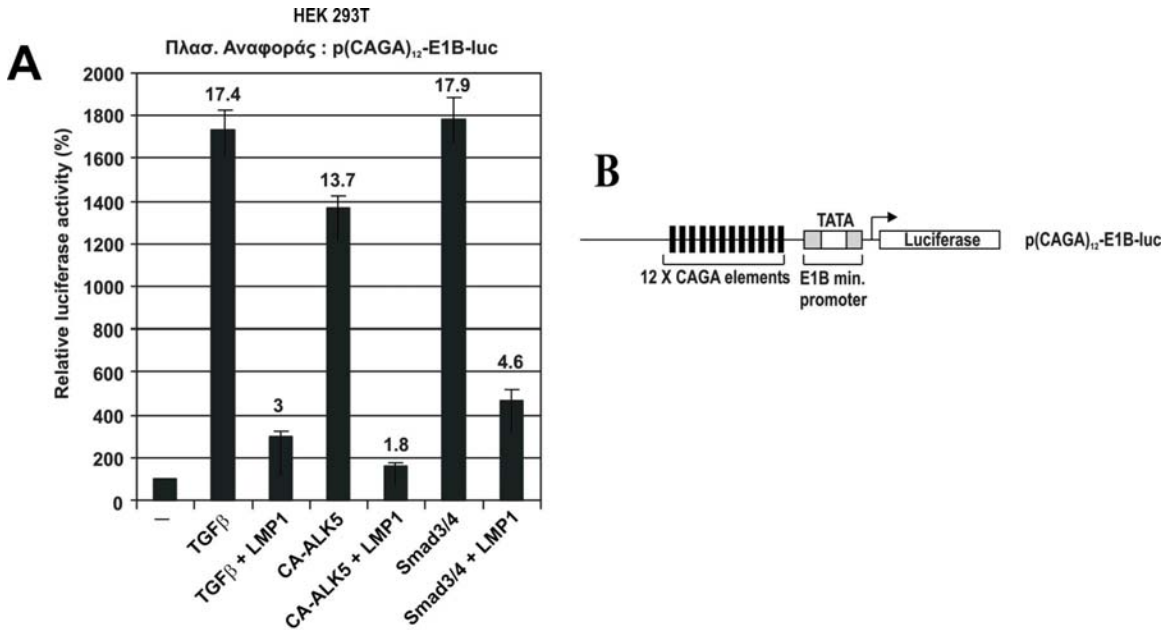
Συνολικά τα αποτελέσματα των **Εικόνων 23 και 24** υποδηλώνουν ότι η έκφραση της LMP1 πρωτεΐνης σε επιθηλιακά κύτταρα ή σε ινοβλάστες καταστέλλει την TGFβ σηματοδότηση και την Smad3/4 επαγόμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής και συνεπώς, ότι η αλληλεπίδραση των δύο σηματοδοτικών μονοπατιών είναι ανταγωνιστική.

Η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλλει την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση των υποκινητών p21/WAF1/Cip-1 και Smad7

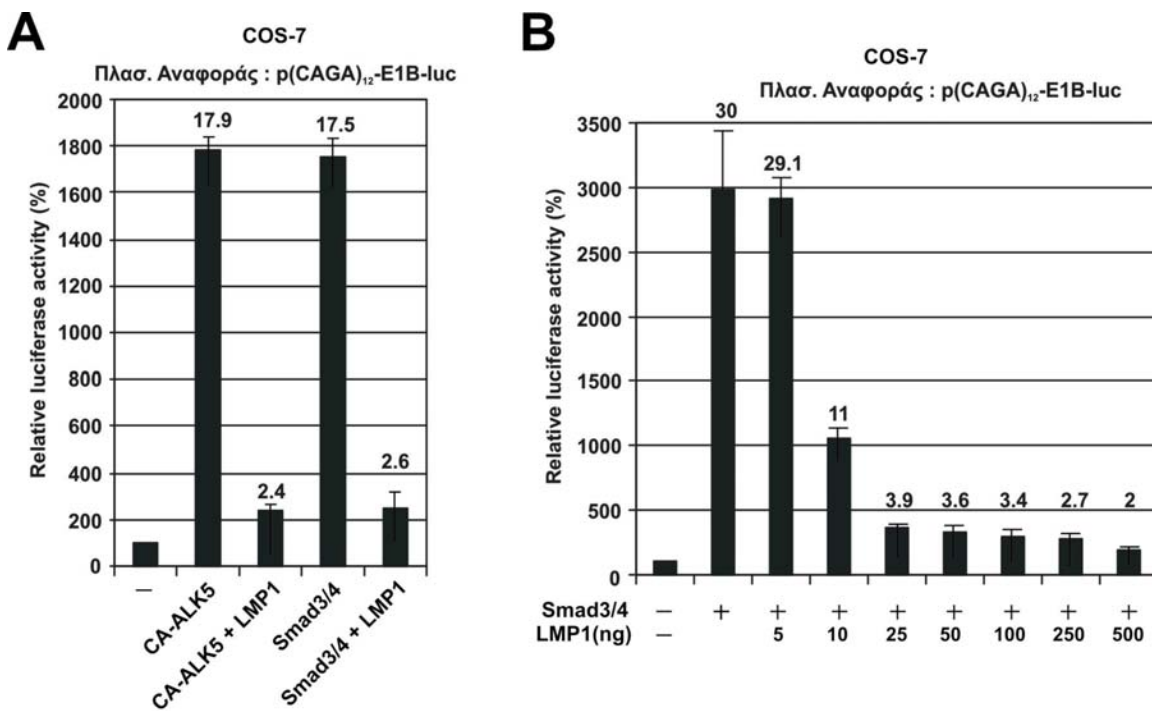
Η επίδραση της LMP1 πρωτεΐνης στην TGFβ σηματοδότηση ελέγχθηκε περαιτέρω με την χρήση δύο φυσικών και TGFβ επαγόμενων υποκινητών: του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου αναστολής του κυτταρικού κύκλου p21/WAF1/Cip-1 και του υποκινητή του γονιδίου του ποντικού Smad7. Όπως δείχνει η **Εικόνα 25A**, οι Smad3/4 πρωτεΐνες ενεργοποιούν μεταγραφικά τον ανθρώπινο -2300/+8 p21 υποκινητή κατά 2.2 φορές σε κύτταρα COS-7. Η συνέκφραση της LMP1 κατέστειλε την δραστηριότητα των Smad3/4 κατά 91% και την βασική μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή κατά 60%. Η υπερέκφραση Smad3/4 σε κύτταρα COS-7 ενεργοποίησε ισχυρά (κατά 7.2 φορές) τον υποκινητή -4200/+110 Smad7 του ποντικού, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 25B**. Η συνέκφραση της LMP1 κατέστειλε την δραστηριότητα των Smad3/4 κατά 94% και την βασική μεταγραφική δραστηριότητα του Smad7 υποκινητή κατά 50%.

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 25** υποδηλώνουν ότι η LMP1 πρωτεΐνη είναι ένας ισχυρός καταστολέας της ενεργότητας των p21/WAF1/Cip-1 και Smad7 υποκινητών και

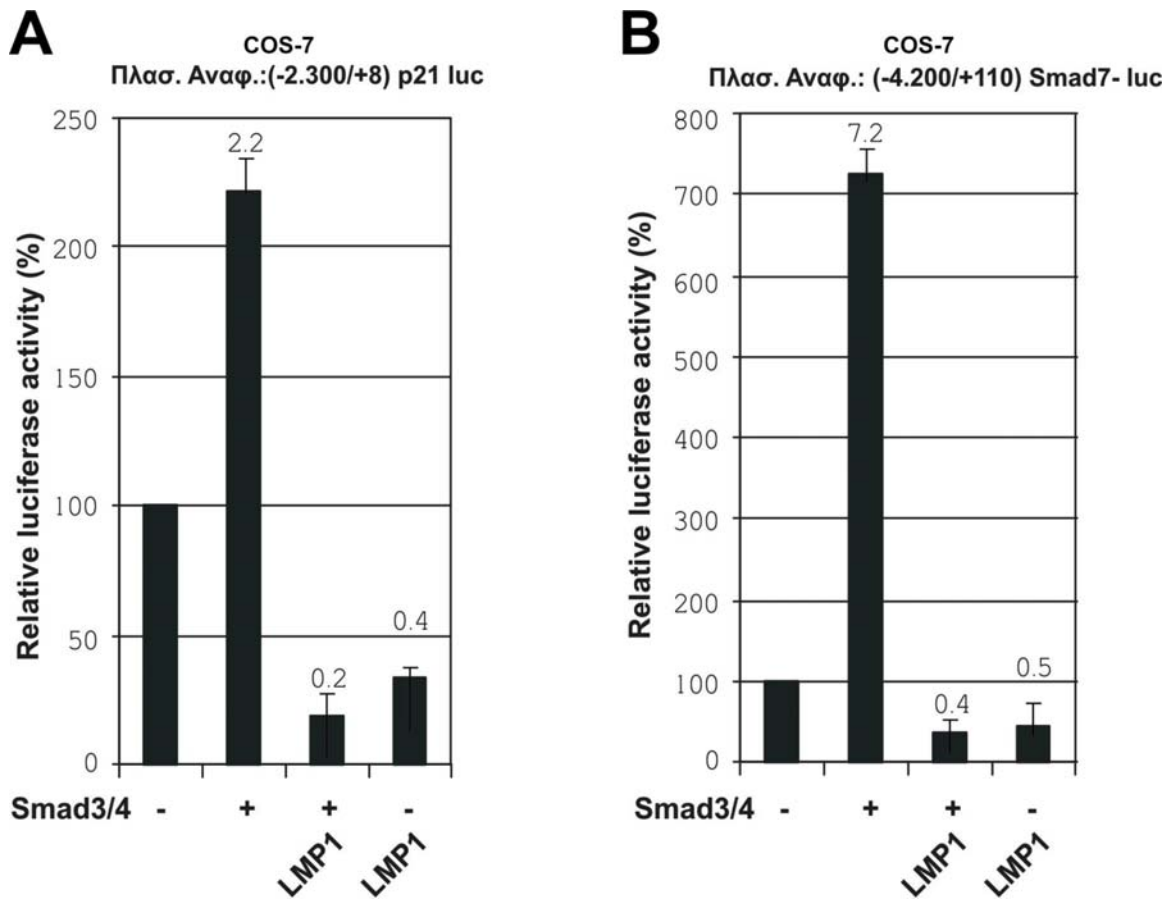
ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση αυτών των υποκινητών από τις Smad3/4 πρωτεΐνες καταστέλεται πλήρως από την LMP1.



Εικόνα 23. Η Λανθάνουσα Μembrανική Πρωτεΐνη 1, (Latent Membrane Protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr καταστέλει την TGFβ σηματοδότηση και την Smad-επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα, σε κύτταρα HEK 293T. **A.** Ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), ή παρουσία του TGFβ (200 pM) και του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της LMP1 σε ποσότητα 1 μg. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Εναλλακτικά, χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5 (1 μg), ή των πρωτεϊνών 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 (1 μg από τον κάθε ένα), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της LMP1 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. **B.** Σχηματική αναπαράσταση του συνθετικού υποκινητή p(CAGA)₁₂-E1B-Luc που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα και σε επόμενες αναλύσεις μεταγραφικής δραστικότητας.



Εικόνα 24. Η Λανθάνουσα Μεμβρανική Πρωτεΐνη 1, (Latent Membrane Protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr καταστέλει την TGFβ σηματοδότηση και την Smad-επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα, σε κύτταρα COS-7. Α. Κύτταρα ινοβλαστών πιθήκου COS-7, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (1 μg), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης (1 μg). Εναλλακτικά, αντί του ALK5, χρησιμοποιήθηκαν, οι φορείς έκφρασης των *6myc-Smad3* και *6myc-Smad4* πρωτεϊνών (σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **Β.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των *6myc-Smad3* και *6myc-Smad4* πρωτεϊνών (σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα), απουσία ή παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων της LMP1 πρωτεΐνης, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **Α-Β.** Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



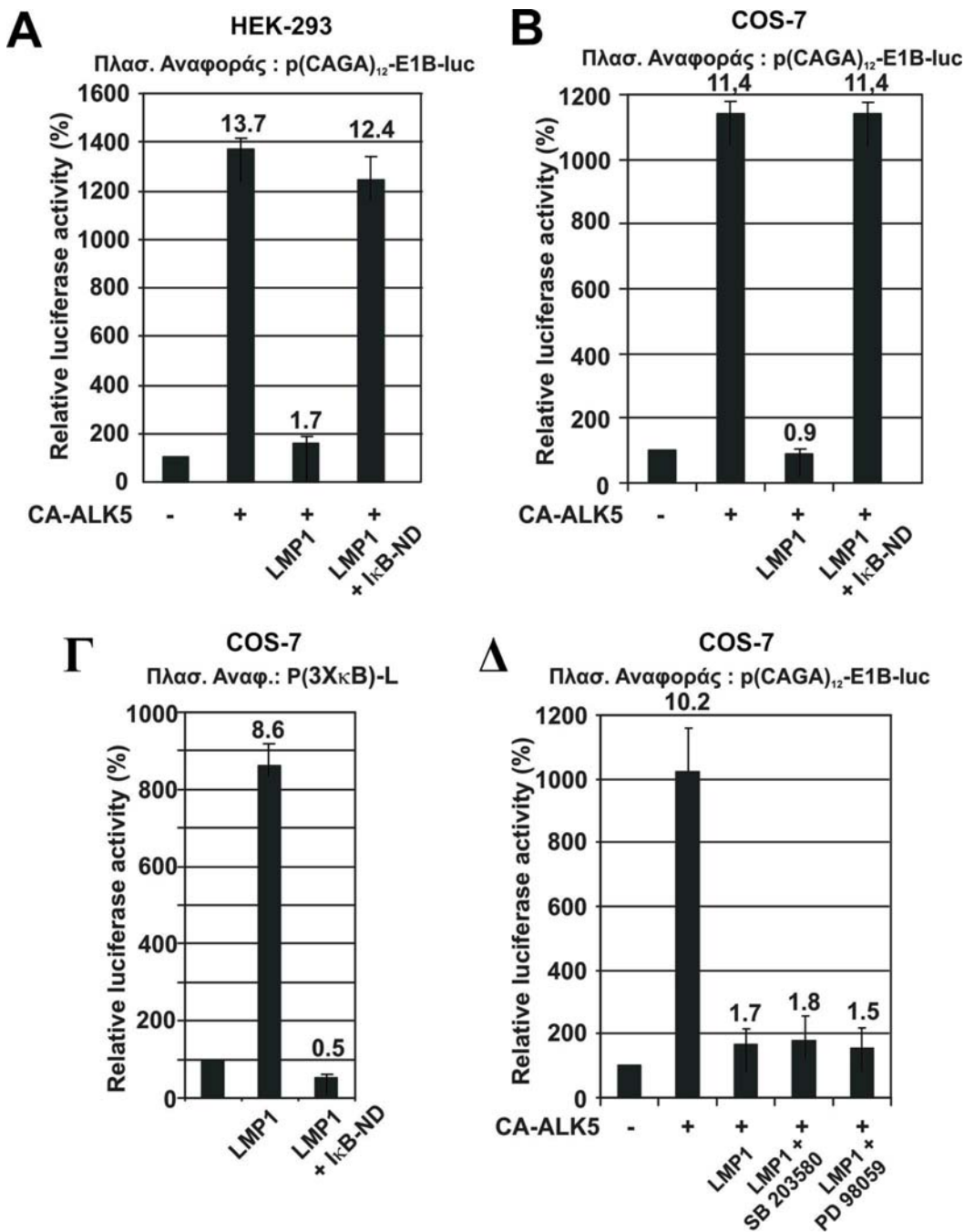
Εικόνα 25. Η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλει την Smad3/Smad4 επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του p21/WAF1/Cip1 υποκινητή του ανθρώπου και του Smad7 υποκινητή του ποντικού. **A.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς που εκφράζει τον συνθετικό υποκινητή (-2.300/+8) p21-luc (1 μg) και τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης των 6myc-Smad3, 6myc-Smad4 και LMP1 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. **B.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς που εκφράζει τον συνθετικό υποκινητή (-4.200/+110) Smad7-luc. **A-B.** Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Μια μεταλλαγμένη, μη αποικοδομήσιμη μορφή του IκB αναστέλλει την κατασταλτική δράση της LMP1 πρωτεΐνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ

Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνεισφορά του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον μηχανισμό της LMP1 επαγόμενης καταστολής της TGFβ σηματοδότησης, κύτταρα HEK 293T και COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-luc και τον φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5, απουσία ή παρουσία της πρωτεΐνης LMP1 και μιας μη αποικοδομήσιμης μορφής του IκB (IκB-ND), η οποία είναι γνωστό ότι καταστέλλει το μονοπάτι του NF-κB, κρατώντας αυτόν τον μεταγραφικό παράγοντα στο κυτταρόπλασμα. Όπως φαίνεται στις **Εικόνες 26 Α και Β**, η πρωτεΐνη ca-ALK5 ενεργοποίησε τον συνθετικό υποκινητή (CAGA)₁₂ κατά 13.7 και 11.4 φορές στα κύτταρα HEK 293T και COS-7 αντίστοιχα, ενώ η συνέκφραση της LMP1 στις δύο κυτταρικές σειρές κατέστειλε δραστικά την μεταγραφική δραστηριότητα του ca-ALK5 κατά 58.6% και 110.5% φορές, αντίστοιχα. Η υπερέκφραση της IκB-ND ανέστειλε την LMP1 επαγόμενη καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας του ca-ALK5 (ενεργοποίηση κατά 12.4 και 11.4 φορές στα HEK 293T και COS-7 κύτταρα, αντίστοιχα).

Η αποτελεσματικότητα της IκB-ND μορφής στην καταστολή της NF-κB ενεργότητας εκτιμήθηκε στα κύτταρα COS-7 που επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XκB-L). Ο συνθετικός υποκινητής που εκφράζεται από αυτό το πλασμίδιο περιέχει τρεις θέσεις πρόσδεσης του NF-κB παράγοντα και ελέγχει την μεταγραφή του γονιδίου της λουσιφεράσης. Η έκφραση της LMP1 πρωτεΐνης επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση αυτού του συνθετικού υποκινητή κατά 8.6 φορές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 26Γ**. Η μεταλλαγμένη IκB-ND κατέστειλε πλήρως την LMP1 επαγόμενη δραστηριότητα του υποκινητή. Αντιθέτως, η χρήση ενός ειδικού καταστολέα της p38 MAP κινάσης (SB 203580) ή της MEK κινάσης (PD 98059) δεν μπόρεσε να αναστείλει την κατασταλτική δράση της LMP1 στην TGFβ σηματοδότηση που επάγεται από τον ca-ALK5, όπως καταδεικνύεται στην **Εικόνα 26Δ**.

Συνεπώς, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 26** υποδηλώνουν ότι η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης από την LMP1 πρωτεΐνη, επάγεται από ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB.



Εικόνα 26. Η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλει την TGFβ σηματοδότηση μέσω ενεργοποίησης του NF-κB. **A-B.** Κύτταρα HEK 293T (**A**) ή κύτταρα COS-7 (**B**), επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του συνθετικού υπικινητή (CAGA)₁₂-E1B-Luc (0.5 μg) και τον φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (0.5 μg), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης (0.5 μg) και της μεταλλαγμένης μορφής IκB-ND (1 μg) στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. **Γ.** Κύτταρα COS-7 επομολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του συνθετικού υποκινητή p(3XκB)-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των LMP1 (0.5 μg) και IκB-ND (1 μg) στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. **Δ.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον φορέα έκφρασης της LMP1 (0.5 μg) πρωτεΐνης, απουσία ή παρουσία του

αναστολέα SB 203580 της p38 MAP κινάσης, ή του αναστολέα PD 98059 της MEK κινάσης, όπως φαίνεται στο γράφημα. **A-Δ.** Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Μία από τις CTAR1/TES1 και CTAR2/TES2 περιοχές αρκεί για την LMP1 επαγόμενη καταστολή της TGFβ σηματοδότησης

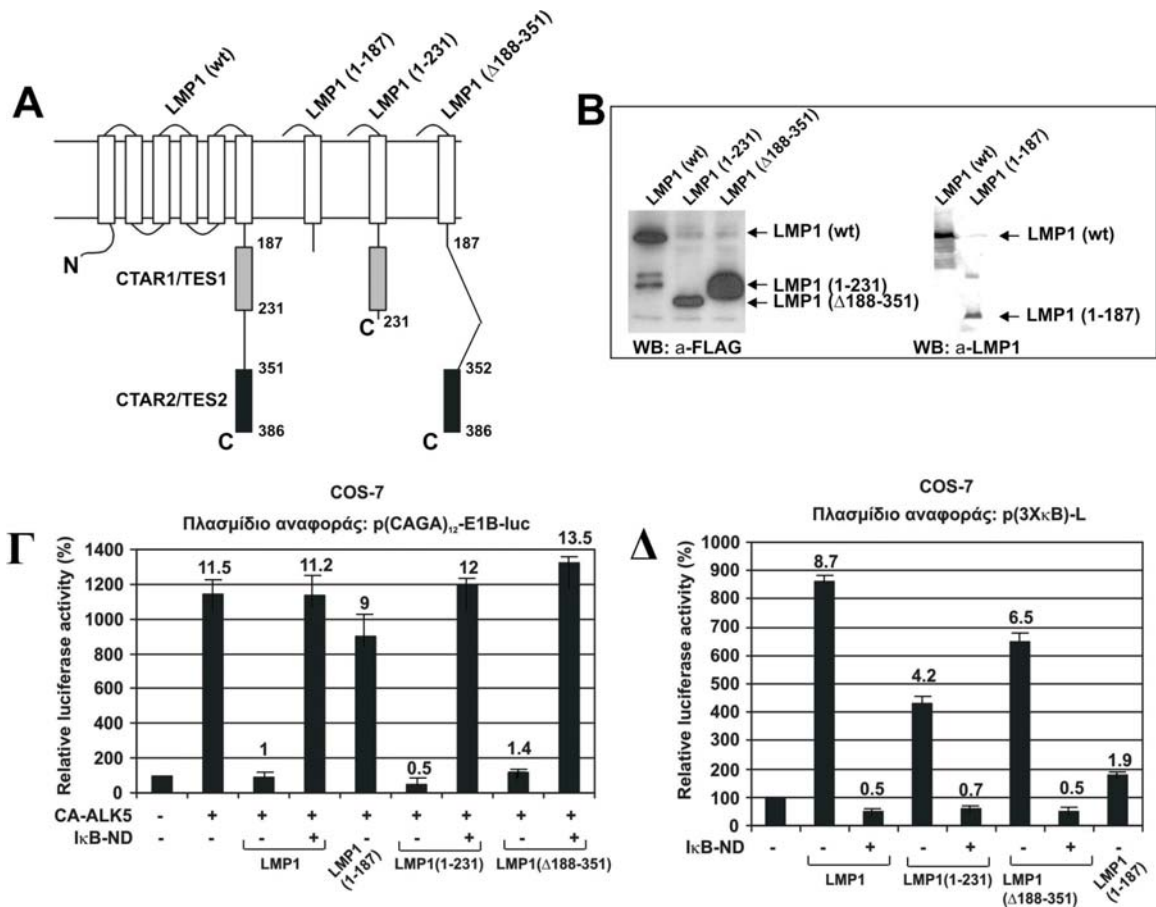
Προκειμένου να καθοριστεί η συνεισφορά κάθε μιας από τις CTAR/TES περιοχές της LMP1 πρωτεΐνης στον μηχανισμό καταστολής της TGFβ σηματοδότησης, χρησιμοποιήθηκαν οι τρεις ελλειμματικές μορφές της LMP1 που παριστάνονται σχηματικά στην **Εικόνα 27A**. Η μεταλλαγμένη LMP1 (1-187) στερείται και των δύο CTAR/TES περιοχών, η LMP1 (1-231) στερείται της αμινοξικής περιοχής 232-386 που περιέχει την CTAR2/TES2 περιοχή, αλλά διατηρεί την CTAR1/TES1 περιοχή, ενώ η LMP1 (Δ188-351) περιέχει μια εσωτερική απαλοιφή των αμινοξέων 188-351 που απομακρύνει την CTAR1/TES1 περιοχή, αλλά διατηρεί την CTAR2/TES2 περιοχή. Αυτές οι ελλειμματικές μορφές της LMP1 πρωτεΐνης εκφράστηκαν σε κύτταρα COS-7 σε επίπεδα ίδια ή μεγαλύτερα με την αγρίου τύπου LMP1 πρωτεΐνη, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27B**. Το πείραμα ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκε με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου Flag που φέρουν οι LMP1, LMP1 (1-231) και LMP1 (Δ188-351) πρωτεΐνες, ή με χρήση αντισώματος έναντι του N-τελικού άκρου της LMP1 για τον εντοπισμό της LMP1 (1-187) πρωτεΐνης.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27Γ**, η LMP1 (1-187) είναι αναποτελεσματική στην καταστολή της μεταγραφικής ενεργοποίησης του συνθετικού υποκινητή p(CAGA)₁₂-E!B-luc που προκαλεί ο ca-ALK5 (22% καταστολή σε σχέση με την 100% καταστολή που προκαλεί η αγρίου τύπου LMP1), σε κύτταρα COS-7. Αντιθέτως, τόσο η LMP1 (1-231), όσο και η LMP1 (Δ188-351) πρωτεΐνη καταστέλλουν αποτελεσματικά την ca-ALK5 σηματοδότηση, και η καταστολή αυτή όπως και εκείνη που προκαλεί η αγρίου τύπου LMP1, εξουδετερώνεται από την συνέκφραση της μεταλλαγμένης IκB-ND.

Η μεταγραφική δραστικότητα των παραπάνω ελλειμματικών μορφών της LMP1 ελέγχθηκε με ένα παράλληλο πείραμα μεταγραφικής ενεργοποίησης που

πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα COS-7, που επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XkB-L), το οποίο φέρει τρεις θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 27Α**, η αγρίου τύπου LMP1 ενεργοποιεί τον υποκινητή κατά 8.7 φορές, η απαλοιφή της CTAR2/TES2 περιοχής (LMP1 1-231) μειώνει την ενεργοποίηση στις 4.2 φορές (μείωση κατά 52%), και η απαλοιφή της CTAR1/TES1 περιοχής (LMP1 Δ188-351) μειώνει την ενεργοποίηση στις 6.5 φορές (μείωση κατά 25%). Τέλος, η απαλοιφή και των δύο CTAR1/TES1 και CTAR2/TES2 περιοχών μειώνει την ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή στις 1.9 φορές (μείωση κατά 78%). Σε όλες τις περιπτώσεις η συνέκφραση της IκB-ND μεταλλαγμένης μορφής, αναστέλει την ενεργοποίηση του 3XkB-L υποκινητή, τόσο από την αγρίου τύπου, όσο και από τις μεταλλαγμένες μορφές της LMP1 πρωτεΐνης.

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 27** υποδηλώνουν ότι τουλάχιστον η μία από τις δύο C-τερματικές κυτταροπλασματικές περιοχές της LMP1 πρωτεΐνης που ενεργοποιούν τον NF-kB μεταγραφικό παράγοντα, αρκεί για την αποτελεσματική καταστολή της TGFβ σηματοδότησης.



Εικόνα 27. Απαλοιφή μιας εκ των δύο CTAR/TES περιοχών της LMP1 πρωτεΐνης δεν επηρεάζει την ικανότητά της να καταστέλλει την TGFβ σηματοδότηση. Α. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών της LMP1 πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας που περιγράφονται στα Γ και Δ. **Β.** Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της LMP1 πρωτεΐνης. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με ποσότητα 5 μg από τον φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου Flag LMP1, της Flag LMP1 (1-231), της Flag LMP1 (Δ 188-351), ή της LMP1 (1-187), όπως υποδεικνύεται στο πάνω μέρος της εικόνας. 40 ώρες μετά την επιμόλυνση, τα κύτταρα λύθηκαν και αναλύθηκε η έκφραση των μορφών της LMP1 με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5%. Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανάλυση ανοσοαποτύπωσης με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου Flag (mouse anti-Flag) ή έναντι του N-τελικού άκρου της LMP1 (EBV.OT22CN), όπως υποδεικνύεται στην εικόνα. Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε δευτερεύον anti-mouse-HRP αντίσωμα και το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL). Η θέση της αγρίου τύπου LMP1 πρωτεΐνης και των μεταλλαγμένων μορφών της, υποδεικνύονται με βέλη. **Γ.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (0.5 μg), τον φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5 (0.5 μg) και της αγρίου τύπου LMP1 πρωτεΐνης, ή των μεταλλαγμένων μορφών LMP1 (1-187), LMP1 (1-231) και LMP1 (Δ 188-351), σε ποσότητα 0.5 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της IkB-ND (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **Δ.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XκB)-luc (1 μg) και τον φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου LMP1 πρωτεΐνης, ή των μεταλλαγμένων μορφών LMP1 (1-187), LMP1 (1-231) και LMP1 (Δ 188-351), σε ποσότητα 0.5 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε

απουσία η παρουσία του φορέα έκφρασης της IκB-ND (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **Γ-Δ.** Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της Smad-επαγόμενης ενεργοποίησης της μεταγραφής από τους μεταγωγείς της LMP1 σηματοδότησης

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως και δείχνεται στην **Εικόνα 28**, η ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB από τις περιοχές CTAR1/TES1 και CTAR2/TES2 της LMP1 πρωτεΐνης, είναι πιθανόν να επάγεται από την άμεση ή έμμεση πρόσδεση της TRAF2 στις προαναφερθείσες περιοχές και την επακόλουθη ενεργοποίηση της κινάσης NIK ή άλλης MAPKKK και του συμπλόκου των IκB κινασών (IκKα, IκKβ). Στην **Εικόνα 29A** και **B** δείχνεται η επίδραση των μεταγωγέων της LMP1 σηματοδότησης, NIK, TRAF2 και IκKb, στην Smad3/4 και TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B-luc σε κύτταρα COS-7 και HepG2. Η υπερέκφραση των TRAF2, NIK και IKKβ σε κύτταρα COS-7 μαζί με την έκφραση των Smad3/4 κατέστειλε πλήρως την μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B-luc από τις Smad πρωτεΐνες (92-97% μείωση). Αντίθετα, η υπερέκφραση των αρνητικώς επικρατούντων μορφών αυτών των μεταγωγέων σε κύτταρα HepG2 (TRAF2-DN, NIK-DN και IκKb-DN), είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική ενίσχυση της TGFβ επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης του (CAGA)₁₂-E1B-luc υποκινητή, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 29B**. Η ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή από τον TGFβ, ενισχύθηκε κατά 3.5, 4 και 1.9 φορές από την συνέκφραση των TRAF2-DN, NIK-DN και IKKb-DN, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η ενεργότητα του ενδογενούς NF-kB μεταγραφικού παράγοντα, δρά αρνητικά στην TGFβ σηματοδότηση.

Ελέγχθηκε επίσης αν η έκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών επηρεάζεται από την συνέκφραση των IKKβ, NIK και TRAF2 πρωτεϊνών. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κυττάρων COS-7 που επιμολύνθηκαν παροδικά με τους φορείς έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών. Για την ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επίτοπου

myc που φέρουν οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 29Γ**, η έκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται από την συνέκφραση της IKKβ, NIK ή TRAF2 πρωτεΐνης, και συνεπώς η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας που προκαλεί αυτή η συνέκφραση δεν οφείλεται σε αποικοδόμηση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της **Εικόνας 29**, η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της Smad μεταγραφικής ενεργότητας από την LMP1 πρωτεΐνη, προκαλείται μέσω ενεργοποίησης του NF-kB από την LMP1, η οποία διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες TRAF2, NIK και IκKB.

Η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της Smad μεταγραφικής ενεργότητας από τον NF-kB αναστέλλεται από την απαλοιφή της C-τερματικής περιοχής της υπομονάδας p65 (αμινοξέα 496-551)

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός της καταστολής της TGFβ σηματοδότησης από τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB, κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B-luc και τους φορείς έκφρασης του ca-ALK5 υποδοχέα και των υπομονάδων p50 και p65 του NF-kB. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 30Α**, η υπερέκφραση της υπομονάδας p65 του NF-kB από μόνη της καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του ca-ALK5, σε κύτταρα COS-7. Αντίθετα, η υπομονάδα p50 και η ελλειμματική μορφή της υπομονάδας p65 που στερείται της C-τερματικής αμινοξικής περιοχής 496-551 (p65 ΔC) δεν καταστέλλουν το σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από τον ca-ALK5 υποδοχέα.

Επιπρόσθετα, η υπομονάδα p65 καταστέλλει την Smad3/4 επαγόμενη ενεργοποίηση του (CAGA)₁₂-E1B-luc υποκινητή, ενώ υπομονάδα p50 και η μεταλλαγμένη p65 ΔC δεν επιφέρουν αυτήν την καταστολή, σε κύτταρα COS-7, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 30Β**. Επίσης, η υβριδική πρωτεΐνη p50/p65 που αποτελείται από την N-τερματική, Rel περιοχή της υπομονάδας p50 και την C-τερματική περιοχή

μεταγραφικής δραστηριότητας της υπομονάδας p65, καταστέλλει αποτελεσματικά την Smad3/4 επαγόμενη ενεργοποίηση του (CAGA)₁₂-E1B-luc υποκινητή (**Εικόνα 30B**).

Η μεταγραφική δραστηριότητα των p50, p65, p65 ΔC και p50/p65 ελέγχθηκε σε κύτταρα COS-7, που επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XkB-L). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 30Γ** η p65 και η υβριδική p50/p65 πρωτεΐνη ενεργοποίησαν ισχυρά την μεταγραφή από τον 3XkB-L υποκινητή, κατά 43 και 37 φορές αντίστοιχα, όπως αναμενόταν. Αντιθέτως, η υπομονάδα p50 και η μεταλλαγμένη p65 ΔC δεν ήταν ικανές να ενεργοποιήσουν μεταγραφικά τον 3XkB-L υποκινητή.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 30** υποδεικνύουν ότι η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της λειτουργίας των Smad πρωτεϊνών από την LMP1 φαίνεται ότι διαμεσολαβείται από την p65/RelA υπομονάδα του NF-κB και ότι η C-τερματική περιοχή της p65/RelA (αμινοξέα 469-551), που αποτελεί τμήμα της περιοχής μεταγραφικής δραστηριότητας της p65/RelA πρωτεΐνης, είναι σημαντική για την παρατηρούμενη καταστολή.

Καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης GAL4-Smad3 από τις LMP1 και p65

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν η πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών στο DNA είναι απαραίτητη για τον μηχανισμό καταστολής της μεταγραφικής τους δραστηριότητας από την LMP1, χρησιμοποιήθηκε το ετερόλογο σύστημα GAL4. Για τον σκοπό αυτό, κατασκευάστηκε μια υβριδική Smad3 πρωτεΐνη που έφερε στο N-τελικό άκρο της την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα GAL4 (αμινοξέα 1-147) του σακχαρομύκητα. Για τις ανάγκες του πειράματος, χρησιμοποιήθηκε ο συνθετικός υποκινητής pG₅-E1B-luc, ο οποίος φέρει 5 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 (**Εικόνα 31A**). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 31B**, η παροδική επιμόλυνση των κυττάρων COS-7 με τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4 δεν ενεργοποίησε μεταγραφικά τον pG₅-E1B-luc υποκινητή, ενώ η έκφραση της GAL4-Smad3 πρωτεΐνης προκάλεσε ενεργοποίηση κατά 7.7 φορές. Αυτή η μεταγραφική δραστηριότητα κατεστάλη πλήρως από την συνέκφραση της LMP1 ή της p65 πρωτεΐνης. Επιπλέον, η καταστολή της

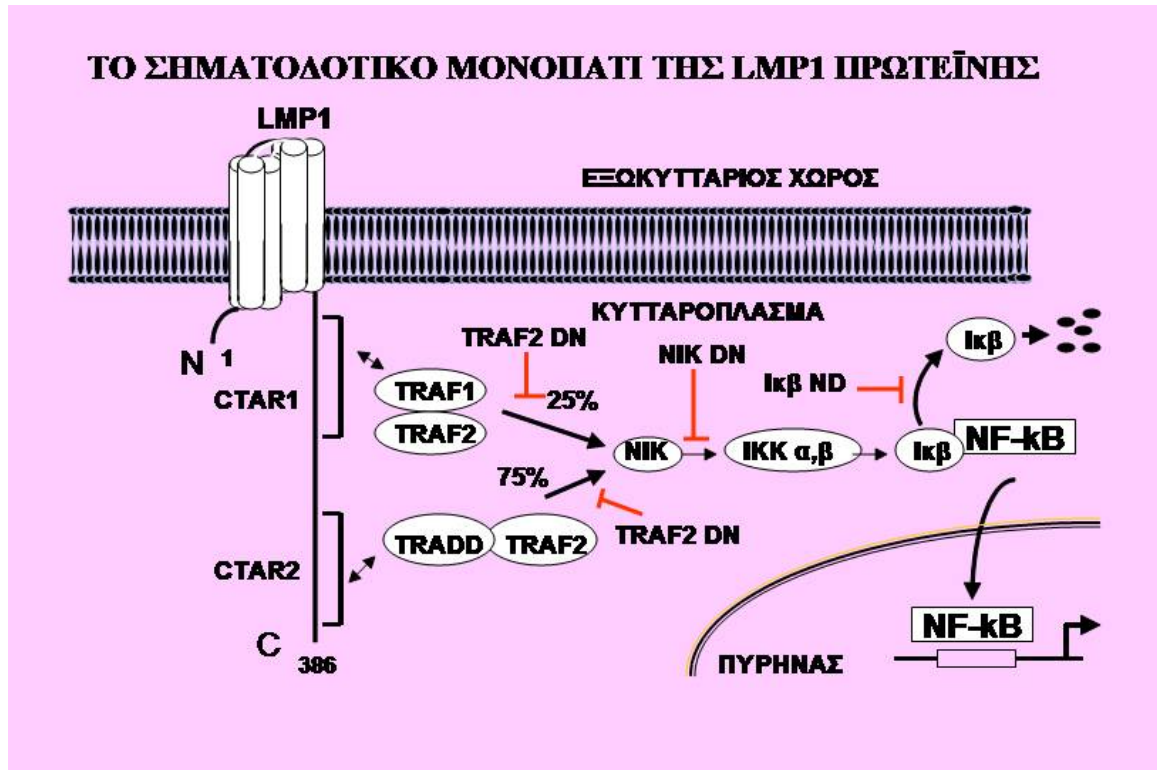
μεταγραφικής ενεργότητας της GAL4-Smad3, που προκλήθηκε από την LMP1 ανεστάλη από την συνέκφραση της IκB-ND πρωτεΐνης, η οποία, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, καταστέλλει την LMP1 σηματοδότηση μέσω του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 31** δείχνουν ότι η LMP1 καταστέλλει την μεταγραφική δραστικότητα της Smad3 πρωτεΐνης ακόμη και όταν η τελευταία στρατολογείται στο DNA μέσω μιας ετερόλογης περιοχής πρόσδεσης στο DNA, όπως αυτή του μεταγραφικού παράγοντα GAL4.

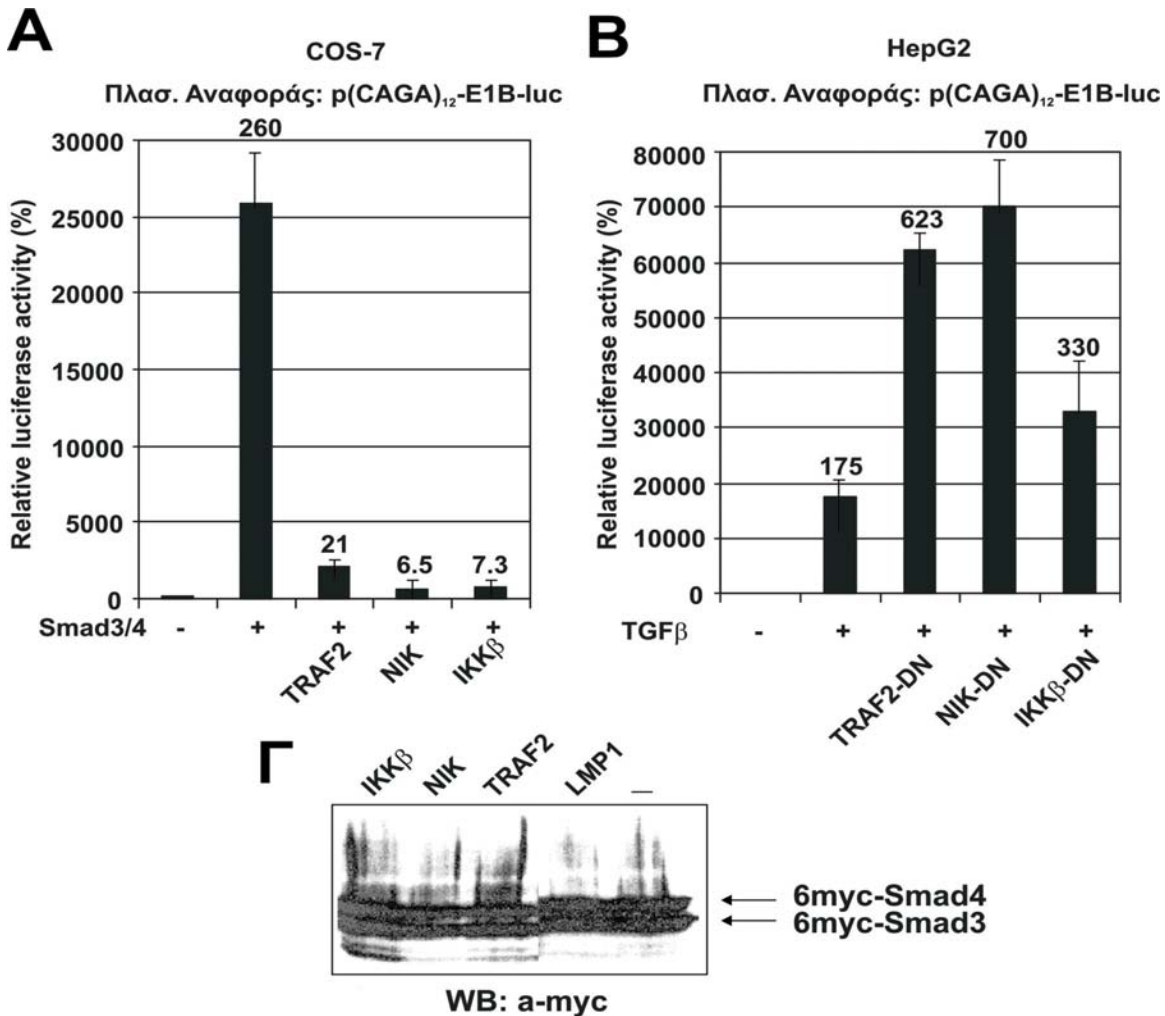
Η LMP1 πρωτεΐνη δεν επηρεάζει τον πυρηνικό εντοπισμό των Smad πρωτεϊνών

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλλει την μεταγραφική δραστικότητα της Smad3, αλλάζοντας την υποκυττάρια κατανομή της τελευταίας, πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοφθορισμού. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με έναν φορέα έκφρασης της Smad3 συζευγμένης στο N-τελικό της άκρο με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescence Protein, GFP-Smad3), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου LMP1 ή της μεταλλαγμένης, LMP1 (1-231). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 32Α**, η GFP-Smad3 εντοπίζεται, με άμεσο ανοσοφθορισμό, αποκλειστικά στον πυρήνα. Αυτός ο πυρηνικός εντοπισμός, δεν άλλαξε από την συνέκφραση της Flag-LMP1, όπως δείχνει η **Εικόνα 32Β**. Η Flag-LMP1 εντοπίζεται, με έμμεσο ανοσοφθορισμό (κόκκινο χρώμα), στην περιοχή γύρω από τον πυρήνα και γενικότερα στις ενδοκυττάριας μεμβράνες, σύμφωνα με την **Εικόνα 32Γ**. Η συνέκφραση των δύο πρωτεϊνών στο ίδιο κύτταρο επιβεβαιώθηκε με αλληλοεπικάλυψη των εικόνων Β και Γ στην **Εικόνα 32Δ**, όπου φάνηκε επίσης η έλλειψη συνεντοπισμού των δύο πρωτεϊνών. Το ίδιο πρότυπο παρατηρήθηκε όταν με την GFP-Smad3 συνεκφράστηκε η ελλειμματική LMP1 (1-231) πρωτεΐνη, όπως φαίνεται στις **Εικόνες 32 Ε-ΣΤ**. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η LMP1 δεν επηρεάζει την υποκυττάρια κατανομή της Smad3 πρωτεΐνης σε κύτταρα COS-7 που συνεκφράζουν τις LMP1 και Smad3, αλλά καταστέλλει την μεταγραφική της δραστικότητα με άλλον, άγνωστο μέχρι στιγμής μηχανισμό.

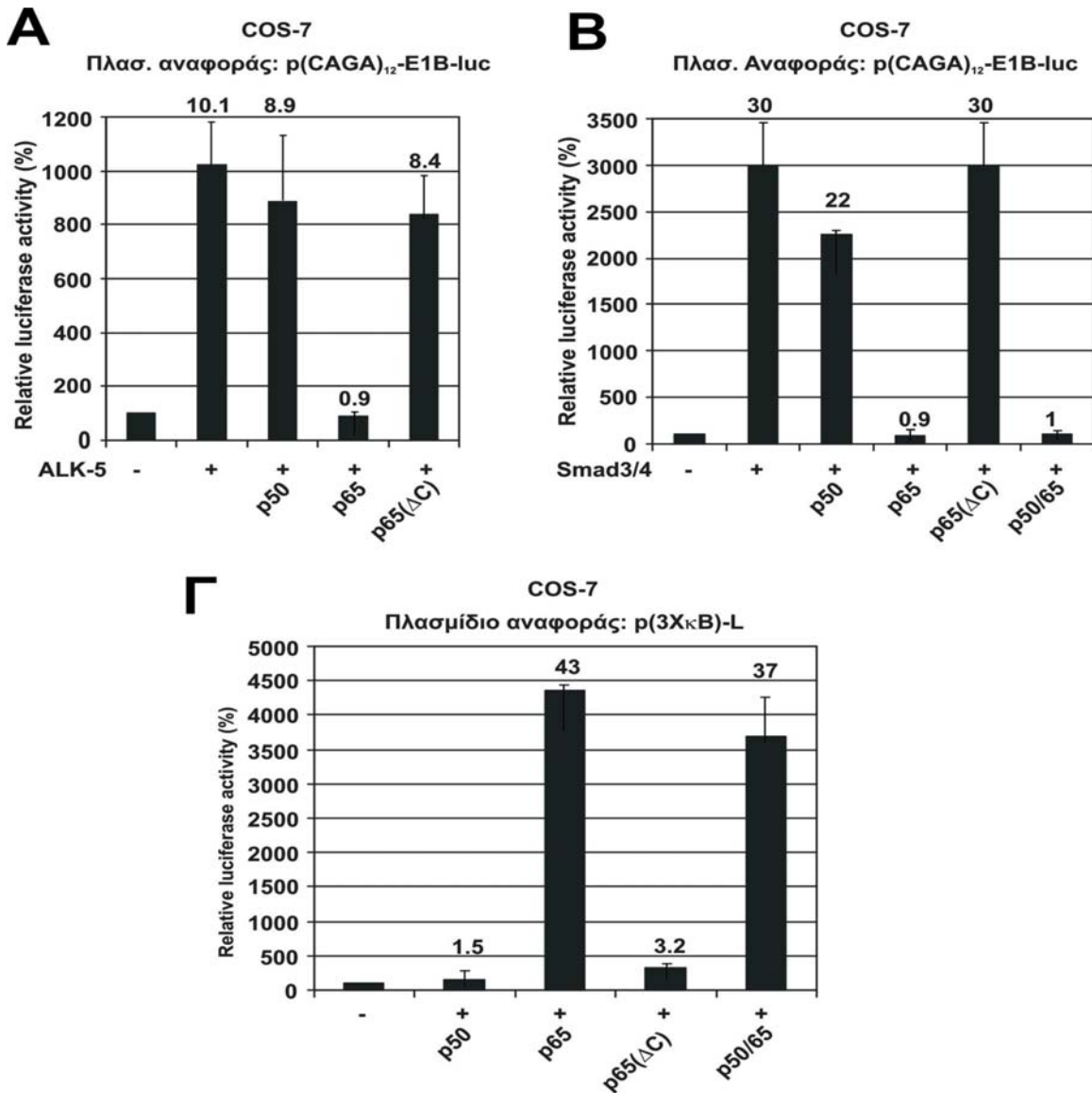
ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ LMP1 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ



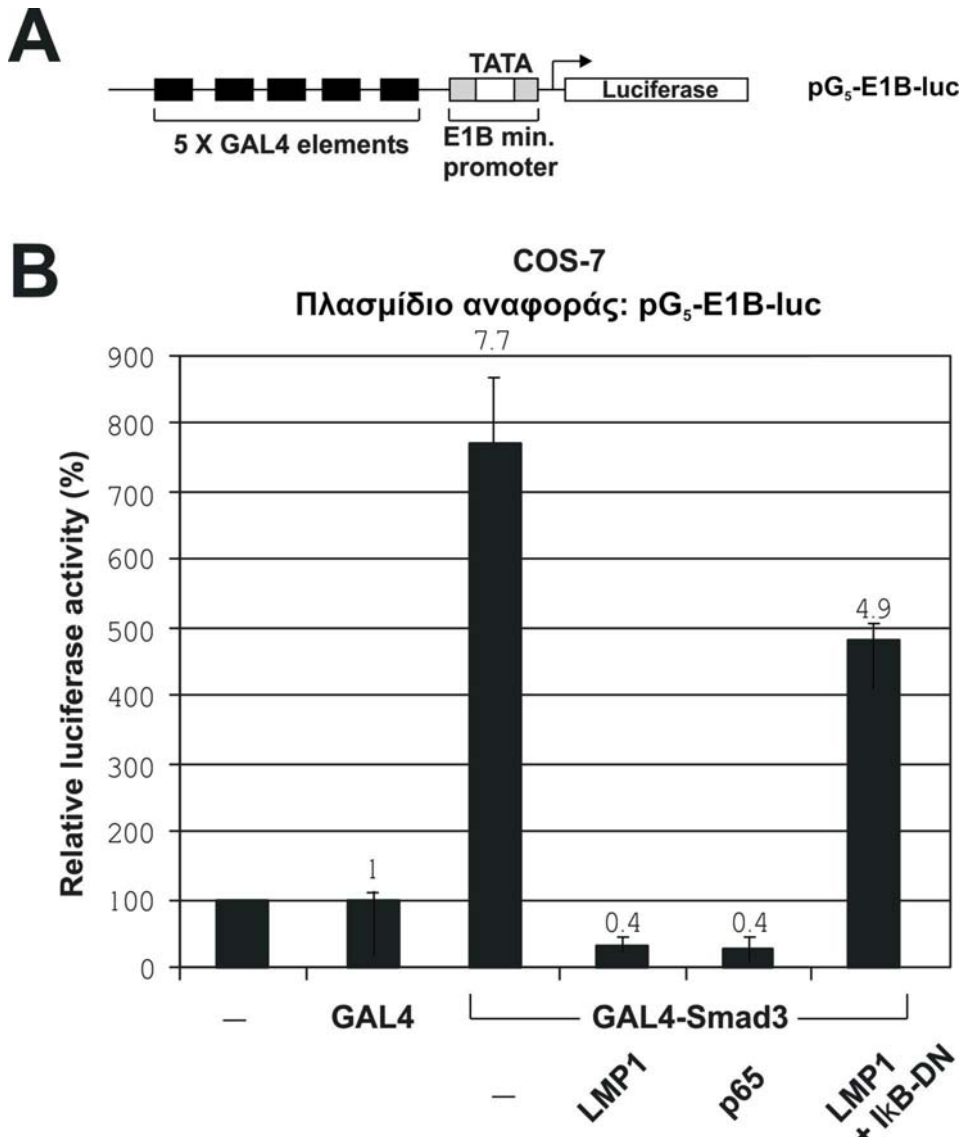
Εικόνα 28. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης LMP1. Το μονοπάτι αυτό οδηγεί στην ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB μέσω των περιοχών STAR1 και STAR2 της LMP1 και των κινασών NIK και ΙκΚα,β.



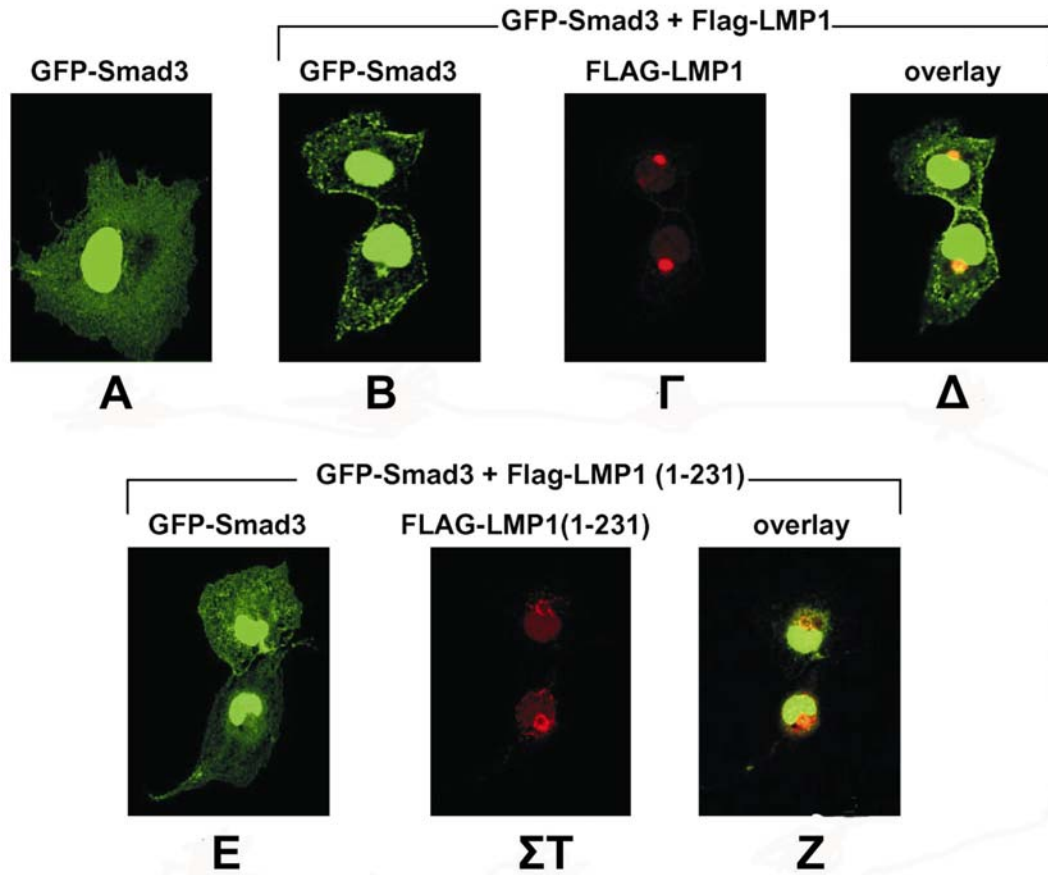
Εικόνα 29. Οι μεταγωγείς TRAF2, NIK και IKKβ της LMP1 σηματοδότησης καταστέλλουν την TGFβ σηματοδότηση και την Smad3/Smad4 μεταγραφική δραστηριότητα. Α. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των 6myc-Smad3 (1 μg) και 6myc-Smad4 (1 μg), απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης της TRAF2, της NIK ή της IKKβ πρωτεΐνης, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **Β.** Ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των TRAF2, NIK ή IKKβ πρωτεϊνών (1 μg από τον κάθε ένα), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. **Α-Β.** Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης, όπως περιγράφεται προηγουμένως. **Γ.** Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4, απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης της LMP1, TRAF2, NIK ή της IKKβ πρωτεΐνης. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς pcDNA-6myc-Smad3 (2 μg) και pcDNA3-6myc-Smad4 (2 μg), απουσία ή παρουσία 2 μg από τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA-LMP1, pcDNA-Flag-IKKβ, pcDNA-Flag-NIK pcDNA-Flag-TRAF2, όπως υποδεικνύεται στην εικόνα. Αναλύθηκε η έκφραση των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5%. Η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έγινε με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου myc που φέρουν (mouse anti-myc, 1:5000). Η θέση των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 πρωτεϊνών υποδεικνύεται με βέλη.



Εικόνα 30. Η p65/RelA υπομονάδα, αλλά όχι η p50 υπομονάδα του NF-κB καταστέλει την TGFβ σηματοδότηση και την Smad3/Smad4 μεταγραφική δραστηριότητα. **A.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (0.5 μg) και τον φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5 (0.5 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία 1 μg από κάθε έναν από τους φορείς έκφρασης των p50, p65 ή p65 ΔC, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **B.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (0.5 μg) και τους φορείς έκφρασης των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 σε ποσότητα 0.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία 1 μg από κάθε έναν από τους φορείς έκφρασης των p50, p65, p65 ΔC ή p50/p65, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **Γ.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XκB)-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των p50, p65, p65 ΔC ή p50/p65 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. **A-Γ.** Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως.



Εικόνα 31. Η LMP1 και η p65/RelA καταστέλουν την μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3 σε κύτταρα COS-7. Α. Σχηματική αναπαράσταση του πλασμιδίου αναφοράς pG₅B-luc που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας που περιγράφονται στο Β και σε επόμενα πειράματα. **Β.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4 ή GAL4-Smad3 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης των LMP1 (0.5 μg), p65 (1 μg) ή/και IκB-ND (1 μg), όπως φαίνεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 32. Η LMP1 πρωτεΐνη δεν επηρεάζει την υποκυττάρια κατανομή της Smad3 πρωτεΐνης. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα pGFP-Smad3 (1 g) ο οποίος εκφράζει την Smad3 σε σύζευξη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα της Flag-LMP1 (1 g) (Α-Δ), ή της Flag-LMP1 1-231 (1g) (Ε-Ζ), όπως υποδεικνύεται στις εικόνες. Η ανίχνευση της GFP-Smad3 και των Flag-LMP1, Flag-LMP1 1-231 έγινε άμεσα ή έμμεσα με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Ο συνενεργοποιητής p300 ενισχύει την μεταγραφική ενεργοποίηση που επάγεται από την TGFβ και την LMP1 σηματοδότηση και εξουδετερώνει την κατασταλτική δράση της LMP1 στο μονοπάτι του TGFβ

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του TGFβ και της LMP1 είναι πιθανό να συναντώνται και να ανταγωνίζονται στην περιοχή του πυρήνα για κοινούς συνενεργοποιητές, αναγκαίους για την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 και p65 πρωτεΐνης (φαινόμενο squelching). Είναι γνωστό ότι η MH2 περιοχή της Smad3 αλληλεπιδρά με την C-τερματική περιοχή των συνενεργοποιητών p300/CBP. Είναι επίσης γνωστό ότι η C-τερματική, και μεταγραφικά ενεργή, περιοχή της p65 αλληλεπιδρά με την N-τερματική περιοχή των συνενεργοποιητών p300/CBP. Τα χαμηλά επίπεδα των p300/CBP στα κύτταρα είναι πιθανόν να είναι ανεπαρκή για την μεταγραφική δραστηριότητα και της Smad3 και της p65, οπότε η χρησιμοποίηση των συνενεργοποιητών από την μία πρωτεΐνη να αναστέλλει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης από την άλλη.

Προκειμένου να διερευνηθεί η προηγούμενη υπόθεση, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης. Για τον σκοπό αυτό, ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-luc, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 33Α**. Ο συνδέτης TGFβ ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό αυτό υποκινητή κατά 330 φορές, μέσω ενεργοποίησης των ενδογενών Smad πρωτεϊνών. Η υπερέκφραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων του συνενεργοποιητή p300, προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας από τον TGFβ, (μέγιστη ενεργοποίηση κατά 1500 φορές περίπου). Η συνέκφραση της LMP1 πρωτεΐνης προκάλεσε περίπου 50% μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας που επάγεται από τον TGFβ και τον p300 (ενεργοποίηση κατά 700 φορές). Αντίστοιχη μείωση, κατά 50% περίπου, προκάλεσε η έκφραση της LMP1 στην μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή από τον TGFβ.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε η πιθανή ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας της LMP1 από τον συνενεργοποιητή p300. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XkB-L) και τον φορέα της LMP1, παρουσία ή απουσία του p300. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 33Β**, η LMP1 αύξησε την δραστηριότητα του υποκινητή 3XkB-L κατά 3.1 φορές. Η συνέκφραση του

συνενεργοποιητή p300 προκάλεσε περαιτέρω αύξηση αυτής της δραστικότητας κατά 42% (ενεργοποίηση κατά 5.4 φορές). Ο συνενεργοποιητής p300 από μόνος του δεν ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή, ενώ η συνέκφραση της LMP1 και της ογκοπρωτεΐνης E1A κατέστειλε την μεταγραφική ενεργότητα της LMP1, πιθανότατα λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύει τα ενδογενή μόρια του p300, όπως έχει περιγραφεί προηγουμένως. Επομένως, από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 33B** προκύπτει ότι ο συνενεργοποιητής p300 ενισχύει την μεταγραφική δραστικότητα της LMP1 πρωτεΐνης.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε εάν η καταστακτική δράση της LMP1 στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ θα μπορούσε να εξουδετερωθεί από υψηλές συγκεντρώσεις του συνενεργοποιητή p300. Όπως αναμενόταν, ο συνδέτης TGFβ ενεργοποίησε μεταγραφικά τον υποκινητή (CAGA)₁₂ και η συνέκφραση του p300 προκάλεσε περαιτέρω αύξηση της δραστικότητας αυτής. Η έκφραση μικρής ποσότητας της LMP1 (ώστε να αποφευχθεί κορεσμός στο σύστημα) μείωσε την δραστικότητα του TGFβ κατά 50%, ενώ η συνέκφραση του συνενεργοποιητή p300, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις, σταδιακά εξουδετέρωσε την καταστακτική δράση της LMP1 στην TGFβ σηματοδότηση. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 33Γ** υποδεικνύουν ότι η καταστολή που παρατηρείται στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGFβ από την LMP1 πρωτεΐνη, θα μπορούσε να αποδοθεί στον ανταγωνισμό των επαγωγέων των δύο μονοπατιών (Smad3 και p65, αντίστοιχα) για τα ενδογενή μόρια του συνενεργοποιητή p300. Η εξωγενής υπερέκφραση του p300 αναστέλλει τον ανταγωνισμό και την καταστολή της μεταγραφικής δραστικότητας που προκαλεί η LMP1 πρωτεΐνη στις Smad πρωτεΐνες.

Έλλειψη συνεργασιακής δράσης των Smad3 και p65 πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση συνθετικού υποκινητή που φέρει θέσεις πρόσδεσης και των δύο πρωτεϊνών

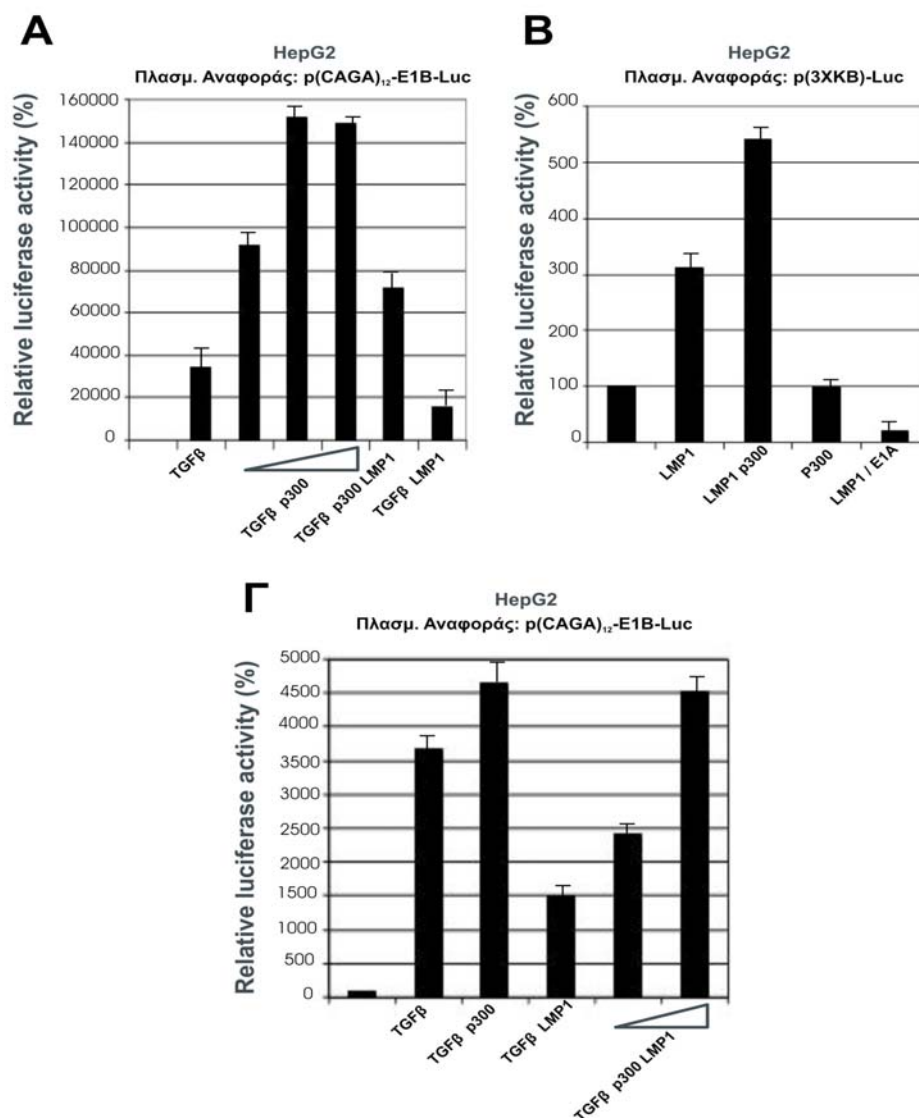
Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια των κυτταροκινών TGFβ και TNFα ενεργοποιούν τον υποκινητή του γονιδίου COL7A1 (Kon et al., 1999), ο οποίος περιέχει θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών NF-kB και Smad3/4. Συνεπώς, οι πρωτεΐνες αυτές είναι πιθανόν να συνεργάζονται σε υποκινητές που φέρουν θέσεις πρόσδεσης αυτών των μεταγραφικών παραγόντων. Προκειμένου να διερευνηθεί

αυτή η πιθανότητα, κατασκευάστηκε το πλασμίδιο αναφοράς που παριστάνεται σχηματικά στην **Εικόνα 34A**, και αποτελείται από το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας υπό τον έλεγχο συνθετικού υποκινητή που αποτελείται από 12 θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα Smad3 και από 2 θέσεις πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB. Η έκφραση της υπομονάδας p65 του NF-kB ενεργοποιεί αυτόν τον συνθετικό υποκινητή κατά 3.1 φορές, σε κύτταρα COS-7, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 34B**. Η έκφραση των Smad3/4 πρωτεϊνών επίσης ενεργοποιεί τον υποκινητή κατά 62 φορές. Η συνέκφραση των p65 και Smad3/4 πρωτεϊνών ενεργοποίησε τον υποκινητή μόνο κατά 5.1 φορές. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 34** υποδηλώνουν την έλλειψη αυξημένης μεταγραφικής δραστηριότητας και συνεπώς την έλλειψη συνεργασιακής δράσης των p65 και Smad3/4 πρωτεϊνών στον υποκινητή που φέρει πρόσδεση και των δύο. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad πρωτεϊνών από τον NF-kB, παρά το γεγονός ότι και οι δύο παράγοντες προσδέονται στο DNA.

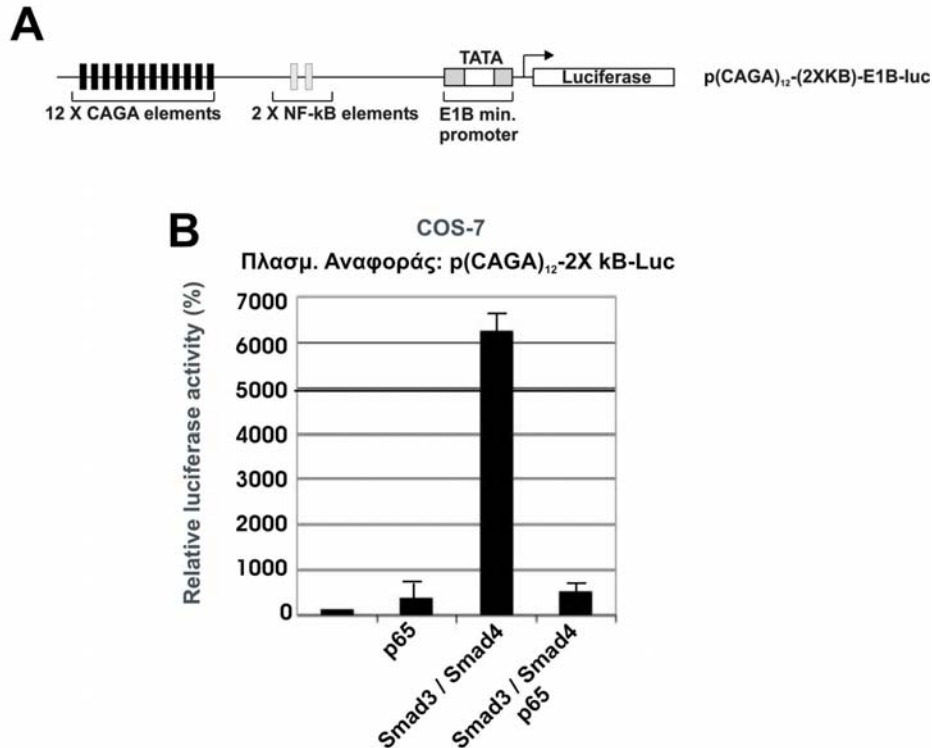
Έλεγχος φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των NF-kB και Smad3 μεταγραφικών παραγόντων

Η ανταγωνιστική δράση των NF-kB και Smad3 μεταγραφικών παραγόντων και η καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας που επιφέρει ο ένας πράγοντας στον άλλο, θα μπορούσαν να οφείλονται σε φυσικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανότητα αυτή χρησιμοποιήθηκε μια σειρά ελλειμματικών μορφών της Smad3, οι οποίες έφεραν στο N-τελικό τους άκρο είτε τον επίτοπο flag είτε τον επίτοπο 6myc, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 35A**. Αυτές οι ελλειμματικές μορφές μεταγράφηκαν και μεταφράστηκαν *in vitro* (TNT *in vitro* transcription-translation), παρουσία ραδιενεργά σημασμένης, με ³⁵S, μεθειονίνης, και επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης στα οποία είχαν προσδεθεί οι πρωτεΐνες GST, GST-p65 (RHD), ή GST-p50. Η πρωτεΐνη GST-p65 (RHD) περιέχει την περιοχή ομολογίας RelA (RelA Homology Domain) της υπομονάδας p65 σε σύντηξη με τον επίτοπο GST, ενώ η GST-p50 περιέχει ολόκληρη την υπομονάδα p50. Ακολούθησε

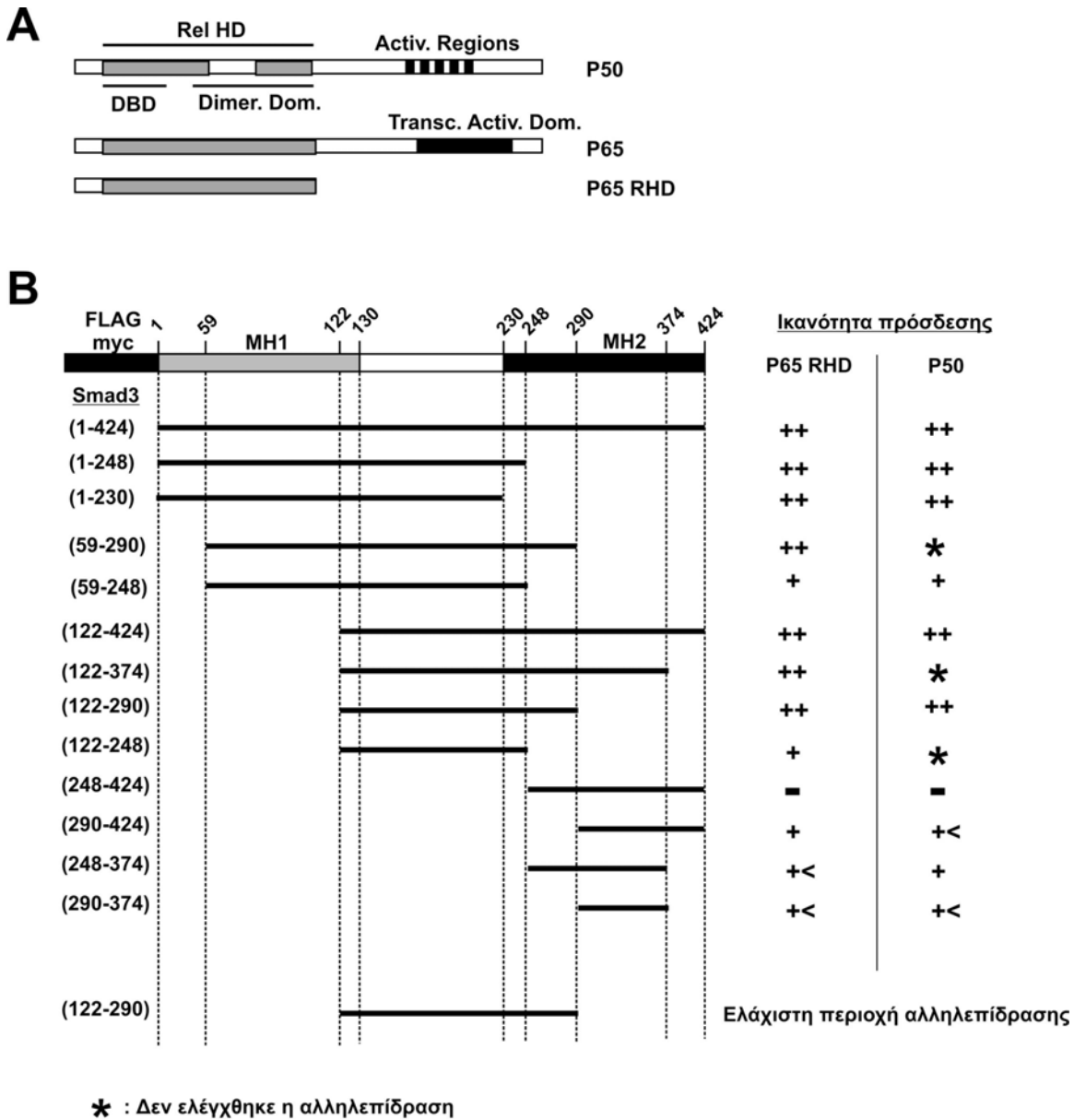
ανάλυση της *in vitro* αλληλεπίδρασης των σφαιριδίων με το μείγμα κάθε TNT αντίδρασης (GST pull down assay). Τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων συνοψίζονται στην **Εικόνα 35B** και υποδηλώνουν ότι η περιοχή RHD, που απαντάται σε όλα τα μέλη της οικογένειας του NF-kB, αλληλεπιδρά *in vitro* με την περιοχή 122-290 της πρωτεΐνης Smad3, η οποία αποτελείται από την περιοχή του συνδέτη (linker) και επεκτείνεται στα 60 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής της Smad3. Η αλληλεπίδραση της περιοχής RHD του NF-kB με την περιοχή 122-290 της Smad3, μπορεί να αποτρέπει είτε την φωσφορυλίωση του linker από τις MAPKKK (Kretzschmar et al., 1999, Funaba et al., 2002), είτε τον σχηματισμό ετεροδιμερών των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών, και κατά επέκταση την μεταγραφική ενεργότητα της Smad3.



Εικόνα 33. Ο συνενεργοποιητής p300 ενισχύει την μεταγραφική ενεργοποίηση που επαγεται από την TGFβ και την LMP1 σηματοδότηση. Α. Ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης της p300, σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (2, 4 και 5 μg) ή/και της LMP1 πρωτεΐνης (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Στο δείγμα στο οποίο συνεκφράστηκαν οι LMP1 και p300 πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη συγκέντρωση του συνενεργοποιητή (5 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. **Β.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(3XkB)-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των LMP1 (1 μg), p300 (1 μg) ή/και E1A (1 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. **Γ.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης της p300 (5 μg) ή της πρωτεΐνης LMP1 πρωτεΐνης (1 μg). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις της p300 (4 και 5 μg) όταν συνεκφράστηκε η LMP1 πρωτεΐνη (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. **Α-Γ.** Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 34. Οι Smad3/4 και p65 πρωτεΐνες δεν ενεργοποιούν συνεργασικά την μεταγραφική δραστηριότητα συνθετικού υποκινητή που φέρει θέσεις πρόσδεσης και για τις Smad3/4 και για τον p65. **A.** Σχηματική αναπαράσταση του συνθετικού υποκινητή που φέρει 12 θέσεις πρόσδεσης των Smad3/4 πρωτεϊνών (CAGA) και 2 θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα NF-kB και συνεπώς και της υπομονάδας του, p65. **B.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-2X KB-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των p65 ή/και Smad3/4 πρωτεϊνών, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 35. Φυσική αλληλεπίδραση της RHD περιοχής του NF-κB με την Smad3 πρωτεΐνη.
A. Σχηματική αναπαράσταση των υπομονάδων p50 και p65 του NF-κB μεταγραφικού παράγοντα, καθώς και της ελλειμματικής p65 RHD που περιλαμβάνει μόνο την Rel Homology Domain. Οι p50 και p65 RHD πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις *in vitro* αλληλεπίδρασης με μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης που περιγράφονται στο B. DBD: DNA Binding Domain, Dimer.Dom.: Dimerization Domain, Rel HD: Rel Homology Domain, Activ Regions: Activation Regions, Transc.Activ.Dom.: Transcriptional Activation Domain.
B. Σχηματική αναπαράσταση των ελλειμματικών μορφών της Smad3 που χρησιμοποιήθηκαν σε GST pull down αναλύσεις αλληλεπίδρασης με τις p50 και p65 RHD. Οι ελλειμματικές αυτές μορφές φέρουν τον επίτοπο FLAG ή 6myc στο N-τελικό τους άκρο. Τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων δείχνονται δεξιά. Όπου -: δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση, +< : πολύ ασθενής αλληλεπίδραση, + : ασθενής αλληλεπίδραση, ++ : ισχυρή αλληλεπίδραση.

ΕΝΟΤΗΤΑ II

Οι Smad πρωτεΐνες λειτουργούν ως συνενεργοποιητές του HNF4

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή, είναι γνωστή η θετική και αρνητική αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με μέλη της υπεροικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Ο πυρηνικός ηπατικός παράγοντας 4 (HNF4) αποτελεί έναν ορφανό πυρηνικό υποδοχέα. Είναι, επίσης, γνωστό ότι οι μεταγωγείς της TGFβ σηματοδότησης, οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4, ενεργοποιούν μεταγραφικά τον υποκινητή του ηπατοειδικού ανθρώπινου γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης apoC-III, μέσω συνεργασιακής αλληλεπίδρασης με τον HNF4 (Kardassis et al., 2000).

Στα πλαίσια της μελέτης αυτής, διερευνήθηκε ο μηχανισμός μεταγραφικής συνεργασίας μεταξύ των Smad και HNF4 και χαρτογραφήθηκαν οι περιοχές των πρωτεϊνών αυτών που απαιτούνται για αυτή τη συνεργασία. Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα διαφόρων μελών της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών να αλληλεπιδρούν λειτουργικά με τον παράγοντα HNF4 *in vivo*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 χρησιμοποιώντας ως πλασμίδιο αναφοράς τον υποκινητή -99/+24 apoC-III και τους φορείς έκφρασης των Smad2, Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών απουσία ή παρουσία εξωγενούς HNF4, στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στην **Εικόνα 36Α**. Τα κύτταρα HepG2 εκφράζουν ενδογενώς τον παράγοντα HNF4 σε σχετικά υψηλά επίπεδα (Kardassis et al., 2000). Απουσία εξωγενούς HNF4, η έκφραση της Smad3 προκάλεσε ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή, κατά 18 φορές σε σύγκριση με την ενεργοποίηση κατά 3.6 φορές που προκαλεί ο HNF4 και την ενεργοποίηση κατά 2 φορές που προκαλεί η έκφραση των Smad2 και Smad4 πρωτεϊνών. Η συνέκφραση της Smad4 διπλασίασε την μεταγραφική ενεργοποίηση που προκάλεσε η Smad3 (ενεργοποίηση κατά 35 φορές). Αντιθέτως, η μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή που προκάλεσε η Smad2 παρέμεινε χαμηλή ακόμα και μετά την συνέκφραση της Smad4 (ενεργοποίηση κατά 6.2 φορές). Παρόμοιο πρότυπο ενεργοποίησης παρατηρήθηκε και μετά την υπερέκφραση του HNF4. Η εξωγενής συνέκφραση του HNF4 με την Smad3 ή με τις Smad3 και Smad4 προκάλεσε συνεργασιακή μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III

υποκινητή κατά 80 και 120 φορές αντίστοιχα, γεγονός που θα μπορούσε να αποδοθεί στην φυσική αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αυτών. Η μεταγραφική ενεργοποίηση που προκαλεί η συνέκφραση των Smad3 Smad4 και HNF4, υπερβαίνει το άθροισμα της ενεργοποίησης που προκαλεί η ανεξάρτητη επιμόλυνση με τον HNF4 και η ανεξάρτητη επιμόλυνση με τις Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες. (3.6 και 35 = 38.6 φορές ενεργοποίησης). Επίσης, η ικανότητα της Smad3 να ενεργοποιεί μεταγραφικά τον apoC-III υποκινητή είναι 10-12 φορές ισχυρότερη από εκείνη των Smad2 και Smad4 πρωτεϊνών, παρά το γεγονός ότι οι Smad2, Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες εκφράζονται στον ίδιο βαθμό στα κύτταρα HepG2, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 36Γ**. Το πείραμα ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκε με τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση της **Εικόνας 36Α**, και με χρήση αντισώματος anti-myc έναντι του επίτοπου myc που φέρουν οι Smad πρωτεΐνες.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός της συνεργασιακής αλληλεπίδρασης των Smad3/4 και HNF4 πρωτεϊνών στην ρύθμιση του apoC-III υποκινητή, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάλυσης της μεταγραφικής ενεργοποίησης σε καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468. Τα κύτταρα αυτά χαρακτηρίζονται από απάλειψη και των δύο αλληλόμορφων του Smad4 γονιδίου και συνεπώς στερούνται των ενδογενών Smad4 πρωτεϊνών (de Winter et al., 1997). Επίσης, στερούνται τον ηπατοειδικό παράγοντα HNF4. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ είναι ανενεργό στα κύτταρα αυτά, λόγω της έλλειψης της Smad4 πρωτεΐνης, αλλά η εκτοπική έκφραση της Smad4 αποκαθιστά την TGFβ σηματοδότηση. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 36Β**, η εκτοπική έκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά, δεν ενεργοποιεί μεταγραφικά τον υποκινητή apoC-III, απουσία του HNF4. Η εκτοπική συνέκφραση του HNF4 ενεργοποίησε ισχυρά τον apoC-III υποκινητή, τόσο απουσία όσο και παρουσία του συνδέτη TGFβ, κατά 40 και 65 φορές αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή απουσία του TGFβ πιθανότατα οφείλεται στην υπερέκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών η οποία προκαλεί συστατική ενεργοποίηση της μεταγραφικής λειτουργίας των Smad πρωτεϊνών, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Zhang et al., 1997, Moustakas and Kardassis, 1998). Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 36Β** υποδηλώνουν ότι οι Smad πρωτεΐνες δεν ενεργοποιούν μεταγραφικά τον apoC-III υποκινητή σε κύτταρα που δεν εκφράζουν

ενδογενώς HNF4, και συνεπώς καταδεικνύουν την σημασία του HNF4 στην προαναφερθείσα μεταγραφική ενεργοποίηση.

Συνολικά τα αποτελέσματα της **Εικόνας 36** υποδηλώνουν ότι τα Smad3/4 ετεροδιμερή είναι οι κύριοι μεταγωγείς της ενεργοποίησης της γονιδιακής έκφρασης της apoC-III και ότι για την ενεργοποίηση αυτή απαιτείται ο παράγοντας HNF4.

Μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης Smad3 δεν επηρεάζουν την ικανότητά της να αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με τον HNF4

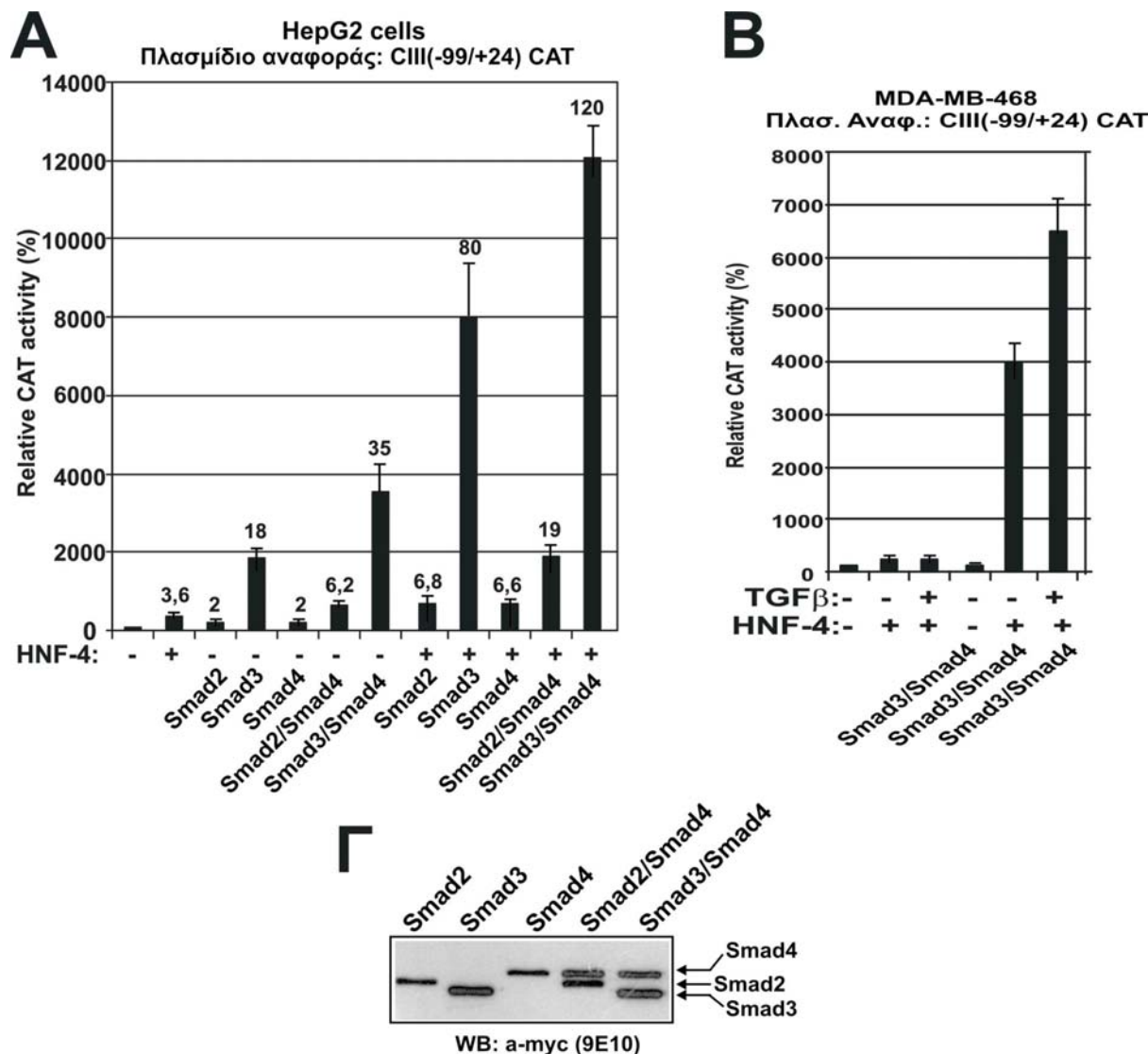
Η MH1 περιοχή των Smad πρωτεϊνών, που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον HNF4 (Chou et al., 2003), απαιτείται επίσης για την άμεση πρόσδεση των Smad στο DNA (Heldin et al., 1997, Massague, 1998, Moustakas et al., 2001). Η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της Smad3 προσδεδεμένης στο DNA, αποκάλυψε την παρουσία μιας δομής β-φουρκέτας μεταξύ των αμινοξέων 70-82 η οποία αλληλεπιδρά με το DNA (Shi et al., 2001). Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της δομής β-φουρκέτας της Smad3 στις λειτουργικές και φυσικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τον HNF4, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας και GST-pull down αλληλεπιδράσεις.

Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-99/+24) apoC-III CAT και τον φορέα έκφρασης είτε της αγρίου τύπου Smad3, είτε της μεταλλαγμένης Smad3 R74K/K81R και της Smad4 πρωτεΐνης, απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του HNF4, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 37A**. Αυτή η μεταλλαγμένη Smad3 φέρει διπλή αμινοξική αντικατάσταση της αργινίνης της αμινοξικής θέσης 74 σε λυσίνη και της λυσίνης της θέσης 81 σε αργινίνη. Αυτές οι αμινοξικές αντικαταστάσεις, έχει δειχθεί ότι αναστέλουν την πρόσδεση της Smad3 στο DNA (Moren et al., 2000). Οι Smad3/Smad4 και Smad3 (R74K/K81R)/Smad4 ενεργοποιούν εξίσου ισχυρά τον (-99/+24) apoC-III υποκινητή παρουσία του HNF4. Η ενεργοποίηση αυτή αυξάνεται περαιτέρω παρουσία του συνδέτη TGFβ (**Εικόνα 37A**).

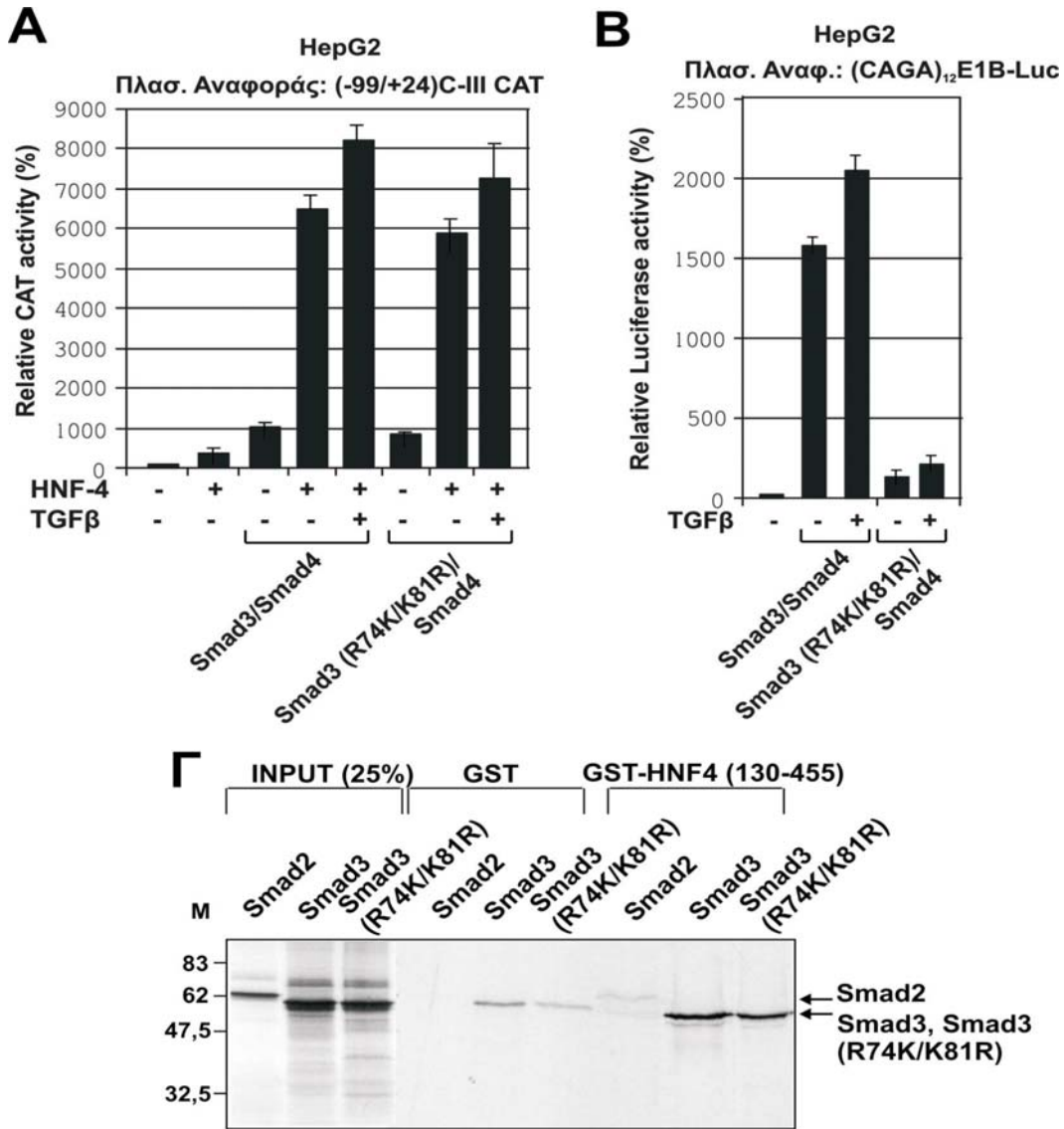
Επίσης, ελέγχθηκε η ικανότητα της διπλά μεταλλαγμένης Smad3 (R74K/K81R) να ενεργοποιεί μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B-luc. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς αυτού του συνθετικού υποκινητή και τους φορείς έκφρασης των Smad3/Smad4 ή των Smad3 (R74K/K81R)/Smad4, απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ. Όπως αναμενόταν, οι μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA της Smad3 εξάλειψαν την μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης, ακόμα και παρουσία του TGFβ (**Εικόνα 37B**).

Μελετήθηκε η ικανότητα φυσικής αλληλεπίδρασης της μεταλλαγμένης Smad3 (R74K/K81R) με την περιοχή 130-455 του παράγοντα HNF4 που είναι γνωστό, από παράλληλες μελέτες, ότι αλληλεπιδρά με τις Smad πρωτεΐνες (Chou et al., 2003). Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης συζευγμένα είτε με την GST πρωτεΐνη είτε με την GST-HNF4 (130-455). Τα σφαιρίδια αυτά επώαστηκαν με τις Smad2, Smad3 ή Smad3 (R74K/K81R) πρωτεΐνες, οι οποίες μεταγράφηκαν και μεταφράστηκαν *in vitro* παρουσία ραδιενεργά σημασμένης μεθειονίνης με ³⁵S. Η συνκατακρήμνιση των Smad πρωτεϊνών ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 37Γ**, τόσο η αγρίου τύπου Smad3 όσο και η μεταλλαγμένη Smad3 (R74K/K81R) προσδένονται ισχυρά και ειδικά στην περιοχή 130-455 του HNF4, σε αντίθεση με την Smad2 πρωτεΐνη.

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 37** υποδηλώνουν ότι μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA της Smad3 δεν επηρεάζουν την φυσική ή λειτουργική της αλληλεπίδραση με τον HNF4, στις οποίες αποδίδεται η συνεργασιακή μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή από αυτούς τους μεταγραφικούς παράγοντες.



Εικόνα 36. Οι Smad3/4 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν λειτουργικά με τον HNF4 και ενισχύουν την μεταγραφή του αρoCIII γονιδίου. Α. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-99/+24) αρoC-III CAT(1 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών HNF4, 6myc-Smad2, 6myc-Smad3 ή/και 6myc-Smad4, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. **Β.** Καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-99/+24) αρoC-III CAT(1 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών HNF4, 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), 16 ώρες μετά την επιμόλυνση, και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. **Α-Β.** Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. **Γ.** Ανάλυση της έκφρασης των Smad πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις Α και Β. Στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των HepG2 κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στο Α, αναλύθηκε η έκφραση των 6myc-Smad2 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 12.5%. Η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έγινε με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου myc που φέρουν (anti-myc 1:2500). Η θέση των 6myc-Smad2, 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 πρωτεϊνών υποδεικνύεται με βέλη.



Εικόνα 37. Μεταλλάξεις στην περιοχή πρόσδεσης στο DNA της Smad3 πρωτεΐνης δεν επηρεάζει τις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με τον HNF4. A-B. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-99/+24) apoC-III CAT(1 μg) (A), ή με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) (B), και τους φορείς έκφρασης των HNF4, Smad3, Smad3 (R74K/K81R) ή Smad4 πρωτεϊνών, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο κάθε γράφημα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM). Η προσθήκη του TGFβ πραγματοποιήθηκε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση, και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης (CAT) (A) ή της λουσιφεράσης (B) δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. **Γ.** Η GST πρωτεΐνη και η υβριδική GST-HNF4 (130-455) εκφράστηκαν και καθαρίστηκαν από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων *E. coli*, DH5α, συζεύχθηκαν σε σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης και αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν με τις Smad2, Smad3, ή Smad3 (R74K/K81R) πρωτεΐνες. Οι τελευταίες είχαν συντεθεί με *in vitro* μεταγραφή/μετάφραση παρουσία ραδιενεργά σημασμένης, με ³⁵S, μεθειονίνης, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με το ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος (input). Η συνκατακρήμιση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες, αναλύθηκε με

SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ανιχνεύθηκε με αυτοραδιογραφία. Τα βέλη υποδεικνύουν την θέση των Smad2, Smad3, και Smad3 (R74K/K81R) πρωτεϊνών. M: μάρτυρας πρωτεϊνικής μοριακής μάζας σε kilodaltons.

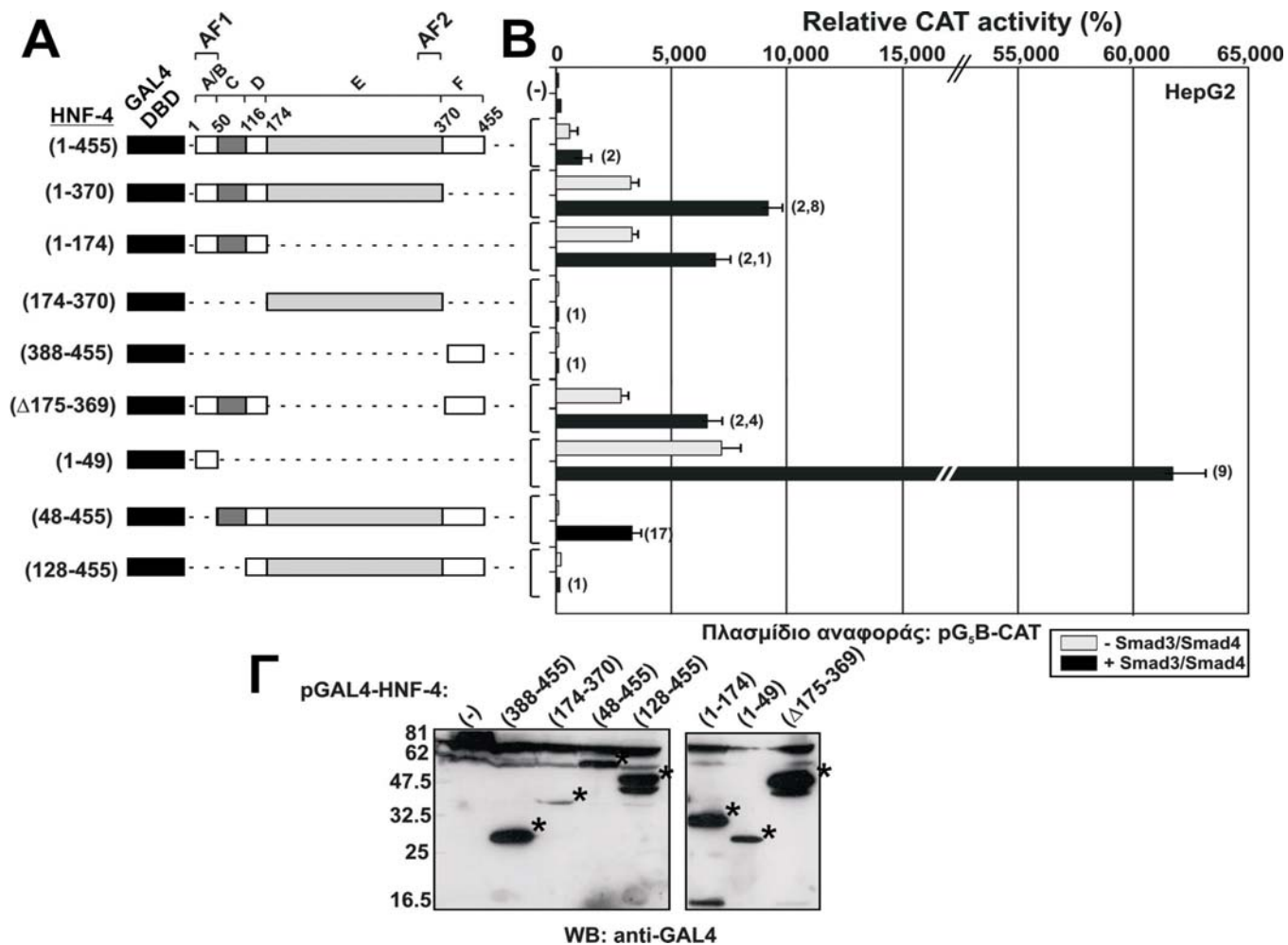
Οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν λειτουργικά με την περιοχή 1-128 του HNF4, που περιλαμβάνει την AF-1 (Activation Function- 1) και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA.

Προκειμένου να χαρτογραφηθούν οι περιοχές του HNF4 που αλληλεπιδρούν με την Smad3 πρωτεΐνη, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά μεταλλαγμένων ελλειμματικών μορφών του παράγοντα HNF4 που φέρουν στο N-τελικό τους άκρο την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα, GAL4. Αυτές οι υβριδικές πρωτεΐνες καθώς και η αγρίου τύπου υβριδική GAL4- HNF4, παριστάνονται σχηματικά στην **Εικόνα 38A**. Η μεταγραφική δραστηριότητα κάθε υβριδικής πρωτεΐνης, παρουσία και απουσία των Smad3/Smad4 πρωτεϊνών, δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος στην **Εικόνα 38B**. Στην ανάλυση αυτή χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HepG2 που επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-CAT το οποίο αποτελείται από 5 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 σε σύζευξη με το γονίδιο CAT. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών. Με την ανάλυση αυτή εκτιμήθηκε η ικανότητα των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών να λειτουργούν ως συνενεργοποιητές της αγρίου τύπου ή των μεταλλαγμένων υβριδικών GAL4- HNF4 μορφών, καταγράφοντας την αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας του συνθετικού υποκινητή pG₅B-CAT.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 38B**, η συνέκφραση των Smad3 και Smad4 διπλασίασε την δραστηριότητα της αγρίου τύπου GAL4- HNF4 (1-455). Η C-τερματική απαλοιφή της περιοχής 371-455 [GAL4- HNF4 (1-370)] ή της περιοχής 175-455 [GAL4- HNF4 (1-174)] ενίσχυσε σημαντικά την μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4, γεγονός που συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Η μεταγραφική ενεργότητα αυτών των ελλειμματικών μορφών ενισχύθηκε κατά 2.8 και 2.1 φορές αντίστοιχα από την συνέκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών. Αντιθέτως, η μεταγραφική δραστηριότητα των υβριδικών GAL4- HNF4 (174-370) και GAL4- HNF4 (388-455), που περιέχουν τις περιοχές E και F, αντίστοιχα, δεν ενισχύθηκε από τη

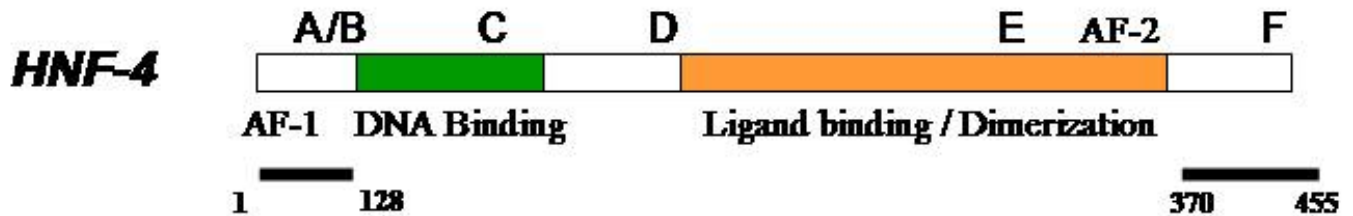
συνέκφραση των Smad3 και Smad4. Η υβριδική GAL4- HNF4 (Δ175-369) που στερείται της περιοχής E, παρουσιάζει μεταγραφική ενεργότητα που αυξήθηκε κατά 2.4 φορές από την συνέκφραση των Smad3 και Smad4. Επιπρόσθετα, η GAL4-HNF4 (1-49) χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα βασικής μεταγραφικής ενεργοποίησης, λόγω της ισχυρής, συστατικά ενεργής AF-1 περιοχής στην αμινοξική περιοχή 1-24 (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Αυτή η βασική μεταγραφική δραστηριότητα αυξήθηκε κατά 9 φορές από την συνέκφραση των Smad3 και Smad4. Η απαλοιφή της περιοχής 1-47 που χαρακτηρίζει την GAL4- HNF4 (48-455) δεν εμπόδισε τις Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες να αυξήσουν την μεταγραφική δραστηριότητα της ελλειμματικής πρωτεΐνης κατά 17 φορές. Αντιθέτως η υβριδική GAL4- HNF4 (128-455) που στερείται τόσο της περιοχής 1-47 όσο και της γειτονικής της, 50-128, δεν συνενεργοποιήθηκε από τις Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες. Στην **Εικόνα 38Γ** περιγράφεται το πείραμα ανοσοαποτύπωσης, σε κύτταρα COS-7, όπου ελέγχεται η έκφραση των υβριδικών GAL4-HNF4 μορφών που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας, με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου GAL4 που φέρουν.

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 38** υποδηλώνουν ότι οι Smad3/ Smad4 πρωτεΐνες λειτουργούν ως συνενεργοποιητές του HNF4, αλληλεπιδρώντας λειτουργικά με την περιοχή 1-248 που περιλαμβάνει την AF-1 περιοχή και την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του παράγοντα HNF4. Τα παραπάνω επιβεβαιώθηκαν από παράλληλες μελέτες του εργαστηρίου μας (Chou et al., 2003), σύμφωνα με τις οποίες οι προαναφερθείσες λειτουργικές αλληλεπιδράσεις συνοδεύονται από άμεσες φυσικές αλληλεπιδράσεις των παραπάνω περιοχών του HNF4 με την MH1 περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 39**.

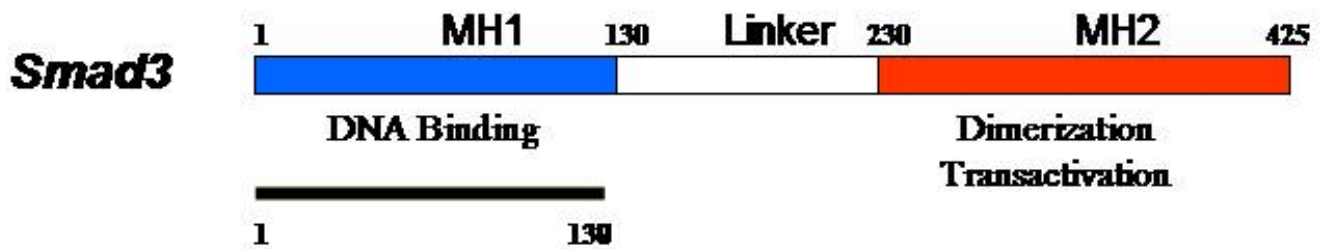


Εικόνα 38. Αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της GAL4-HNF4 από τις Smad3/4 πρωτεΐνες. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της GAL4-HNF4 που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι συζευγμένες με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης GAL4 (GAL4 DBD) στο N-τελικό τους άκρο. **B.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-CAT (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των ενδεδειγμένων GAL4 HNF4 πρωτεϊνών, σε ποσότητα 100 ng από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία (λευκές ράβδοι) ή παρουσία (μαύρες ράβδοι) των φορέων έκφρασης των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης της χλωραμφενικόλης (CAT) δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων. Η ενίσχυση της GAL4 HNF4 μεταγραφικής δραστηριότητας από τις Smad πρωτεΐνες, δείχνεται σε παρένθεση δίπλα σε κάθε ραβδόγραμμα. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. **Γ.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με ποσότητα 17 μg από τους φορείς έκφρασης των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%. Η ανοσοαποτύπωση έγινε με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του GAL4 (mouse anti-GAL4) (1:2500). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τη θέση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών.

Οι περιοχές του HNF4 που αλληλεπιδρούν με την Smad3 είναι η 1-128 και η 370-455



Η περιοχή της Smad3 που αλληλεπιδρά με τον HNF4 είναι η 1-130 (MH1)

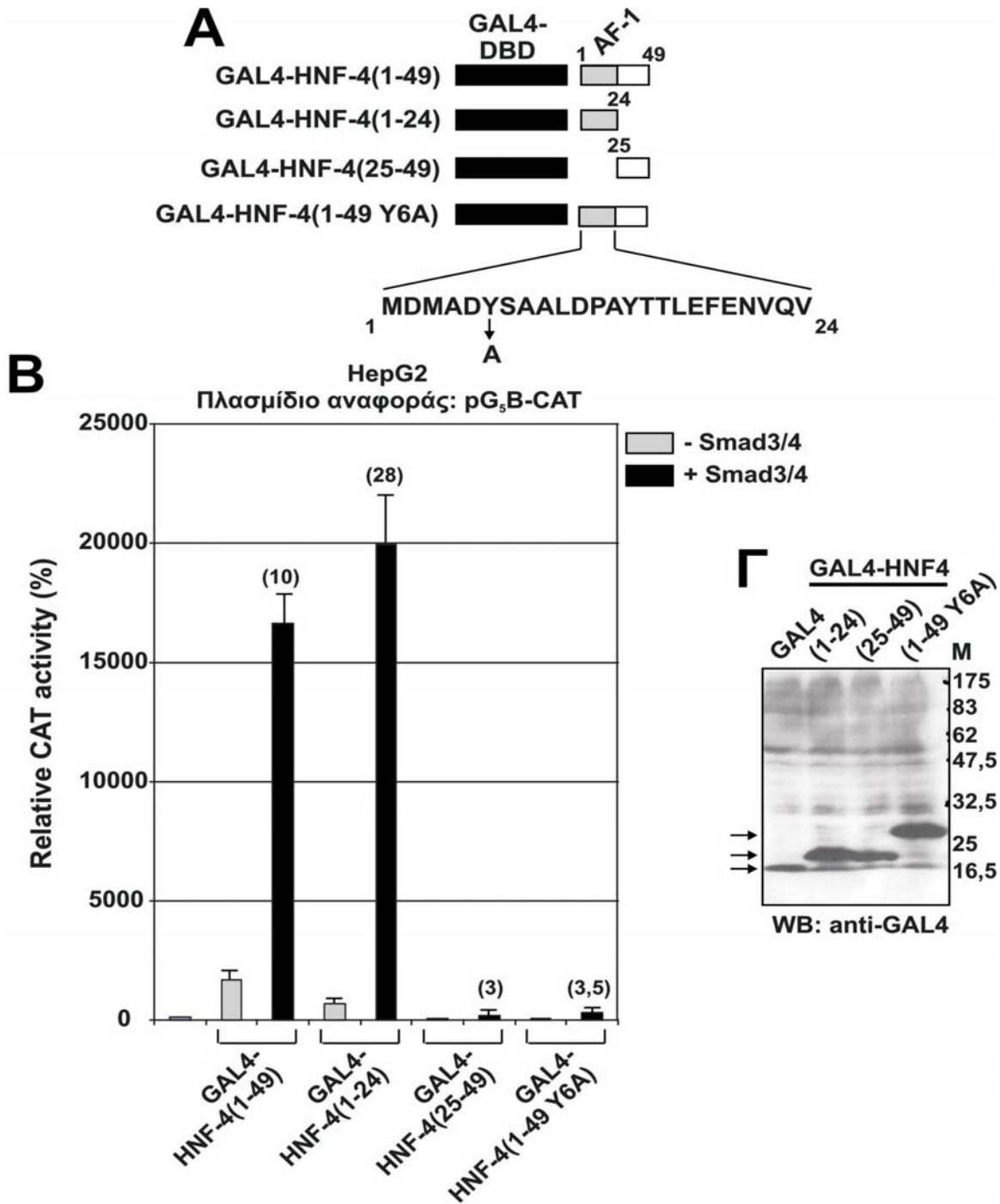


Εικόνα 39. Περιοχές των HNF4 και Smad3 πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις.

Οι υδρόφοβες θέσεις της AF-1 περιοχής του HNF4 είναι απαραίτητες για την λειτουργική αλληλεπίδραση του παράγοντα αυτού με τις Smad πρωτεΐνες

Οι παραπάνω αναλύσεις υποδεικνύουν την περιοχή 1-49 του HNF4 ως επαρκή για την ενεργοποίηση του παράγοντα αυτού από τις Smad πρωτεΐνες. Τα πρώτα 24 αμινοξέα του HNF4 περικλείουν μια περιοχή ισχυρής μεταγραφικής δραστηριότητας που ονομάζεται AF-1 (Activation Function 1) και ποικίλει μεταξύ των μελών της υπερικογένειας των πυρηνικών υποδοχέων. Η AF-1 περιοχή του HNF4 λειτουργεί ως αυτόνομος συστατικός ενεργοποιητής της μεταγραφής (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Η AF-1 περιοχή είναι πλούσια σε όξινα και υδρόφοβα αμινοξέα και προβλέπεται να υιοθετεί μια δευτερεύουσα α-ελικοειδή δομή (Kistanova et al., 2001). Μεταλλάξεις στα όξινα ή υδρόφοβα αμινοξέα της AF-1 περιοχής εξαλείφουν την μεταγραφική της δραστηριότητα (Kistanova et al., 2001). Θελήσαμε, συνεπώς, να διερευνήσουμε την πιθανή συνεισφορά των υδρόφοβων και όξινων αμινοξέων που βρίσκονται στην περιοχή 1-24 στις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις του HNF4 με τις Smad πρωτεΐνες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τις μεταλλαγμένες μορφές του παράγοντα GAL4-HNF4 που δείχνονται στην **Εικόνα 40Α**. Οι μορφές αυτές του HNF4 χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μεταγραφικής δραστηριότητας που υποδεικνύεται στην **Εικόνα 40Β**. Η υβριδική GAL4-HNF4 (1-24) που περιέχει μόνο την AF-1 περιοχή χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα βασικής μεταγραφικής δραστηριότητας (ενεργοποίηση κατά 19 φορές) σε κύτταρα HepG2 τα οποία επιμολύνθηκαν παροδικά με τον συνθετικό υποκινητή pG₅B-CAT. Η δραστηριότητα αυτή ενισχύθηκε σημαντικά από την συνέκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών (ενεργοποίηση κατά 28 φορές). Αντιθέτως, η μεταλλαγμένη GAL4-HNF4 (25-49), που στερείται της AF-1 περιοχής, χαρακτηρίζεται από έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας και συνενεργοποίησης από τις Smad πρωτεΐνες. Επιπλέον, η σημειακά μεταλλαγμένη GAL4-HNF4 (1-49) στην οποία η τυροσίνη της αμινοξικής θέσης 6 αντικαταστάθηκε από αλανίνη (Y6A), στερείται μεταγραφικής ενεργότητας και συνενεργοποίησης από τις Smad3 και Smad4 στα κύτταρα HepG2. Ελέγχθηκε, επίσης, η ομοιογενής έκφραση των προαναφερθέντων μεταλλαγμένων υβριδικών μορφών του HNF4, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 40Γ**. Το πείραμα ανοσοαποτύπωσης πραγματοποιήθηκε με πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κυττάρων COS-7 που επιμολύνθηκαν

παροδικά με τους φορείς έκφρασης των παραπάνω GAL4-HNF4 μορφών. Χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-GAL4 έναντι του επίτοπου που φέρουν. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 40** υποδηλώνουν ότι η τυροσίνη της θέσεως 6 και πιθανόν και άλλες υδρόφοβες αμινοξικές θέσεις της AF-1 περιοχής του HNF4 είναι σημαντικές για την λειτουργική συνεργασιακή δράση των Smad και HNF4 πρωτεϊνών.



Εικόνα 40. Μια σημειακή μετάλλαξη στην AF-1 περιοχή του HNF4 καταστέλει την Smad επαγόμενη συνενεργοποίηση του HNF4. Α. Σχηματική αναπαράσταση των υβριδικών μεταλλαγμένων GAL4-HNF4 μορφών, που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας που περιγράφονται στο Β. Η σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης της τυροσίνης της αμινοξικής θέσης 6, σε αλανίνη (Y6A) υποδεικνύεται με βέλος. **Β.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-CAT (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των ενδεδειγμένων GAL4 HNF4 πρωτεϊνών, σε ποσότητα 100 ng από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία (λευκές ράβδοι) ή παρουσία (μαύρες ράβδοι) των φορέων έκφρασης των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της ακετυλοτρανσφεράσης (CAT) δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και

αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Γ. Ανάλυση της έκφρασης των GAL4 HNF4 πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη μεταγραφικής δραστηριότητας που παρουσιάζεται στο Α. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με ποσότητα 6 μg από τους φορείς έκφρασης των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%. Ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ανοσοαποτύπωση με χρήση μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του GAL4 (mouse anti-GAL4) (1:2500), ενός δευτερεύοντος anti mouse-HRP αντισώματος (1:10000) και του συστήματος ECL. Τα βέλη, αριστερά του ανοσοαποτυπώματος, υποδηλώνουν τη θέση των εκφραζόμενων πρωτεϊνών. Μ: μάρτυρας πρωτεϊνικής μοριακής μάζας σε kilodaltons.

Επίδραση συνενεργοποιητών στην μεταγραφική δραστηριότητα της υβριδικής GAL4-HNF4 πρωτεΐνης

Οι προηγούμενες αναλύσεις δείχνουν ότι οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες λειτουργούν ως συνενεργοποιητές που ενισχύουν την μεταγραφική δραστηριότητα του παράγοντα HNF4. Θεωρήθηκε σκόπιμη η σύγκριση της δράσης των Smad πρωτεϊνών με την αντίστοιχη δράση κλασικών συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων στην μεταγραφική ενεργότητα του HNF4. Για τον σκοπό αυτό, ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc παρουσία ή απουσία της πρωτεΐνης GAL4- HNF4 και των συνενεργοποιητών Src-1a, PGC1, CBP και RAC3. Όπως δείχνεται στην **Εικόνα 41**, ο συνθετικός υποκινητής pG₅B ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά κατά 8 φορές από την αγρίου τύπου υβριδική GAL4-HNF4 πρωτεΐνη. Η συνέκφραση του συνενεργοποιητή Src-1a προκάλεσε περαιτέρω αύξηση αυτής της μεταγραφικής ενεργοποίησης (ενεργοποίηση κατά 37 φορές). Αντίστοιχη αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας της GAL4-HNF4 προκάλεσε η συνέκφραση του συνενεργοποιητή RAC3 (ενεργοποίηση κατά 33 φορές). Η συνέκφραση του συνενεργοποιητή CBP προκάλεσε σχετικά μικρή ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας του GAL4-HNF4 (ενεργοποίηση κατά 11 φορές). Τέλος, η συνέκφραση του GAL4-HNF4 και του συνενεργοποιητή PGC1 ενεργοποίησε πολύ ισχυρά τον συνθετικό υποκινητή (ενεργοποίηση κατά 1564 φορές). Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας του παράγοντα HNF4 από τους συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων Src-1a, RAC3, CBP και κυρίως από τον PGC1.

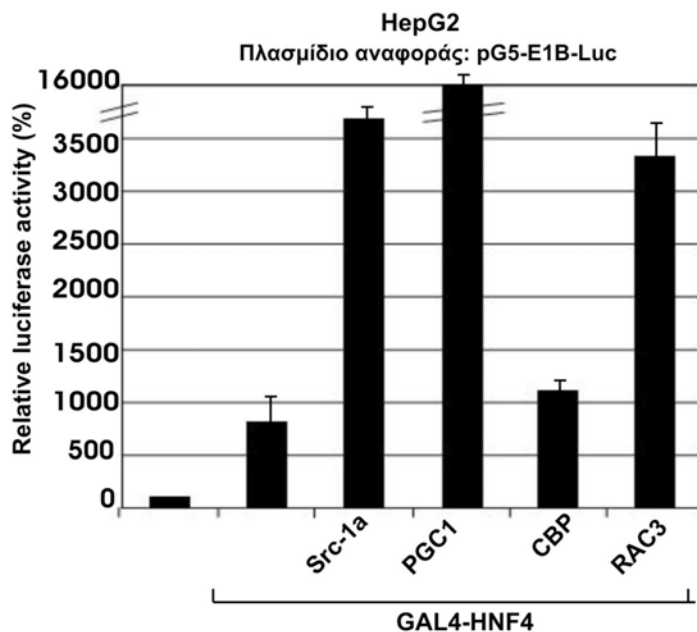
Προκειμένου να εντοπιστούν οι περιοχές του HNF4 που αλληλεπιδρούν λειτουργικά με τους συνενεργοποιητές και να συγκριθούν με την περιοχή που απαιτείται για την ενεργοποίηση από τις Smad πρωτεΐνες, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταλλαγμένες υβριδικές GAL4-HNF4 (1-50) και GAL4-HNF4 (50-455) που παριστάνονται σχηματικά στην **Εικόνα 42A**. Η παροδική επιμόλυνση HepG2 κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc και τον φορέα έκφρασης της GAL4-HNF4 (1-50) προκάλεσε μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή κατά 142 φορές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 42B**. Η συνέκφραση των συνενεργοποιητών Src-1a, RAC3, PGC1 καθώς και του TIF2, ο οποίος επίσης αποτελεί μέλος της οικογένειας των p160 συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων αύξησαν την δραστικότητα του GAL4-HNF4 (1-50) κατά 2.1, 1.5, 1.7 και 1.4 φορές αντίστοιχα (συνολική ενεργοποίηση κατά 300, 217, 238 και 204 φορές αντίστοιχα). Η επιμόλυνση των HepG2 κυττάρων με τον φορέα έκφρασης της GAL4-HNF4 (50-455) ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή κατά 1.2 φορές. Η συνέκφραση των συνενεργοποιητών TIF2, Src-1a και RAC3 δεν κατόρθωσαν να αυξήσουν τη δραστικότητα της GAL4-HNF4 (50-455). Αντιθέτως, ο συνενεργοποιητής PGC1 προκάλεσε μια σημαντική αύξηση της δραστικότητας αυτής κατά 937.5 φορές. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 42** υποδηλώνουν ότι οι κύριοι συνενεργοποιητές του παράγοντα HNF4 είναι ο Src-1a και ο PGC1. Ο πρώτος δρά κυρίως στην AF-1 περιοχή (1-49) και ο δεύτερος δρά κυρίως στο υπόλοιπο μόριο του HNF4 (49-455).

Στην συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση των συνενεργοποιητών Src-1a και PGC1 σε σύγκριση με την επίδραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών στην μεταγραφική ενεργότητα των μεταλλαγμένων GAL4-HNF4 (1-50) και GAL4-HNF4 (50-455) μορφών. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 43**, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc. Η συνέκφραση των Smad3/Smad4 με την GAL4-HNF4 (1-50) αύξησε την μεταγραφική ενεργότητα της μεταλλαγμένης HNF4 πρωτεΐνης κατά 8.8 φορές (ενεργοποίηση κατά 1250 φορές έναντι 142), ενώ η συνέκφραση του συνενεργοποιητή Src-1a ή του PGC1 αύξησε την μεταγραφική δραστικότητα της GAL4-HNF4 (1-50) κατά 1.7 και 2.1 φορές αντίστοιχα (ενεργοποίηση κατά 240 και 300 φορές έναντι 142). Η συνέκφραση των PGC1 και GAL4-HNF4 (50-455) αύξησε την μεταγραφική δραστικότητα αυτής της υβριδικής πρωτεΐνης κατά 370.6 φορές (ενεργοποίηση κατά 1112 φορές έναντι ενεργοποίησης κατά 3 φορές), ενώ η

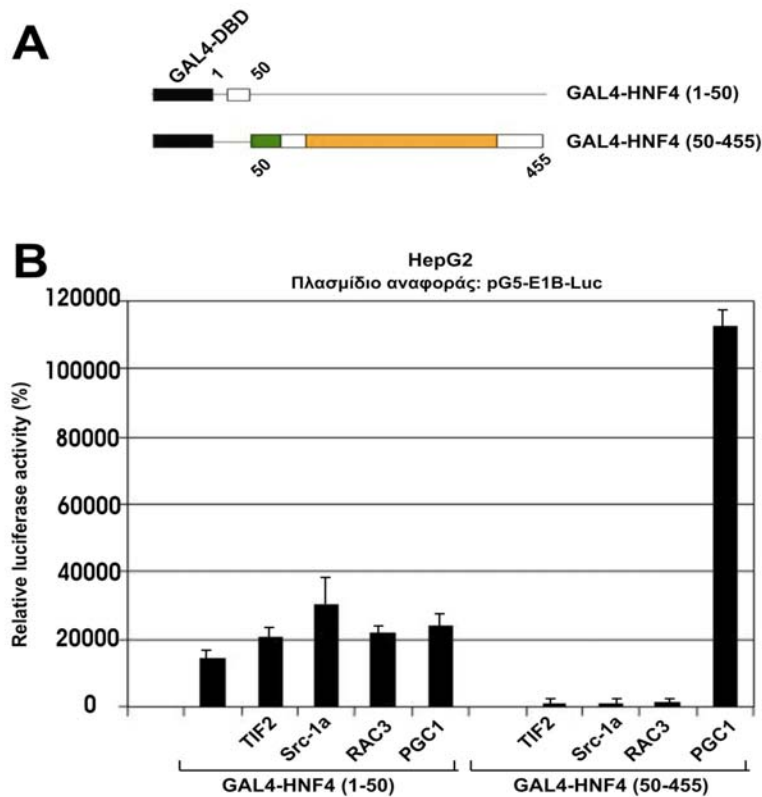
συνέκφραση των Smad3/ Smad4 ή του συνενεργοποιητή Src-1a αύξησε την μεταγραφική ενεργότητα της GAL4-HNF4 (50-455) κατά 1.8 και 1.3 φορές αντίστοιχα (ενεργοποίηση κατά 5.5 και 4 φορές έναντι ενεργοποίησης κατά 3 φορές που προκαλεί μόνη της η περιοχή 50-455 του παράγοντα HNF4). Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 43** αποδεικνύουν ότι οι Smad3/Smad4 πρωτεΐνες αυξάνουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4 αποκλειστικά μέσω της AF-1 περιοχής, ενώ ο συνενεργοποιητής PGC1 ενισχύει σημαντικά την μεταγραφική δραστηριότητα του υπόλοιπου μορίου του παράγοντα HNF4.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε αν οι Smad3/Smad4 πρωτεΐνες μπορούν να ενισχύσουν την μεταγραφική ενεργότητα της GAL4-HNF4 (50-455) σε συνεργασία με τον συνενεργοποιητή Src-1a. Για τον σκοπό αυτό κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5B-luc. Όπως έχει προαναφερθεί και φαίνεται στην **Εικόνα 44**, η έκφραση της υβριδικής GAL4-HNF4 (50-455) ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή κατά 3 φορές. Η συνέκφραση του συνενεργοποιητή Src-1a ενίσχυσε αυτή την ενεργότητα κατά 2 φορές (ενεργοποίηση κατά 6 φορές), ενώ η συνέκφραση των Smad3/Smad4 πρωτεϊνών αύξησε την ενεργότητα της GAL4-HNF4 (50-455) κατά 1.3 φορές (ενεργοποίηση κατά 4 φορές). Η ενεργοποίηση της περιοχής 50-455 του HNF4 από τις Smad πρωτεΐνες οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ικανότητα των Smad πρωτεϊνών να προσδένονται άμεσα στην περιοχή 370-455 (περιοχή F) όπως έχει δειχθεί σε παράλληλα πειράματα (Chou et al., 2003). Η ταυτόχρονη υπερέκφραση των Smad3/Smad4 και Src-1a αύξησε την μεταγραφική ενεργότητα της GAL4-HNF4 (50-455) κατά 4 φορές (ενεργοποίηση κατά 12 φορές). Η αύξηση αυτή είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα των αυξήσεων που προκάλεσε η ανεξάρτητη έκφραση των Smad3/Smad4 και Src-1a (1.3 και 2= 3.3). Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 44** υποδηλώνουν την συνεργασιακή δράση των Smad3/Smad4 και Src-1a στην αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της περιοχής 50-455 του μεταγραφικού παράγοντα HNF4.

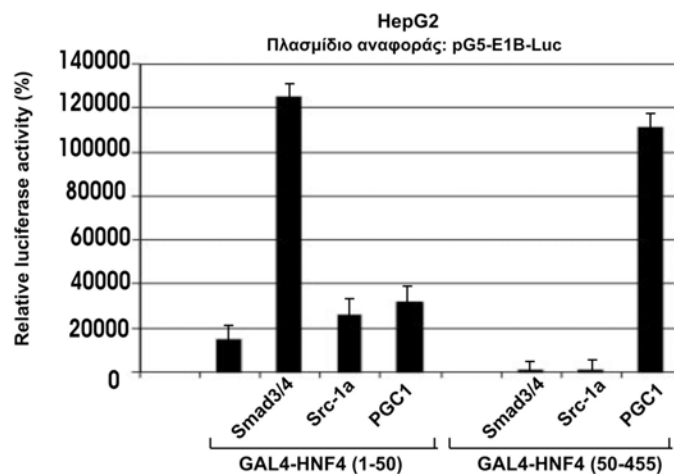
Συνολικά, οι προαναφερθείσες αναλύσεις καταδεικνύουν ότι οι Smad3/Smad4 πρωτεΐνες δρουν ως συνενεργοποιητές της AF-1 περιοχής του HNF4 και ότι μπορούν να ενισχύσουν την δραστηριότητα της περιοχής 50-455 του HNF4 μέσω συνεργασιακής αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή Src-1a. Επίσης, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν τον συνενεργοποιητή PGC1 ως τον κύριο ενισχυτή της μεταγραφικής δραστηριότητας της HNF4 πρωτεΐνης που αποτελείται από την περιοχή 50-455.



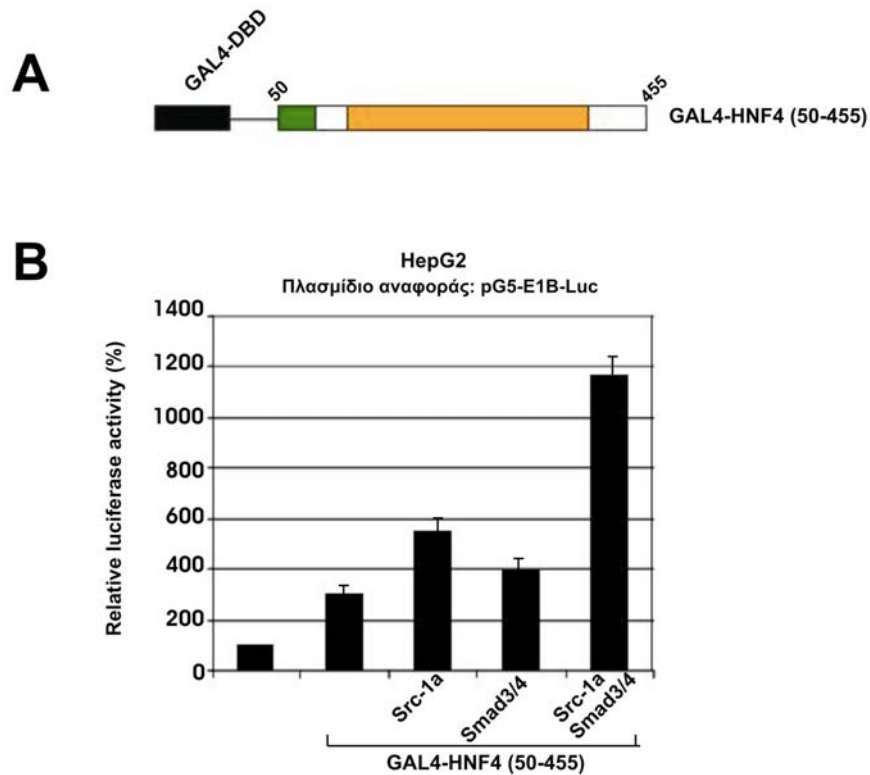
Εικόνα 41. Επίδραση συνενεργοποιητών στη μεταγραφική δραστηριότητα της υβριδικής GAL4-HNF4 πρωτεΐνης. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4-HNF4, Src-1a, PGC1, CBP και RAC3 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 42. Επίδραση συνενεργοποιητών πυρηνικών υποδοχέων στην μεταγραφική δραστηριότητα μεταλλαγμένων μορφών της GAL4-HNF4 πρωτεΐνης. Α. Σχηματική αναπαράσταση των μεταλλαγμένων μορφών HNF4 (1-50) και HNF4 (50-455), που χρησιμοποιήθηκαν. Αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές είναι συζευγμένες στο N-τελικό άκρο τους με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA της πρωτεΐνης GAL4 (GAL4 DBD). **Β.** Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4 HNF4 (1-50) ή GAL4-HNF4 (50-455), σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης των TIF2, Src-1a, RAC3 ή PGC1 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. όπως φαίνεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



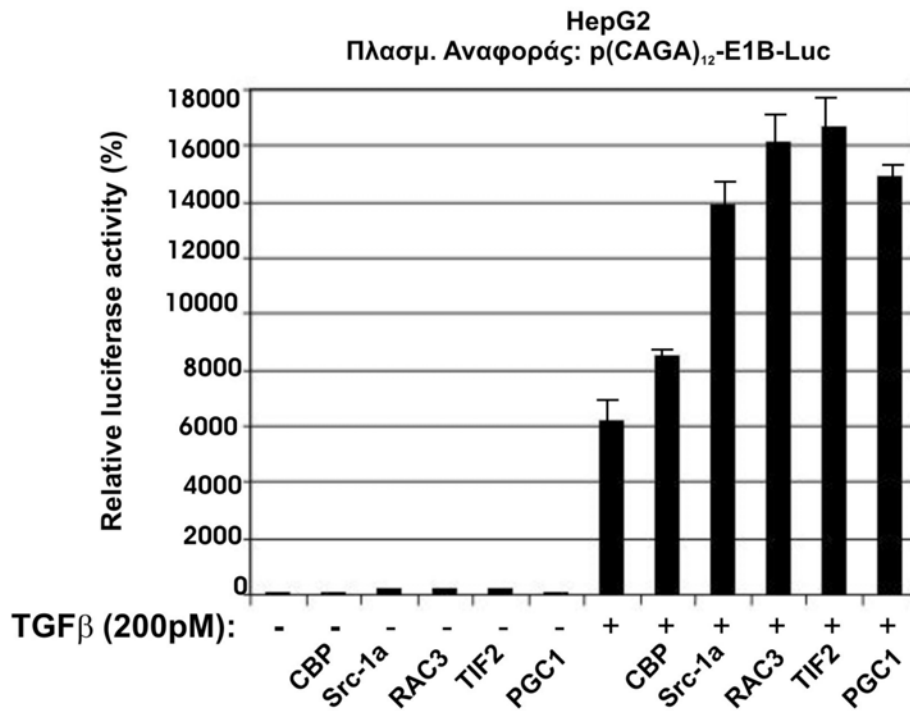
Εικόνα 43. Οι Smad3/4 πρωτεΐνες αυξάνουν την μεταφραφική δραστηριότητα του HNF4 αποκλειστικά μέσω της AF-1 περιοχής του. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών GAL4 HNF4 (1-50) ή GAL4-HNF4 (50-455), σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης των Smad3/4, Src-1a, ή PGC1 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, όπως φαίνεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 44. Συνεργασιακή δράση των Smad3/4 και Src-1a στην μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-HNF4 (50-455). **A.** Σχηματική αναπαράσταση της μεταλλαγμένης GAL4-HNF4 (50-455). **B.** Κύτταρα HepG2 επιμόλυνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅B-luc (1 μg) και τον φορέα έκφρασης της πρωτεΐνης GAL4-HNF4 (50-455), σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία των φορέων έκφρασης των Src-1a ή/και Smad3/4 ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα, όπως φαίνεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμόλυνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Επίδραση των συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGFβ

Παράλληλα με τον έλεγχο της δράσης των Smad3/Smad4 πρωτεϊνών ως συνενεργοποιητών του ορφανού πυρηνικού υποδοχέα HNF4, κρίθηκε σκόπιμος ο έλεγχος της ικανότητας των προαναφερθέντων συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων να ενισχύουν το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ηπατικά κύτταρα HepG2 τα οποία επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-luc, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 45**. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ και χρησιμοποιήθηκε ο συνενεργοποιητής CBP του μονοπατιού TGFβ για την πιστοποίηση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων (control). Απουσία του συνδέτη, η έκφραση των συνενεργοποιητών CBP, Src-1a, RAC3, TIF2 ή PGC1 ενεργοποίησε μεταγραφικά τις ενδογενείς Smad3/Smad4 πρωτεΐνες κατά 0.8, 1.7, 1.8, 1.5 και 1.3 φορές αντίστοιχα. Η παρουσία του συνδέτη TGFβ ενεργοποίησε μεταγραφικά τις ενδογενείς Smad3/Smad4 πρωτεΐνες και συνεπώς τον συνθετικό υποκινητή, κατά 62 φορές. Η έκφραση του συνενεργοποιητή CBP αύξησε την δραστικότητα του TGFβ κατά 1.4 φορές (ενεργοποίηση κατά 85.5 φορές). Η έκφραση των Src-1a, RAC3, TIF2 ή PGC1 αύξησε την μεταγραφική δραστικότητα του TGFβ κατά 2.2, 2.6, 2.7 και 2.4 φορές αντίστοιχα (ενεργοποίηση κατά 139, 162, 167 και 149 φορές αντίστοιχα). Συνεπώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της **Εικόνας 45**, οι συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων Src-1a, RAC3, TIF2 και PGC1 ενισχύουν την μεταγραφική ενεργότητα που επάγεται από τον TGFβ, πιθανώς μέσω λειτουργικών αλληλεπιδράσεων με τις Smad πρωτεΐνες, όπως συμβαίνει με τον συνενεργοποιητή CBP.



Εικόνα 45. Επίδραση συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων στο μονοπάτι σηματοδότησης του TGFβ. Ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τους φορείς έκφρασης των συνενεργοποιητών CBP, Src-1a, RAC3, TIF2 και PGC1, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM). Η προσθήκη του TGFβ πραγματοποιήθηκε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση, και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος και αποτελεί τη μέση τιμή τουλάχιστον δύο ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ

Περιοχές της TGFβ-ρυθμιζόμενης Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστηριότητα

Η Smad3 πρωτεΐνη αποτελεί έναν από τους κυριότερους μεταγωγείς της TGFβ σηματοδότησης και δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής γονιδίων-στόχων του συνδέτη TGFβ. Προκειμένου να αναγνωριστούν και να χαρακτηριστούν περιοχές της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης που ρυθμίζουν την μεταγραφική της δράση, ως απόκριση στον συνδέτη TGFβ, κατασκευάστηκαν διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της Smad3, χρησιμοποιώντας την μέθοδο της PCR και κλωνοποιήθηκαν σε σύζευξη, στην N-τερματική περιοχή τους, με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA Binding Domain, DBD), του GAL4 ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα (aa 1-147). Με την χρήση αυτού του ετερόλογου συστήματος, οι διάφορες μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης μπορούν να ελεγχθούν ως προς την μεταγραφική τους δραστηριότητα, ανεξάρτητα από την ικανότητά τους να προσδένονται στο DNA. Επίσης, η περιοχή GAL4 DBD περιέχει ένα σινιάλο πυρηνικής μετατόπισης, επομένως όλες οι πρωτεΐνες που συζεύγνυνται με αυτή την περιοχή εντοπίζονται στον πυρήνα σε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων κυττάρων. Οι μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 πρωτεΐνης εκφράστηκαν σε κύτταρα θηλαστικών και ελέγχθηκε η ικανότητά τους να ενεργοποιούν μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή pG5-E1B-luc, ο οποίος αποτελείται από πέντε διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του GAL4 σε σύζευξη με τον ελάχιστο E1B υποκινητή και το γονίδιο της λουσιφεράσης της πυγολαμπίδας (γονίδιο αναφοράς). Στις αναλύσεις αυτές η μεταγραφική δραστηριότητα των απαλοιφών της Smad3 συσχετίστηκαν με την μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης GAL4 DBD η οποία για τον λόγο αυτό τέθηκε ίση με την μονάδα.

Κύτταρα ανθρώπινου ηπατώματος HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG5-E1B-luc και τον φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου GAL4-Smad3 πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα την αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του συνθετικού υποκινητή κατά 57 φορές, όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 46**. Όταν η

επιβολή πραγματοποιήθηκε παρουσία του συνδέτη TGFβ παρατηρήθηκε περίπου 9 φορές μεγαλύτερη αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή (ενεργοποίηση κατά 538 φορές) σε σχέση με την μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3 απουσία του συνδέτη TGFβ, γεγονός που υποδεικνύει ότι η TGFβ σηματοδότηση ενισχύει την μεταγραφική δράση της υβριδικής GAL4-Smad3, πιθανότητα μέσω αλληλεπιδράσεών της με τις ενδογενείς Smad3 ή Smad4 πρωτεΐνες. Η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 που αποτελείται από την MH1 περιοχή (1-130), ή την MH1 περιοχή και την περιοχή linker (1-230) δεν ενεργοποίησε μεταγραφικά τον G₅B υποκινητή. Αντιθέτως, η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 (1-248) που αποτελείται από την MH1 περιοχή, τον linker και τα 18 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής, τα οποία περιλαμβάνουν τις δύο πρώτες β πτυχωτές επιφάνειες (β1 και β2), εμφάνισε μεγάλη μεταγραφική δραστηριότητα σε κύτταρα HepG2, καθώς ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 28 φορές. Το αποτέλεσμα αυτό επισημαίνει ότι μπορεί να επιτευχθεί μεταγραφική δραστηριότητα από μια μεταλλαγμένη Smad3 πρωτεΐνη που στερείται του μεγαλύτερου μέρους της MH2 περιοχής της. Το ενδιαφέρον αυτό εύρημα έρχεται σε αντίθεση με την ισχύουσα θεωρία ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση από την Smad3 απαιτεί μόνο την MH2 περιοχή.

Η υβριδική GAL4-Smad3 (130-424) που στερείται της MH1 περιοχής παρουσίασε μεγάλη μεταγραφική δραστηριότητα, καθώς ενεργοποίησε τον υποκινητή G₅B κατά 167 φορές και η δραστηριότητα αυτή αυξάνεται περαιτέρω από τον συνδέτη TGFβ κατά 3 φορές (ενεργοποίηση κατά 518 φορές). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς προηγούμενες μελέτες υποδεικνύουν τον κατασταλτικό ρόλο της MH1 περιοχής στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης (Liu et al., 1996). Η GAL4-Smad3 (230-424), που αποτελείται μόνο από την MH2 περιοχή παρουσίασε επίσης μεγάλη μεταγραφική δραστηριότητα στα κύτταρα HepG2, τόσο απουσία (ενεργοποίηση κατά 68 φορές) όσο και παρουσία του TGFβ (ενεργοποίηση κατά 168 φορές, αύξηση κατά 2.4 φορές), όπως αναμενόταν. Ωστόσο, η απαλοιφή των 18 πρώτων αμινοξέων από την MH2 περιοχή στην υβριδική GAL4-Smad3 (248-424) πρωτεΐνη, ανέστειλε πλήρως την μεταγραφική δραστηριότητα της MH2 περιοχής, τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ, στα κύτταρα HepG2. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα 18 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής της Smad3 είναι απαραίτητα για την μεταγραφική της ενεργότητα.

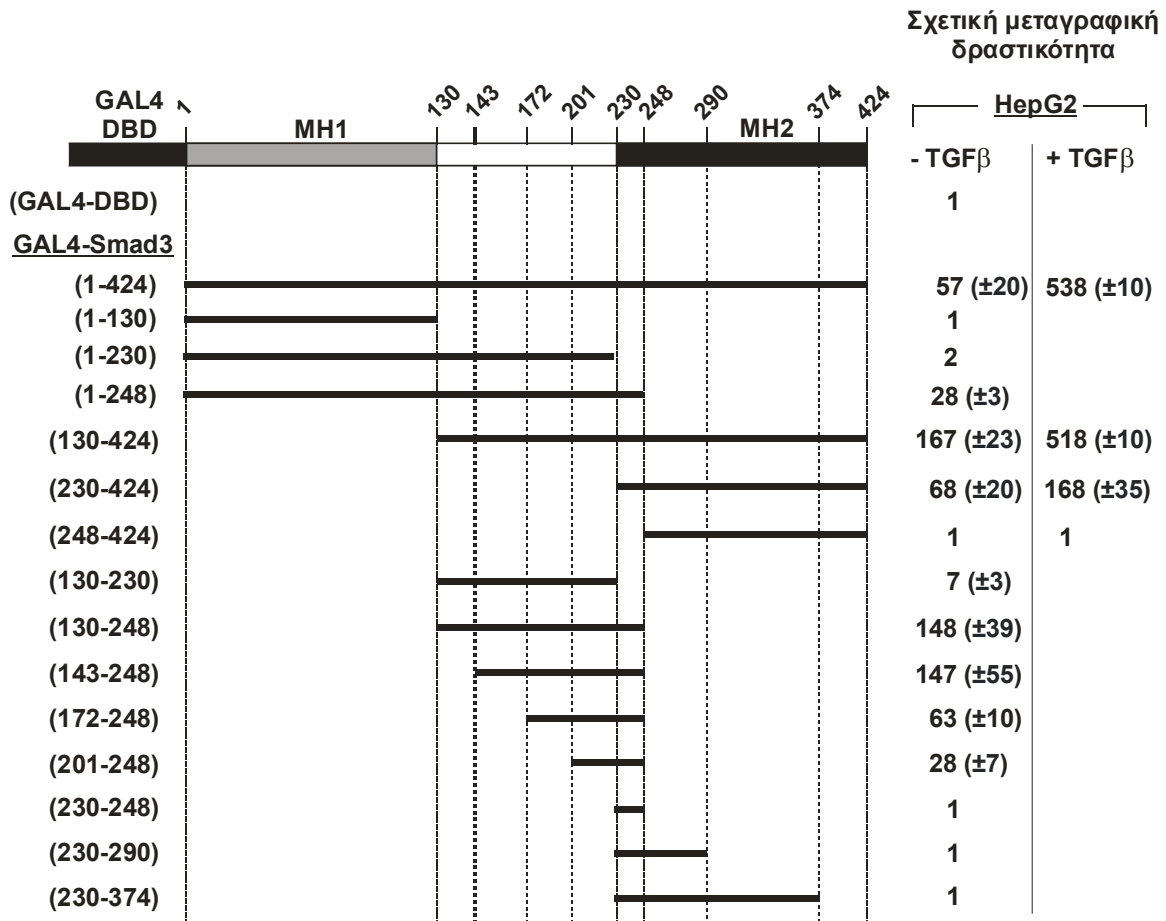
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 46** η υβριδική GAL4-Smad3 (230-248), που αποτελείται μόνο από τα 18 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής της Smad3, ήταν μεταγραφικά ανενεργή, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι απαιτούνται συμπληρωματικές, N-τερματικές ή C-τερματικές αλληλουχίες της Smad3, προκειμένου η 230-248 περιοχή να επιδείξει την μεταγραφική της δράση. Προκειμένου να ερευνηθεί αυτή η πιθανότητα, κατασκευάστηκε μια δεύτερη ομάδα μεταλλαγμένων, υβριδικών με το GAL4 DBD, μορφών της Smad3 πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 46**, η GAL4-Smad3 (130-230) που αποτελείται μόνο από τον linker παρουσιάζει ελάχιστη μεταγραφική δραστηριότητα, ενώ η προσθήκη των 18 αμινοξέων της MH2 περιοχής σε αυτή, δηλαδή η GAL4-Smad3 (130-248), αυξάνει δραματικά την μεταγραφική δραστηριότητα του συνθετικού υποκινητή κατά 148 φορές, σε κύτταρα HepG2. Αυτή η έντονη μεταγραφική δραστηριότητα δεν επηρεάστηκε από την απαλοιφή των 12 πρώτων αμινοξέων του linker που οδήγησε στην υβριδική GAL4-Smad3 (143-248) (ενεργοποίηση κατά 147 φορές.), αλλά μειώθηκε σημαντικά με διαδοχικές απαλοιφές περιοχών του linker. Έτσι, η GAL4-Smad3 (172-248) ενεργοποίησε τον συνθετικό υποκινητή κατά 63 φορές και η GAL4-Smad3 (201-248) κατά 28 φορές, σε κύτταρα HepG2. Η μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3 (230-248) δεν αυξήθηκε ούτε από την προέκταση αυτής μέχρι το αμινοξύ 290 ή μέχρι το αμινοξύ 374 της περιοχής MH2.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα των επιμολύνσεων των HepG2 κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού NIH 3T3. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 47** η υβριδική GAL4-Smad3 ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή pG5-E1B-luc κατά 49 φορές απουσία του TGFβ και κατά 150 φορές παρουσία του συνδέτη (αύξηση κατά 3 φορές) στα κύτταρα NIH 3T3. Η υβριδική GAL4-Smad3 (1-248) εμφάνισε και στα κύτταρα αυτά, όπως και στα HepG2, αυξημένη μεταγραφική ενεργότητα και μάλιστα μεγαλύτερη από την αγρίου τύπου GAL4-Smad3 (ενεργοποίηση κατά 63 φορές). Η μεταγραφική ενεργότητα των GAL4-Smad3 (130-424) και GAL4-Smad3 (230-424) ήταν όπως αναμενόταν υψηλή, τόσο απουσία του TGFβ (ενεργοποίηση κατά 166 και 25 φορές αντίστοιχα) όσο και παρουσία του συνδέτη (ενεργοποίηση κατά 268 και 53 φορές αντίστοιχα) (αύξηση κατά 1.6 και 2.1 φορές αντίστοιχα). Η απαλοιφή των 18 πρώτων αμινοξέων της MH2 περιοχής

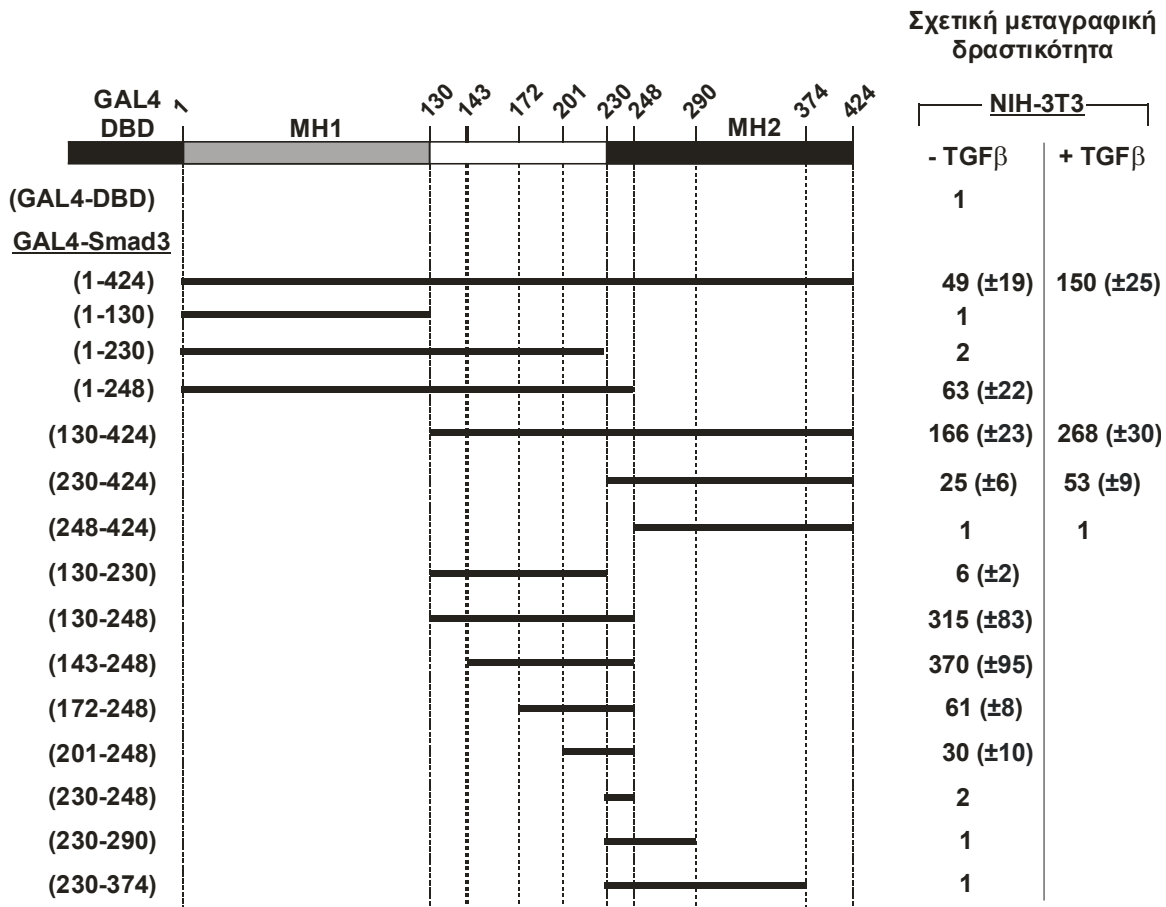
κατέστησε την υβριδική GAL4-Smad3 (248-424) μεταγραφικώς ανενεργή και σε αυτή την κυτταρική σειρά. Η GAL4-Smad3 (130-230) που αποτελείται μόνο από την περιοχή linker εμφάνισε ελάχιστη μεταγραφική δραστηριότητα που αυξήθηκε δραματικά με την προσθήκη σε αυτήν των 18 πρώτων αμινοξέων της MH2 περιοχής (ενεργοποίηση κατά 315 φορές). Η μεγάλη μεταγραφική ενεργότητα της GAL4-Smad3 (130-248) διατηρήθηκε και στην υβριδική GAL4-Smad3 (143-248), καθώς η τελευταία ενεργοποίησε τον συνθετικό υποκινητή κατά 370 φορές. Οι διαδοχικές απαλοιφές περιοχών του linker οδήγησαν σε αντίστοιχη διαδοχική μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας. Έτσι, η GAL4-Smad3 (172-248) ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 61 φορές. Η GAL4-Smad3 (201-248) περιέχει την ελάχιστη περιοχή της Smad3 που παρουσιάζει μεταγραφική δραστηριότητα (ενεργοποίηση του υποκινητή κατά 30 φορές), καθώς η GAL4-Smad3 (230-248) ήταν και στα NIH 3T3 κύτταρα μεταγραφικά σιωπηρή και παρέμεινε σιωπηρή ακόμα και μετά τις C-τερματικές προεκτάσεις της στην MH2 περιοχή (μεταλλαγμένες μορφές GAL4-Smad3 (230-290) και GAL4-Smad3 (230-374)).

Για να επιβεβαιώσουμε ότι η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας που παρουσιάζουν κάποιες από τις μεταλλαγμένες μορφές της υβριδικής GAL4-Smad3 πρωτεΐνης, δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφρασή τους, νεφρικά κύτταρα πιθήκου COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης όλων των υβριδικών GAL4-Smad3 πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν στις προηγούμενες αναλύσεις. Όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 48**, η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων των προαναφερθέντων κυττάρων έδειξε ότι όλες οι μεταλλαγμένες υβριδικές μορφές της Smad3 πρωτεΐνης εκφράζονται σε συγκρίσιμο μεταξύ τους βαθμό. Εξαιρέση αποτελεί η GAL4-Smad3 (248-424) που εκφράζεται σε χαμηλότερα αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα.

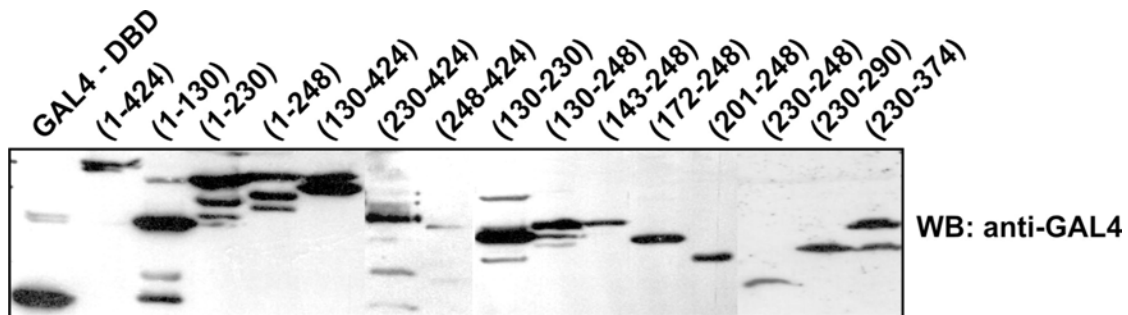
Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι εκτός της MH2 περιοχής, μια δεύτερη περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης εμφανίζει εξαιρετικά μεγάλη μεταγραφική ενεργότητα σε κύτταρα θηλαστικών. Η δεύτερη αυτή περιοχή εντοπίζεται στην περιοχή του linker και επεκτείνεται στην MH2 περιοχή για να συμπεριλάβει τα αμινοξέα 230-248, τα οποία όπως προκύπτει από το πείραμα ανοσοαποτύπωσης, πιθανότατα απαιτούνται για την σταθερότητα της MH2 περιοχής.



Εικόνα 46. Δομική - λειτουργική ανάλυση της μεταγραφικής δραστηριότητας της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης, με χρήση του ετερόλογου συστήματος GAL4, σε κύτταρα HepG2. Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου και απαλοιφών της Smad3 πρωτεΐνης, συζευγμένων με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4 (GAL4 DBD), που χρησιμοποιήθηκαν. Κύτταρα HepG2 επιμόλυνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης των μορφών της GAL4-Smad3 που υποδεικνύονται, σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του TGFβ (200 pM), όπως υποδεικνύεται, η προσθήκη του οποίου έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η μεταγραφική δραστηριότητα κάθε GAL4-Smad3 πρωτεΐνης αναλύθηκε σε σχέση με τη μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4 DBD πρωτεΐνης που τέθηκε ίση με την μονάδα. Κάθε μεταγραφική δραστηριότητα που παρουσιάζεται στα δεξιά του σχήματος, αποτελεί την μέση τιμή (+/- απόκλιση) τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1g), με τον οποίο επιμόλυνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 47. Δομική - λειτουργική ανάλυση της μεταγραφικής δραστηριότητας της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της ανθρώπινης Smad3 πρωτεΐνης, με χρήση του ετερόλογου συστήματος GAL4, σε κύτταρα NIH3T3. Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου και απαλοιφών της Smad3 πρωτεΐνης, συζευγμένων με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του ενεργοποιητή του σακχαρομύκητα GAL4 (GAL4 DBD), που χρησιμοποιήθηκαν. Κύτταρα NIH3T3 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και με τους πλασμδιακούς φορείς έκφρασης των μορφών της GAL4-Smad3 που υποδεικνύονται, σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του TGFβ (200 pM), όπως υποδεικνύεται, η προσθήκη του οποίου έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η μεταγραφική δραστηριότητα κάθε GAL4-Smad3 πρωτεΐνης αναλύθηκε σε σχέση με τη μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4 DBD πρωτεΐνης που τέθηκε ίση με την μονάδα. Κάθε μεταγραφική δραστηριότητα που παρουσιάζεται στα δεξιά του σχήματος, αποτελεί την μέση τιμή (+/- απόκλιση) τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων κάθε ένα από τα οποία πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εφράζεται από τον πλασμδιακό φορέα pCMVβ-gal (1g), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

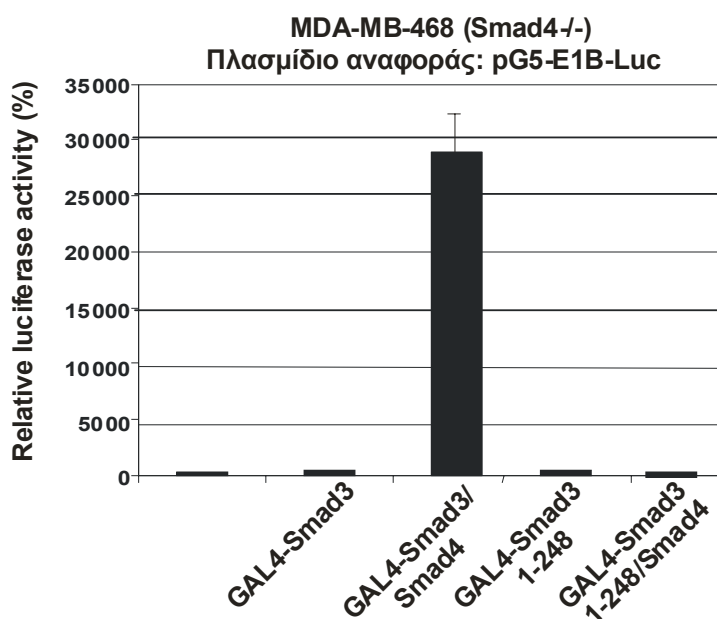


Εικόνα 48. Έλεγχος της έκφρασης της αγρίου τύπου GAL4-Smad3 πρωτεΐνης και μεταλλαγμένων μορφών της. Η GAL4-Smad3 πρωτεΐνη, οι μεταλλαγμένες μορφές της των οποίων ελέγχθηκε η μεταγραφική δραστηριότητα, και η GAL4 πρωτεΐνη, αναλύθηκαν ως προς την έκφρασή τους με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με 15 μg από τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών. 48 ώρες μετά την επιμόλυνση, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των επιμολυσμένων κυττάρων αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%. Οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-GAL4 αντίσωμα (1:2500) και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000). Η ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών έγινε με χρήση του συστήματος ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL).

Η μεταγραφική δραστικότητα της GAL4-Smad3 1-248 είναι ανεξάρτητη της Smad4 πρωτεΐνης

Όπως υπέδειξαν οι αναλύσεις μεταγραφικής δραστικότητας στα κύτταρα HepG2 και NIH 3T3, η περιοχή 1-248 της Smad3 πρωτεΐνης εμφανίζει μεταγραφική ενεργότητα αντίστοιχη με αυτήν της αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνης. Η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 1-248 πρωτεΐνη αποτελείται από την MH1 περιοχή, τον linker και τα πρώτα 18 αμινοξέα της MH2 περιοχής της Smad3. Προκειμένου να ελεγχθεί αν η μεταγραφική δραστικότητά της οφείλεται στην λειτουργική της αλληλεπίδραση με την Smad4 πρωτεΐνη, καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 που στερούνται ενδογενών Smad4 μορίων (de Winter et al., 1997) επιμολύνθηκαν παροδικά με τον συνθετικό υποκινητή pG5-E1B-luc ο οποίος ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά από την GAL4-Smad3 κατά 4.1 φορές, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 49**. Η συνέκφραση της *6myc-Smad4* οδήγησε σε ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της μεταγραφικής δραστικότητας της GAL4-Smad3 (ενεργοποίηση κατά 290 φορές). Η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 1-248 πρωτεΐνη ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό υποκινητή κατά 4.7 φορές, αλλά δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αύξηση με την συνέκφραση της *6myc-Smad4* (ενεργοποίηση κατά 4.6 φορές).

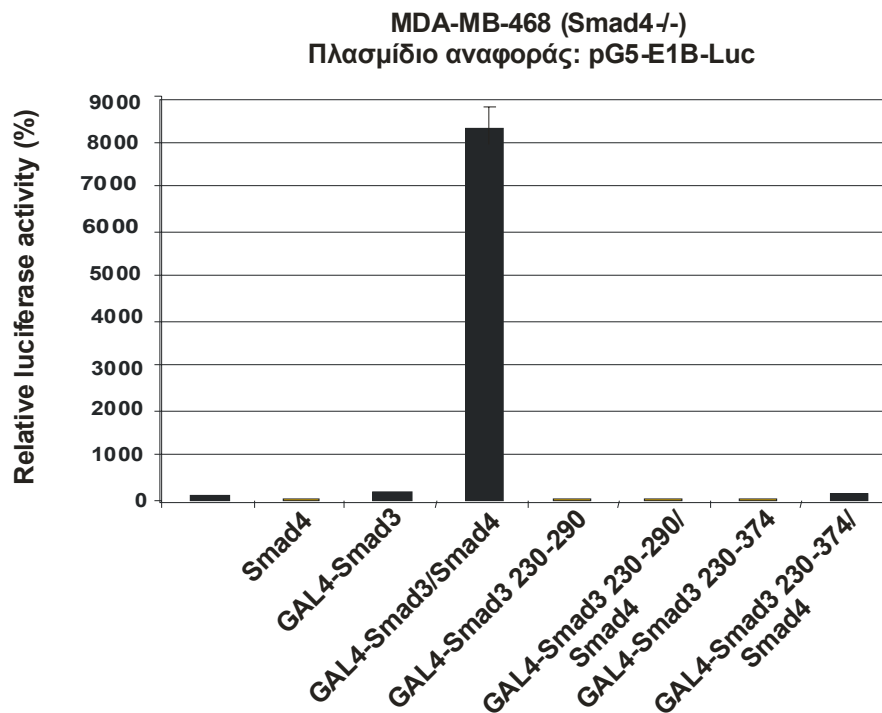
Είναι γνωστό ότι η MH2 περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης ευθύνεται για την αλληλεπίδρασή της με την Smad4. Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην **Εικόνα 49** προκύπτει ότι τα 18 πρώτα αμινοξέα της Smad3, ενώ δεν αρκούν για την λειτουργική αλληλεπίδραση με την Smad4, εμφανίζουν ενδογενή μεταγραφική δραστικότητα συγκρίσιμη με εκείνη της αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνης.



Εικόνα 49. Η μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3 1-248 είναι ανεξάρτητη της Smad4 πρωτεΐνης. Καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 που στερούνται των ενδογενών Smad4 πρωτεϊνών επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και με τους πλασμδιακούς φορείς έκφρασης της GAL4-Smad3 ή της GAL4-Smad3 1-248 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της *hmyc*-Smad4 πρωτεΐνης (1g) όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλοτήτας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εφράζεται από τον πλασμδιακό φορέα pCMVβ-gal (1g), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Οι μεταγραφικώς ανενεργές GAL4-Smad3 230-290 και GAL4-Smad3 230-374 στερούνται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4

Οι υβριδικές GAL4-Smad3 230-290 και GAL4-Smad3 230-374 περιλαμβάνουν μεγάλο μέρος της MH2 περιοχής της Smad3 πρωτεΐνης. Σύμφωνα με τις αναλύσεις των Εικόνων 23 και 24 αυτές οι υβριδικές μορφές είναι μεταγραφικά σιωπηρές. Προκειμένου να ελεγχθεί αν αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές μπορούν να αλληλεπιδρούν λειτουργικά με την Smad4 πρωτεΐνη, καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 που στερούνται ενδογενών Smad4 μορίων επιμολύνθηκαν παροδικά με τον συνθετικό υποκινητή pG5-E1B-luc. Όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 50**, η 6myc-Smad4 πρωτεΐνη δεν ενεργοποίησε μεταγραφικά τον συνθετικό αυτό υποκινητή, γεγονός που αναμενόταν, δεδομένου ότι αυτή η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τις ενδογενείς Smad3 πρωτεΐνες οι οποίες δεν μπορούν να προσδεθούν στον συγκεκριμένο υποκινητή. Η GAL4-Smad3 πρωτεΐνη ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 2 μόνο φορές, προφανώς λόγω της έλλειψης ενδογενών Smad4 μορίων. Η συνέκφραση της 6myc-Smad4 αύξησε σημαντικά την μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3 (ενεργοποίηση κατά 83 φορές). Οι μεταγραφικώς ανενεργές GAL4-Smad3 230-290 και GAL4-Smad3 230-374 δεν επηρεάστηκαν από την συνέκφραση της 6myc-Smad4, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 50**. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι εκτός της περιοχής 1-248 και ειδικότερα της ελάχιστης περιοχής 201-248 που εμφανίζει ενδογενή μεταγραφική δραστηριότητα, υπάρχει και δεύτερη περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης, που εντοπίζεται στο C-τερματικό άκρο της και εμφανίζει Smad4-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργότητα.

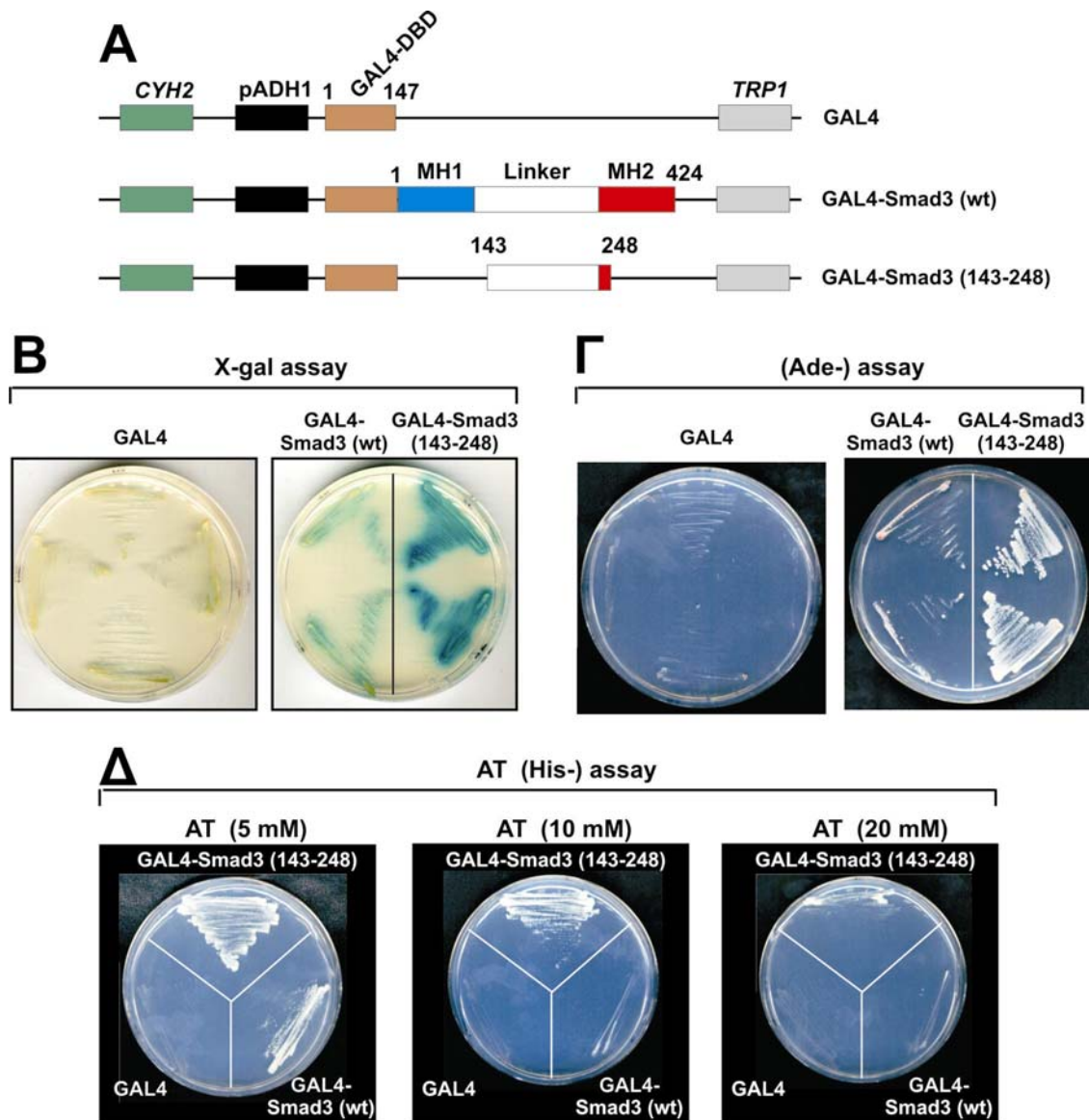


Εικόνα 50. Οι μεταλλαγμένες GAL4-Smad3 230-290 και GAL4-Smad3 230-374 στερούνται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη. Καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 που στερούνται των ενδογενών Smad4 πρωτεϊνών επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της GAL4-Smad3, της GAL4-Smad3 230-290, ή της GAL4-Smad3 230-374 πρωτεΐνης, όπως υποδεικνύεται στο γράφημα, σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της δmyc-Smad4 πρωτεΐνης (1g) όπως φαίνεται στο γράφημα. Η % δραστικότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1g), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Λειτουργικότητα της αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνης και της μεταλλαγμένης Smad3 143-248 σε κύτταρα σακχαρομύκητα

Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 46** και της **Εικόνας 47** προκύπτει ότι η μεταλλαγμένη υβριδική Smad3 143-248 πρωτεΐνη παρουσιάζει την μέγιστη μεταγραφική δραστηριότητα στις δύο κυτταρικές σειρές που ελέγχθηκαν. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αυτά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε κύτταρα σακχαρομύκητα, τα οποία στερούνται ενδογενούς TGFβ/Smad σηματοδοτικού συστήματος. Για τον σκοπό αυτό, η αγρίου τύπου Smad3 και η μεταλλαγμένη Smad3 143-248 κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pAS2-1 που επιτρέπει έκφραση γονιδίων στον σακχαρομύκητα, ως υβριδικές μορφές που φέρουν το DBD του GAL4 στην N-τερματική περιοχή τους, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 51A**, και ελέγχθηκαν για την ικανότητά τους να ενεργοποιούν μεταγραφικά έναν GAL4-εξαρτώμενο υποκινητή που είχε συζευχθεί με γονίδιο αναφοράς είτε της β-γαλακτοσιδάσης (χρώση με X-gal, **Εικ. 51B**), είτε της αδενίνης ADE1 (που προσφέρει αυξοτροφία αδενίνης, **Εικ. 51Γ**), είτε της ιστιδίνης HIS3 (που προσφέρει αυξοτροφία ιστιδίνης, **Εικ. 51Δ**). Καθέ ένα από αυτά τα γονίδια αναφοράς είχαν ενσωματωθεί ανεξάρτητα μεταξύ τους στο γονιδίωμα του *Sacharomyces cerevisiae* σε σύζευξη πάντα με τον GAL4-εξαρτώμενο υποκινητή. Η μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 143-248 παρουσίασε στις προαναφερθείσες αναλύσεις, περίπου 3 φορές μεγαλύτερη μεταγραφική δραστηριότητα από την αγρίου τύπου GAL4-Smad3, στα κύτταρα του σακχαρομύκητα. Αυτή η διαφορά στην μεταγραφική δραστηριότητα των δύο πρωτεϊνών είναι αντίστοιχη με εκείνη που καταγράφεται από τα πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα HepG2 (**Εικόνα 23**) και NIH 3T3 (**Εικόνα 24**).

Τα πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης που πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα του σακχαρομύκητα επιβεβαίωσαν ότι η περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης που περικλείει σχεδόν όλο τον linker και τα πρώτα 18 αμινοξέα της MH2 περιοχής της, έχει ισχυρή μεταγραφική δραστηριότητα η οποία πιθανότατα απαιτεί την αλληλεπίδραση με εξελικτικά συντηρημένους παραγόντες.



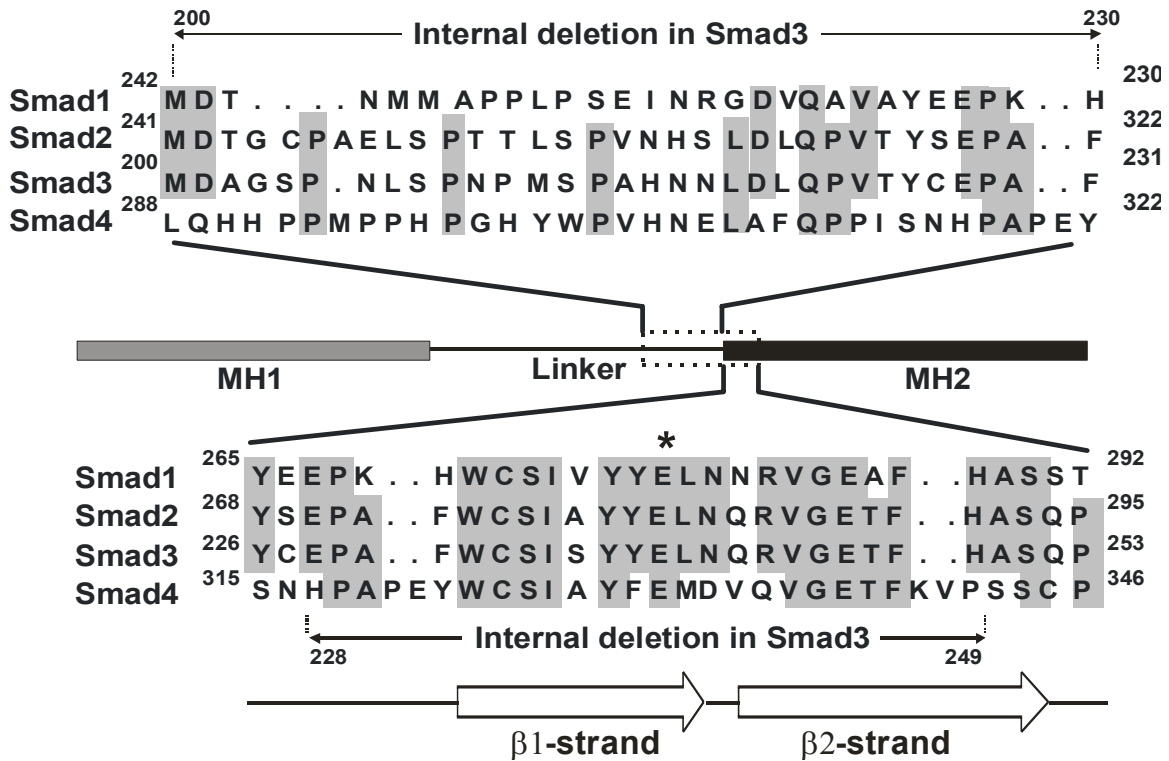
Εικόνα 51. Η αγρίου τύπου Smad3 και η μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 (143-248) έχουν μεταγραφική δραστηριότητα σε κύτταρα σακχαρομύκητα. **A.** Σχηματική αναπαράσταση των πλασμιδιακών φορέων έκφρασης των Smad3 και Smad3 (143-248) πρωτεϊνών σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Οι δύο πρωτεΐνες εκφράζονται σε σύζευξη με το GAL4 DBD. **B-Δ.** Λειτουργικές αναλύσεις που υποδεικνύουν την μεταγραφική δραστηριότητα των GAL4-Smad3 (wt) και GAL4-Smad3 (143-248) σε κύτταρα σακχαρομύκητα. Οι αναλύσεις αυτές βασίστηκαν στην ικανότητα των GAL4-Smad3 (wt) και GAL4-Smad3 (143-248) να ενεργοποιούν την μεταγραφή ενσωματωμένων στην χρωματίνη συνθετικών υποκινητών με τους οποίους είχαν μετασηματιστεί κύτταρα σακχαρομύκητα. Οι υποκινητές αυτοί αποτελούνται από 5 θέσεις πρόσδεσης του GAL4 σε σύζευξη είτε με το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (B), είτε με το γονίδιο της αδεΐνης ADE1 (Γ), είτε με το γονίδιο της ιστιδίνης HIS3 (Δ). Στην ανάλυση Δ χρησιμοποιήθηκε η χημική ένωση αμινο-τριαζόλη (AT) σε συγκέντρωση 5 mM, 10 mM και 20 mM. Αυτή η χημική ένωση καταστέλλει ειδικά την αυξοτροφία της ιστιδίνης. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι.

Εσωτερικές απαλοιφές της Smad3 πρωτεΐνης στην περιοχή 200-248 μειώνουν ή αναστέλλουν την μεταγραφική της δραστηριότητα

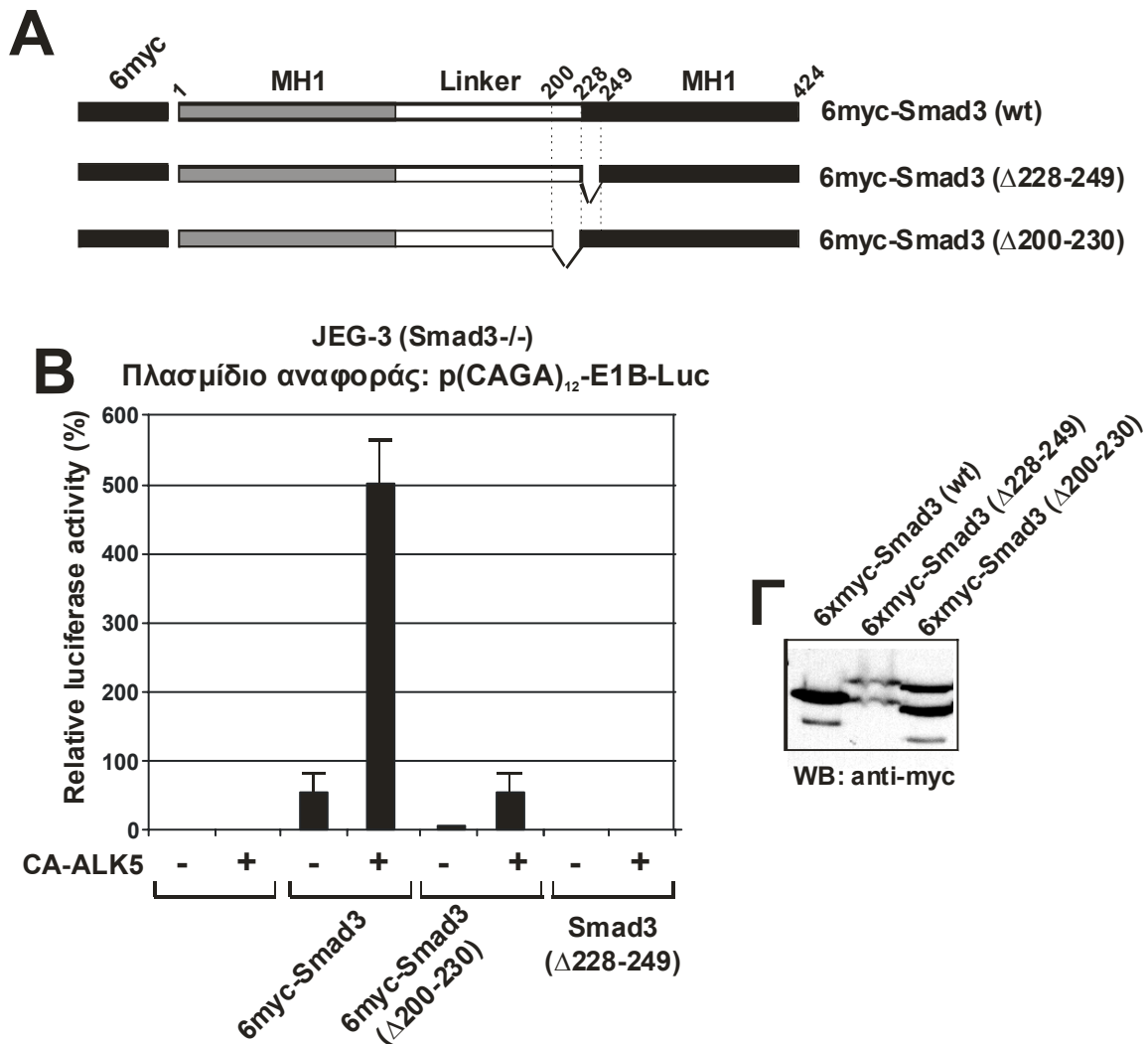
Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω η μεταγραφική δραστηριότητα που αποδίδεται στην περιοχή της Smad3 πρωτεΐνης που αποτελείται από τον linker και τα 18 πρώτα αμινοξέα της MH2 περιοχής της, κατασκευάστηκαν δύο μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 που φέρουν εσωτερικές απαλοιφές στην περιοχή αυτή. Αυτές οι εσωτερικές απαλοιφές κατασκευάστηκαν στο πλαίσιο της πλήρους μήκους Smad3 και σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να αφαιρούν είτε την αμινοξική περιοχή 200-230, είτε την περιοχή 228-249. Όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 52**, η πρώτη περιοχή αφορά μια μη συντηρημένη αλληλουχία 30 αμινοξέων που εντοπίζεται στο C-τερματικό άκρο του linker. Η περιοχή αυτή παρουσιάζει ομολογία κυρίως ως προς την παρουσία προλινών με τις Smad2 Smad4 και συγκεκριμένα αποτελεί περιοχή αντίστοιχη με τμήμα της Smad4 πρωτεΐνης που ονομάζεται SAD (Smad4 Activation Domain) και ευθύνεται για την μεταγραφική ενεργότητα της τελευταίας. Η περιοχή 228-249 της Smad3 αφορά μια εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή που εντοπίζεται στο N-τερματικό άκρο της MH2 περιοχής και περιλαμβάνει τις δύο πρώτες β πτυχωτές επιφάνειες του πυρήνα β sandwich που σχηματίζει η MH2 περιοχή.

Οι μεταλλαγμένες Smad3 Δ200-230 και Smad3 Δ228-249 κλωνοποιήθηκαν αρχικά στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA1amp με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο τον επίτοπο 6myc, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 53A**. Η μεταγραφική δραστηριότητα αυτών των μεταλλαγμένων μορφών εκτιμήθηκε αρχικά με πειράματα σε ανθρώπινα κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3, τα οποία στερούνται των ενδογενών Smad3 πρωτεϊνών (Xu G. et al., 2001), και συγκρίθηκε με την μεταγραφική δραστηριότητα της αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνης. Όπως υποδεικνύεται στην **Εικόνα 53B**, τα κύτταρα αυτά επιμολύνθηκαν παροδικά με τον συνθετικό υποκινητή p(CAGA)₁₂-E1B-luc, ο οποίος αποτελείται από δώδεκα διαδοχικές επαναλήψεις της αλληλουχίας 5' CAGAC 3' που είναι το στοιχείο πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών (Smad Binding Element, SBE) και τον ελάχιστο E1B υποκινητή σε σύζευξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης. Η μεταγραφική ενεργότητα αυτού του συνθετικού υποκινητή είναι αμελητέα στα JEG-3 κύτταρα, τόσο απουσία όσο και παρουσία του συστατικά

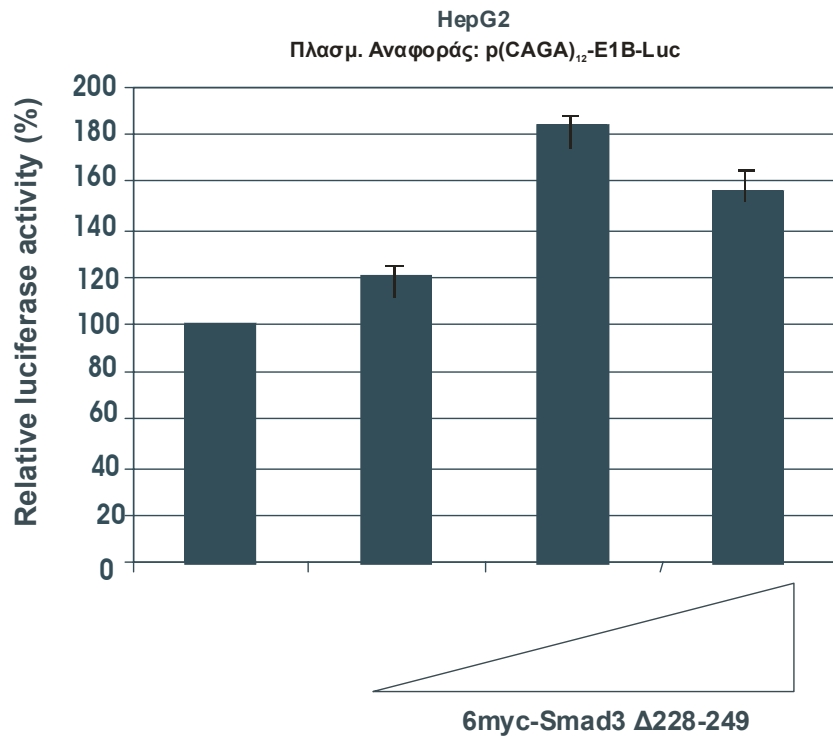
ενεργοποιημένου υποδοχέα τύπου I του TGFβ, ALK5, προφανώς λόγω της απουσίας των ενδογενών Smad3 μορίων. Ο ca-ALK5 περιέχει μια σημειακή μετάλλαξη (αντικατάσταση της θρεονίνης 204 σε ασπαρτικό οξύ, T204D), η οποία τον καθιστά συνεχώς ενεργό, ακόμα και απουσία του συνδέτη TGFβ. Η υπερέκφραση της αγρίου τύπου 6myc-Smad3 ενεργοποίησε μεταγραφικά τον p(CAGA)₁₂-E1B-luc υποκινητή κατά 5 φορές, ενώ η συνέκφραση του ALK5 οδήγησε σε περαιτέρω αύξηση κατά 10 φορές, αυτής της δραστηριότητας (ενεργοποίηση κατά 50 φορές). Η υπερέκφραση της 6myc-Smad3 Δ200-230 προκάλεσε μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή τόσο απουσία του ALK5 (1.3 φορές) όσο και παρουσία αυτού (5 φορές). Η 6myc-Smad3 Δ228-249 δεν ενεργοποίησε μεταγραφικά τον υποκινητή σε καμία περίπτωση. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 53Γ**, η 6myc-Smad3 Δ200-230 εκφράζεται, σε ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK 293T, σε επίπεδα αντίστοιχα με την αγρίου τύπου 6myc-Smad3 πρωτεΐνη, και συνεπώς, η μειωμένη μεταγραφική της δραστηριότητα δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφρασή της. Η ανάλυση ανοσοαποτύπωσης έδειξε, επίσης, ότι η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 αποσταθεροποιεί την πρωτεΐνη. Ωστόσο, η πλήρης αναστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας της 6myc-Smad3 Δ228-249 δεν μπορεί να αποδοθεί στην αποσταθεροποίησή της, καθώς η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη μεταγραφική δραστηριότητα από την 6myc-Smad3 Δ228-249, ακόμα και όταν αυξήθηκε σημαντικά η συγκέντρωση του πλασμιδιακού φορέα έκφρασής της, όπως φαίνεται στο πείραμα τιτλοδότησης που περιγράφεται στην **Εικόνα 54**. Επομένως, η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 200-230 της Smad3 πρωτεΐνης μειώνει την μεταγραφική της δραστηριότητα, και η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 την αναστέλλει πλήρως.



Εικόνα 52. Ομολογία της Smad3 με άλλα μέλη της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών στην μεταγραφικά ενεργή περιοχή που περικλείει τα αμινοξέα 200-248. Χρησιμοποιήθηκε ο μονογραμματικός κώδικας για την αντιπροσώπευση των αμινοξικών αλληλουχιών. Τα αμινοξέα που είναι ταυτόσημα για τις Smad πρωτεΐνες παρουσιάζονται σκιασμένα. Τα λεπτά μαύρα βέλη υποδεικνύουν τις εσωτερικές απαλοιφές που έχουν εισαχθεί στην πλήρους μήκους πρωτεΐνη. Τα μεγάλα λευκά βέλη αντικατοπτρίζουν τις β πτυχωτές επιφάνειες β1 και β2. Μια σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης στο συντηρημένο αμινοξύ της θέσεως 330 (E330) της Smad4, το οποίο σχετίζεται με καρκινογένεση, υποδεικνύεται με αστερίσκο.



Εικόνα 53. Επίδραση των εσωτερικών απαλοιφών των αμινοξικών περιοχών 200-230 και 229-248 στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης. Α. Σχηματική αναπαράσταση της αργίου του 6myc-Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της, 6myc-Smad3(Δ200-230) και 6myc-Smad3 (Δ228-249), που φέρουν εσωτερική απαλοιφή των αμινοξικών περιοχών 200-230 και 228-249 αντίστοιχα. Οι κάθετες διακεκομμένες μορφές και οι αριθμοί υποδεικνύουν τις περιοχές των απαλοιφών. **Β.** Κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3 (Smad3^{-/-}) που στερούνται των ενδογενών Smad3 μορίων, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂ -E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, 6myc-Smad3(Δ200-230) ή 6myc-Smad3 (Δ228-249) (1 μg), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. **Γ.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, 6myc-Smad3(Δ200-230) ή 6myc-Smad3 (Δ228-249) (30 μg). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%. Για την ανοσοαποτύπωση της έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-myc αντίσωμα (1:5000), δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000), και το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL).

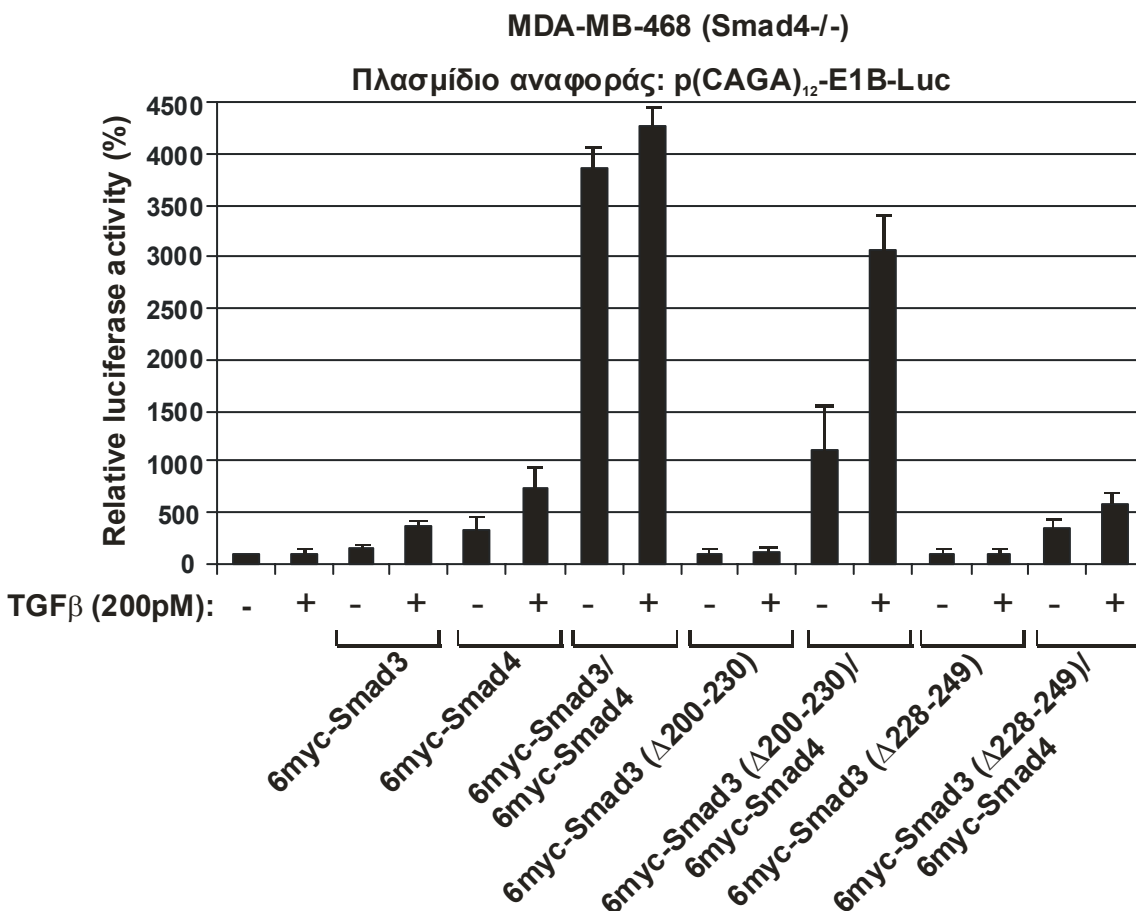


Εικόνα 54. Η μεταλλαγμένη 6myc-Smad3 Δ228-249 πρωτεΐνη είναι μεταγραφικά ανενεργή. Ηπατικά κύτταρα HepG2, που αναπτύσσονταν σε P-60 πιάτα, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (2 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3 (Δ228-249) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις (4 μg, 8 μg και 12 μg). Η % δραστηριότητα (+/- απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (2 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

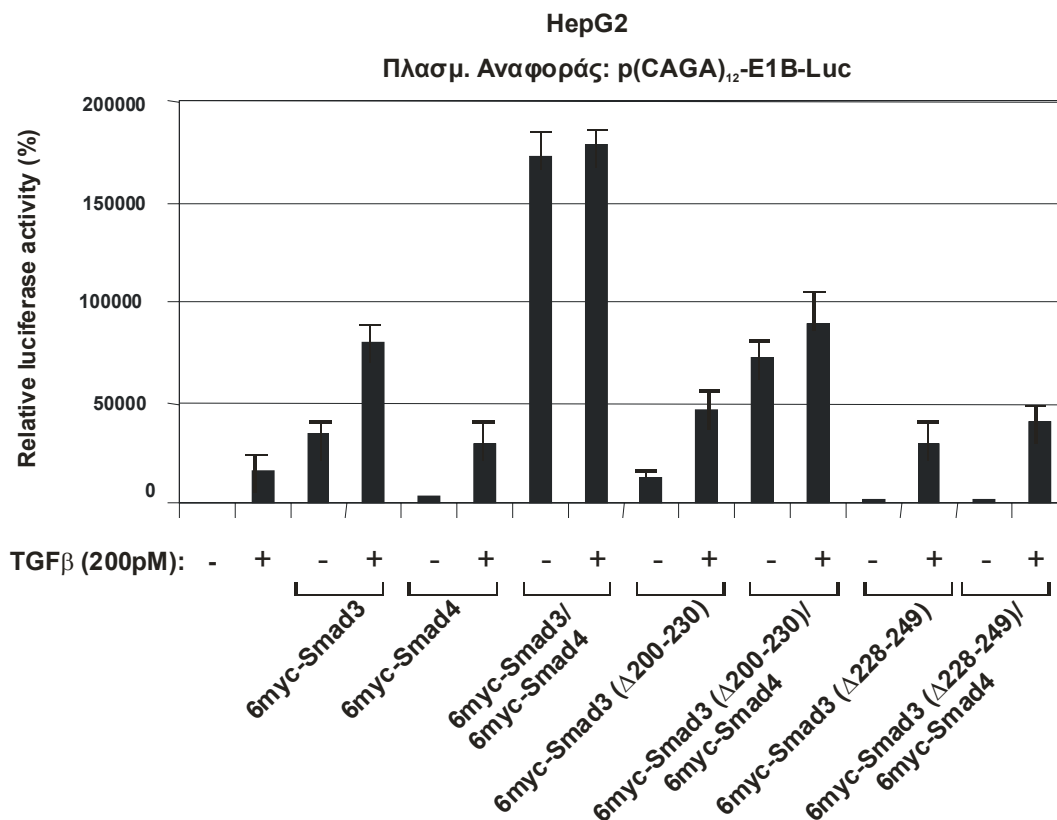
Η *Smad3* Δ228-249 στερείται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την *Smad4* πρωτεΐνη

Η εσωτερική απαλοιφή των περιοχών 200-230 και 228-249 που μειώνει και αναστέλλει, αντίστοιχα, την μεταγραφική δραστηριότητα της *Smad3* πρωτεΐνης, μπορεί να επηρεάζει τον ετεροπολυμερισμό της *Smad3* με την *Smad4*. Προκειμένου να ελεγχθεί η ικανότητα των δυο μεταλλαγμένων μορφών της *Smad3* πρωτεΐνης *Smad3* Δ200-230 και *Smad3* Δ228-249 να αλληλεπιδρούν με την *Smad4*, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης σε κύτταρα MDA-MB-468 τα οποία στερούνται ενδογενούς *Smad4* πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 55**, η μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή (CAGA)₁₂ αυξήθηκε μόνο κατά 1.5 και 4 φορές από την έκφραση της *Smad3*, απουσία και παρουσία του TGFβ αντίστοιχα, προφανώς λόγω της έλλειψης ενδογενούς *Smad4* πρωτεΐνης. Η υπερέκφραση της *Smad4* αύξησε την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή κατά 3.5 και 7.5 φορές απουσία και παρουσία του TGFβ, προφανώς αλληλεπιδρώντας με μόρια ενδογενούς *Smad3* πρωτεΐνης. Η συνέκφραση των *Smad3* και *Smad4* προκάλεσε δραματική αύξηση της δραστηριότητας του υποκινητή κατά 38 και 43 φορές απουσία και παρουσία του TGFβ. Η μεταγραφική ενεργότητα της *Smad3* Δ200-230 ήταν, και σε αυτή την κυτταρική σειρά όπως και στα JEG-3, πολύ χαμηλή τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ. Η συνέκφραση των *Smad3* Δ200-230 και *Smad4* ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 11.5 και 30.5 φορές απουσία και παρουσία του TGFβ, υποδηλώνοντας ότι η *Smad3* Δ200-230 διατηρεί την ικανότητα να αλληλεπιδρά λειτουργικά με την *Smad4*. Αντιθέτως, η συνέκφραση των *Smad3* Δ228-249 και *Smad4* δεν προκάλεσε μεταγραφική δραστηριότητα μεγαλύτερη από εκείνη που προκαλεί η *Smad4* μόνη της, τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ, γεγονός που υποδηλώνει ότι η *Smad3* Δ228-249 στερείται λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την *Smad4*. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε το ίδιο πείραμα και στα ηπατικά κύτταρα HepG2, τα οποία εκφράζουν τις *Smad3* και *Smad4* πρωτεΐνες ενδογενώς. Όπως προκύπτει από την **Εικόνα 56**, η *Smad3* Δ200-230, σε αντίθεση με την *Smad3* Δ228-249, αλληλεπιδρά με την *Smad4*, και στα κύτταρα HepG2. Τα αποτελέσματα των **Εικόνων 55** και **56** υποδεικνύουν ότι η μεταλλαγμένη

μορφή Smad3 Δ200-230 παρουσιάζει μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα σε σχέση με την αγρίου τύπου Smad3 αλλά διατηρεί την ικανότητα λειτουργικής συνεργασίας με την Smad4. Αντιθέτως, η μεταλλαγμένη μορφή Smad3 Δ228-249 έχει χάσει την ικανότητα μεταγραφικής ενεργοποίησης πιθανόν λόγω έλλειψης λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από αναλύσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 55. Έλεγχος της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3, που φέρουν εσωτερικές απαλοιφές των αμινοξικών περιοχών 200-230 και 228-249, με την αγρίου τύπου Smad4 πρωτεΐνη. Καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 που στερούνται των ενδογενών Smad4 πρωτεϊνών, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, 6myc-Smad3 (Δ200-230) ή 6myc-Smad3 (Δ228-249) σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), και του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

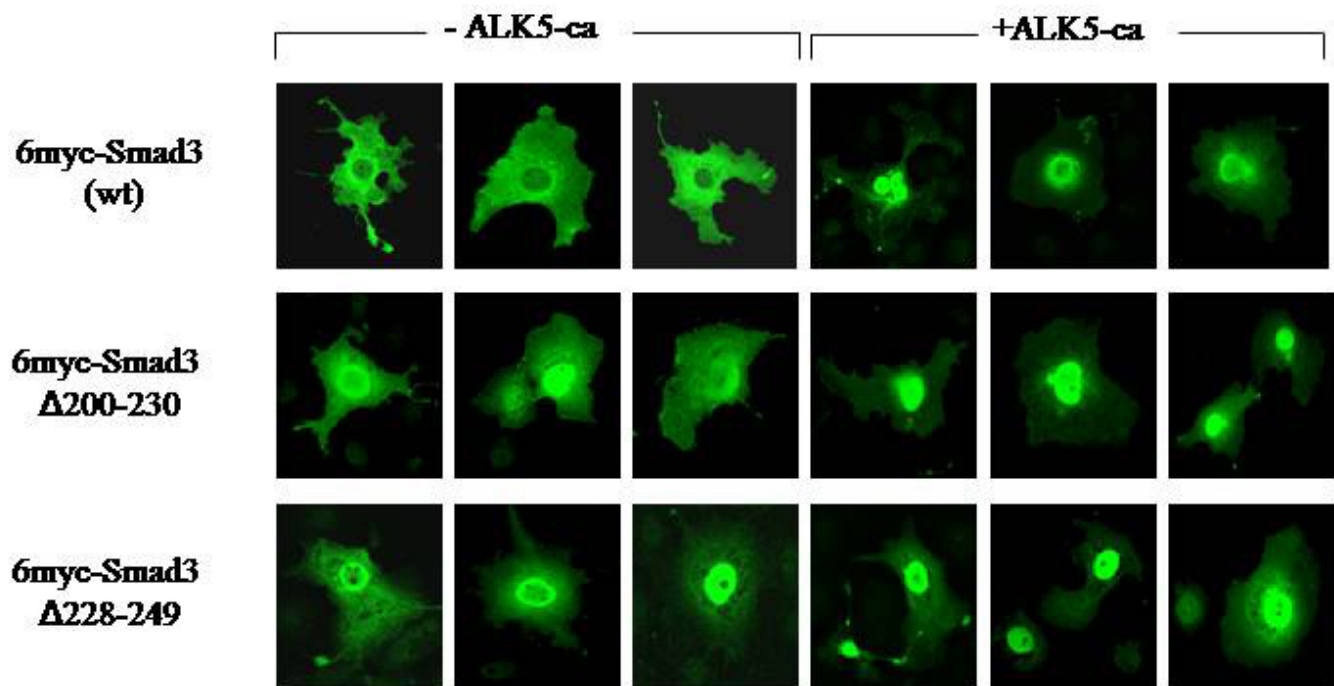


Εικόνα 56. Έλεγχος της μεταγραφικής δραστηριότητας των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3, που φέρουν εσωτερικές απαλοιφές των αμινοξικών περιοχών 200-230 και 228-249, σε κύτταρα HepG2. Ηπατικά κύτταρα ανθρώπου HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, 6myc-Smad3 (Δ200-230) ή 6myc-Smad3 (Δ228-249) σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), και του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Πυρηνικός εντοπισμός των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που φέρουν εσωτερικές απαλοιφές των περιοχών 200-230 και 228-249

Η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα της *6myc-Smad3* Δ200-230 και η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας της *6myc-Smad3* Δ228-249, θα μπορούσε να αποδοθεί σε πιθανή μεταβολή του ενδοκυττάριου εντοπισμού τους που προκαλείται από μεταλλάξεις. Προκειμένου να ελεγχθεί ο ενδοκυτταρικός εντοπισμός αυτών των πρωτεϊνών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού σε νεφρικά κύτταρα πιθήκου COS-7, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επίτοπου *myc* που φέρουν οι πρωτεΐνες στο N-τερματικό άκρο τους. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 57**, η αγρίου τύπου *6myc-Smad3* εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα απουσία της έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (επάνω σειρά -ALK5-ca). Η συνέκφραση του ALK5 οδηγεί στην συσσώρευση της *6myc-Smad3* στον πυρήνα (επάνω σειρά +ALK5-ca). Αντιθέτως, οι *6myc-Smad3* Δ200-230 και *6myc-Smad3* Δ228-249 εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα απουσία του ALK5, και με την συνέκφραση του υποδοχέα οι πρωτεΐνες αυτές γίνονται αποκλειστικά πυρηνικές (μεσαία και κάτω σειρά αντίστοιχα).

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 57** υποδηλώνουν ότι η μείωση ή η έλλειψη μεταγραφικής ενεργότητας που χαρακτηρίζουν τις μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 που στερούνται των περιοχών 200-230 και 228-249, δεν οφείλεται στην παρεμπόδιση της εισόδου τους στον πυρήνα. Είναι πιθανό ότι οι δύο εσωτερικές απαλοιφές διαταράσσουν, τουλάχιστον εν μέρει, αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες που συγκατούν την Smad3 στο κυτταρόπλασμα απουσία του TGFβ. Μια τέτοια υπόθεση θα μπορούσε να ερμηνεύσει την ενισχυμένη πυρηνική έκφραση των δύο μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 απουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5.

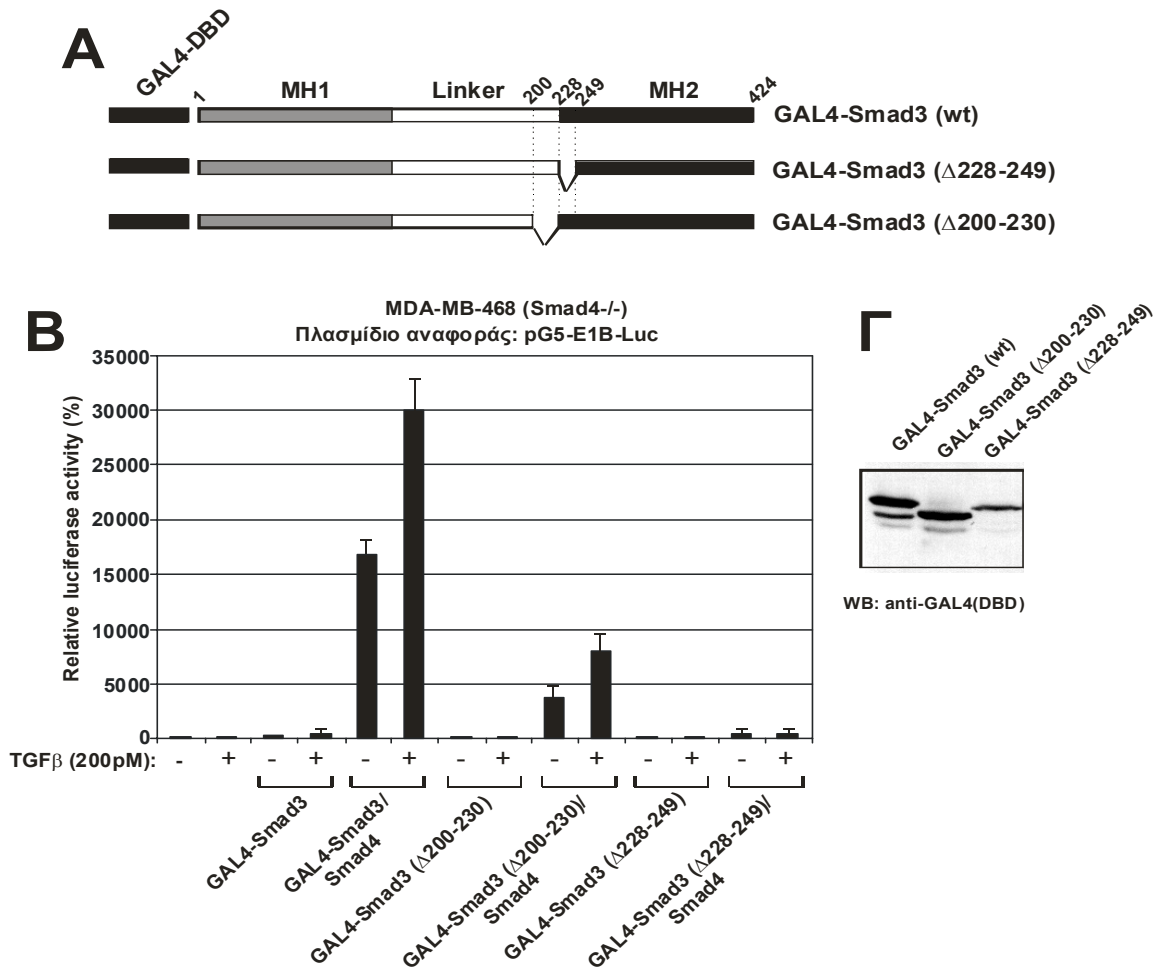


Εικόνα 57. Ενδοκυττάρια κατανομή της αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης με χρήση έμμεσου ανασοφθορισμού. Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της αγρίου 6myc Smad3, pcDNA1amp6myc Smad3 (πάνω σειρά), ή με τους αντίστοιχους φορείς έκφρασης των Smad3 Δ200-230 (μεσαία σειρά) και Smad3 Δ228-249 (κάτω σειρά), απουσία ή παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου (ca) υποδοχέα ALK5 όπως υποδεικνύεται στο σχήμα. Χρησιμοποιήθηκαν 2 μg από κάθε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης και ο ανοσοφθορισμός πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-myc (9E10) έναντι του επίτοπου που φέρουν οι Smad3 πρωτεΐνες, anti-mouse FITC-συζευγμένο δευτερεύον αντίσωμα και μικροσκόπιο συνεστίασης.

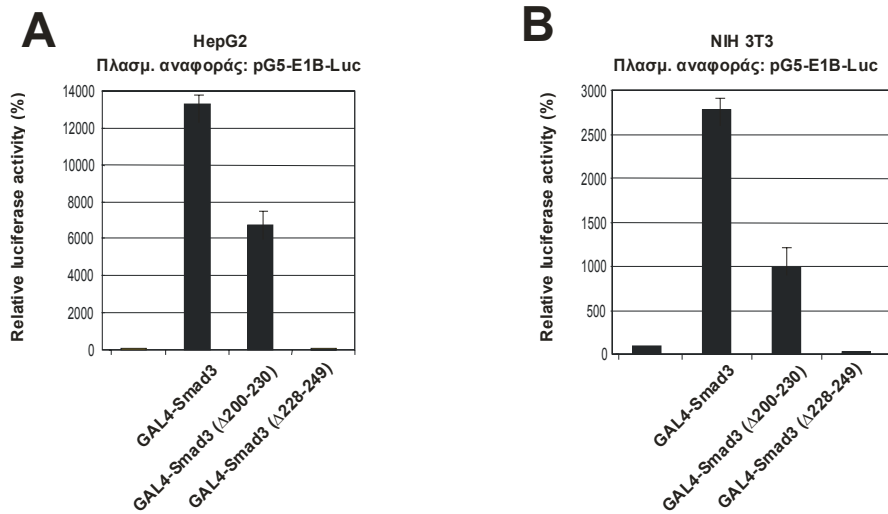
Η GAL4-Smad3 Δ228-249 στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη

Η απαλοιφή της περιοχής 200-230 ή 228-249 της πρωτεΐνης Smad3 θα μπορούσε να επηρεάζει την ικανότητα πρόσδεσης των αντίστοιχων μεταλλαγμένων πρωτεϊνών στο DNA, με αποτέλεσμα την παρατηρούμενη μείωση ή την έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας. Πρεοκειμένου να ελεγχθεί η μεταγραφική δραστηριότητα και η ικανότητα αλληλεπίδρασης των Smad3 Δ200-230 και Smad3 Δ228-249 με την Smad4, ανεξάρτητα από την ικανότητά τους να προσδένονται άμεσα στο DNA, χρησιμοποιήθηκε το ετερόλογο σύστημα GAL4. Για τον σκοπό αυτό οι δύο μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 κλωνοποιήθηκαν στο πλασμίδιο pBXG1, με τέτοιο τρόπο ώστε να φέρουν στο N-τερματικό άκρο τους το GAL4 DBD, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 58A**. Στην συνέχεια, ελέγχθηκε η μεταγραφική τους δραστηριότητα με πειράματα παροδικών επιμολύνσεων σε κύτταρα MDA-MB-468, χρησιμοποιώντας το πλασμίδιο αναφοράς pG5-E1B-luc. Όπως δείχνει η **Εικόνα 58B**, η αγρίου τύπου GAL4-Smad3 ενεργοποίησε ισχυρά (κατά 170 φορές) την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή παρουσία της συνεκφραζόμενης Smad4 και η ενεργοποίηση αυτή αυξήθηκε περαιτέρω από την παρουσία του TGFβ (ενεργοποίηση κατά 300 φορές). Η GAL4-Smad3 Δ200-230 ήταν ικανή να ενεργοποιήσει την μεταγραφή (κατά 40 φορές), παρουσία της εξωγενούς Smad4, και η ενεργοποίηση αυτή αυξήθηκε περίπου 2 φορές παρουσία του TGFβ (συνολική ενεργοποίηση κατά 75 φορές). Σε κάθε περίπτωση, η μεταγραφική ενεργότητα της GAL4-Smad3 Δ200-230 ήταν μικρότερη από εκείνη της αγρίου τύπου GAL4-Smad3. Αντιθέτως, η GAL4-Smad3 Δ228-249 ήταν μεταγραφικά ανενεργή ακόμα και παρουσία εξωγενούς Smad4 και TGFβ. Η ανάλυση ανοσοαποτόπωσης που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 58Γ**, δείχνει ότι η αγρίου τύπου GAL4-Smad3 και η GAL4-Smad3 Δ200-230 εκφράζονται σε συγκρίσιμα επίπεδα, ενώ η έκφραση της GAL4-Smad3 Δ228-249 εμφανίζεται ελαφρά μειωμένη. Παρόμοιο πείραμα ελέγχου της μεταγραφικής δραστηριότητας των δύο μεταλλαγμένων μορφών της Smad3, πραγματοποιήθηκε σε ηπατικά κύτταρα HepG2 (**Εικόνα 59A**) και σε ινοβλάστες ποντικού NIH 3T3 (**Εικόνα 59B**). Και σε αυτές τις κυτταρικές σειρές η GAL4-Smad3 Δ200-230 εμφάνισε μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα ενώ η GAL4-Smad3 Δ228-249 ήταν μεταγραφικά σιωπηρή.

Τα αποτελέσματα των **Εικόνων 58** και **59**, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα, υποστηρίζουν την σημασία της περιοχής που περιλαμβάνει τον linker και την αμινοξική αλληλουχία 230-248 στον ρυθμιστικό ρόλο της Smad3 πρωτεΐνης στην διαδικασία της μεταγραφής.



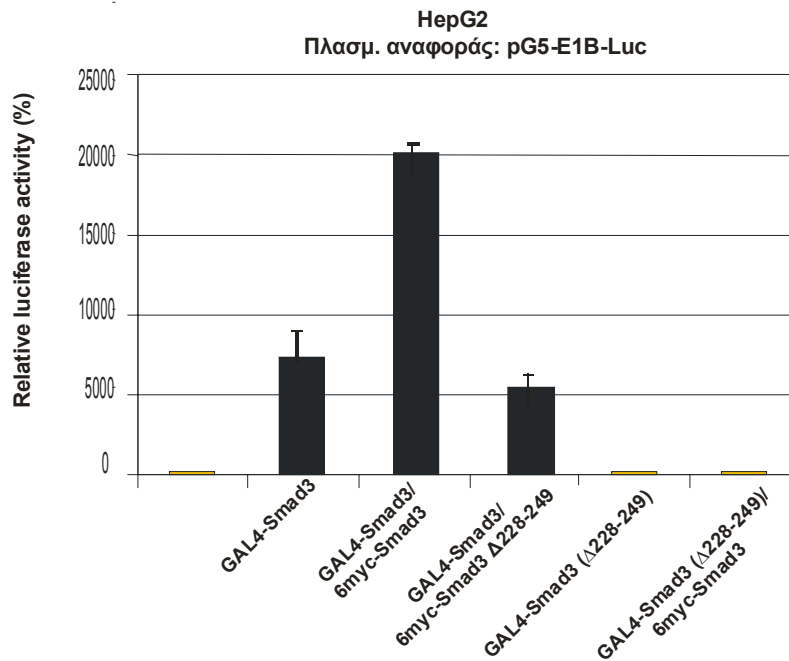
Εικόνα 58. Η Smad4 πρωτεΐνη δεν μπορεί να αποκαταστήσει την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 που στερείται της αμινοξικής περιοχής 228-249, σε MDA-MB-468 κύτταρα. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου GAL4-Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της, GAL4-Smad3(Δ200-230) και GAL4-Smad3 (Δ228-249), που φέρουν εσωτερική απαλοιφή της αμινοξικής περιοχής 200-230 και 228-249 αντίστοιχα. Οι κάθετες διακεκομμένες γραμμές και οι αριθμοί υποδεικνύουν τις περιοχές των απαλοιφών. Αυτές οι Smad3 πρωτεΐνες είναι συζευγμένες με το GAL4 DBD στο N-τερματικό τους άκρο. **B.** Καρκινικά κύτταρα MDA-MB-468, επιμόλυνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3, GAL4-Smad3 (Δ200-230) ή GAL4-Smad3 (Δ228-249) (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), και του φορέα έκφρασης της *6myc*-Smad4 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφηκε προηγουμένως. **Γ.** Κύτταρα HEK 293T επιμόλυνθηκαν παροδικά με τον πλασμιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3, GAL4-Smad3(Δ200-230) ή GAL4-Smad3 (Δ228-249) (30 μg). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%. Για την ανοσοαποτύπωση της έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-GAL4 αντίσωμα (1:2500), δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000), και το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού (ECL).



Εικόνα 59. Έλεγχος της μεταγραφικής δραστηριότητας των μεταλλαγμένων μορφών της **Smad3**, που φέρουν εσωτερικές απαλοιφές των αμινοξικών περιοχών **200-230** και **228-249**, σε κύτταρα **HepG2** και **NIH3T3**. **A.** Ηπατικά κύτταρα ανθρώπου **HepG2** επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς **pG5-E1B-Luc** (1 μ g) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της **GAL4-Smad3**, **GAL4-Smad3 (Δ200-230)** ή **GAL4-Smad3 (Δ228-249)** σε ποσότητα 1 μ g. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα **pCMVβ-gal** (1 μ g), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. **B.** Επαναλήφθηκε το πείραμα που περιγράφεται στο **A**, χρησιμοποιώντας ινοβλάστες ποντικού **NIH 3T3**.

Η GAL4-Smad3 Δ228-249 στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την αγρίου τύπου Smad3 πρωτεΐνη

Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 58** υποδηλώνουν την ανικανότητα της GAL4-Smad3 Δ228-249 να αλληλεπιδράσει λειτουργικά με την Smad4 πρωτεΐνη. Στην συνέχεια ελέγχθηκε αν η απαλοιφή της περιοχής 228-249 από την Smad3 πρωτεΐνη επηρεάζει την ικανότητα αυτής της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά λειτουργικά με την αγρίου τύπου Smad3. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 60**, ο υποκινητής G₅-E1B ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά κατά 70 φορές από την αγρίου τύπου GAL4-Smad3 σε ηπατικά κύτταρα HepG2. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ενεργοποίηση, κατά 201 φορές, από την συνέκφραση των GAL4-Smad3 και 6myc-Smad4, πιθανώς λόγω του σχηματισμού λειτουργικών συμπλόκων ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες. Η συνέκφραση των GAL4-Smad3 και 6myc-Smad3 Δ228-249 ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 50 φορές, μεταγραφική ενεργοποίηση που είναι αντίστοιχη της GAL4-Smad3 πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει την έλλειψη λειτουργικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα σε αυτές τις δύο πρωτεΐνες. Η GAL4-Smad3 Δ228-249 παρέμεινε μεταγραφικά σιωπηρή ακόμα και μετά την συνέκφραση της 6myc-Smad3. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η απαλοιφή της περιοχής 228-249 της Smad3 πρωτεΐνης αναστέλλει τον ομοδιμερισμό της.



Εικόνα 60. Η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 της Smad3 πρωτεΐνης καταστέλλει την ικανότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την αγρίου τύπου Smad3. Ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3, ή της GAL4-Smad3 (Δ228-249) σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 της πρωτεΐνης Smad3 καταστέλλει τον ομοπολυμερισμό και τον ετεροπολυμερισμό της

Τα προηγούμενα πειράματα επισημαίνουν ότι η αφαίρεση της αμινοξικής αλληλουχίας 228-249 από την Smad3 πρωτεΐνη αναστέλλει την μεταγραφική της δράση και την ικανότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης με τις Smad3 και Smad4. Η τελευταία θα μπορούσε να αποδοθεί σε έλλειψη φυσικής αλληλεπίδρασης ανάμεσα στην μεταλλαγμένη Smad3 με τις αγρίου τύπου Smad3 και Smad4. Επίσης, η μείωση της μεταγραφικής δραστηριότητας που προκαλεί η απαλοιφή της περιοχής 200-230 θα μπορούσε να αποδοθεί σε μειωμένη φυσική αλληλεπίδραση της Smad3 Δ200-230 με τις Smad3 και Smad4, αν και τα αποτελέσματα της Εικόνας 35 υποδηλώνουν ότι υπάρχει λειτουργική τουλάχιστον αλληλεπίδραση της Smad3 Δ200-230 με την Smad4. Για να ελεγχθούν πιθανές φυσικές αλληλεπιδράσεις των δύο μεταλλαγμένων μορφών της Smad3, με τις αγρίου τύπου Smad3 και Smad4, χρησιμοποιήθηκε ένα σύγχρονο και ευαίσθητο σύστημα μελέτης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση (de Boer et al., 2003). Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής παρουσιάζεται σχηματικά στην **Εικόνα 61Α**. Η Smad3 πρωτεΐνη κλωνοποιήθηκε στον πλασμιδιακό φορέα pcDNA3, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρει στο N-τερματικό άκρο της ένα πεπτίδιο 22 αμινοξέων που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την λιγάση βιοτίνης BirA, η οποία είναι βακτηριακής προέλευσης. Η Bio-Smad3 βιοτινυλιώνεται σε κύτταρα θηλαστικών όταν συνεκφράζεται στα κύτταρα αυτά η BirA. Η βιοτινυλίωση της Smad3 *in vivo* μπορεί εύκολα να διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Η στρεπταβιδίνη προσδένεται με μεγάλη συγγένεια και ειδικότητα στις βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στην βιοτινυλιωμένη Smad3. Η τελευταία, μαζί τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με αυτή, προσδένεται σε σφαιρίδια αγαρόζης που είναι επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη. Η συνκατακρήμιση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την Bio-Smad3 μπορεί να αναλυθεί με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση με την χρησιμοποίηση των κατάλληλων αντισωμάτων.

Κατ'αρχήν, ελέγχθηκε η πιθανή επίδραση της βιοτινυλίωσης στην μεταγραφική ενεργότητα της Smad3. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-luc παρουσία της Bio-Smad3 ή

του πεπτιδίου Bio, απουσία και παρουσία της BirA. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 61B**, το Bio πεπτίδιο δεν ενεργοποίησε μεταγραφικά τον υποκινητή, γεγονός που αναμενόταν. Αντιθέτως, η Bio-Smad3 προκάλεσε ισχυρή μεταγραφική ενεργοποίηση η οποία δεν επηρεάστηκε από την συνέκφραση της BirA και συνεπώς την βιοτινυλίωση της πρωτεΐνης. Επομένως, το Bio πεπτίδιο που έχει συζευχθεί στο N-τερματικό άκρο της Smad3, δεν επηρεάζει την μεταγραφική της δραστηριότητα ούτε πριν ούτε μετά την βιοτινυλίωσή του.

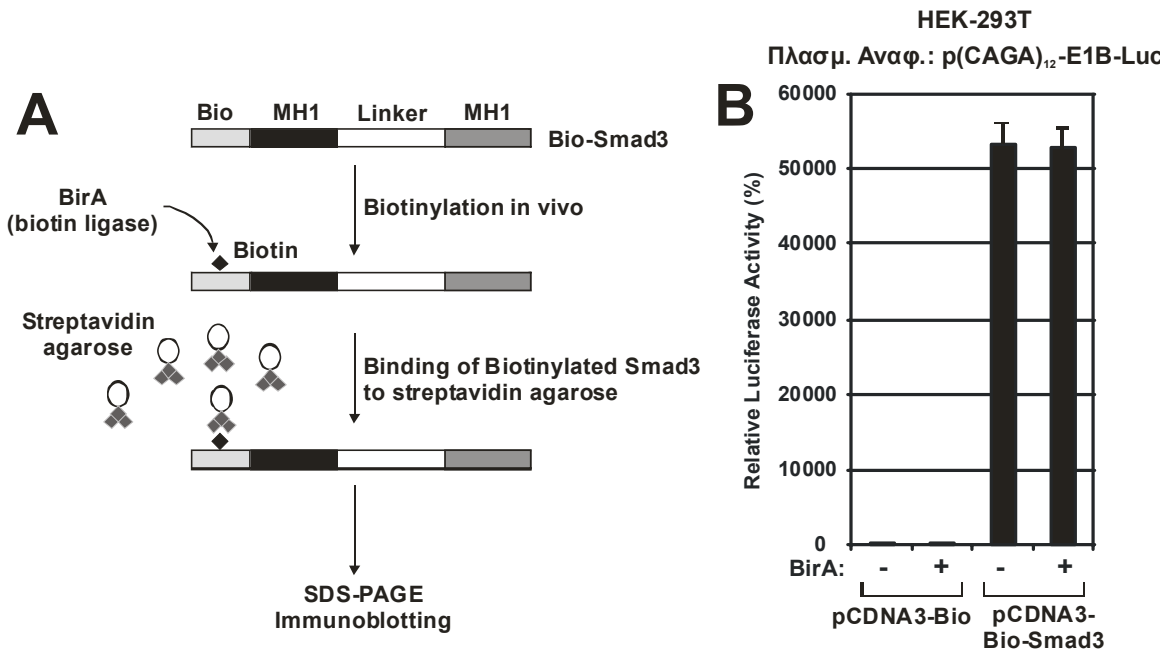
Χρησιμοποιώντας το σύστημα της βιοτινυλίωσης, ήταν δυνατή η αναπαραγωγή της γνωστής αλληλεπίδρασης της Smad3 με τον εαυτό της (ομοπολυμερισμός) και με την Smad4 (ετεροπολυμερισμός). Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με φορείς έκφρασης για τις αγρίου τύπου 6myc-Smad3 ή 6myc-Smad4, καθώς και με τον φορέα έκφρασης του Bio πεπτιδίου (διαδρομές 1-3), ή με τον φορέα έκφρασης της Bio-Smad3 (διαδρομές 4-9). Όπως φαίνεται στο πρώτο ανοσοαποτύπωμα της **Εικόνας 62**, στο οποίο ανιχνεύεται η αλληλεπίδραση με την 6myc-Smad3, το πεπτίδιο Bio δεν αλληλεπιδρά με την υπερεκφρασμένη 6myc-Smad3 (διαδρομή 1), ούτε μετά την έκφραση της BirA (διαδρομή 2), ούτε μετά την έκφραση της BirA και του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (διαδρομή 3). Η Bio-Smad3 συνκατακρημνίζει και άρα αλληλεπιδρά με την 6myc-Smad3, μόνο μετά την βιοτινυλίωσή της από την BirA και την ταυτόχρονη ενεργοποίησή της από τον υποδοχέα ALK5 (διαδρομή 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Το ίδιο ισχύει και για την αλληλεπίδραση της Bio-Smad3 με την 6myc-Smad4 (διαδρομή 9, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Ελέγχθηκε η έκφραση της 6myc-Smad3 και της 6myc-Smad4, όπως φαίνεται στο τρίτο ανοσοαποτύπωμα, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-myc. Επίσης, ελέγχθηκε η έκφραση της βιοτινυλιωμένης Bio-Smad3, τόσο στα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, όσο και στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης-αγαρόζης (τέταρτο και δεύτερο ανοσοαποτύπωμα, αντίστοιχα), χρησιμοποιώντας στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP.

Αφού ελέγχθηκε η λειτουργικότητα του συστήματος βιοτινυλίωσης για την ανάλυση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των Smad πρωτεϊνών *in vivo*, αναλύθηκε η ικανότητα ομο- και ετεροπολυμερισμού των δύο μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης που φέρουν τις εσωτερικές απαλοιφές των περιοχών 200-230 και 228-249. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν νέα πλασμίδια που εκφράζουν κάθε μια

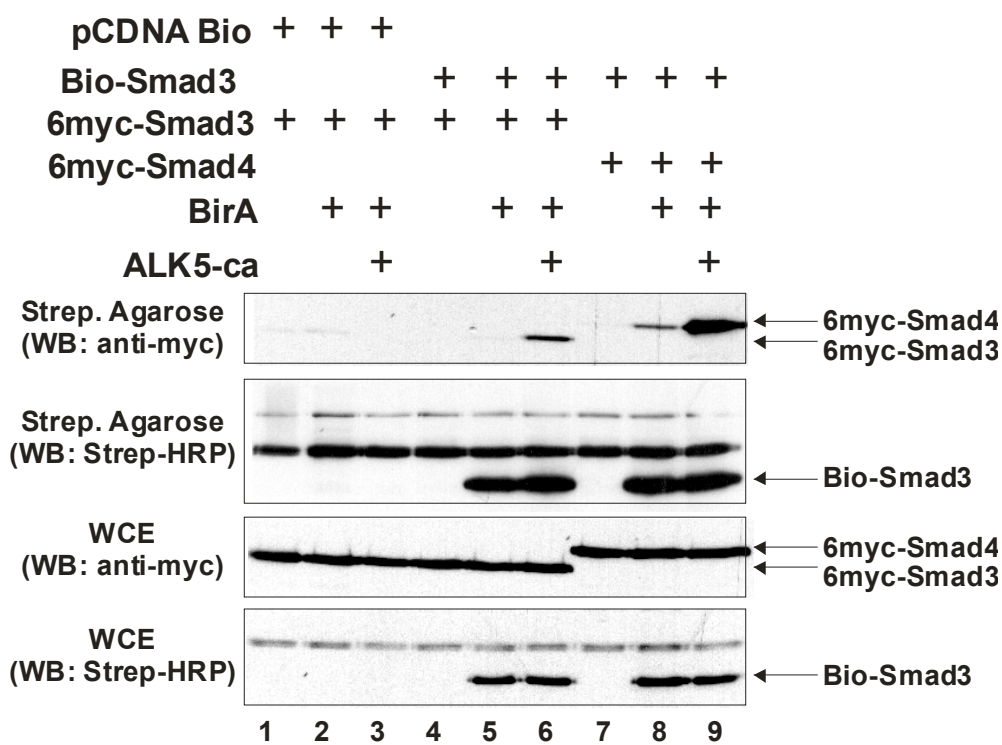
από τις μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 σε σύζευξη, στο N-τερματικό τους άκρο, με το Bio πεπτίδιο, όπως δείχνει η **Εικόνα 63A**. Η **Εικόνα 63B** δείχνει ότι η Bio-Smad3 Δ200-230 αλληλεπιδρά με την 6myc-Smad3 μόνο μετά την βιοτινυλίωσή της από την BirA λιγάση και την ταυτόχρονη ενεργοποίησή της από την συνέκφραση του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (διαδρομή 3, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Αντιθέτως, η Bio-Smad3 Δ228-249 δεν αλληλεπιδρά με την 6myc-Smad3 ούτε μετά την βιοτινυλίωσή της και την ενεργοποίησή της από τον υποδοχέα (διαδρομές 5 και 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Αυτή η έλλειψη αλληλεπίδρασης δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της Bio-Smad3 Δ228-249, αφού όπως δείχνει το δεύτερο ανοσοαποτύπωμα, αυτή η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εκφράζεται στον ίδιο βαθμό με την Bio-Smad3 Δ200-230. Επίσης, η έλλειψη αλληλεπίδρασης δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της 6myc-Smad3 στα συγκεκριμένα δείγματα, όπως φαίνεται στο τρίτο ανοσοαποτύπωμα, όπου ανιχνεύεται η έκφραση της 6myc-Smad3 στα συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 63B** υποδηλώνουν τον αποτελεσματικό ALK5-εξαρτώμενο ομοπολυμερισμό της βιοτινυλιωμένης Bio-Smad3 Δ200-230 με την αγρίου τύπου Smad3. Η απαλοιφή, όμως, της περιοχής 228-249 της Smad3 αναστέλλει τον ομοπολυμερισμό της πρωτεΐνης.

Με τον ίδιο τρόπο δείχθηκε στην **Εικόνα 63Γ**, ότι η βιοτινυλιωμένη Bio-Smad3 Δ200-230 αλληλεπιδρά με την αγρίου τύπου 6myc-Smad4, κατά έναν ALK5-εξαρτώμενο τρόπο (διαδρομή 3, πρώτο ανοσοαποτύπωμα), σε αντίθεση με την Bio-Smad3 Δ228-249 που δεν παρουσίασε τέτοια αλληλεπίδραση (διαδρομές 5 και 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Επιβεβαιώθηκε και πάλι ότι η έλλειψη αλληλεπίδρασης της Bio-Smad3 Δ228-249 με την αγρίου τύπου Smad4, δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση της πρώτης (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα) ή της δεύτερης (τρίτο ανοσοαποτύπωμα).

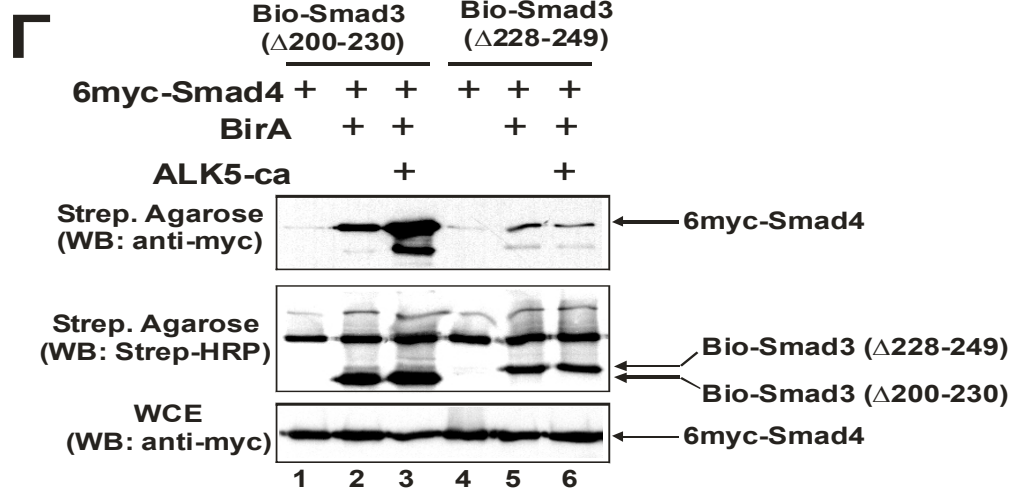
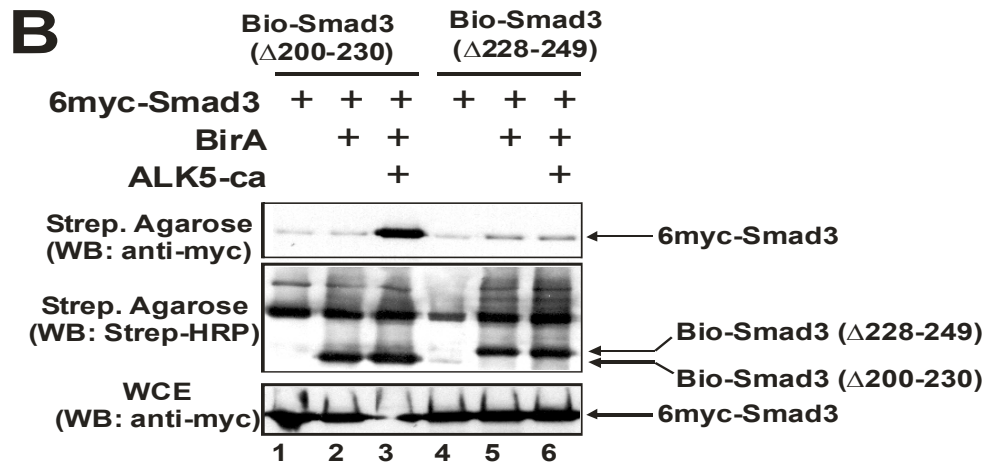
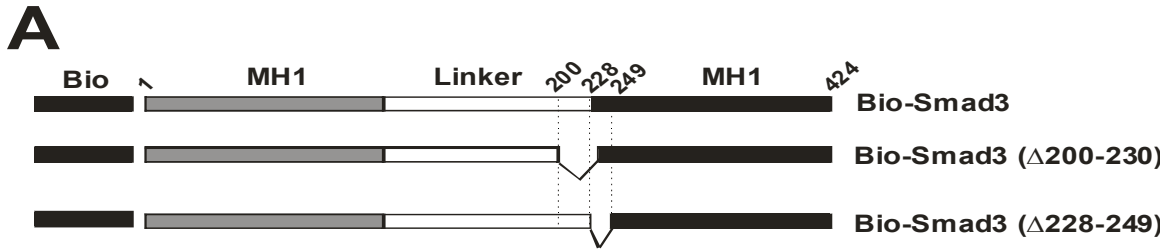
Συνολικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 63** υποδηλώνουν ότι η απαλοιφή της περιοχής 200-230 δεν επηρεάζει την ικανότητα ομοπολυμερισμού και ετεροπολυμερισμού της Smad3 πρωτεΐνης, ενώ η απαλοιφή της περιοχής 228-249 αναστέλλει πλήρως αυτές τις ιδιότητες της Smad3, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να εξηγεί την έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας της Smad3 Δ228-249.



Εικόνα 61. Το σύστημα της *in vivo* βιοτινυλίωσης και ανάλυση της επίδρασης της βιοτινυλίωσης στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης. **A.** Βασική αρχή του συστήματος *in vivo* βιοτινυλίωσης, που χρησιμοποιήθηκε στην μελέτη των αλληλεπιδράσεων της Bio-Smad3 με άλλες πρωτεΐνες. Η Smad3 βιοτινυλιώνεται από την βακτηριακή λιγάση BirA και μπορεί κατόπιν να προσδεθεί σε αγαρόζη επικαλυμμένη με στρεπταβιδίνη. Οποιαδήποτε πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την Smad3 συν-κατακρημνίζεται με την αγαρόζη στρεπταβιδίνη στην οποία έχει προσδεθεί η Bio-Smad3. **B.** Κύτταρα HEK 293T επιμόλυνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα pCDNA3-Bio ή pCDNA3-Bio-Smad3 (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμόλυνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 62. Χρήση του συστήματος της *in vivo* βιοτινυλίωσης για την επιβεβαίωση της ικανότητας ολιγομερισμού της Smad3 πρωτεΐνης. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 και τους φορείς έκφρασης των 6myc-Smad3 ή 6myc-Smad4, σε ποσότητα 7.5 μ g από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μ g) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGF β , ca-ALK5 (7.5 μ g), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με $\frac{1}{4}$ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνη (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμιση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-myc αντίσωμα (1:5000) έναντι του επίτοπου myc των 6myc-Smad3 και 6myc-Smad4 και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδέεται στην Bio-Smad3 (1:10000) (δεύτερο και τέταρτο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη.



Εικόνα 63. Η Smad3 πρωτεΐνη που φέρει εσωτερική απαλοιφή της αμινοξικής περιοχής 228-249 στερείται της ικανότητας ομοπολυμερισμού με την Smad3 και ετεροπολυμερισμού με την Smad4. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου Smad3 και των μεταλλαγμένων Smad3 Δ200-230 και Smad3 Δ228-249, οι οποίες φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο το 22 αμινοξέων Bio πεπτίδιο που είναι στόχος βιοτινυλίωσης από την BirA λιγάση βιοτίνης. Οι κάθετες διακεκομμένες γραμμές και οι αριθμοί υποδεικνύουν τις περιοχές των απαλοιφών. **B.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio Smad3 (Δ200-230) ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 (Δ228-249) και τον φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνη

(Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμιση των αλληλεπιδρώντων πρωτεϊνών ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-myc αντίσωμα (1:5000) έναντι του επίτοπου myc της *6myc-Smad3* και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες *Smad3* πρωτεΐνες (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη. Γ. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο Β, με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε η *6myc-Smad4* αντί της *6myc-Smad3*.

Η ελάχιστη περιοχή 201-248 της *Smad3* πρωτεΐνης αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με τον συνενεργοποιητή CBP, και η απαλοιφή της περιοχής 228-249 καταστέλλει αυτή την αλληλεπίδραση

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων αναλύσεων μεταγραφικής δραστηριότητας υποδηλώνουν ότι η περιοχή 130-248 της *Smad3* πρωτεΐνης είναι εξαιρετικά ενεργή μεταγραφικά. Η ενεργότητα αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί σε φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην περιοχή αυτή και τον συνενεργοποιητή CBP της *Smad3* πρωτεΐνης. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα αυτή, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές μεταλλαγμένες μορφές του συνενεργοποιητή CBP που αποτελούνται από διαδοχικά μη επικαλυπτόμενα τμήματά του (1-1098, 1098-1620, 1620-1877 και 1877-2441), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 64A**. Αυτές οι μεταλλαγμένες μορφές που φέρουν τον επίτοπο GST στο N-τερματικό άκρο τους, εκφράστηκαν σε βακτηριακά κύτταρα BL21. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αυτών των κυττάρων επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης με τα οποία συζεύχθηκαν μέσω του GST επίτοπου. Η έκφραση των μεταλλαγμένων μορφών του CBP αναλύθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση και με χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 64B**. Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης σεφαρόζης που φέρουν τις μεταλλαγμένες μορφές του CBP, χρησιμοποιήθηκαν σε GST pull down αναλύσεις για να ελεγχθεί η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με διάφορες μεταλλαγμένες και μη μορφές της *Smad3* πρωτεΐνης. Οι μορφές της *Smad3* πρωτεΐνης που έχουν συζευχθεί στο N-τερματικό τους άκρο με το GAL4 DBD, εκφράστηκαν σε κύτταρα COS-7 και η συνκατακρήμισή τους με τα GST CBP σφαιρίδια αναλύθηκε με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό anti-GAL4 DBD αντίσωμα. Όπως υποδεικνύει η **Εικόνα 65A**, η αγρίου τύπου GAL4-*Smad3*

δεν προσδένεται στον επίτοπο GST ούτε στην GST-CBP (1-1098), αλλά προσδένεται στις GST-CBP (1098-1620), GST-CBP (1620-1877) και GST-CBP (1877-2441). Η περιοχή του linker της Smad3, που εμφανίζει μικρή μεταγραφική δραστικότητα σε κύτταρα HepG2 και NIH3T3 (Εικόνα 23 και 24), βρέθηκε ότι αλληλεπιδρά *in vitro* με τις περιοχές 1098-1620 και 1620-1877, αλλά όχι με την περιοχή 1877-2441 του CBP. Το ίδιο πρότυπο αλληλεπίδρασης παρατηρήθηκε και όταν χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές N-τερματικές απαλοιφές της περιοχής που περιλαμβάνει τον linker και εκτείνεται μέχρι την αμινοξική θέση 248 (μεταλλαγμένες μορφές 130-248, 143-248, 172-248 και 201-248). Επιπλέον, η GAL4-Smad3 Δ228-249 αλληλεπιδρά με τις περιοχές 1098-1620 και 1620-1877, αλλά όχι με την περιοχή 1877-2441 του CBP. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 65A** υποδεικνύουν ότι η περιοχή 201-248 της Smad3 πρωτεΐνης είναι η ελάχιστη περιοχή που αλληλεπιδρά *in vitro* με τον συνενεργοποιητή CBP και η περιοχή 228-249 της Smad3 είναι απαραίτητη για την *in vitro* αλληλεπίδραση με την περιοχή 1877-2441 του συνενεργοποιητή CBP.

Προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα, η αλληλεπίδραση της Smad3 πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή CBP να μην είναι άμεση αλλά να συμβαίνει παρουσία κάποιου παράγοντα που υπάρχει στα κύτταρα COS-7, κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις που περιγράφονται στην Εικόνα 42A επαναλήφθηκαν χρησιμοποιώντας μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 που φέρουν τον επίτοπο *6myc* στην N-τερματική περιοχή τους. Οι πρωτεΐνες αυτές εκφράστηκαν με *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση παρουσία ραδιενεργά σημασμένης με ³⁵S μεθειονίνης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 65B**, οι μεταλλαγμένες Smad3 143-248, Smad3 172-248 και Smad3 201-248 αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά και ειδικά με τις περιοχές 1098-1620 και 1620-1877 του συνενεργοποιητή CBP, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της Εικόνας 42A.

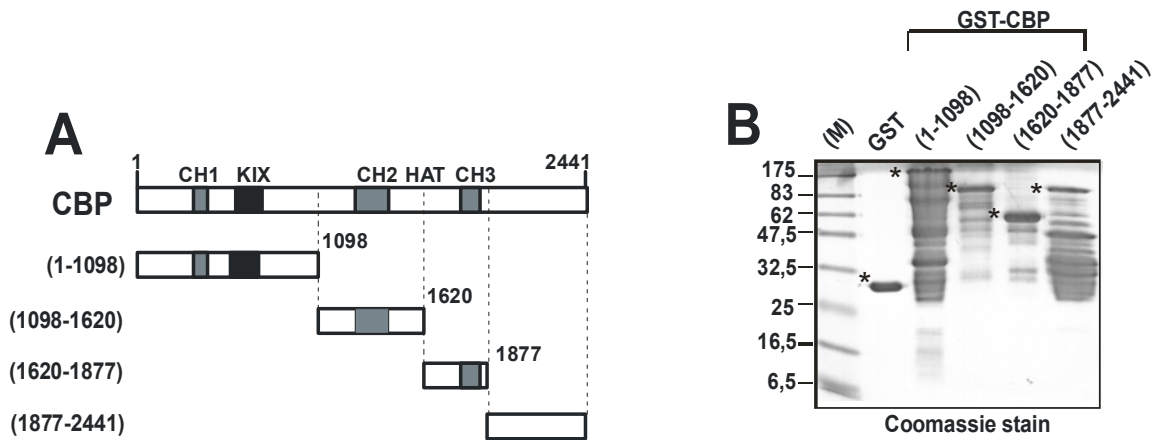
Στην συνέχεια ελέγχθηκαν πιθανές λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad3, Smad3 143-248 και Smad3 201-248 με τον συνενεργοποιητή CBP. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του συνθετικού υποκινητή pG5-E1B-luc, καθώς και με την αγρίου τύπου ή τις δύο μεταλλαγμένες μορφές της Smad3 σε σύντηξη με το GAL4 DBD, παρουσία ή απουσία του CBP και του TGFβ. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 66**, ο TGFβ από μόνος του δεν μπορεί να ενεργοποιήσει τον pG5-E1B-luc υποκινητή. Η έκφραση της εξωγενούς GAL4-

Smad3 ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 146 φορές και παρουσία του TGFβ κατά 294 φορές (αύξηση κατά 2.1 φορές). Η συνέκφραση των GAL4-Smad3 και CBP ενεργοποίησε τον συνθετικό υποκινητή κατά 312 φορές, αυξάνοντας την ενεργοποίηση που προκάλεσε η GAL4-Smad3 μόνη της κατά 2.1 φορές. Η συνέκφραση αυτή παρουσία του TGFβ προκάλεσε μεταγραφική ενεργοποίηση κατά 945 φορές, αυξάνοντας την ενεργοποίηση που προκάλεσε μόνη της η GAL4-Smad3 παρουσία του TGFβ κατά 3.2 φορές. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 66** προκύπτει ότι ο συνενεργοποιητής CBP επάγει την μεταγραφική δραστηριότητα της GAL4-Smad3, σε κύτταρα HepG2.

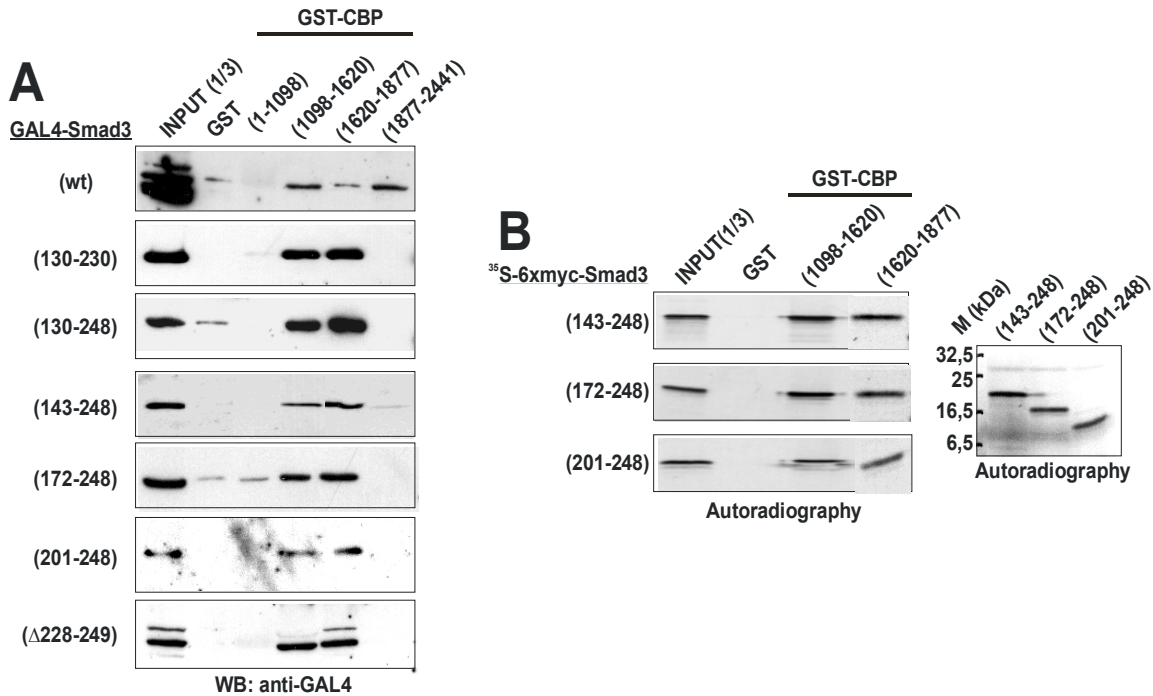
Η **Εικόνα 67** περιγράφει τον έλεγχο της μεταγραφικής δραστηριότητας της μεταλλαγμένης GAL4-Smad3 143-248 πρωτεΐνης παρουσία του συνενεργοποιητή CBP. Η GAL4-Smad3 143-248 εμφάνισε την μέγιστη μεταγραφική δραστηριότητα στις αναλύσεις που περιγράφονται στις Εικόνες 46 και 47 και ήταν ενεργή μεταγραφικά και σε κύτταρα σακχαρομύκητα, όπως έδειξε η Εικόνα 51. Στο πείραμα που περιγράφεται στην **Εικόνα 67**, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα ινοβλαστών ποντικού NIH 3T3 και ο φορέας έκφρασης του συνθετικού υποκινητή pG5-E1B-luc. Η αγρίου τύπου GAL4-Smad3 ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 32 φορές και η συνέκφραση του CBP προκάλεσε ενεργοποίηση κατά 46 φορές (αύξηση κατά 1.4 φορές). Η GAL4-Smad3 143-248 ενεργοποίησε την μεταγραφή από τον συνθετικό υποκινητή κατά 186 φορές και η συνέκφραση του CBP προκάλεσε μεταγραφική ενεργοποίηση κατά 533 φορές (αύξηση κατά 2.9 φορές). Συνεπώς, ο συνενεργοποιητής CBP αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα όχι μόνο της αγρίου τύπου GAL4-Smad3 αλλά και της μεταλλαγμένης GAL4-Smad3 143-248 μορφής, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των φυσικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο πρωτεϊνών που δείχνονται στην **Εικόνα 65A** και **65B**.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η λειτουργική αλληλεπίδραση της GAL4-Smad3 201-248 με τον συνενεργοποιητή CBP. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα NIH 3T3 επιμολύνθηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3 201-248 απουσία και παρουσία του φορέα έκφρασης του CBP. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 68A**, η GAL4-Smad3 201-248 αύξησε την μεταγραφική ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή G5-E1B κατά 13 φορές. Η συνέκφραση του συνενεργοποιητή CBP σε δύο αυξανόμενες συγκεντρώσεις προκάλεσε αύξηση της μεταγραφικής ενεργότητας της GAL4-Smad3 201-248 κατά 3.8 και 5.7 φορές (ενεργοποίηση κατά 50 και 74 φορές αντίστοιχα). Το πρότυπο

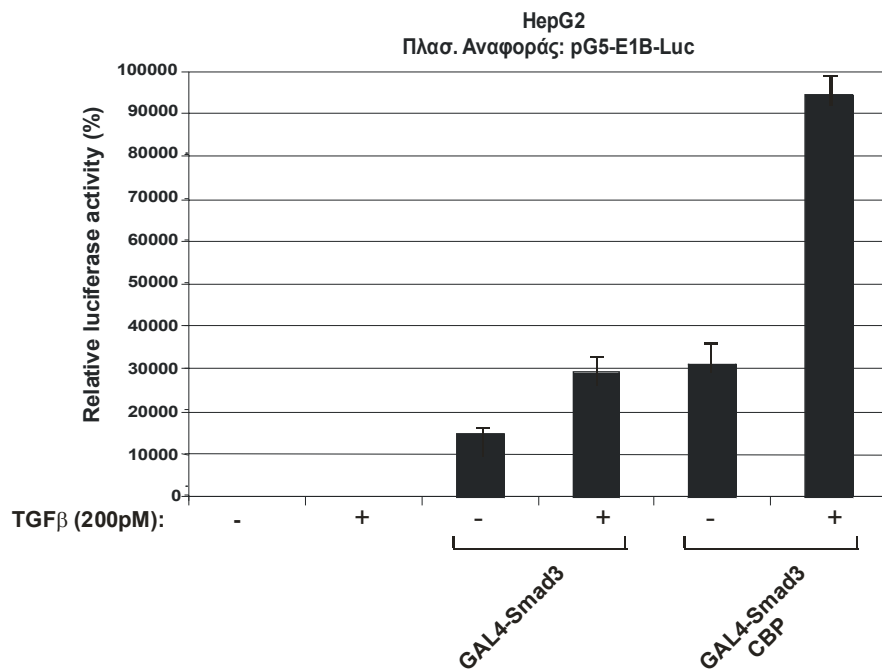
ενεργοποίησης επαναλήφθηκε και στο πείραμα **Εικόνα 68B**, όπου η GAL4-Smad3 201-248 ενεργοποίησε τον υποκινητή G5-E1B κατά 19 φορές, ενώ η συνέκφραση του CBP αύξησε την ενεργότητα αυτή κατά 3.5 φορές (ενεργοποίηση κατά 67 φορές). Επιπρόσθετα, η συνέκφραση της αδενοϊκής ογκοπρωτεΐνης E1A μείωσε την μεταγραφική ενεργοποίηση που προκάλεσε στην GAL4-Smad3 201-248 ο CBP κατά 1.7 φορές. Είναι γνωστό ότι η ογκοπρωτεΐνη E1A αλληλεπιδρά με τον CBP, γεγονός που έχει αντίκτυπο στα επίπεδα μεταγραφικής ενεργότητας παραγόντων που βασίζονται στην αλληλεπίδραση με τον CBP για την μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 68** υποδηλώνουν την λειτουργική αλληλεπίδραση της περιοχής 201-248 της Smad3 πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή CBP, που θα μπορούσε να θεωρηθεί λογική συνέπεια της φυσικής αλληλεπίδρασης που υπάρχει ανάμεσα στις δύο πρωτεΐνες.



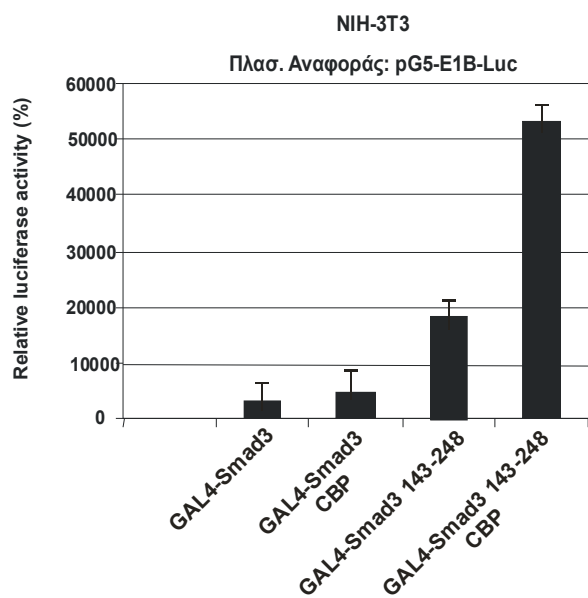
Εικόνα 64. Έλεγχος της έκφρασης μεταλλαγμένων μορφών του συνενεργοποιητή CBP. **A.** Σχηματική αναπαράσταση του CBP μορίου και διαδοχικών απαλοιφών του που φέρουν στην N-τερματική περιοχή τους τον επίτοπο GST. **B.** Έκφραση και καθαρισμός των διαδοχικών απαλοιφών του CBP από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα βακτηριακών κυττάρων BL21, τα οποία επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%, και ακολούθησε χρώση του πηκτώματος με Coomassie blue. Οι απαλοιφές του CBP υποδεικνύονται με αστερίσκο.



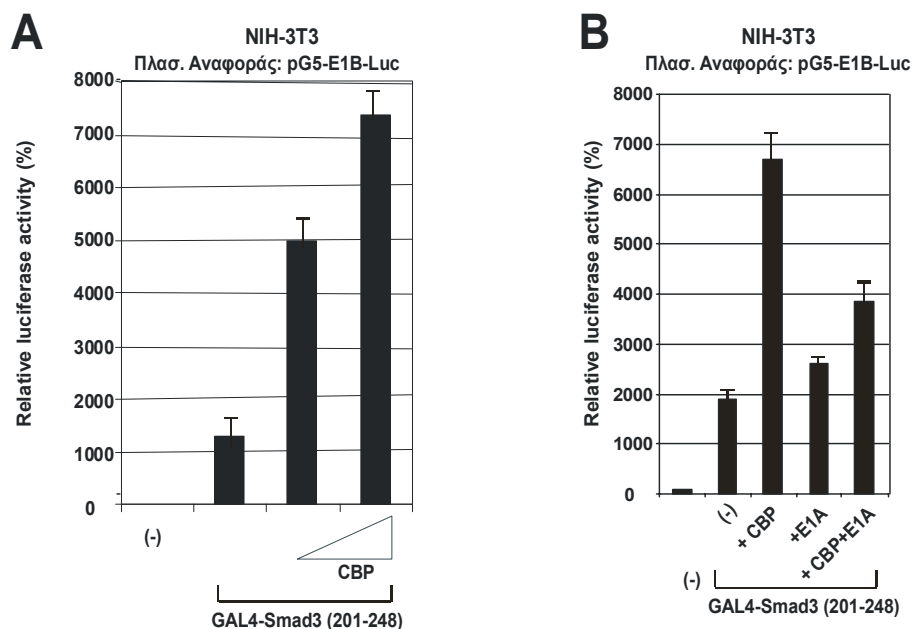
Εικόνα 65. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αγρίου τύπου και μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης με ελλειμματικές μορφές του συνενεργοποιητή CBP *in vitro*. **A.** Κύτταρα COS-7 επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης pBXG1 Smad3 της αγρίου τύπου GAL4 Smad3 ή των μεταλλαγμένων GAL4 μορφών της Smad3 που υποδεικνύονται στο σχήμα, σε ποσότητα 30 μg. Τα κύτταρα λύθηκαν όπως περιγράφηκε στα Υλικά και Μέθοδοι και κρατήθηκε ποσότητα που αντιστοιχεί στο 1/3 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος από κάθε δείγμα (input). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν στους 4 C° για 20 ώρες με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης στα οποία έχει συζευχθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή οι GST απαλοιφές του CBP. Αναλύθηκε η συν-κατακρήμιση (GST-pull down) των GAL4 Smad3 πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5%, και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse αντίσωμα έναντι του επίτοπου GAL4 (1:2500) και δευτερεύον anti-mouse HRP αντισώματος (1:10000). Για την ανοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ενισχυμένου χημειοφωσφορισμού ECL. **B.** Οι πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης pcDNA1amp 6myc Smad3 143-248, pcDNA1amp 6myc Smad3 172-248 και pcDNA1amp 6myc Smad3 201-248 μεταγράφηκαν και μεταφράστηκαν *in vitro* παρουσία ραδιενεργά σημασμένης, με ³⁵S, μεθειονίνης, όπως περιγράφεται στα Υλικά και Μέθοδοι. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα που αντιστοιχεί στο 1/4 του προϊόντος, ενώ το υπόλοιπο δείγμα αφέθηκε να αλληλεπιδράσει στους 4 C° για 20 ώρες με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης στα οποία έχει συζευχθεί η GST πρωτεΐνη (control) ή οι GST απαλοιφές του CBP: GST CBP 1098-1620 ή 1620-1877. Αναλύθηκε η συν-κατακρήμιση των *in vitro* μεταγραφόμενων Smad3 143-248, Smad3 172-248 και Smad3 201-248 πρωτεϊνών με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης, με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και αυτοραδιογραφία. Η συγκριτική έκφραση των *in vitro* μεταγραφόμενων και μεταφραζόμενων Smad3 143-248, Smad3 172-248 και Smad3 201-248 πρωτεϊνών απεικονίζεται στο παρακείμενο αυτοραδιογράφημα.



Εικόνα 66. Ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας της GAL4-Smad3 από τον συνενεργοποιητή CBP, σε κύτταρα HepG2. Ηπατικά κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3 σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του CBP (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 67. Ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας της GAL4-Smad3 και της GAL4-Smad3 από τον συνενεργοποιητή CBP, σε κύτταρα NIH 3T3. Κύτταρα ινοβλαστών ποντικού NIH 3T3 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3 ή της GAL4-Smad3 143-248 σε ποσότητα 1 μg από τον κάθε ένα. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του CBP (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



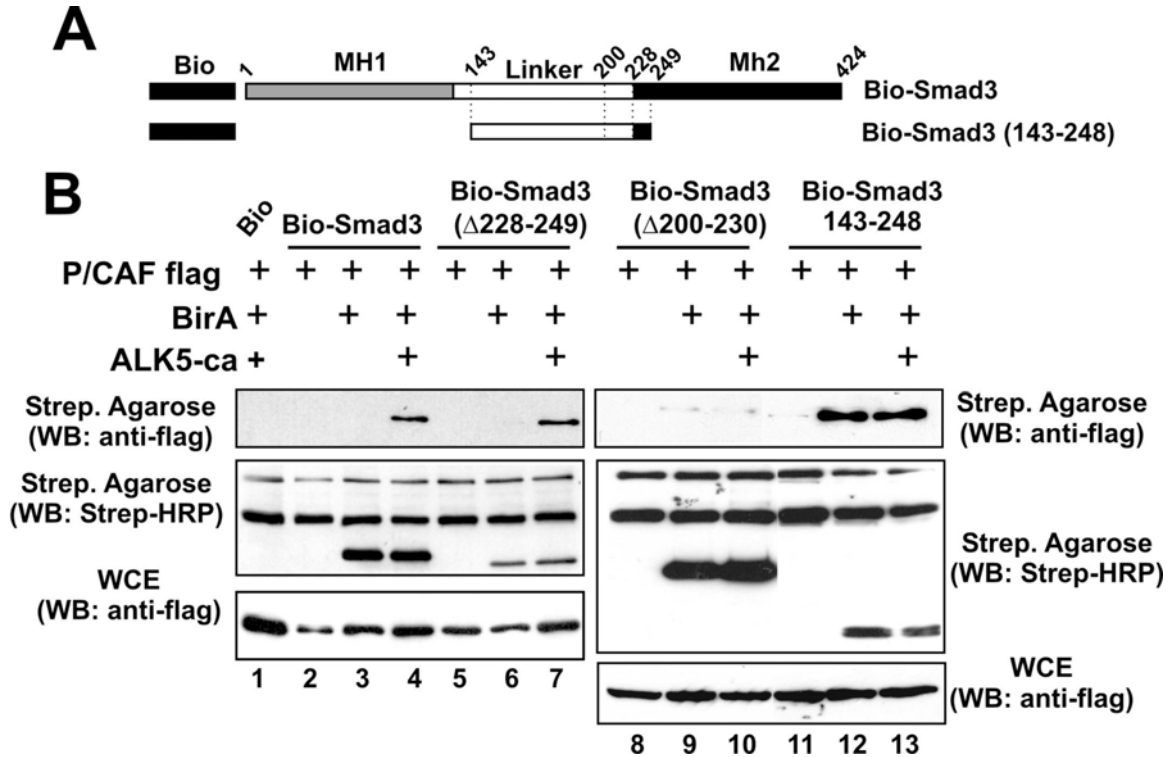
Εικόνα 68. Ενίσχυση της μεταγραφικής δραστηριότητας της GAL4-Smad3 201-248 από τον συνενεργοποιητή CBP, σε κύτταρα NIH 3T3. Α. Κύτταρα ινοβλαστών ποντικού NIH 3T3 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3 201-248 σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία δύο συγκεντρώσεων του φορέα έκφρασης του CBP (2 μg και 4 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. **Β.** Κύτταρα NIH 3T3 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3 201-248 σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του CBP (1 μg) και του φορέα έκφρασης της αδενοϊκής ογκοπρωτεΐνης E1A (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Ανάλυση των περιοχών της Smad3 πρωτεΐνης που αλληλεπιδρούν με τον συνενεργοποιητή p/CAF

Εκτός από τον συνενεργοποιητή CBP, είναι γνωστό ότι ο συνενεργοποιητής p/CAF, ο οποίος έχει επίσης ενεργότητα ακετυλοτρανσφεράσης, αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με την Smad3 πρωτεΐνη (Itoh et al., 2000). Κρίθηκε σκόπιμος ο έλεγχος της ικανότητας διαφόρων μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 να αλληλεπιδρούν φυσικά με τον συνενεργοποιητή p/CAF. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της βιοτινυλίωσης *in vivo*. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 69A**, εκτός των Bio-Smad3, Bio-Smad3 Δ200-230 και Bio-Smad3 Δ228-249, που χρησιμοποιήθηκαν σε προηγούμενες αναλύσεις, κατασκευάστηκε η υβριδική Bio-Smad3 143-248 που φέρει στο N-τερματικό άκρο της το Bio πεπτίδιο, καθώς από τις προηγούμενες αναλύσεις προκύπτει ότι η περιοχή 143-248 εμφανίζει υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα και αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με τον συνενεργοποιητή CBP. Οι παραπάνω μορφές της Bio-Smad3 και η πρωτεΐνη Bio εκφράστηκαν σε ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα HEK 293T, όπως υποδηλώνει η **Εικόνα 69B**. Η τελευταία, ακόμα και μετά την βιοτινυλίωσή της από την συνέκφραση της BirA λιγάσης βιοτίνης και την συνέκφραση του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5, δεν συνκατακρημνίζει τον συνενεργοποιητή p/CAF (διαδρομή 1, πρώτο ανοσοαποτύπωμα), γεγονός που εξασφαλίζει την ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων. Η αγρίου τύπου Bio-Smad3 μετά την βιοτινυλίωσή της αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή p/CAF μόνο μετά την ενεργοποίησή της από τον ALK5 (διαδρομή 4, πρώτο αριστερό ανοσοαποτύπωμα). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς είναι γνωστό ότι η ενεργοποίηση της Bio-Smad3 από τον υποδοχέα ALK5 έχει ως αποτέλεσμα να ανασταλεί η κατασταλτική αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών MH1 και MH2 και έτσι η MH2 περιοχή μπορεί να αλληλεπιδράσει με τον p/CAF. Στην προσπάθεια να εντοπιστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η περιοχή της Smad3 που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον p/CAF, χρησιμοποιήθηκε η Bio-Smad3 Δ228-249. Από την **Εικόνα 69B** προκύπτει ότι η εσωτερική απαλοιφή της περιοχής 228-249 δεν επηρεάζει την αλληλεπίδραση της Smad3 με τον συνενεργοποιητή p/CAF, καθώς η Bio-Smad3 Δ228-249 μετά την βιοτινυλίωση και ενεργοποίησή της, συνκατακρημνίζει την p/CAF (διαδρομή 7, πρώτο αριστερό ανοσοαποτύπωμα).

Αντιθέτως, η Bio-Smad3 Δ200-230 δεν μπορεί να συνκατακρημνίσει τον p/CAF ακόμα και μετά την βιοτινυλίωση και ενεργοποίησή της (διαδρομή 10, πρώτο δεξιό ανοσοαποτύπωμα). Συνεπώς, η περιοχή 200-230 του linker είναι απαραίτητη για την αλληλεπίδραση της Smad3 με τον p/CAF. Προκειμένου να ελεγχθεί η παρατήρηση αυτή, χρησιμοποιήθηκε η Bio-Smad3 143-248 η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά μετά την βιοτινυλίωσή της με τον συνενεργοποιητή p/CAF ακόμα και χωρίς την ενεργοποίησή της από τον ALK5 (διαδρομή 12 και 13, πρώτο δεξιό ανοσοαποτύπωμα). Η TGFβ-ανεξάρτητη αλληλεπίδραση της περιοχής 143-248 της Smad3 με τον p/CAF ήταν αναμενόμενη, καθώς οι C-τερματικές θέσεις φωσφορυλίωσης της MH2 περιοχής από τον υποδοχέα λείπουν από την μεταλλαγμένη Bio-Smad3 143-248. Οι βιοτινυλιωμένες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στις παραπάνω αναλύσεις εκφράζονται σε συγκρίσιμα μεταξύ τους επίπεδα, όπως δείχνει το δεύτερο ανοσοαποτύπωμα (δεξιό και αριστερό) όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα στρεπταβιδίνης συζευγμένο με HRP. Πιστοποιήθηκε, επίσης, ότι η έλλειψη αλληλεπίδρασης, όπου αυτή παρατηρήθηκε, δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση του συνενεργοποιητή p/CAF, όπως δείχνει το τρίτο ανοσοαποτύπωμα (δεξιό και αριστερό), όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι του επίτιπου flag που φέρει ο p/CAF σε συνολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 69** υποδηλώνουν ότι η C-τερματική περιοχή του linker της Smad3 (αμινοξέα 200-230) είναι απαραίτητη για την φυσική αλληλεπίδρασή της με τον συνενεργοποιητή p/CAF. Η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 Δ200-230 πιθανότατα να οφείλεται, τουλάχιστον μερικώς, στην έλλειψη αλληλεπίδρασης με τον p/CAF. Αντιθέτως, η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας που χαρακτηρίζει την Smad3 Δ228-249 οφείλεται, πιθανότατα, στην αναστολή του ομο- και ετερο-πολυμερισμού της καθώς αυτή η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τους συνενεργοποιητές p/CAF και CBP.

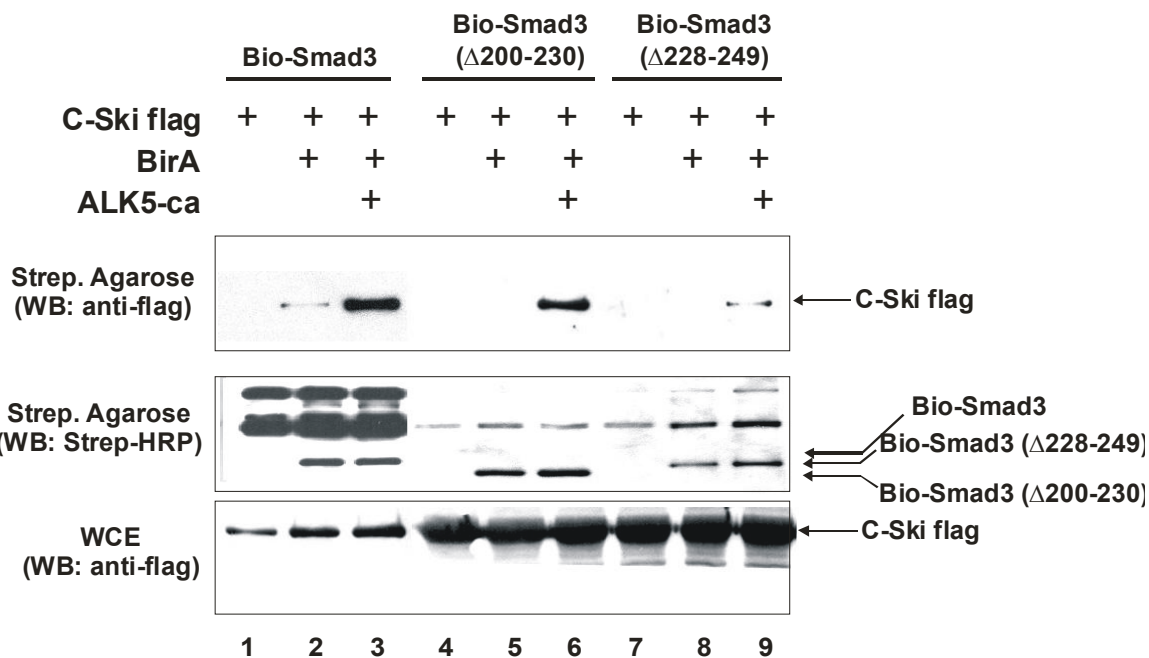


Εικόνα 69. Η Smad3 που στερείται των αμινοξέων 228-249 και η Smad3 143-248 αλληλεπιδρούν με τον συννεργοποιητή p/CAF. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου Smad3 και της μεταλλαγμένης Smad3 143-248, οι οποίες φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο το 22 αμινοξέων Bio πεπτίδιο που είναι στόχος βιοτινυλίωσης από την BirA λιγάση βιοτίνης. **B.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio, της πρωτεΐνης Bio Smad3 (Δ200-230), της πρωτεΐνης Bio-Smad3 (Δ228-249) ή της πρωτεΐνης Bio Smad3 143-248 και τον φορέα έκφρασης του συννεργοποιητή p/CAF Flag, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνης (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμιση της p/CAF Flag ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-Flag αντίσωμα (1:2500) έναντι του επίτοπου Flag του p/CAF Flag και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Strep.:στρεπταβιδίνη.

Ανάλυση της ικανότητας των μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 πρωτεΐνης να αλληλεπιδρούν φυσικά με τον συνκαταστολέα c-Ski

Είναι γνωστό ότι η Smad3 πρωτεΐνη αλληλεπιδρά φυσικά με τον συνκαταστολέα c-Ski. Η c-Ski ογκοπρωτεΐνη αλληλεπιδρά μέσω των αμινοξικών περιοχών 16-40 και 338-490 με την MH2 περιοχή της Smad3 και συγκεκριμένα με τις β2 και β3 πτυχωτές επιφάνειες του πυρήνα της δομής β sandwich της MH2 (Qin et al., 2002, Akiyoshi et al., 1999). Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα, η μείωση και η έλλειψη της μεταγραφικής δραστηριότητας των μεταλλαγμένων μορφών Smad3 Δ200-230 και Smad3 Δ228-249 να οφείλεται στην ενισχυμένη αλληλεπίδρασή τους με τον συνκαταστολέα c-Ski, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της βιοτινυλίωσης *in vivo*. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 70**, τόσο η αγρίου τύπου Bio-Smad3 όσο και η Bio-Smad3 Δ200-230 αλληλεπιδρούν με την c-Ski, μετά την βιοτινυλίωση από την BirA και την ενεργοποίησή τους από τον συστατικά ενεργοποιημένο υποδοχέα ALK5 (διαδρομές 3 και 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Αντιθέτως, η Bio-Smad3 Δ228-249 δεν αλληλεπιδρά με τον συνκαταστολέα c-Ski, ούτε μετά την ενεργοποίησή της από τον υποδοχέα ALK5 (διαδρομή 9, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Και σε αυτά τα πειράματα ελέγχθηκε η έκφραση των βιοτινυλιωμένων μορφών της Smad3 που χρησιμοποιήθηκαν (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα), με χρήση στρεπταβιδίνης-HRP, καθώς και η έκφραση του συνκαταστολέα c-Ski (τρίτο ανοσοαποτύπωμα), με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου flag που φέρει η c-Ski πρωτεΐνη.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 70** υποδεικνύουν ότι η απαλοιφή της περιοχής 200-230 της Smad3 πρωτεΐνης δεν επηρεάζει την αλληλεπίδρασή της με τον συνκαταστολέα c-Ski. Αντιθέτως, η απαλοιφή της περιοχής 228-249 δηλαδή των β1 και β2 πτυχωτών επιφανειών της MH2 περιοχής της Smad3, καταστέλλει την αλληλεπίδραση με τον c-Ski. Η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 Δ200-230 είναι πιθανό να οφείλεται, τουλάχιστον μερικώς, στην αλληλεπίδραση με τον c-Ski, ο οποίος αφ'ενός προσελκύει απακετυλάσες ιστονών (HDACs) και αφ'ετέρου παρεμποδίζει την πρόσδεση συνενεργοποιητών όπως οι CBP/p300 και p/CAF. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με εκείνα της Εικόνας 46, που υποδηλώνουν την έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ των Smad3 Δ200-230 και του p/CAF.



Εικόνα 70. Η Smad3 που στερείται των αμινοξέων 200-230 διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον συνκαταστολέα c-Ski. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio-Smad3, της πρωτεΐνης Bio Smad3 (Δ 200-230), ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 (Δ 228-249) και τον φορέα έκφρασης του συνκαταστολέα c-Ski Flag, σε ποσότητα 7.5 μ g από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μ g) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGF β , ca-ALK5 (7.5 μ g), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με $\frac{1}{4}$ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνης (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμνιση του c-Ski ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-Flag αντίσωμα (1:2500) έναντι του επίτοπου Flag του c-Ski και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη.

Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην αμινοξική θέση 238 της Smad3 πρωτεΐνης αναστέλλει την μεταγραφική της ενεργότητα

Η απαλοιφή μεγάλων αμινοξικών περιοχών της Smad3 πρωτεΐνης δεν είναι επαρκώς λεπτομερής ως προς τον ρόλο συγκεκριμένων αμινοξέων στις μεταγραφικές λειτουργίες της Smad3. Η ανάγκη για λεπτομερέστερο και πιο συγκεκριμένο χαρακτηρισμό αμινοξικών θέσεων που παίζουν ρόλο στον ομο- και ετεροπολιμερισμό, στην αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς και γενικότερα στην μεταγραφική ενεργότητα της Smad3, και η ανάγκη συσχετισμού των ευρυμάτων με τον βιολογικό ρόλο της πρωτεΐνης (ογκογένεση, ογκοκαταστολή), οδήγησαν στον σχεδιασμό μιας νέας μεταλλαγμένης μορφής της Smad3 πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε μια μεταλλαγμένη Smad3 που φέρει στην θέση 238 αντί του γλουταμινικού οξέος το αμινοξύ αλανίνη (Smad3 E238A). Η μετάλλαξη αυτή είναι παρόμοια με μια σημειακή μετάλλαξη αντικατάστασης E330A (γλουταμινικού οξέος της θέσεως 330 σε αλανίνη) στην Smad4 πρωτεΐνη, η οποία συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου του εντέρου και με το σύνδρομο εμφάνισης πολυπόδων σε εφήβους (Juvenile Polyposis Syndrome, JPS) (Waite and Eng, 2003, Shi et al., 1997).

Η Smad3 E238A κλωνοποιήθηκε αρχικά στο πλασμιδιακό φορέα pcDNA1amp, με τέτοιο τρόπο, ώστε να φέρει τον επίτοπο 6myc στο N-τελικό άκρο της και απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 71Α**. Η μεταγραφική της δραστηριότητα ελέγχθηκε αρχικά σε κύτταρα JEG-3. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 71Β**, η μεταγραφική δραστηριότητα του συνθετικού υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B-luc δεν αυξήθηκε από την έκφραση του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5, καθώς τα JEG-3 κύτταρα στερούνται ενδογενών Smad3 μορίων. Η αγρίου τύπου 6myc-Smad3 ενεργοποίησε, όπως αναμενόταν, την μεταγραφική δραστηριότητα του υποκινητή κατά 5 φορές, ενώ η συνέκφραση του ALK5 αύξησε την ενεργοποίηση αυτή κατά 10 φορές (ενεργοποίηση κατά 50 φορές). Η 6myc-Smad3 E238A ήταν μεταγραφικά ανενεργή τόσο απουσία όσο και παρουσία του ALK5. Η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας θα μπορούσε να αποδοθεί σε μειωμένη έκφραση της 6myc-Smad3 E238A, οπότε πραγματοποιήθηκε πείραμα ανοσοαποτύπωσης, σε κύτταρα HEK 293T, χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του επίτοπου myc. Όπως υποδηλώνει η **Εικόνα 71Γ**, η 6myc-Smad3

E238A εκφράζεται σε μικρότερο βαθμό από την αγρίου τύπου *6myc-Smad3*, εύρημα που πιθανόν να οφείλεται σε ελαττωμένη σταθερότητα της πρωτεΐνης λόγω της μετάλλαξης. Παρόλα αυτά, η μείωση δεν είναι τόσο δραστική που να εξηγεί την καταστολή της μεταγραφικής δραστικότητας της εν λόγω πρωτεΐνης.

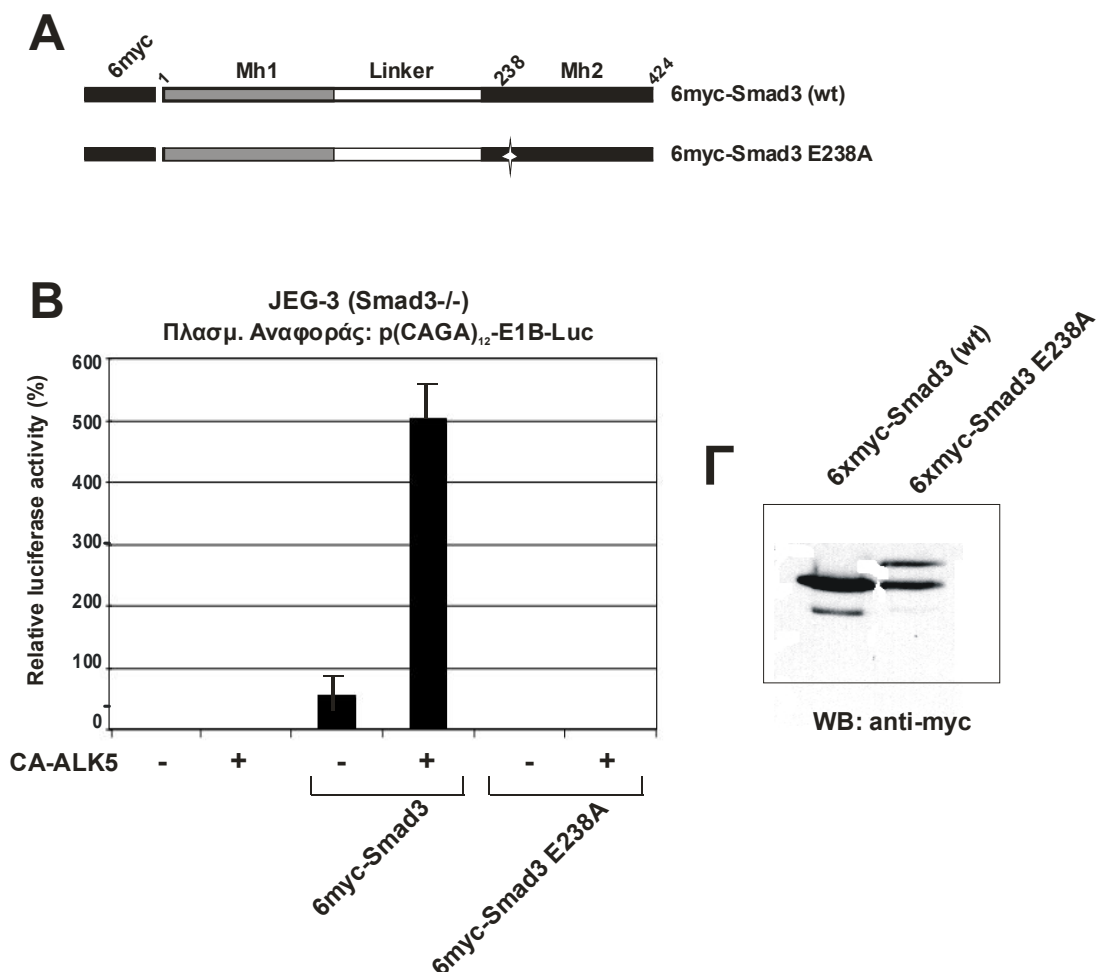
Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 71** υποδεικνύουν ότι η σημειακή αντικατάσταση E238A στην *Smad3* πρωτεΐνη αναστέλλει την μεταγραφική της δραστικότητα και την ενεργοποίησή της από τον υποδοχέα του TGFβ.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε η ικανότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης της *6myc-Smad3* E238A με την *Smad4* πρωτεΐνη. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα MDA-MB-468 που στερούνται έκφρασης του ενδογενούς *Smad4* γονιδίου, επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του συνθετικού υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B-luc, σε συνδυασμό με την αγρίου τύπου *Smad3* ή την μεταλλαγμένη *Smad3* E238A και την *Smad4*, απουσία και παρουσία του TGFβ. Όπως δείχνει η **Εικόνα 72**, ο υποκινητής (CAGA)₁₂-E1B δεν ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά από τον συνδέτη TGFβ, καθώς τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στερούνται ενδογενών *Smad4* μορίων. Για τον ίδιο λόγο παρατηρήθηκε μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση από την αγρίου τύπου *6myc-Smad3*, τόσο απουσία όσο και παρουσία του συνδέτη TGFβ (ενεργοποίηση κατά 1.5 και 4 φορές, αντίστοιχα). Η έκφραση της εξωγενούς *6myc-Smad4* ενεργοποίησε τον υποκινητή κατά 3.5 φορές απουσία του TGFβ και κατά 7.5 φορές παρουσία του TGFβ. Η συνέκφραση των *6myc-Smad3* και *6myc-Smad4* προκάλεσε σημαντική αύξηση της μεταγραφικής δραστικότητας του υποκινητή τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ (ενεργοποίηση κατά 38 και 40.5 φορές αντίστοιχα). Η *6myc-Smad3* E238A ήταν μεταγραφικά ανενεργή απουσία ή παρουσία του TGFβ, ενώ η συνέκφρασή της με την *6myc-Smad4* ενεργοποίησε τον υποκινητή όσο η έκφραση μόνο της *6myc-Smad4*, απουσία ή παρουσία του TGFβ. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 72** υποδεικνύουν την έλλειψη μεταγραφικής δραστικότητας της *6myc-Smad3* E238A και της λειτουργικής αλληλεπίδρασής της με την *Smad4* πρωτεΐνη.

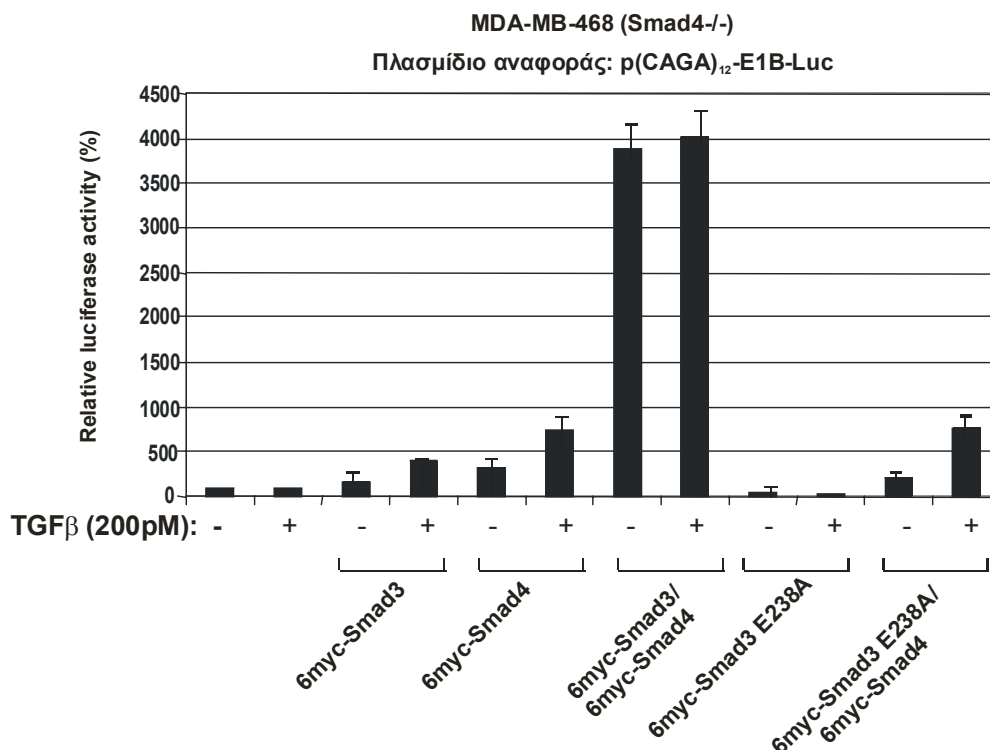
Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε και σε ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα HepG2. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 73**, παρουσία του TGFβ ο συνθετικός υποκινητής (CAGA)₁₂-E1B ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά κατά 198 φορές. Η έκφραση της αγρίου τύπου *6myc-Smad3* αύξησε την μεταγραφική δραστικότητα του υποκινητή κατά 380

φορές απουσία του TGFβ και κατά 800 φορές παρουσία αυτού (αύξηση κατά 2.1 φορές). Η έκφραση της *6myc-Smad4* προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 80 φορές απουσία του TGFβ και κατά 250 φορές παρουσία αυτού (αύξηση κατά 3.1 φορές). Η συνέκφραση των *6myc-Smad3* και *6myc-Smad4* προκάλεσε δραματική αύξηση της μεταγραφικής δραστηριότητας του υποκινητή σε αυτά τα κύτταρα, τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ (ενεργοποίηση κατά 1700 και 1790 φορές αντίστοιχα). Και στα κύτταρα αυτά η *6myc-Smad3 E238A* ήταν μεταγραφικά ανενεργή απουσία ή παρουσία του TGFβ, ενώ η συνέκφρασή της με την *6myc-Smad4* ενεργοποίησε τον υποκινητή περίπου όσο η έκφραση μόνο της *6myc-Smad4*, απουσία ή παρουσία του TGFβ. Από τα αποτελέσματα της **Εικόνας 73** επιβεβαιώνεται η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας της *6myc-Smad3 E238A* και της αλληλεπίδρασής της με την *Smad4*.

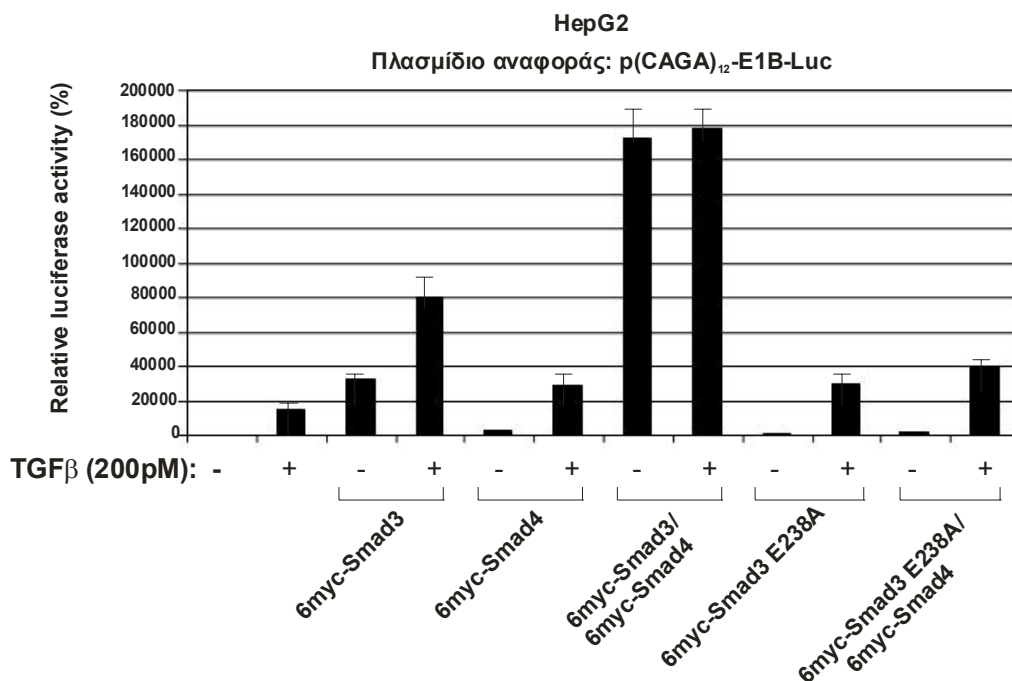
Συνολικά, τα αποτελέσματα των Εικόνων 48, 49 και 50 υποδεικνύουν ότι η εισαγωγή της καρκινογόνου μετάλλαξης της *Smad4 E330A* στην *Smad3* πρωτεΐνη (*E238A*), αναστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα της *Smad3*, την ενεργοποίησή της από τον TGFβ και την δυνατότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την *Smad4* πρωτεΐνη.



Εικόνα 71. Επίδραση της σημειακής μετάλλαξης E238A στην μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου 6myc-Smad3 και της 6myc-Smad3 E238A πρωτεΐνης. Η δεύτερη φέρει αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος της θέσεως 238 σε αλανίνη. Και οι δύο πρωτεΐνες φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο τον επίτοπο 6myc. Ο σταυρός υποδεικνύει τη θέση της σημειακής μετάλλαξης. **B.** Κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3 (Smad3^{-/-}) που στερούνται των ενδογενών Smad3 μορίων, επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, ή της 6myc-Smad3 E238A (1 μg) πρωτεΐνης, απουσία ή παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ca-ALK5 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποκιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg). **Γ.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, ή 6myc-Smad3 E238A (30 μg). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την ανοσοαποτύπωση της έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-myc αντίσωμα (1:5000), δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000), και το σύστημα (ECL).



Εικόνα 72. Η μεταλλαγμένη Smad3 E238A πρωτεΐνη δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει λειτουργικά με την Smad4 πρωτεΐνη. Καρκινικά κύτταρα μαστού ανθρώπου MDA-MB-468 που στερούνται των ενδογενών Smad4 πρωτεϊνών, επιμόλυνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, ή της 6myc-Smad3 E238A σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμόλυνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.



Εικόνα 73. Έλεγχος της μεταγραφικής δραστηριότητας της σημειακά μεταλλαγμένης Smad3 E238A, σε κύτταρα HepG2. Ηπατικά κύτταρα ανθρώπου HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)₁₂-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, ή της 6myc-Smad3 E238A σε ποσότητα 1 μg. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της 6myc-Smad4 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) του ενζύμου της λουσιφεράσης δείχνεται υπό μορφή ραβδογράμματος. Η κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

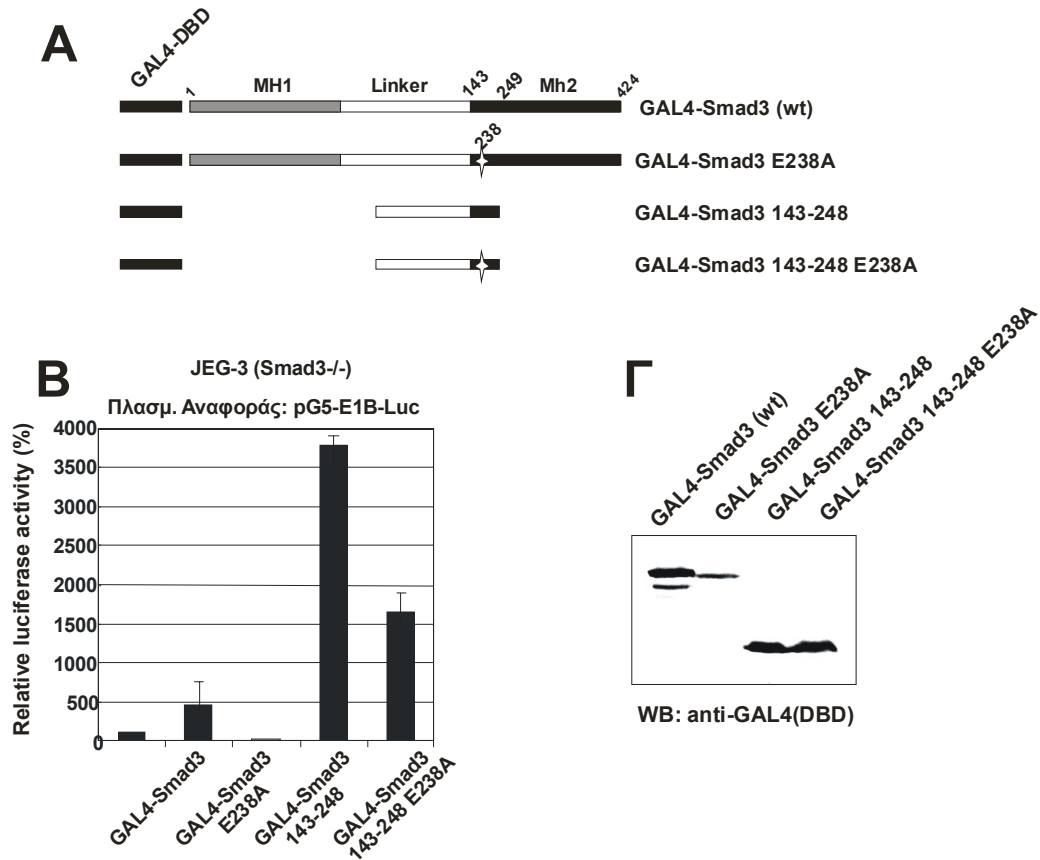
Η υβριδική GAL4-Smad3 E238A στερείται μεταγραφικής δραστικότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη

Κρίθηκε σκόπιμος ο έλεγχος της μεταγραφικής ενεργότητας της μεταλλαγμένης Smad3 E238A πρωτεΐνης ανεξάρτητα από την ικανότητα πρόσδεσής της στο DNA. Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκε μια νέα μορφή της μεταλλαγμένης Smad3 E238A που φέρει στο N-τελικό άκρο της το GAL4 DBD και απεικονίζεται στην **Εικόνα 74A**. Επίσης, κατασκευάστηκε σημειακά μεταλλαγμένη μορφή της υβριδικής GAL4-Smad3 143-248 πρωτεΐνης, στην θέση 238. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε η επίδραση της μετάλλαξης E238A στην εξαιρετικά μεγάλη μεταγραφική δραστικότητα της GAL4-Smad3 143-248 πρωτεΐνης. Οι υβριδικές GAL4-Smad3 143-248 και GAL4-Smad3 143-248 E238A απεικονίζονται επίσης στην **Εικόνα 74A**. Η μεταγραφική δραστικότητα αυτών των μεταλλαγμένων μορφών συγκρίθηκε με εκείνη της αγρίου τύπου GAL4-Smad3, σε κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3 που στερούνται ενδογενών Smad3 πρωτεϊνών, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 74B**. Τα κύτταρα αυτά επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης του συνθετικού υποκινητή G5-E1B, ο οποίος ενεργοποιήθηκε μεταγραφικά κατά 5 φορές από την έκφραση της GAL4-Smad3. Η υβριδική GAL4-Smad3 143-248 E238A ήταν μεταγραφικά ανενεργή, ενώ η GAL4-Smad3 143-248 εμφάνισε, και στα κύτταρα αυτά, μεγάλη μεταγραφική δραστικότητα (ενεργοποίηση κατά 37.5 φορές, 7.5 φορές περισσότερη ενεργοποίηση από εκείνη της αγρίου τύπου πρωτεΐνης). Η εισαγωγή της μετάλλαξης E238A στην GAL4-Smad3 143-248, μείωσε την μεταγραφική της δραστικότητα στο μισό περίπου (ενεργοποίηση κατά 16.5 φορές). Στην **Εικόνα 74Γ** υποδεικνύεται η έκφραση των παραπάνω υβριδικών μορφών της Smad3 πρωτεΐνης, σε κύτταρα HEK 293T. Είναι αξιοσημείωτο ότι η εισαγωγή της μετάλλαξης E238A στην GAL4-Smad3 143-248, δεν φαίνεται να αποσταθεροποιεί την έκφρασή της, όπως συμβαίνει με την GAL4-Smad3 E238A. Η επίδραση της μετάλλαξης E238A στην σταθερότητα της GAL4-Smad3 πρωτεΐνης χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

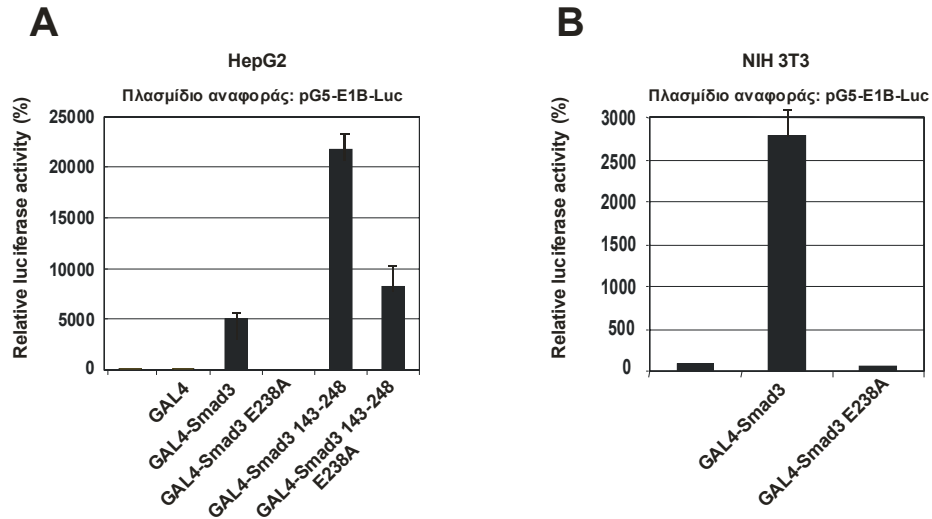
Από τις παραπάνω αναλύσεις μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η σημειακή μετάλλαξη E238A εξαλείφει ή μειώνει την μεταγραφική δραστικότητα των πρωτεϊνών GAL4-Smad3 και GAL4-Smad3 143-248.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε η μεταγραφική δραστικότητα των παραπάνω μεταλλαγμένων μορφών στα κύτταρα HepG2. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 75Α**, η GAL4 πρωτεΐνη δεν ενεργοποιεί την μεταγραφή του συνθετικού υποκινητή G5-E1B, όπως αναμενόταν. Η GAL4-Smad3 προκάλεσε ενεργοποίηση κατά 50 φορές, ενώ η σημειακά μεταλλαγμένη GAL4-Smad3 E238A ήταν μεταγραφικά ανενεργή και στα HepG2 κύτταρα. Η GAL4-Smad3 143-248 ενεργοποίησε μεταγραφικά τον υποκινητή κατά 220 φορές και η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης E238A σε αυτή μείωσε την δραστικότητά της τουλάχιστον κατά το ήμισυ (ενεργοποίηση κατά 80 φορές). Παρόμοιες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα ινοβλαστών ποντικού NIH 3T3. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 75Β**, η αγρίου τύπου GAL4-Smad3 ενεργοποίησε τον υποκινητή G5-E1B κατά 27.5 φορές, ενώ η GAL4-Smad3 E238A ήταν μεταγραφικά σιωπηρή. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την κατασταλτική δράση της σημειακής μετάλλαξης E238A στην μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 πρωτεΐνης.

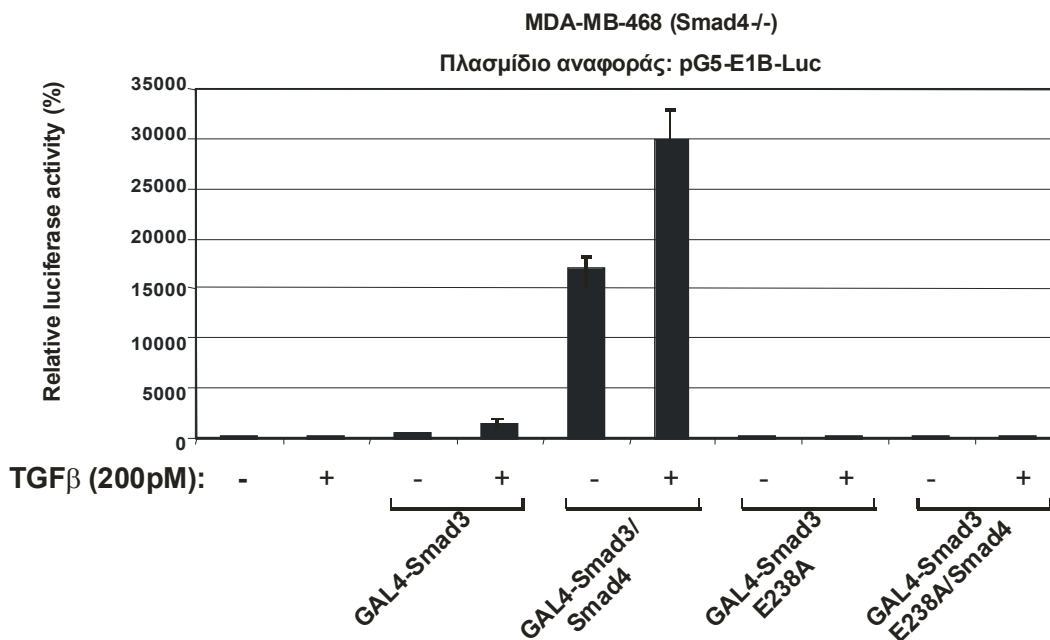
Κατόπιν, ελέγχθηκε η ικανότητα της GAL4-Smad3 E238A να αλληλεπιδρά λειτουργικά με την Smad4 πρωτεΐνη, σε καρκινικά κύτταρα μαστού MDA-MB-468 τα οποία στερούνται ενδογενούς Smad4 πρωτεΐνης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 76**, η συνέκφραση της *6myc-Smad4* αύξησε σημαντικά την μεταγραφική ενεργότητα της GAL4-Smad3, τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ, αλλά σε καμία περίπτωση δεν επηρέασε την μηδενική μεταγραφική δραστικότητα της GAL4-Smad3 E238A. Συνεπώς, η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης E238A στην GAL4-Smad3 αναστέλλει την λειτουργική της αλληλεπίδραση με την Smad4 πρωτεΐνη.



Εικόνα 74. Η υβριδική GAL4-Smad3 πρωτεΐνη που φέρει την σημειακή μετάλλαξη E238A στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας. Α. Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου GAL4-Smad3 και των μεταλλαγμένων μορφών της, GAL4-Smad3 E238A, GAL4-Smad3 143-248 και GAL4-Smad3 143-248 E238A, που χρησιμοποιήθηκαν. Ο λευκός σταυρός υποδεικνύει την θέση της σημειακής μετάλλαξης E238A. Αυτές οι Smad3 πρωτεΐνες είναι συζευγμένες με το GAL4 DBD στο N-τελικό άκρο τους. **Β.** Κύτταρα χοριοκαρκινώματος JEG-3 (Smad3^{-/-}), επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3, της GAL4-Smad3 E238A, της GAL4-Smad3 143-248, ή της GAL4-Smad3 143-248 E238A (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) 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 (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. **Γ.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3, GAL4-Smad3 E238A, της GAL4-Smad3 143-248, ή της GAL4-Smad3 143-248 E238A (30 μg). Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων αναλύθηκαν με SDS/PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Για την ανοσοαποτύπωση της έκφρασης των προαναφερθέντων πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-GAL4 αντίσωμα (1:2500), δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000), και το σύστημα ECL.



Εικόνα 75. Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην αμινοξική θέση 238 της Smad3 πρωτεΐνης, στερεί την μεταγραφική της δραστηριότητα. Α. Κύτταρα HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4, της GAL4-Smad3, της GAL4-Smad3 E238A, της GAL4-Smad3 143-248, ή της GAL4-Smad3 143-248 E238A (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) 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 (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. **Β.** Κύτταρα NIH 3T3 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον φορέα έκφρασης της της GAL4-Smad3, ή της GAL4-Smad3 E238A (1 μg). Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) 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 (1 μg).

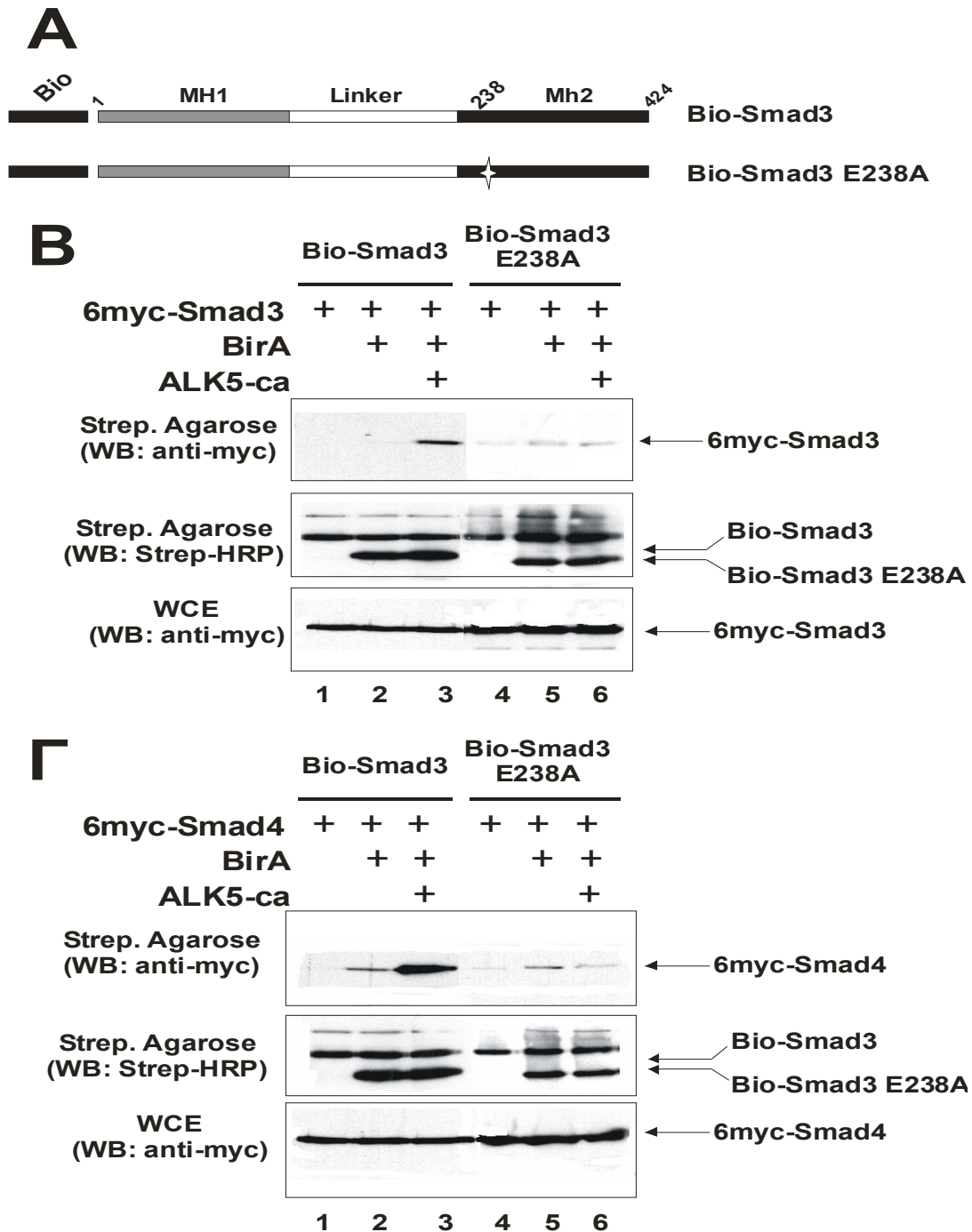


Εικόνα 76. Η εισαγωγή σημειακής μετάλλαξης στην αμινοξική θέση 238 της Smad3 πρωτεΐνης, στερεί την μεταγραφική της δραστηριότητα και την ικανότητα λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 πρωτεΐνη, σε κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα MDA-MB-468 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς pG₅-E1B-Luc (1 μg) και τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης της GAL4-Smad3, ή της GAL4-Smad3 E238A, (1 μg). Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του συνδέτη TGFβ (200 pM), απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης της *hmyc*-Smad4 (1 μg), όπως υποδεικνύεται στο γράφημα. Η προσθήκη του TGFβ έγινε 16 ώρες μετά την επιμόλυνση και ακολούθησε επώαση των κυττάρων για 24 ακόμα ώρες. Η % δραστηριότητα (+/- μέση απόκλιση) 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 (1 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε.

Η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης E238A στην Smad3 πρωτεΐνη καταστέλλει τον ομοπολυμερισμό και τον ετεροπολυμερισμό της με την Smad4 πρωτεΐνη

Η έλλειψη μεταγραφικής δραστικότητας και λειτουργικής αλληλεπίδρασης με την Smad4 που παρουσίασε η σημειακά μεταλλαγμένη Smad3 E238A στις προηγούμενες αναλύσεις, θα μπορούσε να αποδοθεί στην ανικανότητα αυτής της πρωτεΐνης να αλληλεπιδρά και να σχηματίζει σύμπλοκα με τις αγρίου τύπου Smad3 και Smad4. Για να ελεγχθεί το ενδεχόμενο αυτό κατασκευάστηκε νέα υβριδική μορφή της Smad3 E238A που φέρει το Bio πεπτίδιο στο N-τελικό άκρο της, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 77Α**. Η Bio-Smad3 E238A εκφράστηκε σε κύτταρα HEK 293T και ελέγχθηκε, με το σύστημα της βιοτινυλίωσης *in vivo*, η ικανότητά της να αλληλεπιδρά με την αγρίου τύπου 6myc-Smad3. Όπως υποδηλώνει η **Εικόνα 77Β**, ενώ η αγρίου τύπου Bio-Smad3 αλληλεπιδρά με την 6myc-Smad3 μετά την βιοτινυλίωση από την λιγάση βιοτίνης BirA και την ενεργοποίησή της από την συνέκφραση του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (διαδρομή 3, πρώτο ανοσοαποτύπωμα), η Bio-Smad3 E238A στερείται αυτής της ικανότητας, ακόμα και παρουσία του ALK5 (διαδρομή 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Η έλλειψη φυσικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των Bio-Smad3 E238A και 6myc-Smad3 δεν οφείλεται σε μειωμένη έκφραση κάποιας από τις δύο, αφού οι πρωτεΐνες αυτές εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα σε όλα τα δείγματα (δεύτερο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα).

Στην εικόνα **77Γ** καταδεικνύεται ότι η Bio-Smad3 E238A δεν αλληλεπιδρά με την 6myc-Smad4 πρωτεΐνη ούτε μετά την βιοτινυλίωση και την ενεργοποίηση από τον ALK5 (διαδρομή 6, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Η εγκυρότητα του πειράματος πιστοποιείται από την παρατηρούμενη αλληλεπίδραση της αγρίου τύπου Bio-Smad3 με την 6myc-Smad4 (διαδρομή 3, πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Επίσης ελέγχθηκε η έκφραση τόσο της Bio-Smad3 E238A (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα), με χρήση στρεπταβιδίνης συζευγμένης με HRP, όσο και της 6myc-Smad4 (τρίτο ανοσοαποτύπωμα), με χρήση αντισώματος anti-myc σε ολικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 77** υποδηλώνουν ότι η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης E238A στην Smad3 πρωτεΐνη αναστέλλει τον



ομο- και ετεροπολυμερισμό της, και πιθανόν, για τον λόγο αυτό, και την μεταγραφική της δράση.

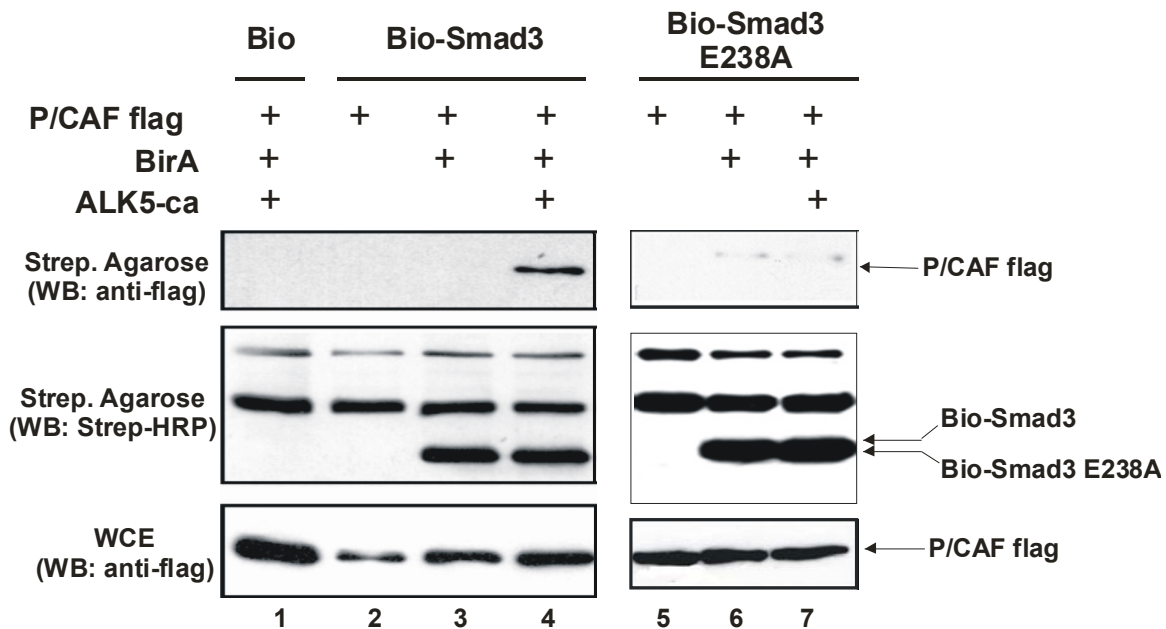
Εικόνα 77. Η Smad3 E238A πρωτεΐνη στερείται της ικανότητας ομοπολυμερισμού με την Smad3 και ετεροπολυμερισμού με την Smad4. Α. Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου Smad3 και της σημειακά μεταλλαγμένης Smad3 E238A, οι οποίες φέρουν στο N-τελικό τους άκρο το, 22 αμινοξέων, Bio πεπτίδιο που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την BirA λιγάση

βιοτίνης. Ο λευκός σταυρός υποδεικνύει την θέση της σημειακής μετάλλαξης E238A. **B.** Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio Smad3 ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 E238A και τον φορέα έκφρασης της 6myc-Smad3, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα όπως υποδεικνύεται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στην εικόνα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνη (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμνιση της 6myc-Smad3 ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-myc αντίσωμα (1:5000) έναντι του επίτοπου myc της 6myc-Smad3 και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 πρωτεΐνες (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη. **Γ.** Το πείραμα πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στο B, με την διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε ο φορέας έκφρασης της 6myc-Smad4 αντί της 6myc-Smad3 πρωτεΐνης.

Η Smad3 E238A πρωτεΐνη στερείται της ικανότητας λειτουργικής αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή p/CAF

Η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας που χαρακτηρίζει την Smad3 E238A θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναστολή της αλληλεπίδρασής της με συνενεργοποιητές όπως ο p/CAF. Προκειμένου να ελεγχθεί το ενδεχόμενο αυτό, χρησιμοποιήθηκε και πάλι το σύστημα της βιοτινυλίωσης *in vivo*, σε κύτταρα HEK 293T. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 78**, το Bio πεπτίδιο δεν αλληλεπιδρά με τον συνενεργοποιητή p/CAF παρουσία του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα ALK5 (διαδρομή 1 πρώτο αριστερό ανοσοαποτύπωμα), εξασφαλίζοντας την ειδικότητα των αλληλεπιδράσεων. Η αγρίου τύπου Bio-Smad3 αλληλεπιδρά με τον p/CAF μετά την βιοτινυλίωσή της από την λιγάση βιοτίνης BirA και την ενεργοποίησή της από την συνέκφραση του ALK5 (διαδρομή 4, πρώτο αριστερό ανοσοαποτύπωμα), όπως έχει δειχθεί και σε προηγούμενες αναλύσεις (Εικόνα 46). Αντιθέτως η σημειακά μεταλλαγμένη Bio-Smad3 E238A στερείται αυτής της ικανότητας, ακόμα και παρουσία του ALK5 (διαδρομή 7, δεξιό πρώτο ανοσοαποτύπωμα). Οι πρωτεΐνες Bio-Smad3 και Bio-Smad3 E238A εκφράζονται στον ίδιο βαθμό, όπως φαίνεται στο δεύτερο αριστερό και δεξιό ανοσοαποτύπωμα, όπου χρησιμοποιήθηκε στρεπταβιδίνη συζευγμένη με HRP. Ο συνενεργοποιητής p/CAF εκφράζεται σε συγκρίσιμο βαθμό, τουλάχιστον στα δείγματα που αφορούν τις

αλληλεπιδράσεις (διαδρομές 1, 4 και 7) όπως φαίνεται στο τρίτο αριστερό και δεξιό ανοσοαποτύπωμα, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα anti-flag, έναντι του επίτοπου που φέρει ο p/CAF. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα της **Εικόνας 78** υποδηλώνουν ότι η αντικατάσταση του γλουταμινικού οξέος της θέσεως 238 σε αλανίνη αναστέλλει την ικανότητα αλληλεπίδρασης της Smad3 πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή p/CAF.



Εικόνα 78. Η Smad3 πρωτεΐνη που φέρει την σημειακή μετάλλαξη E238A στερείται της ικανότητας αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή p/CAF. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio, της πρωτεΐνης Bio Smad3 ή της πρωτεΐνης Bio-Smad3 E238A και τον φορέα έκφρασης του συνενεργοποιητή p/CAF Flag, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στην εικόνα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με ¼ του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνης (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμιση του p/CAF Flag ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-Flag αντίσωμα (1:2500) έναντι του επίτοπου Flag του συνενεργοποιητή p/CAF Flag και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 πρωτεΐνες (1:10000) (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά

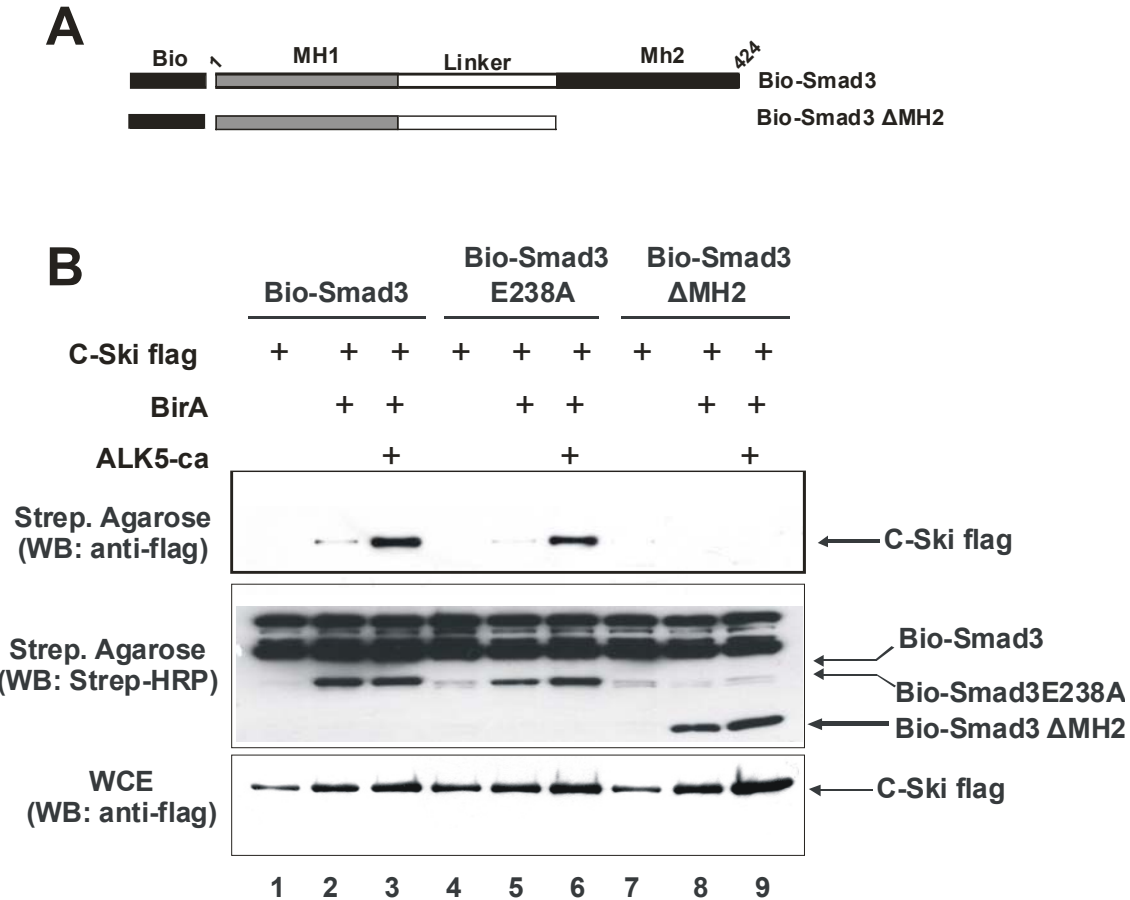
βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη.

Η σημειακά μεταλλαγμένη Smad3 E238A διατηρεί την ικανότητα αλληλεπίδρασης με τον συνκαταστολέα c-Ski

Η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας που χαρακτηρίζει την Smad3 E238A, όπως καταγράφεται από τις προηγούμενες αναλύσεις, θα μπορούσε να αποδοθεί σε ισχυρή αλληλεπίδρασή της με τον συνκαταστολέα c-Ski. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα αυτή, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της βιοτινυλίωσης *in vivo*. Εκτός των Bio-Smad3 Bio-Smad3 E238A χρησιμοποιήθηκε μια άλλη μεταλλαγμένη μορφή της Smad3 πρωτεΐνης. Είναι γνωστό από προηγούμενες αναλύσεις ότι η περιοχή της Smad3 που ευθύνεται για την αλληλεπίδραση με τον συνκαταστολέα c-Ski είναι η MH2. Έτσι, κατασκευάστηκε η Bio-Smad3 ΔMH2, που απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 79Α**, η οποία χρησιμοποιήθηκε για τον αρνητικό έλεγχο του πειράματος.

Όπως υποδηλώνει η **Εικόνα 79Β**, και έχει δειχθεί και σε προηγούμενες αναλύσεις, η αγρίου τύπου Bio-Smad3 αλληλεπιδρά με τον c-Ski μετά την βιοτινυλίωσή της από την λιγάση βιοτίνης BirA και την ενεργοποίησή της από την συνέκφραση του ALK5 (διαδρομή 3, πρώτο ανοσοαποτύπωμα, δείγμα θετικού ελέγχου) στα κύτταρα HEK 293T που χρησιμοποιήθηκαν. Η Bio-Smad3 ΔMH2 στερείται αντίστοιχης δυνατότητας (διαδρομή 9, πρώτο ανοσοαποτύπωμα, δείγμα αρνητικού ελέγχου), πιστοποιώντας την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων. Η Bio-Smad3 E238A αλληλεπιδρά με τον συνκαταστολέα c-Ski μετά την βιοτινυλίωση και την ενεργοποίησή της από τον ALK5, σε βαθμό συγκρίσιμο με αυτόν της αγρίου τύπου Smad3. Ελέγχθηκε, επίσης, η έκφραση τόσο των Bio-Smad3, Bio-Smad3 E238A, και Bio-Smad3 ΔMH2 πρωτεϊνών (δεύτερο ανοσοαποτύπωμα) με χρήση συζευγμένης με HRP στρεπταβιδίνης, όσο και του συνκαταστολέα c-Ski (τρίτο ανοσοαποτύπωμα) με χρήση αντισώματος έναντι του επίτοπου flag που αυτός φέρει. Και στις δύο περιπτώσεις, η έκφραση των πρωτεϊνών ήταν φυσιολογική.

Συνεπώς η εισαγωγή της σημειακής μετάλλαξης στην θέση 238 της Smad3 πρωτεΐνης δεν επηρεάζει την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τον συνκαταστολέα c-Ski.



Εικόνα 79. Η σημειακά μεταλλαγμένη Smad3 E238A πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με τον συνκαταστολέα c-Ski. **A.** Σχηματική αναπαράσταση της αγρίου τύπου Smad3 και της μεταλλαγμένης Smad3 ΔMH2, οι οποίες φέρουν στο N-τερματικό τους άκρο το Bio πεπτίδιο που αποτελεί στόχο βιοτινυλίωσης από την BirA λιγάση βιοτίνης. **B.** Κύτταρα HEK 293T επιμόλυνθηκαν παροδικά με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της πρωτεΐνης Bio Smad3, της πρωτεΐνης Bio-Smad3 E238A ή της πρωτεΐνης Bio Smad3 ΔMH2 και τον φορέα έκφρασης του συνκαταστολέα c-Ski flag, σε ποσότητα 7.5 μg από τον κάθε ένα και στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο πάνω μέρος των ανοσοαποτυπωμάτων. Η επιμόλυνση πραγματοποιήθηκε απουσία ή παρουσία του πλασμιδιακού φορέα έκφρασης της λιγάσης BirA (7.5 μg) και απουσία ή παρουσία του φορέα έκφρασης του συστατικά ενεργοποιημένου υποδοχέα του TGFβ, ca-ALK5 (7.5 μg), στους συνδυασμούς που υποδεικνύονται στο σχήμα. Από κάθε δείγμα κρατήθηκε ποσότητα ίση με 1/4 του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, πριν την επώαση των δειγμάτων με την αгарόζη στρεπταβιδίνη (Whole Cell Extract, WCE). Η συν-κατακρήμνιση του c-Ski ελέγχθηκε με SDS/PAGE ηλεκτοφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10.5% και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό mouse anti-flag αντίσωμα (1:2500) έναντι του επίτοπου Flag του συνκαταστολέα c-Ski flag και δευτερεύον anti-mouse HRP αντίσωμα (1:10000) (πρώτο και τρίτο ανοσοαποτύπωμα), ή HRP-συζευγμένη στρεπταβιδίνη (Strep-HRP) που προσδένεται στις βιοτινυλιωμένες Smad3 πρωτεΐνες (1:10000)

(δεύτερο ανοσοαποτύπωμα). Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ECL. Τα λεπτά βέλη στα δεξιά των ανοσοαποτυπωμάτων υποδεικνύουν την θέση των ενδεδειγμένων πρωτεϊνών. Strep.:στρεπταβιδίνη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ TGFβ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΡΩΤΕΪΝΗ LMP1 ΤΟΥ ΙΟΥ EPSTEIN-BARR

Η απώλεια της απόκρισης στον συνδέτη TGFβ οδηγεί στον μετασχηματισμό των κυττάρων και καρκινογένεση

Ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας β (Transforming Growth Factor β, TGFβ) είναι μια ογκοκατασταλτική κυτοκίνη που καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων λόγω της παύσης στην G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή. Παρόλο που ο μηχανισμός με τον οποίο ο TGFβ προκαλεί αυτήν την παύση δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί, πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι ο TGFβ επάγει την έκφραση γονιδίων που καταστέλλουν τον κυτταρικό κύκλο όπως τα p21/WAF1/Cip-1 και p15. Η καταστολή του TGFβ/Smad σηματοδοτικού μονοπατιού μπορεί να προκαλέσει ογκογένεση λόγω της αντίστασης των κυττάρων στην καταστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επάγεται από τον TGFβ. Έτσι, έχει παρατηρηθεί απώλεια της απόκρισης στον TGFβ σε κύτταρα που έχουν μετασχηματιστεί από τα προϊόντα διαφόρων ιικών ογκογονιδίων όπως η αδενοϊκή E1A πρωτεΐνη και η λανθάνουσα μεμβρανική πρωτεΐνη 1 (Latent Membrane Protein 1, LMP1) του ιού Epstein-Barr.

Η LMP1 πρωτεΐνη είναι σημαντική για τον μετασχηματισμό των B λεμφοκυττάρων. Μια πρόσφατη μελέτη (Takanashi et al., 1999) έδειξε ότι η LMP1 μετασχηματίζει ινοβλάστες αρουραίου όπως είναι οι NIH3T3 και Rat1 καλλιέργειες κυττάρων. Ο κυτταρικός μετασχηματισμός ήταν εμφανής από την απώλεια της καταστολής της κυτταρικής ανάπτυξης λόγω επαφής τον ανεξάρτητο της αγκυροβόλησης πολλαπλασιασμό και την απώλεια της απόκρισης στον TGFβ. Μια άλλη μελέτη (Arvanitakis et al., 1995) έδειξε ότι η LMP1 προκαλεί απώλεια της TGFβ επαγόμενης καταστολής του πολλαπλασιασμού των ανθρώπινων B λεμφοκυττάρων, ενώ δεν επηρεάζει την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων όπως το

jun B. Επιπλέον, τα μετασχηματισμένα από τον Epstein-Barr B λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζονται από λειτουργικούς υποδοχείς TGFβ, υποδηλώνοντας έτσι, ότι η ρύθμιση της μεταγραφής και η καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ως απόκριση των γονιδίων των B λεμφοκυττάρων στον TGFβ ελέγχονται από διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη (Inman et al., 2000), έδειξε ότι η LMP1 πρωτεΐνη δεν επιδρά αρνητικά στην TGFβ επαγόμενη καταστολή του πολλαπλασιασμού των B λεμφοκυττάρων. Ο λόγος της ασυμφωνίας των αποτελεσμάτων των διάφορων αναλύσεων δεν είναι σαφής, αλλά θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορές των συνθηκών καλλιέργειας των κυττάρων και των επιπέδων έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης.

Η LMP1 πρωτεΐνη αποτελεί καταστολέα της βασικής και TGFβ επαγόμενης ενεργότητας των υποκινητών των p21/WAF1/Cip1 και Smad7 γονιδίων

Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η έκφραση της LMP1 πρωτεΐνης σε χαμηλά επίπεδα ανέστειλε την Smad επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού (CAGA)₁₂ υποκινητή (**Εικόνα 24B**), υποδηλώνοντας την απορύθμιση της λειτουργίας των Smad πρωτεϊνών σε κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης της LMP1. Είναι αξιοσημείωτο ότι η LMP1 αναστέλλει πλήρως τόσο την βασική όσο και την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του γονιδίου του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21/WAF1/Cip-1 (**Εικόνα 25A**). Η καταστολή της ενεργότητας του p21 υποκινητή από την LMP1 θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως το αποτέλεσμα της επίδρασης της LMP1 στην ενεργότητα των ενδογενών Smad πρωτεϊνών που εκφράζονται στα κύτταρα COS-7. Εναλλακτικά, η LMP1 θα μπορούσε να καταστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα άλλων παραγόντων όπως του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 που προσδένεται στον p21 υποκινητή και ρυθμίζει την ενεργότητά του. Ο Sp1 προσδένεται σε 6 θέσεις που εντοπίζονται στην περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -122 και -60 πριν την θέση έναρξης της μεταγραφής του p21 γονιδίου (Gartel et al., 1999). Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας είχαν δείξει ότι η περιοχή αυτή του p21 υποκινητή είναι απαραίτητη για την μεταγραφική ενεργοποίηση του p21 υποκινητή από

τον TGFβ μέσω των Smad πρωτεϊνών (Moustakas and Kardassis, 1998; Pardali et al. 2000). Η πιθανή εμπλοκή του Sp1 στην LMP1 επαγόμενη καταστολή του p21 υποκινητή ενισχύθηκε από μια πρόσφατη μελέτη που δείχνει ότι η LMP1 καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα του υποκινητή του CD99 γονιδίου που εκφράζει μια πρωτεΐνη η οποία εμπλέκεται στην κυτταρική αγκυροβόληση, διαφοροποίηση και απόπτωση των T κυττάρων και των νευρώνων (Lee et al., 2001).. Η κοντινή περιοχή του υποκινητή του CD99 γονιδίου περιέχει μια θέση πρόσδεσης του Sp1, η οποία φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την κατασταλτική δράση της LMP1 (Lee et al., 2001). Επίσης, προκαταρκτικά αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η πρωτεΐνη LMP1 καταστέλλει την ενεργότητα μιας ελλειμματικής μορφής του p21 υποκινητή η οποία περιέχει μόνο τις κοντινές θέσεις πρόσδεσης του παράγοντα Sp1 (Koustodontis and Kardassis, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η υπερέκφραση πρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από την πρωτεΐνη LMP1 όπως ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι στην περίπτωση του p21 γονιδίου, η κατασταλτική δράση της LMP1 στην βασική έκφραση του γονιδίου αλλά και στην επαγόμενη, από τον TGFβ έκφρασή του, οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ των Smad πρωτεϊνών και του παράγοντα NF-κB για τον παράγοντα Sp1. Σύμφωνα με αυτήν την θεωρία, η δράση του παράγοντα Sp1 στον υποκινητή του p21 γονιδίου καθορίζεται από τα σχετικά επίπεδα ενεργοποίησης των ανωτέρω σηματοδοτικών διαμεσολαβητών σε κάθε κύτταρο.

Ένας πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η LMP1 πρωτεΐνη καταστέλλει την TGFβ σηματοδότηση θα μπορούσε να είναι η αύξηση της έκφρασης του Smad7 γονιδίου (Nakao et al., 1997). Ο TGFβ επάγει την ραγδαία μεταγραφή του Smad7 γονιδίου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η Smad7 πρωτεΐνη εμπλέκεται στην ρύθμιση της κυτταρικής απόκρισης στον TGFβ μέσω ενός μηχανισμού ανάδρασης (Afrakhte et al., 1998, Itoh et al., 1998, Brodin et al., 2000). Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι η μεταγραφική ενεργότητα του Smad7 υποκινητή αναστέλλεται πλήρως σε κύτταρα που επιμολύνθηκαν με τον φορέα έκφρασης της LMP1 πρωτεΐνης (**Εικόνα 25B**). Επιπλέον, η Smad3/4 επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του Smad7 υποκινητή καταστέλλεται πλήρως από την συνέκφραση της LMP1 (**Εικόνα 25B**). Η LMP1 πρωτεΐνη, καταστέλλοντας την μεταγραφή του Smad7 γονιδίου, θα μπορούσε να καταστείλει το δίκτυο των TGFβ

επαγόμενων γονιδίων που επηρεάζουν την κυτταρική αύξηση, διαφοροποίηση και απόπτωση.

Ο κρίσιμος ρόλος του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στην LMP1 επαγόμενη καταστολή της TGFβ σηματοδότησης και της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad πρωτεϊνών

Η παρούσα διατριβή υποστηρίζει τον σημαντικό ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στην καταστολή της σηματοδότησης του TGFβ που προκαλεί η LMP1 πρωτεΐνη. Παρατηρήθηκε ισχυρή καταστολή της Smad επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης του συνθετικού υποκινητή (CAGA)₁₂-E1B από τους μεταγωγείς της LMP1 σηματοδότησης και συγκεκριμένα από τις πρωτεϊνικές κινάσες TRAF2, NIK και IκKβ (**Εικόνα 29A**). Επιπλέον, οι αρνητικώς επικρατούσες μορφές (DN) των παραπάνω μεταγωγέων (TRAF2-DN, NIK-DN και IκKβ-DN) επάγουν την TGFβ σηματοδότηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι, υπό συνθήκες ενεργοποίησης από τον TGFβ, ο ενδογενής NF-κB μεταγραφικός παράγοντας ανταγωνίζεται τις Smad πρωτεΐνες. Επίσης, η υπερέκφραση της p65/RelA υπομονάδας του NF-κB κατέστειλε τόσο την ALK5- όσο και την Smad-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του (CAGA)₁₂-E1B συνθετικού υποκινητή σε κύτταρα COS-7. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει λειτουργικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στον NF-κB και τις Smad πρωτεΐνες. Έτσι, έχει παρατηρηθεί αρνητική αλληλεπίδραση μεταξύ των p65 και Smad3 μεταγραφικών παραγόντων στην ενεργοποίηση είτε του συνθετικού υποκινητή p3TP-lux, ο οποίος φέρει θέσεις πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών αλλά όχι του NF-κB, είτε του AR3 (Activin Responsive 3) υποκινητή, ο οποίος επίσης στερείται θέσεων πρόσδεσης του NF-κB και απαιτεί για την ενεργοποίηση του τον παράγοντα FAST-2 (Nagarajan et al., 2000). Η παρατηρούμενη καταστολή της TGFβ σηματοδότησης από τον NF-κB συσχετίζεται με τον σημαντικό ρόλο αυτού του μεταγραφικού παράγοντα στον μετασχηματισμό ινοβλαστών αρουραίου από την LMP1 πρωτεΐνη (He et al., 2000).

Πιθανοί μηχανισμοί καταστολής της TGFβ σηματοδότησης από την LMP1 πρωτεΐνη

Η καταστολή της TGFβ σηματοδότησης από την LMP1 πρωτεΐνη θα μπορούσε να ερμηνευτεί με έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους μηχανισμούς.

A) LMP1-επαγόμενη συγκράτηση στο κυτταρόπλασμα ή ενισχυμένη πυρηνική έξοδος των Smad πρωτεϊνών. Μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η ενδοκυττάρια κατανομή των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών τροποποιείται από την ογκογονικά ενεργοποιημένη Ras πρωτεΐνη και ο μηχανισμός απενεργοποίησης των Smad περιλαμβάνει φωσφορυλίωσή τους στην περιοχή του συνδέτη (linker) (Kretzschmar et al., 1999). Κατά παρόμοιο τρόπο, οι Smad πρωτεΐνες θα μπορούσαν να φωσφορυλιωθούν από μια LMP1 επαγόμενη κινάση, με αποτέλεσμα την συγκράτησή τους στο κυτταρόπλασμα και την μεταγραφική απενεργοποίηση. Η παρούσα μελέτη δεν υποστηρίζει την υπόθεση της συγκράτησης των Smad στο κυτταρόπλασμα από την LMP1, αν και δεν αποκλείει την φωσφορυλίωσή τους από μια LMP1 επαγόμενη κινάση. Οι αναλύσεις άμεσου και έμμεσου ανοσοφθορισμού με χρήση μικροσκοπίας συνεστίασης έδειξαν ότι η LMP1 δεν επηρεάζει την ενδοκυττάρια κατανομή της Smad3 πρωτεΐνης σε κύτταρα COS-7 (**Εικόνα 32**). Η έκφραση της FLAG-LMP1 παρατηρήθηκε με έμμεση μικροσκοπία χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα για τον επίτοπο FLAG της LMP1 πρωτεΐνης και δευτερεύον αντίσωμα συζευγμένο με Texas Red. Η ανάλυση έδειξε ότι η τόσο η αγρίου τύπου LMP1 όσο και η ελλειμματική LMP1 (1-231) παρουσιάζει στικτώδες και περιπυρηνικό πρότυπο έκφρασης. Ο στικτώδης εντοπισμός της LMP1 στους ινοβλάστες συμφωνεί με τον καταγεγραμμένο εντοπισμό της LMP1 στην πλασματική μεμβράνη (Wang et al., 1985, Martin et al., 1991). Ο περιπυρηνικός εντοπισμός της LMP1 έχει επίσης παρατηρηθεί σε προηγούμενες αναλύσεις (Martin et al., 1991). Αυτό το πρότυπο εντοπισμού της LMP1 συμφωνεί με την έκφραση της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο και πιθανότατα οφείλεται στην ικανότητά της να εισαγάζεται μετα-μεταφραστικά σε ενδοκυττάρια μεμβράνες, εκτός της πλασματικής

μεμβράνης. Ο ρόλος της LMP1 που εντοπίζεται στις ενδοκυττάρειες μεμβράνες και η συνεισφορά της στην καταστολή της σηματοδότησης από τον TGFβ είναι άγνωστος.

Η έκφραση της Smad3 πρωτεΐνης στο συγκεκριμένο πείραμα ανιχνεύθηκε από τον φθορισμό που εκπέμπει η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη με την οποία είχε συζευχθεί η Smad3 στο N-τελικό της άκρο. Η υβριδική GFP-Smad3 ήταν συνεχώς εντοπισμένη στον πυρήνα των επιμολυσμένων COS-7 κυττάρων ακόμα και απουσία του συνδέτη TGFβ, πιθανότατα λόγω υπρέκφρασης της πρωτεΐνης (**Εικόνα 32A**). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι η υπερέκφραση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών σε COS-1 ή HepG2 κύτταρα προκαλεί τον αποκλειστικό πυρηνικό εντοπισμό τους και σε TGFβ ανεξάρτητη μεταγραφική ενεργοποίηση υποκινητών στόχων, όπως ο PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) και ο p21/WAF1/Cip1 υποκινητής (Moustakas et al., 1998, Zhang et al., 1997). Στις αναλύσεις συνεπιμόλυνσης κυττάρων, ο πυρηνικός εντοπισμός της GFP-Smad3 δεν επηρεάστηκε από τη συνέκφραση της αγρίου τύπου LMP1 ή της ελλειμματικής LMP1 (1-231) (**Εικόνα 32**). Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, συμπεραίνουμε ότι η δραματική καταστολή της Smad3 μεταγραφικής δραστηριότητας από την LMP1 δεν οφείλεται στην LMP1-επαγόμενη καταστολή της πυρηνικής μετακίνησης της Smad3 ή στην ενίσχυση της εξόδου της Smad3 στο κυτταρόπλασμα.

B) Αυξημένη αποικοδόμιση των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών σε κύτταρα που συνεκφράζουν την LMP1. Οι αναλύσεις ανοσοαποτύπωσης των Smad πρωτεϊνών εκφραζόμενων σε COS-7 κύτταρα τα οποία συνεπιμολύνθηκαν με τους φορείς έκφρασης της LMP1 ή των μεταγωγέων της LMP1 σηματοδότησης TRAF2, NIK και IKKβ, δεν έδειξαν κάποια αλλαγή στην έκφραση των Smad3 και Smad4 σε σχέση με την έκφρασή τους απουσία της LMP1 ή των μεταγωγέων της.

Γ) Καταστολή της Smad μεταγραφικής δραστηριότητας στην περιοχή του πυρήνα. Στην παρούσα διατριβή παρατηρήθηκε ότι η LMP1 καταστέλλει την ικανότητα της υβριδικής GAL4-Smad3 πρωτεΐνης να ενεργοποιεί μεταγραφικά έναν GAL4-εξαρτώμενο υποκινητή (**Εικόνα 31**). Καθώς η ενεργοποίηση αυτού του υποκινητή εξαρτάται αποκλειστικά από την στρατολόγηση της πρωτεΐνης Smad3 στο DNA μέσω της περιοχής πρόσδεσης στο DNA του GAL4 και καθώς η GAL4-Smad3 εντοπίζεται στον πυρήνα τόσο απουσία όσο και παρουσία του TGFβ, είναι μάλλον απίθανο η LMP1 να

καταστέλλει την μεταγραφική ενεργότητα της Smad3 πρωτεΐνης παρεμποδίζοντας την πρόσδεσή της στο DNA.

Εχοντας αποκλείσει τους παραπάνω μηχανισμούς, θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα, η παρατηρούμενη καταστολή να οφείλεται σε άμεσες, φυσικές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης Smad3 με τις υπομονάδες p50 και p65 του NF-κB. Πράγματι, με αναλύσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων *in vitro* βρήκαμε ότι η Smad3 πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά φυσικά με την περιοχή RHD (Rel Homology Domain) που υπάρχει και στις δυο υπομονάδες (**Εικόνα 35**). Τα αποτελέσματά μας είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που είχαν δείξει άμεση φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση της ομόλογης της p50 υπομονάδας, p52, με την Smad3 που οδηγεί στην συνεργασιακή μεταγραφική ενεργοποίηση του TGFβ επαγόμενου Jun B υποκινητή μέσω μιας θέσης πρόσδεσης του NF-κB που περιέχει αυτός ο υποκινητής (Lopez-Rovira et al., 2000).

Τέλος, ο ανταγωνισμός μεταξύ των πρωτεϊνών Smad3 και NF-κB για κοινούς συνενεργοποιητές όπως ο p300, θα μπορούσε να αποτελεί την αιτία της καταστολής της μεταγραφικής δραστηριότητας της Smad3 από την LMP1. Προηγούμενες αναλύσεις έχουν δείξει ότι ο συνενεργοποιητής p300 είναι σημαντικός για την λειτουργία των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα και ότι αλληλεπιδρά φυσικά με τις Smad2 και Smad3 (Janknecht et al., 1998, Feng et al., 1998). Επίσης, ο p300 είναι εξίσου σημαντικός για την μεταγραφική δραστηριότητα του NF-κB μέσω άμεσης φυσικής αλληλεπίδρασης με την C-τερματική περιοχή μεταγραφικής δραστηριότητας της υπομονάδας p65/RelA (Sheppard et al., 1999, Gerritsen et al., 1997). Επομένως, η ενεργοποίηση p65/RelA από την LMP1 μπορεί να προσελκύει και να αφαιρεί μόρια p300 από την πυρηνική δεξαμενή και έτσι να αποτρέπει την Smad επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση υποκινητών που αποτελούνται μόνο από Smad-αποκρινόμενα στοιχεία. Τα αποτελέσματα της **Εικόνας 33Γ** δείχνουν ότι η εξωγενής αύξηση της συγκέντρωσης του συνενεργοποιητή p300 αναστέλλει την κατασταλτική δράση της LMP1 στην Smad επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του συνθετικού υποκινητή (CAGA)₁₂ και επομένως συμφωνούν με το παραπάνω μοντέλο.

ΟΙ SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΩΣ ΣΥΝΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΕΣ ΤΟΥ HNF4

Περιοχές των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών που απαιτούνται για την φυσική και λειτουργική αλληλεπίδραση με τον HNF4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4)

Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, έχουν δείξει ότι ο TGFβ και οι επαγωγείς του, Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες, ενεργοποιούν μεταγραφικά τον υποκινητή του γονιδίου της απολιποπρωτεΐνης C-III (apoC-III) του ανθρώπου, μέσω ενός μηχανισμού που βασίζεται σε συνεργασιακή αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τον ορφανό πυρηνικό υποδοχέα HNF4 (Kardassis et al., 2000). Τμήμα της παρούσας διατριβής, σε συνδυασμό με παράλληλες μελέτες του εργαστηρίου μας, αφορούσε στον χαρακτηρισμό των περιοχών των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών που εμπλέκονται στις φυσικές αλληλεπιδράσεις με τον HNF-4 και στην αποσαφήνιση του μηχανισμού λειτουργικής συνεργασίας μεταξύ των Smad και τον HNF4 στην ρύθμιση ηπατικών γονιδίων.

Οι παράλληλες αναλύσεις του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι οι Smad3 και Smad4 αλλά όχι η Smad2 αλληλεπιδρούν φυσικά με τον HNF4 που εκφράζεται ενδογενώς στα κύτταρα HepG2 (Chou et al, 2003). Οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad3 και Smad4 και του HNF4 εξαλείφθηκαν με την απαλοιφή της MH1 περιοχής, αλλά δεν επηρεάστηκαν από την απαλοιφή της MH2 περιοχής της Smad3 (Chou et al, 2003). Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η MH1 περιοχή των Smad πρωτεϊνών είναι σημαντική για την φυσική και λειτουργική τους αλληλεπίδραση με τον HNF4. Ο ρόλος της MH1 περιοχής των Smad πρωτεϊνών στην μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων και στις αλληλεπιδράσεις τους με πρωτεΐνες άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών έχει μελετηθεί στο παρελθόν (Moustakas et al., 2001). Είναι γνωστό ότι η MH1 περιοχή αλληλεπιδρά με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως είναι τα μέλη της AP-1 οικογένειας, (ATF-2, c-Jun, Jun B και Jun-D), ο ευρέως εκφραζόμενος μεταγραφικός παράγοντας Sp1, ο πυρηνικός υποδοχέας της βιταμίνης D (VitDR), και ο πυρηνικός παράγοντας YY1, μεταξύ άλλων (Moustakas et al., 2001). Επιπλέον, η MH1 περιοχή

αλληλεπιδρά με τους συν-καταστολείς της μεταγραφής HDAC και Hoxc-8 και με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες φιλαμίνη και μμπορτίνη β1 (Moustakas et al., 2001). Επομένως, η MH1 περιοχή των Smad πρωτεϊνών φαίνεται ότι προάγει τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες με ποικίλους φυσιολογικούς ρόλους.

Εκτός των προαναφερθέντων ρυθμιστικών λειτουργιών, η MH1 περιοχή επάγει την άμεση πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών στο DNA. Η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της MH1 περιοχής της Smad3 πρωτεΐνης, με κρυσταλλογραφία ακτίνων x, παρουσία του ρυθμιστικού στοιχείου DNA στο οποίο προσδένονται οι Smad πρωτεΐνες (Smad Binding Element, SBE), αποκάλυψε τον σχηματισμό μιας δομής β-φουρκέτας στην αμινοξική περιοχή 70-82 (Shi, 2001). Η ανάλυση αυτής της δομής έδειξε ότι τα αμινοξέα R74, Q76 και K81 της Smad3, έρχονται σε άμεση επαφή με το DNA (Shi, 2001). Μεταλλάξεις στα αμινοξέα αυτά, εξαλείφουν την πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών στα SBEs και κατ'έπекταση την μεταγραφική ενεργοποίηση Smad-αποκρινόμενων υποκινητών σε αναλύσεις παροδικών επιμολύνσεων κυττάρων (Moren et al., 2000).

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι μεταλλάξεις αμινοξέων στη δομή β-φουρκέτας της Smad3 πρωτεΐνης δεν επηρέασαν τις φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad πρωτεϊνών και του HNF4, ούτε την Smad-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή (**Εικόνα 37**). Οι μεταλλάξεις της Smad3 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη (R74K/K81R), ήταν αρκετά συντηρητικές (αργινίνη σε λυσίνη ή το αντίστροφο) και είχαν σχεδιαστεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να μην καταστρέφουν την δομή β-φουρκέτας (Moren et al., 2000), γεγονός που επιβεβαιώθηκε με αναλύσεις της τρισδιάστατης δομής της MH1 περιοχής της Smad3 με την βοήθεια υπολογιστή (Μουστάκας, προσωπική επικοινωνία). Οι αμινοξικές αντικαταστάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ανέστειλαν μόνο την επαφή των Smad πρωτεϊνών με το DNA όπως δείχθηκε από την ανικανότητα των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών να ενεργοποιούν μεταγραφικά τον (CAGA)₁₂ υποκινητή ο οποίος απαιτεί άμεση πρόσδεση των Smad στο DNA (**Εικόνα 37**). Επιπλέον, η αντικατάσταση της αργινίνης με λυσίνη και της λυσίνης με αργινίνη δεν αλλάζει το συνολικό αμινοξικό φορτίο της δομής β-φουρκέτας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ευνοούν ένα μοντέλο σύμφωνα με το οποίο οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad και HNF4 σε υποκινητές γονιδίων στόχων μπορούν να συμβούν ακόμα και απουσία άμεσης πρόσδεσης των Smad στο DNA. Το

μοντέλο αυτής της αλληλεπίδρασης βρίσκει εφαρμογή στον apoC-III υποκινητή αλλά και στους υποκινητές apoB και apoA-IV που επίσης ενεργοποιήθηκαν μεταγραφικά από τις Smad3/Smad4 και HNF4 σε παράλληλες μελέτες του εργαστηρίου μας (Chou et al, 2003). Ωστόσο, δεν θα μπορούσε να αποκλειστεί η πιθανότητα οι Smad πρωτεΐνες να αναγνωρίζουν, έστω και με μικρή συνάφεια, SBEs που είναι πιθανό να υπάρχουν κοντά στα HREs (Hormone Response Elements) των προαναφερθέντων υποκινητών. Η πιθανότητα αυτή, όμως, δεν υποστηρίζεται από προηγούμενες παρατηρήσεις μας, σύμφωνα με τις οποίες η συνεργασιακή μεταγραφική δράση των Smad3/Smad4 και HNF4 διατηρήθηκε όταν τα HREs των apoC-III, apoA-I και apoC-II υποκινητών μεταφέρθηκαν σε έναν ετερόλογο υποκινητή, και συγκεκριμένα στον ελάχιστο υποκινητή ενός όψιμου γονιδίου της αδενοϊού (Kardassis et al., 2000; Chou et al, 2003). Επίσης, η πιθανότητα αυτή δεν υποστηρίζεται από μελέτες ηλεκτροφορητικής κινητικότητας συμπλόκων, που έδειξαν ότι η Smad3 πρωτεΐνη δεν προσδένεται άμεσα σε ολιγονουκλεοτίδια που καλύπτουν την περιοχή -90/-9 του apoC-III υποκινητή (Kardassis D. αδημοσίευτα αποτελέσματα)..

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της **Εικόνας 36**, η Smad2 πρωτεΐνη δεν αλληλεπιδρά με τον HNF4. Οι Smad2, Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία στην MH1 περιοχή τους (>90% αμινοξική ομοιότητα). Η μόνη διαφορά έγκειται στην παρουσία δύο επιπρόσθετων αμινοξικών αλληλουχιών στην MH1 περιοχή της Smad2, οι οποίες απουσιάζουν από τις Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες (Dennler et al., 1999, Yagi et al., 1999). Σε αντίθεση με τις Smad3 και Smad4, η Smad2 δεν προσδένεται άμεσα στο DNA, πιθανότατα λόγω της απουσίας δομής β-φουρκέτας στην MH1 περιοχή της. Επιπλέον, βρέθηκε ότι μια μορφή της Smad2, από την οποία απουσιάζει το εξόνιο 3 λόγω εναλλακτικού ματίσματος και η οποία αναγνωρίστηκε πρόσφατα σε διάφορους τύπους κυττάρων, προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί μεταγραφικά TGFβ-αποκρινόμενους υποκινητές, το ίδιο αποτελεσματικά με την Smad3 (Yagi et al., 1999). Οι πληροφορίες αυτές ενισχύουν την υπόθεση ότι ο σχηματισμός της δομής β-φουρκέτας στην MH1 περιοχή των Smad πρωτεϊνών είναι σημαντικός για τη μεταγραφική ενεργότητα αυτών των πρωτεϊνών και για τις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες.

Η περιοχή AF-1, η περιοχή C πρόσδεσης στο DNA και η καρβοξυ-τερματική περιοχή F του HNF4 συνεισφέρουν στις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad3 και HNF4 πρωτεϊνών

Η διαθεσιμότητα μιας μεγάλης σειράς μεταλλαγμένων μορφών του παράγοντα HNF4 μας επέτρεψε να χαρτογραφήσουμε τις περιοχές του HNF4 που εμπλέκονται σε φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις με την Smad3 πρωτεΐνη. Παράλληλες μελέτες του εργαστηρίου μας αποκάλυψαν ότι δύο περιοχές του HNF4 αλληλεπιδρούν φυσικά με την Smad3, η N-τερματική περιοχή που εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 1-128 και περιλαμβάνει τις περιοχές A/B, C και D, και η C-τερματική περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 388-455 και περιλαμβάνει την περιοχή F. Αντιθέτως, η κεντρική αμινοξική περιοχή 174-370 του HNF4, που περιλαμβάνει την περιοχή E, δεν αλληλεπιδρά με την Smad3 πρωτεΐνη *in vitro* (Chou et al, 2003).

Οι υβριδικές μεταλλαγμένες GAL4-HNF4 πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* αναλύσεις πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (Chou et al, 2003), χρησιμοποιήθηκαν και στις αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή. Όπως δείχνει η **Εικόνα 38**, οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες δρουν ως συνενεργοποιητές της μεταγραφικής δραστηριότητας του HNF4, και η περιοχή AF-1 (αμινοξέα 1-24) είναι σημαντική για την λειτουργική συνεργασία του HNF4 με τις Smads. Η περιοχή AF-1 (Activation Function-1) είναι γνωστό ότι χαρακτηρίζεται από ισχυρή μεταγραφική δραστηριότητα που δεν εξαρτάται από κάποιο συνδέτη (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Επίσης, είναι γνωστό ότι η περιοχή αυτή προσδένει παράγοντες της βασικής μεταγραφικής μηχανής όπως ο TF-IIB, καθώς και τον ευρέως εκφραζόμενο συνενεργοποιητή CBP (cAMP response element-binding protein) (Dell & Hadzopoulou-Cladaras, 1999, Kistanova et al., 2001). Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων, η AF-1 περιοχή φαίνεται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δραστηριότητας του HNF4 στον πυρήνα. Ο μηχανισμός συνενεργοποίησης του HNF4 από τις Smads, μέσω της AF-1 περιοχής, δεν είναι γνωστός. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η CBP πρωτεΐνη, εκτός από συνενεργοποιητής του HNF4

μέσω της AF-1 περιοχής, αποτελεί συνενεργοποιητή της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών (Feng et al., 1998, Janknecht et al., 1998, Rouponnot et al., 1998). Η αλληλεπίδραση των Smads με την περιοχή AF-1 του HNF4 θα μπορούσε να ενισχύσει την στρατολόγηση του CBP ή άλλων συνενεργοποιητών σε αυτήν την περιοχή του HNF4, αλλά η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Οι Smads δεν συνενεργοποίησαν μεταγραφικά την υβριδική GAL4-HNF4 (174-370) πρωτεΐνη που περιέχει την περιοχή E του HNF4, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 38**. Η περιοχή E των πυρηνικών υποδοχέων περιέχει την υπο-περιοχή AF-2 (Activation Function-2), που απαιτείται για την προσέλκυση συγκεκριμένων συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων όπως οι συνενεργοποιητές της οικογένειας p160, ο CBP/p300 κ.α. (Moras & Gronemeyer, 1998). Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι Smads δεν είναι συνενεργοποιητές του HNF-4 μέσω της AF-2 περιοχής. Οι Smad πρωτεΐνες στερούνται του μοτίβου LXXLL (όπου L αντιπροσωπεύει την λευκίνη και X οποιοδήποτε αμινοξύ), το οποίο είναι ένα χαρακτηριστικό μοτίβο των συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων και απαιτείται για την πρόσδεση στην περιοχή AF-2 (Moras & Gronemeyer, 1998). Ωστόσο, οι Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες συνενεργοποίησαν την GAL4-HNF4 (49-455), η οποία στερείται της AF-1 περιοχής, ενώ η απαλοιφή της γειτονικής περιοχής πρόσδεσης στο DNA (περιοχή C) εξουδετέρωσε την συνεργασιακή δράση των Smad πρωτεϊνών με τον HNF-4. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι και η περιοχή πρόσδεσης στο DNA παίζει σημαντικό ρόλο στην συνεργασία μεταξύ των πρωτεϊνών Smad και HNF4. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η περιοχή πρόσδεσης στο DNA του παράγοντα HNF4 ακετυλιώνεται από τον συνενεργοποιητή CBP σε συγκεκριμένες λυσίνες, και ότι η ακετυλίωση αυτή επηρεάζει σημαντικές λειτουργίες του HNF4, όπως η πρόσδεση στο DNA, ο πυρηνικός εντοπισμός και η αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές (Soutoglou et al., 2000). Επομένως, η πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών στο DBD (DNA Binding Domain) του παράγοντα HNF4 και/ή στην γειτονική περιοχή AF-1 θα μπορούσε να ενθαρρύνει την στρατολόγηση του CBP στην DBD περιοχή του HNF4, με αποτέλεσμα την ακετυλίωση αυτής της περιοχής.

Ο ρόλος της C-τερματικής περιοχής F (αμινοξέα 388-455) του παράγοντα HNF4 στις λειτουργικές αλληλεπιδράσεις του HNF4 με την Smad3 πρωτεΐνη

Παράλληλες αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι η περιοχή F του παράγοντα HNF4 (αμινοξέα 388-455) χαρακτηρίζεται από ικανότητα άμεσης αλληλεπίδρασης με τις Smad πρωτεΐνες *in vitro* (Chou et al, 2003). Η περιοχή F είναι παρούσα σε όλους τους πυρηνικούς υποδοχείς αλλά είναι ασυνήθιστα μεγάλη στον παράγοντα HNF4 και έχει δειχθεί ότι αποτελεί αρνητική ρυθμιστική περιοχή που εμποδίζει την πρόσδεση συνενεργοποιητών όπως είναι οι GRIP-1 και SRC-1 (Sladek et al., 1999). Η απαλοιφή της περιοχής F αύξησε την HNF4-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του apoC-III υποκινητή σε κύτταρα HepG2 (Hadzopoulou-Cladaras et al., 1997). Ο ρόλος αυτής της περιοχής στην συνεργασιακή δράση των Smad/HNF4 και σε άλλες λειτουργίες του HNF4 παραμένει ασαφής. Είναι πιθανόν η περιοχή F να λειτουργεί ως περιοχή πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων, όπως είναι οι Smads που ρυθμίζουν την λειτουργία του HNF4 μέσω προσέλευσης συνενεργοποιητών ως απόκριση σε εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια σήματα. Επομένως, αυτή η περιοχή θα μπορούσε να καταστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4 απουσία σήματος, αλλά θα μπορούσε να επάγει αυτή τη δραστηριότητα υπό συγκεκριμένες συνθήκες ενεργοποίησης. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του HNF4 μπορεί να προκύπτει από την αλληλεπίδραση των Smads με συνενεργοποιητές που προσδένονται στην γειτονική AF-2 περιοχή του HNF4.

Επίδραση συνενεργοποιητών στη μεταγραφική ενεργότητα του HNF4 και στην λειτουργική αλληλεπίδραση του με τις Smads.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι η μεταγραφική δραστηριότητα του HNF4 ενισχύεται από την συνέκφραση των συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων Src-1a, RAC3 και κυρίως του PGC1. Με χρήση των υβριδικών ελλειμματικών GAL4-HNF4 (1-49) GAL4-HNF4 (49-455) πρωτεϊνών δείξαμε ότι ο

συνενεργοποιητής Src-1a ενισχύει την δραστικότητα της AF-1 περιοχής ενώ ο συνενεργοποιητής PGC1 ενισχύει την δραστικότητα της AF-2 περιοχής του HNF4 (Εικόνα 42). Η συγκριτική μελέτη της δράσης των Smad3/Smad4 και PGC1 πρωτεϊνών ως συνενεργοποιητών της μεταγραφικής ενεργότητας του HNF4 έδειξε ότι οι Smad3/Smad4 ενισχύουν την μεταγραφική δραστικότητα της AF-1 περιοχής και επιβεβαίωσε την ενισχυτική δράση του PGC1 στην δραστικότητα της AF-2 περιοχής (Εικόνα 43). Η ταυτόχρονη συνέκφραση των Smad3/Smad4 και του συνενεργοποιητή Src-1a αύξησε συνεργιστικά τη μεταγραφική δραστικότητα της AF-2 περιοχής του HNF4, ενισχύοντας το μοντέλο που προαναφέρθηκε, σύμφωνα με το οποίο, η πρόσδεση των Smad3/Smad4 πρωτεϊνών στην περιοχή F επιτρέπει την προσέλκυση συνενεργοποιητών των πυρηνικών υποδοχέων που ενισχύουν τη δραστικότητα της AF-2 περιοχής.

Τέλος, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων Src-1a, RAC3, TIF2 και PGC1 ενισχύουν την μεταγραφική δραστικότητα του TGFβ στον συνθετικό υποκινητή (CAGA)₁₂ ο οποίος αποτελείται από 12 θέσεις πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι ο εν λόγω υποκινητής ενεργοποιείται αποκλειστικά από τις Smad πρωτεΐνες ως απόκριση στον TGFβ, το παραπάνω εύρημα προτείνει ότι οι Smad πρωτεΐνες και οι πυρηνικοί υποδοχείς χρησιμοποιούν κοινούς συνενεργοποιητές. Δεν έχει ακόμη αναφερθεί στην βιβλιογραφία άμεση φυσική αλληλεπίδραση των Smad πρωτεϊνών με τους συνενεργοποιητές των πυρηνικών υποδοχέων. Σε συμφωνία όμως με την παραπάνω υπόθεση είναι το εύρημα ότι η πρωτεΐνη Smad3 έχει εντοπιστεί σε ένα πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιλαμβάνει επίσης τον υποδοχέα της βιταμίνης D (VitDR) και τον συνενεργοποιητή Src-1 (Yanagi et al, 1999; Yanagisawa et al, 1999). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν την πιθανή συνομιλία και αλληλεπίδραση του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού με τους πυρηνικούς υποδοχείς.

Οι επιπτώσεις της αλληλεπίδρασης των Smad και HNF4 πρωτεϊνών στην ηπατική γονιδιακή έκφραση

Οι φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των HNF4 και Smad3 πρωτεϊνών στα ηπατικά κύτταρα που καταγράφονται στην παρούσα μελέτη, ενδεχομένως να έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην έκφραση διαφόρων ηπατικών γονιδίων που ρυθμίζονται από τον υποδοχέα HNF-4. Οι παράλληλες μελέτες του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι οι Smad3/Smad4 πρωτεΐνες ενεργοποίησαν μεταγραφικά έκτός από τον apoC-III υποκινητή και τους apoB και apoA-IV υποκινητές που ρυθμίζονται από τον HNF4 (Chou et al, 2003). Σε όλους αυτούς τους υποκινητές, παρατηρήθηκε συνεργασιακή δράση των HNF4 και Smad πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η αλληλεπίδραση των HNF4 και Smad δεν περιορίζεται στον apoC-III υποκινητή αλλά έχει ευρύτερες επιπτώσεις στην ηπατική γονιδιακή έκφραση. Ωστόσο, αυτή η συνεργιστική δράση δεν παρατηρήθηκε στην ενεργοποίηση των apoA-I και apoA-II υποκινητών (Ladias et al., 1992, Tzamelis & Zannis, 1996, Chou et al, 2003). Επιπλέον, οι Smad πρωτεΐνες δεν ενεργοποίησαν συνεργασιακά με τον HNF4 έναν συνθετικό υποκινητή που αποτελείται από 3 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης του HNF4 που προέρχονται από τον apoA-II υποκινητή, αλλά ενεργοποίησαν συνεργασιακά συνθετικούς υποκινητές που αποτελούνται από θέσεις πρόσδεσης του HNF4 που προέρχονται από τους apoC-III και apoA-I υποκινητές (Kardassis et al., 2000). Συνεπώς, το είδος του υποκινητή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγραφική συνεργασία μεταξύ των HNF4 και Smad πρωτεϊνών. Είναι πιθανόν, παράγοντες που προσδένονται σε στοιχεία γειτονικά των θέσεων πρόσδεσης του HNF4 να επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των HNF4 και Smad πρωτεϊνών. Εναλλακτικά, η πρόσδεση του HNF4 σε διάφορα HREs μπορεί να αλλάζει την διαμόρφωση του μορίου με αποτέλεσμα την έκθεση ή την απόκρυψη επιφανειών που αλληλεπιδρούν με τις Smads όπως η AF-1 περιοχή, η περιοχή πρόσδεσης στο DNA και η περιοχή F του HNF4. Η αποσαφήνιση της τρισδιάστατης δομής του HNF4 αναμένεται να αποκαλύψει να σημαντικές και καινούργιες λειτουργίες του παράγοντα αυτού.

ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΕΩΣ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ SMAD3 ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Περιοχές της Smad3 πρωτεΐνης που ευθύνονται για την μεταγραφική της δραστηριότητα

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια εκτεταμένη δομική-λειτουργική ανάλυση της Smad3 πρωτεΐνης, ενός από τους σημαντικότερους μεταγωγείς των σηματοδοτικών μονοπατιών του TGFβ και της ακτιβίνης. Σκοπός αυτών των αναλύσεων ήταν η αποσαφήνιση των περιοχών της Smad3 που απαιτούνται για τη μεταγραφική της δραστηριότητα. Η Smad3 ανήκει στις R-Smads (Receptor regulated Smads) και επάγει την TGFβ σηματοδότηση μέσω του σχηματισμού ομοπολυμερών και ετεροπολυμερών με την Smad4 πρωτεΐνη. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα στην συνέχεια μεταβαίνουν στον πυρήνα, προσδένονται σε SBEs (Smad Binding Elements) υποκινητών των γονιδίων στόχων και ενεργοποιούν τη μεταγραφή συνεργασιακά με άλλους πυρηνικούς συν-παράγοντες (co-factors) που σταθεροποιούν την αλληλεπίδραση των Smad με το DNA και προσφέρουν ποικιλότητα στην επιλογή γονιδίων στόχων (Derynck & Zhang, 2003, Shi & Massague, 2003, Moustakas et al., 2001, ten Dijke et al., 2000, Massague & Wotton, 2000). Η συνεργασία με συνενεργοποιητές είναι, επίσης, σημαντική για την Smad-επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποκάλυψαν σημαντικά στοιχεία σχετικά με την ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητας της Smad3. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι η MH2 περιοχή χαρακτηρίζεται από ενδογενή μεταγραφική δραστηριότητα και αλληλεπιδρά με πυρηνικούς συνενεργοποιητές (Feng et al., 1998, Rouponnot et al., 1998, Janknecht et al., 1998, Shen et al., 1998, de Caestecker et al., 2000, Itoh et al., 2000). Η δομή της περιοχής MH2 της Smad3 πρωτεΐνης, όπως προβλέπεται με χρήση υπολογιστικού προγράμματος, φαίνεται στην **Εικόνα 80Α**. Η παρούσα διατριβή έδειξε ότι η Smad3 έχει μια δεύτερη αυτόνομη περιοχή μεταγραφικής δραστηριότητας που εντοπίζεται στο κεντρικό τμήμα της πρωτεΐνης και συγκεκριμένα στην αμινοξική περιοχή 143-248. Αυτή η μεταγραφικά ενεργή περιοχή χαρακτηρίστηκε περαιτέρω με αναλύσεις μεταγραφικής δραστηριότητας όπου χρησιμοποιήθηκαν

διαδοχικές απαλοιφές της πρωτεΐνης. Έτσι, δείχθηκε ότι N-τερματικές ή C-τερματικές απαλοιφές της περιοχής 143-248, καθώς και εσωτερικές απαλοιφές των αμινοξικών περιοχών 200-230 και 230-248 στα πλαίσια της πλήρους μήκους Smad3, εξαλείφουν τη μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας τη σημασία αυτής της περιοχής για την μεταγραφή. Η σημαντική, για την μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 πρωτεΐνης, περιοχή 228-249 φαίνεται στην **Εικόνα 80B**.

Φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις της μεταγραφικά ενεργής περιοχής 143-248 της Smad3 με συνενεργοποιητές

Η μεταγραφική δραστηριότητα της κεντρικής περιοχής 143-248 της Smad3 θα μπορούσε να αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, στην αλληλεπίδραση αυτής της περιοχής με πυρηνικούς συνενεργοποιητές, όπως οι ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών CBP/p300 και p/CAF. Είναι πιθανό, η περιοχή αυτή να παίζει ρόλο αντίστοιχο με εκείνον της περιοχής SAD (Smad Activation Domain) της Smad4 πρωτεΐνης. Η SAD είναι μια περιοχή 48 αμινοξέων, πλούσια σε προλίνες, που εντοπίζεται στην ευρύτερη περιοχή του linker της Smad4 και έχειδειχθεί ότι είναι ικανή και αναγκαία για τη μεταγραφική ενεργότητα της πρωτεΐνης στο σύστημα GAL4 (de Caestecker et al., 2000). Η μεταγραφική δραστηριότητα της SAD θα μπορούσε να αποδοθεί, τουλάχιστον εν μέρει, στις φυσικές και λειτουργικές αλληλεπιδράσεις της με τον συνενεργοποιητή p300 (de Caestecker et al., 2000). Στην παρούσα διατριβή δείξαμε ότι η περιοχή 200-248 είναι η ελάχιστη περιοχή της Smad3 που αλληλεπιδρά φυσικά και λειτουργικά με την ομόλογη του p300, CBP πρωτεΐνη (CREB Binding Protein). Η σύγκριση της αμινοξικής αλληλουχίας μεταξύ της περιοχής 200-230 της Smad3 και της SAD περιοχής της Smad4 (**Εικόνα 52**) αποκάλυψε την παρουσία πολλών συντηρημένων προλινών (αμινοξικές θέσεις 201, 208, 213, 222 και 228) καθώς και άλλων αμινοξέων που θα μπορούσαν να είναι σημαντικά για τη μεταγραφική δραστηριότητα των περιοχών αυτών, αλλά η υπόθεση αυτή χρήζει περαιτέρω διερεύνησης με χρήση σημειακά μεταλλαγμένων μορφών αυτών των περιοχών.

Η περιοχή 143-248 της ανθρώπινης Smad3 είναι μεταγραφικά δραστική σε κύτταρα σακχαρομύκητα

Στην παρούσα διατριβή δείξαμε ότι η περιοχή 143-248 της ανθρώπινης Smad3 είναι μεταγραφικά δραστική σε κύτταρα σακχαρομύκητα (**Εικόνα 51**). Η εξαιρετικά υψηλή μεταγραφική δραστηριότητα της μεταλλαγμένης Smad3 143-248 στα κύτταρα του *S. cerevisiae* θα μπορούσε να αποδοθεί σε αλληλεπίδραση αυτής της πρωτεΐνης με την ομόλογη του p/CAF στον σακχαρομύκητα, GCN5 πρωτεΐνη (Sternglanz & Schindelin, 1999). Εάν η υπόθεση αυτή είναι σωστή, η παρατηρούμενη μεταγραφική δραστηριότητα της Smad3 αναμένεται να καταστέλλεται σε στελέχη σακχαρομύκητα στα οποία το ενδογενές *gcn5* γονίδιο έχει απενεργοποιηθεί. Δεδομένου ότι ένας σημαντικός αριθμός ρυθμιστικών της μεταγραφής πρωτεϊνών του σακχαρομύκητα, όπως συνενεργοποιητές, ακετυλοτρανσφεράσες ιστονών (GCN5), και ένζυμα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης, είναι ομόλογες με αντίστοιχες πρωτεΐνες κυττάρων θηλαστικών (Berk, 1999, Kurdistani & Grunstein, 2003, Rachez & Freedman, 2001), το σύστημα του σακχαρομύκητα θα μπορούσε να αποδειχθεί ένα ιδιαίτερα χρήσιμο εργαλείο στην αναγνώριση παραγόντων που συμμετέχουν σε εξελικτικά συντηρημένους μηχανισμούς Smad-επαγόμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης.

Η χρήση του συστήματος της *in vivo* βιοτινυλίωσης στην μελέτη των φυσικών αλληλεπιδράσεων της Smad3 πρωτεΐνης

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας το σύστημα ανάλυσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που βασίζεται στην *in vivo* βιοτινυλίωση (de Boer et al., 2003), επαναλάβαμε τις καταγεγραμμένες, εξαρτώμενες από τον συνδέτη, ομοπολυμερικές και ετεροπολυμερικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Smad πρωτεϊνών και αναλύσαμε την επίδραση μεταλλάξεων σε αυτές τις αλληλεπιδράσεις. Το σύστημα αυτό είναι πολύ πιο ειδικό και ευαίσθητο από το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα συνκατακρήμνισης (co-immunoprecipitation), λόγω της εξαιρετικά υψηλής συνάφειας και ειδικότητας της αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη. Η χρήση αντισωμάτων ελέγχου δεν

ανίχνευσε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις στο σύστημα αυτό. Επιπλέον, η πρόσδεση των ενδογενώς βιοτινυλιωμένων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια αγαρόζης στρεπταβιδίνης που είναι ανιχνεύσιμες στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης, δεν παρεμβαίνει στην πρόσδεση των Smad πρωτεϊνών καθώς και των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτές στα σφαιρίδια στρεπταβιδίνης σεφαρόζης.

Το προαναφερθέν σύστημα χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό δύο μεταλλαγμένων μορφών της Smad3 που φέρουν εσωτερική απαλοιφή των περιοχών 200-230 και 228-249 (Smad3 Δ200-230, Smad3 Δ228-249), ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με τις αγρίου τύπου Smad3, Smad4 πρωτεΐνες με τον συνενεργοποιητή p/CAF και τον συνκαταστολέα c-Ski. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι η απαλοιφή της περιοχής 228-249, που αποτελεί τμήμα της δομής β-sandwich της MH2 περιοχής, αναστέλλει τις Smad3/Smad3 και Smad3/Smad4 αλληλεπιδράσεις. Επομένως, η περιοχή 228-249 φαίνεται ότι είναι αναγκαία για τον ολιγομερισμό της Smad3 πρωτεΐνης, ο οποίος σηματοδοτείται από την φωσφορυλίωση της Smad3 από τον συνδέτη TGFβ και αποτελεί τη βάση του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού. Συνεπώς, η έλλειψη μεταγραφικής δραστηριότητας που χαρακτηρίζει την Smad3 Δ228-249 πιθανότητα οφείλεται στην έλλειψη ικανότητας ολιγομερισμού αυτής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης. Η σημασία των αλληλεπιδράσεων των Smad πρωτεϊνών για την TGFβ σηματοδότηση πιστοποιείται από την απενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού σε καρκινοπαθείς με μεταλλάξεις που αναστέλλουν τον ολιγομερισμό της Smad4 πρωτεΐνης (Wu et al., 2000). Η πλειοψηφία των ογκογόνων μεταλλάξεων του Smad4 γονιδίου εντοπίζονται στις επιφάνειες επαφής των MH2 υπομονάδων (Shi et al., 1997, Hata et al., 1997, Hata et al., 1998).

Χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα δείξαμε επίσης ότι η περιοχή 143-248 της Smad3 αλληλεπιδρά με την ακετυλοτρανσφεράση ιστονών p/CAF, ενώ η εσωτερική απαλοιφή τμήματος αυτής της περιοχής από την πλήρους μήκους Smad3 (Smad3 Δ200-230), παρά το γεγονός ότι αφήνει άθικτη την MH2 περιοχή, αναστέλλει την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τον συνενεργοποιητή p/CAF (**Εικόνα 69B**). Σε αυτή την αναστολή οφείλεται, πιθανότατα, η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα που παρουσιάζει η μεταλλαγμένη Smad3 Δ200-230. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι αντιδιαστέλλονται με προηγούμενες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες η μεταλλαγμένη

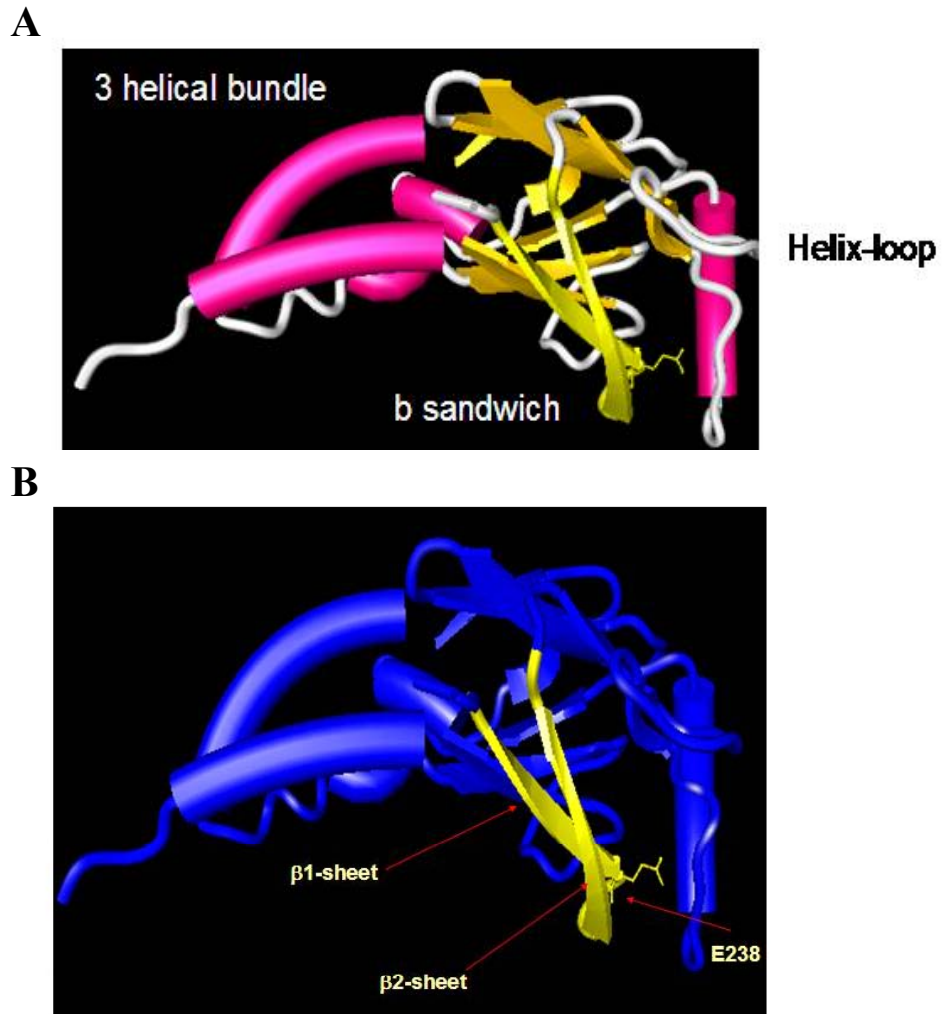
Smad3 που στερείται της MH2 περιοχής (Smad3 ΔMH2) δεν αλληλεπιδρά με τον p/CAF (Itoh et al., 2001). Ωστόσο, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα η περιοχή 200-230, εκτός από την λειτουργία της ως δευτερεύουσα θέση πρόσδεσης του p/CAF, να σταθεροποιεί την MH2 δομή και να επάγει κάποιες από τις λειτουργίες της, όπως η αλληλεπίδραση με τον συγκεκριμένο συνενεργοποιητή. Η συνεισφορά της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών Smad3 και p/CAF στις Smad-επαγόμενες μεταγραφικές αποκρίσεις *in vivo*, χρήζει αποσαφήνισης με πειράματα γονιδιακής καταστολής (gene knock out).

Για να εξηγήσουμε την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας των Smad3 πρωτεϊνών που περιέχουν της εσπτερικές απαλοιφές Δ200-230 και Δ228-249, διερευνήσαμε πιθανές φυσικές αλληλεπιδράσεις των μεταλλαγμένων αυτών πρωτεϊνών με τον συνκαταστολέα c-ski. Προηγούμενες μελέτες είχαν δείξει ότι το προϊόν του πρωτο-ογκογονιδίου c-ski καταστέλλει την μεταγραφική δραστηριότητα των Smad πρωτεϊνών με το να προσδέεται άμεσα σε αυτές και να στρατολογεί συνκαταστολείς/απακετυλάσες ιστονών στους υποκινητές γονιδίων στόχων του TGFβ (Luo et al., 1999). Η υπόθεσή μας ήταν ότι οι μεταλλαγμένες Smad πρωτεΐνες είναι πιθανόν να συνδέονται πιο ισχυρά και ίσως μη αντιστρεπτά με τον συνκαταστολέα c-ski. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απαλοιφή των δύο πρώτων β πτυχωτών επιφανειών της MH2 περιοχής της Smad3 (Δ228-249) εξουδετέρωσε την αλληλεπίδραση της Smad3 με τον συνκαταστολέα c-Ski. Αντιθέτως, η απαλοιφή της αμινοξικής περιοχής 200-230 δεν επηρέασε αλλά ούτε και ενίσχυσε τις αλληλεπιδράσεις της Smad3 με τον συνκαταστολέα c-Ski. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μείωση της μεταγραφικής ενεργότητας των μεταλλαγμένων μορφών Smad3 Δ228-249 και Δ200-230 δεν οφείλεται σε μεταβολές της ικανότητας των μορφών αυτών με το προϊόν του ογκογονιδίου c-ski, αλλά πιθανότατα οφείλεται σε μεταβολές στον ολιγομερισμό και στην αλληλεπίδραση με συνενεργοποιητές.

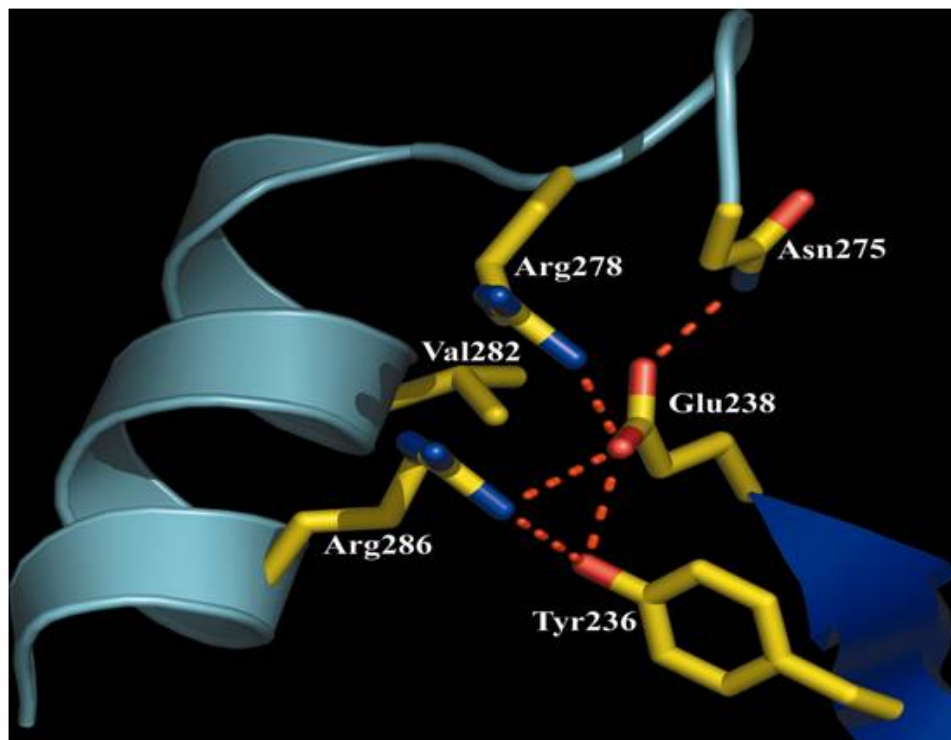
Η σημειοκά μεταλλαγμένη Smad3 E238A στερείται μεταγραφικής δραστηριότητας, ικανότητας ολιγομερισμού και αλληλεπίδρασης με τον συνενεργοποιητή p/CAF

Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής 230-248 του N-τελικού άκρου της MH2 περιοχής εμφανίζεται συντηρημένη μεταξύ όλων των Smad πρωτεϊνών (**Εικόνα 52**), η περιοχή αυτή πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στην ικανότητα ολιγομερισμού και άλλων R-Smads (Smad1, Smad2) όπως και της Smad4. Ωστόσο, αυτή η υπόθεση θα πρέπει να διερευνηθεί με μεταλλαξιγένεση των αντίστοιχων αμινοξέων των άλλων Smads. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η σημειοκά αντικατάσταση ενός αμινοξέος στην β1 πτυχωτή επιφάνεια της Smad4 (E330A) συσχετίζεται με καρκινογένεση (Hata et al., 1998). Το συγκεκριμένο αμινοξύ είναι συντηρημένο στις R-Smads, όπως η Smad1, η Smad2 και η Smad3 (**Εικόνα 52**). Δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί εάν η συγκεκριμένη μετάλλαξη στην Smad4 πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την απώλεια της TGFβ σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα. Στην παρούσα διατριβή δείξαμε ότι η αντίστοιχη σημειοκά μετάλλαξη στην Smad3 πρωτεΐνη (Smad3 E238A) καταστέλλει την μεταγραφική της δραστηριότητα, καθώς και την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με τις αγρίου τύπου Smad3 και Smad4 και με τον συνενεργοποιητή p/CAF. Η θέση του E238 στην MH2 περιοχή της Smad3 δείχνεται στην **Εικόνα 81**. Το γλουταμινικό οξύ της αμινοξικής θέσης 238 της Smad3 προβλέπεται, με την βοήθεια υπολογιστή, να αλληλεπιδρά τόσο με την γειτονική τυροσίνη (αμινοξύ 236), όσο και με την αργινίνη (278), και την αργινίνη (286) της γειτονικής α-έλικας, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 81**. Τα αποτελέσματα αυτά πιστοποιούν τον σημαντικό ρόλο του N-τελικού άκρου της MH2 περιοχής της Smad3 στην μεταγραφική ενεργότητα αυτής της πρωτεΐνης και προτείνουν έναν πιθανό μηχανισμό απώλειας της μεταγραφικής δραστηριότητας της Smad4 και κατά συνέπεια και της TGFβ σηματοδότησης σε ασθενείς με καρκίνο που φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Δομή της MH2 περιοχής της Smad3



Εικόνα 80. Υπολογιστικό μοντέλο της δομής της MH2 περιοχής της Smad3 πρωτεΐνης. **A.** Οι α -έλικες απεικονίζονται με ροζ χρώμα, οι θηλιές (loops) με άσπρο χρώμα και οι β -πτυχωτές επιφάνειες με κίτρινο χρώμα. **B.** Με κόκκινα βέλη υποδεικνύονται οι πτυχωτές επιφάνειες $\beta 1$ και $\beta 2$ που περικλύονται στην αμινοξική περιοχή 228-249 της Smad3 πρωτεΐνης. Επίσης, με κόκκινο βέλος υποδεικνύεται η θέση της σημειακής μετάλλαξης E238A.



Εικόνα 81. Αλληλεπίδραση του γλουταμινικού οξέος 238 με άλλα αμινοξέα της MH2 περιοχής της Smad3 πρωτεΐνη. Με την βοήθεια υπολογιστή διαμορφώθηκε το εικονιζόμενο μοντέλο που προβλέπει την θέση και τυχούσες αλληλεπιδράσεις του αμινοξέως Glu238 της β2 πτυχωτής επιφάνειας της Smad πρωτεΐνης με την γειτονική Tyr236, την Asn275 της L2 θηλιάς, καθώς και τις Arg278 και Arg286 της α-έλικας 1 (H1).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- Abdollah, S., Macías-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L. and Wrana, J. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 27678-27685.
- Abraham D.J., X. Shiwen, C.M. Black, S. Sa, Y. Xu, and A. Leask, *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, No. 20, 15220-15225.
- Akiyoshi S., Inoue H., Hanai J., Kusanagi K., Nemoto N., Miyazono K., and Kawabata M., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol.: 274, 35269-35277.
- Alliston, T., Choy, L., Ducy, P., Karsenty, G. and Derynck, R., *EMBO J.* 2001, 20: 2254-2272.
- Arora, K. & Warrior, R., *Dev. Cell*, 2001, 1: 441–442.
- Arvanitakis L., N.Yaseen, and S. Sharma, *J. Immunol.*, 1995, 155(3), 1047-1056.
- Afrakhte M., Moren A., Jossan S., Itoh S., Sampath K., Westermarck B., Heldin C. H., Heldin N. E., & ten Dijke P., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 249: 505-511.
- Bai, S., Shi, X., Yang, X. and Cao, X., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 8267-8270.
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L. & Arteaga, C. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 36803–36810.
- Bakin, A. V., Rinehart, C., Tomlinson, A. K. & Arteaga, C. L., *J. Cell Sci.*, 2002, 115: 3193–3206.
- Bandyopadhyay, A. *et al.*, *Cancer Res.*, 1999, 59: 5041–5046.
- Bandyopadhyay, A. *et al.*, *Oncogene*, 2002, 21: 3541–3551.
- Bannister A.J., and Kouzarides T., *Nature*, 1996, 384:641-643.
- Barbara, N. P., Wrana, J. L. & Letarte, M., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 584–594
- Berk A. J., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1999, 11: 330-335
- Bhowmick, N. A. *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12: 27–36.
- Bitzer M., von Gersdorff G., Liang D., Dominguez-Rosales A., Beg A.A., Rojkind M., and Bottinger E.P., *Genes and Development*, 2000, 14(2): 187-197.

- Blain, S. W., Montalvo, E. & Massague, J., *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272: 25863–25872.
- Blanco J.C., Minucci S., Lu J., Yang X.-J., Walker K.K. Chen H., Evans R.M., Nakatani Y., & Ozato K., *Genes and Development*, 1998, 12: 1638-1651.
- Blobe, G. C., Liu, X., Fang, S. J., How, T. and Lodish, H. F. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 39608-39617.
- Bonni, S., Wang, H. R., Causing, C. G., Kavsak, P., Stroschein, S. L., Luo K. and Wrana, J. L. *Nat. Cell. Biol.*, 2001, 3: 587-595.
- Brabletz, T. *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 1993, 13: 1155–1162.
- Brodin G., Ahgren A., ten Dijke P., Heldin C. H. & Heuchel R., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 29023–29030.
- Brown, J. D., DiChiara, M. R., Anderson, K. R., Gimbrone Jr, M. A. and Topper J. N. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 8797-8805.
- Chacko, B. M., Qin, B., Correia, J. J., Lam, S. S., de Caestecker, M. P. and Lin K., *Nat. Struct. Biol.* 2001, 8: 248-253.
- Chen H., Lin R.J., Schiltz R.L., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky M. L., Nakatani Y., & Evans R. M., *Cell*, 1997, 90: 569-580.
- Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L. & Reiss, M., *Cancer Res.*, 1998, 58: 4805–4810
- Chen H., Lin R.J., Schiltz R.L., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky M. L., Nakatani Y., & Evans R. M., *Cell*, 1997, 90: 569-580.
- Chen Y-G., Hata A., Lo R.S., Wotton D., Shi Y., Pavletich N., and Massague J., *Genes and Development*, 1998, 12: 2144-2152.
- Chen, C. R., Kang, Y. & Massagué, J., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 992–999.
- Chen, C. R., Kang, Y., Siegel, P. M. & Massagué, J., *Cell*, 2002, 110: 19–32.
- Choy, L. & Derynck, R., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 31455–31462.
- Choy, L. & Derynck, R., *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 9609–9619.
- Chipuk, J.E., Cornelius, S.C., Pultz, N.J., Jorgensen, J.S., Bonham, M.J., and Kim, S.J., and Danielpour, D. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 1240–1248.
- Comijn, J. *et al.*, *Mol. Cell*, 2001, 7: 1267–1278.

- Correia, J. J., Chacko, B. M., Lam, S. S. and Lin, K. *Biochem.* 2001, 40: 1473-1482.
- Cui, W. et al., *Genes Dev.*, 1995, 9: 945–955.
- Cui, W. et al., *Cell*, 1996, 86: 531–542.
- Currie R.A., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 1430–1434.
- Datta, P. K. & Moses, H. L., *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 3157–3167.
- Datto, M. B. et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1995, 92:5545–5549.
- de Boer, E., Rodriguez, P., Bonte, E., Krijgsveld, J., Katsantoni, E., Heck, A., Grosveld, F., & Strouboulis, J., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 7480–7485.
- de Caestecker, M. P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W. T., Huang, S., Hill, C. S., Shioda, T., Roberts, A. B. and Lechleider, R. J., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000b, 275: 2115-2122.
- Dell, H., and Hadzopoulou-Cladaras, M. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 9013–9021.
- Dennler S., Huet S., & Gauthier J.M., *Oncogene*, 1999, 18: 1643-1648.
- Derynck, R. & Feng, X.-H., *Biochim. Biophys. Acta*, 1997, 1333: F105–F150.
- Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A., *Nature Genet.*, 2001, 29: 117–129.
- Derynck, R. & Zhang Y, E., *Nature Rev. Articles.*, 2003, 425: 557–584.
- Devergne O., E. Hatzivassiliou, K.M. Izumi, K.M. Kaye, M.F.Kleijnen, E.D. Kieff, and G. Mosialos, *Mol. Cell. Biol.*, 1996, 16: 7098-7108
- Devergne O., E.C. McFarland, G.Mosialos, K.M. Izumi, C.F. Ware, and E.D. Kieff, *Journal of Virology*, 1998, 72, 7900-7908.
- de Winter, J.P., Roelen, B.A., ten Dijke, P., van der Burg, B., & van den Eijnden-van Raaij, A.J., *Oncogene*, 1997, 14: 1891-1899.
- Dickson, M. C. et al., *Development*, 1995, 121: 1845–1854.
- Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F. & Wrana, J. L., *Nature Cell Biol.*, 2003, 5: 410–421.
- Dong C., Li Z., Goldschmidt-Clermont P.J., *Mol. Cell*, 2000, 5: 27-34.

- Dong, Y., Tang, L., Letterio, J. J. & Benveniste, E. N., *J. Immunol.*, 2001, 167: 311–319.
- Doré, J. J., Jr, Yao, D., Edens, M., Garamszegi, N., Sholl, E. L. and Leof, E. B. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12: 675-684.
- Dumont, N. & Arteaga, C. L., *Cancer Cell*, 2003, 3: 531–536.
- Duncan SA, Manova K, Chen WS, Hoodless P, Weinstein DC, Bachvarova RF, & Darnell JE Jr., *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 7598-7602.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T. and Miyazono, K. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276: 12477-12480.
- Edlund, S., Landström, M., Heldin, C. H. & Aspenström, P., *Mol. Biol. Cell*, 2002, 13: 902–914.
- Eliopoulos, A.G., Gallagher, N.J., Blake, S.M., Dawson, C.W., and Young, L.S. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol.: 274: 16085-16096.
- Eliopoulos, A.G., Blake, S.M., Floettmann, J.E., Rowe, M., and Young, L.S., *J. Virol.* 1999, 73: 1023–1035.
- Engel, M. E., Datta, P. K. & Moses, H. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 9921–9926.
- Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K. and Moses, H. L., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 37413-37420.
- Enholm, B. *et al.*, *Oncogene*, 1997, 14: 2475–2483.
- Eppert, K. *et al.*, *Cell*, 1996, 86: 543–552.
- Factor, V. M. *et al.*, *Cancer Res.*, 1997, 57: 2089–2095.
- Feng X.-H., Zhang Y., Wu R.-Y., and Derynck R., *Genes Dev.*, 1998, 12: 2153-2163.
- Feng, X. H., Lin, X. and Derynck, R. *EMBO J.*, 2000, 19: 5178-5193.
- Fennewald S., Van Santen V., and Kieffe., *J. Virology*, 1984, 51, 411-419.
- Floettmann JE, Eliopoulos A. G., Jones M., Young LS, Rowe M., *Oncogene*, 1998, 17: 2383-2392.
- Foletta, V. C. *et al.*, *J. Cell Biol.*, 2003, 162: 1089–1098.

- Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K. and Miyazono, K., *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12: 1431-1443.
- Funaba, M., Zimmerman, C. M. & Mathews, L. S., *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 41361–41368.
- Furuhashi, M., Yagi, K., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Shimada, S., Nakamura, Y., Kikuchi, A., Miyazono, K. and Kato, M., *Mol. Cell. Biol.*, 2001, 21: 5132-5141.
- Furuta, K. *et al.*, *Int. J Cancer*, 1999, 81: 851–853.
- Gartel A.L. & Tyner A.L., *Exp.Cell Res.*, 1999, 246:280-289.
- Geissmann, F. *et al.*, *J. Immunol.*, 1999, 162: 4567–4575.
- Georgopoulos, S., Kan, H.-Y., Reardon-Alulis, C., and Zannis, V., *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28: 4919-4929.
- Gerritsen M.E., Williams A.J., Neish A.S., Moore S., Shi Y., Collins T., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1997, 94 (7): 2927-2932.
- Gilboa, L. *et al.*, *Mol. Biol. Cell*, 2000, 11: 1023–1035.
- Gires O, Kohlhuber F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C., Zeidler D., Scheffer B., Ueffing M. and Hammerschmidt W., *EMBO J.*, 1999, Vol.18, No. 11: 3064-3073.
- Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. *Genes Dev.*, 2000, 14: 121–141.
- Goggins, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 1998, 58: 5329–5332.
- Gorelik, L. & Flavell, R. A., *Nature Med.*, 2001, 7: 1118–1122.
- Gorelik, L. & Flavell, R. A., *Nature Rev. Immunol.*, 2002, 2: 46–53.
- Goumans, M. J. *et al.*, *EMBO J.*, 2002, 21: 1743–1753.
- Grishin, N. V., *J. Mol. Biol.*, 2001, 307: 31-37.
- Griswold-Prenner, I., Kamibayashi, C., Maruoka, E. M., Mumby, M. C. & Derynck, R., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18: 6595–6604.
- Gu W., and Roeder R.G., *Cell*, 1997, 90:595-606.
- Hahn, S.A. *et al.*, *Science*, 1996, 271: 350–353.
- Hannon, G. J. & Beach, D., *Nature*, 1994, 371: 257–261.

- Hanyu, A. et al., *J. Cell Biol.*, 2001, 155: 1017–1027.
- Harris, B. Z. and Lim, W. A. *J. Cell Sci.*, 2001, 114: 3219-3231.
- Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Lagna, G. and Massagué, J., *Nature*, 1997, 388: 82-87.
- Hata, A., Shi Y., & Massagué J., *Molecular Medicin Today*, 1998, 257-262.
- Hayes, S.A., Zarnegar, M., Sharma, M., Yang, F., Peehl, D.M., ten Dijke, P., and Sun, Z. *Cancer Res.*, 2001, 61: 2112–2118.
- Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J., *Mol. Cell. Biol.*, 2001, 21: 1393–1403.
- He Z., Xin B., Yang X., Chan C.-P., & Cao L., *Cancer Res.*, 2000, 60: 1845-1848.
- Heery D.M., Kalkhoven E., Hoare S., & Parker M.G., *Nature*, 1997, 387: 733-736.
- Heinzel T., Lavinsky R. M., Mullen T. M., Soderstrom M., Laherty C.D., Torchia J., Yang W. M., Brard G., Ngo S.D., Davie J. R., *Nature*, 1997, 387: 43-48.
- Hertz R, Magenheim J, Berman I, Bar TJ., *Nature*, 1998, 392: 512-516.
- Hill-Kapturczak, N., Truong, L., Thamilselvan, V., Visner, G. A. and Nick, H. S. (*The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 40904-40909.
- Hocevar, B. A., Smine, A., Xu, X. X. and Howe, P. H., *EMBO J.*, 2001, 20: 2789-2801.
- Hoodless, P. A., Tsukazaki, T., Nishimatsu, S., Attisano, L., Wrana, J. L. and Thomsen, G. H., *Dev. Biol.*, 1999, 207:364-379.
- Horlein A.J., Naar A. M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C.K., & Rosenfeld M., *Nature*, 1995, 377: 397-404.
- Howell, M., Itoh, F., Pierreux, C. E., Valgeirsdóttir, S., Itoh, S., ten Dijke, P., and Hill, C. S., *Dev. Biol.*, 1999, 214: 354-369.
- Huse, M., Chen, Y.-G., Massague', J. & Kuriyan, J., *Cell*, 1999, 96: 425–436.
- Huse, M. et al., *Mol. Cell*, 2001, 8: 671–682.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K., *Nature*, 1997, 389: 622-626.
- Inman G.J., and M.J. Allday, *J. Gen. Virol.*, 2000, 81, 1567-1578.

- Inman, G. J., Nicolas, F. J. & Hill, C. S., *Mol. Cell*, 2002, 10: 283–294.
- Inman, G. J. & Hill, C. S., *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 51008–51016.
- Inman, G. J. *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2002, 62: 65–74.
- Itoh, S., Landström, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C.-H., Heldin, N.-E., and ten Dijke, P. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273: 29195-29201.
- Itoh, S., Ericsson, J., Nishikawa, J.-I., Heldin, C.-H. and ten Dijke, P., *Nucl. Acid. Res.*, 2000a, 28: 4291-4298.
- Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M. J. and ten Dijke, P. *Eur.J. Biochem.*, 2000b, 267: 6954-6967.
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C.-H., ten Dijke, P. and Itoh, S., *EMBO J.* 2001, 20: 4132-4142.
- Izumi K.M., Kaye K.M., and Kieff ED., *J. Virology*, 1994, 68, 4369-4376.
- Izumi K.M., K.M. Kaye, and E.D. Kieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:1447-1452.
- Izumi K.M., and E.D. Kieff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94:12592-12597.
- Izumi K.M., Cahir McFarland ED., Ting AT, Riley EA., Seed B., and Kieff ED., *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19, 5759-5767.
- Izumi K.M., E.C.McFarland, E.A. Riley, D Rizzo, Y. Chen, and E.D. Kieff, *Journal of Virology*, 1999, 9908-9916.
- Izumoto, S. *et al.*, *Cancer Lett.*, 1997, 112: 251–256.
- Janknecht R., Wells N.-J., and Hunter T., *Genes Dev.*, 1998, 12: 2114-2119.
- Jang, C. W. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2002, 4: 51–58.
- Jayaraman, L. and Massagué, J., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 40710-40717.
- Jepsen K., Hermanson O., Onami T.M., Gleiberman A.S., Lunyak V., McEvilly R.J., Kurokawa R., Kumar V., Liu F., Seto E., *et al.*, *Cell*, 2000, 102: 753-763.

- Kan, H. Y., Georgopoulos, S., and Zannis, V., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 30423-31.
- Kang, Y., Chen, C.-R. & Massagué, J., *Mol. Cell*, 2003, 11: 915–926.
- Kang, Y. *et al.*, *Cancer Cell*, 2003, 3: 537–549.
- Kardassis, D., Tzamelis, I., Hadzopoulou-Cladaras, M., Talianidis, I., and Zannis, V. I. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.*, 1997, 17: 222-232.
- Kardassis, D., Pardali, K. and Zannis, V. I. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 41405–41414.
- Kardassis, D., Falvey, E., Tsantili, P., Hadzopoulou-Cladaras M., and Zannis V. I., *Biochemistry*, 2002, 41: 1217-1228.
- Katzenellenbogen B.S., Montano M.M., Ediger T.R., Sun J., Ekena K., Lazennec G., Martini P.G., McInerney E. M., Delage-Mourroux R., Weis K., Katzenellenbogen J.A., *Recent Prog. Horm. Res.*, 2000, 55: 163-193.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L., *Mol. Cell*, 2000, 6: 1365-1375.
- Kawabata M., Inoue H., Hanyu A., Imamura T., Miyazono K., *EMBO J.*, 1998, 17: 4056-4065.
- Kaye, K.M., K.M. Izumi, H. Li, E. Johannsen, D. Davidson, R. Longnecker, and E.D. Kieff, *Journal of Virology*, 1999, 10525-10530.
- Kieser, A., Kaiser, C., and Hammerschmidt, W., *EMBO J.*, 1999, 18: 2511–2521.
- Kim, S.K. *et al.*, *Cancer Res.*, 1996, 56: 2519–2521.
- Kistanova, E., Dell, H., Tsantili, P., Falvey, E., Cladaras, C., and Hadzopoulou-Cladaras, M., *Biochem. J.*, 2001, 356: 635–642.
- Kon A., Vindevoghel L., Kouba D.J., Fujimura Y., Vitto J., & Mauviel A., *Oncogene*, 1999, 18: 1837-1844.
- Korzus E., Torchia J., Rose D.W., Xu L., Kurokawa R., McInerney E.M., Mullen T.-M., Glass C.K., & Rosenfeld M.G., *Science*, 1998, 279: 703-707.
- Kretschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. and Massagué, J., *Genes Dev.*, 1999, 13: 804-816.

- Ktistaki, E., Lacorte, J.-M., Katrakili, N., Zannis, V. I., and Talianidis, I., *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22: 4689-4696.
- Kuo M.H., Brownell J.E., Sobel R.E., Ranalli T.A., Cook R.G., Edmondson D.G., Roth S.Y., and Allis C.D., *Nature*, 1996, 383: 269-272.
- Kurdistani S.K., & Grunstein M., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, 4: 276-284.
- Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.-H. and Moustakas, A., *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12: 1079-1091.
- Kusanagi, K., Kawabata, M., Mishima, H. K. and Miyazono, K., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 28155-28163.
- Labbé, E., Silvestri, C., Hoodless, P. A., Wrana, J. L. and Attisano, L., *Mol. Cell*, 1998, 2: 109-120.
- Ladas J. A. A., Hadzopoulou-Cladaras M., Kardassis D., Cardot P., Cheng j., Zannis V. I., & Cladaras C., *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 15849-15860.
- Lai, Y. T. et al., *Dev. Biol.*, 2000, 222: 1–11.
- Laiho, M., DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Livingston, D. M. & Massagué, J., *Cell*, 1990, 62: 175–185.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A. and Massagué, J., *Nature*, 1996, 383: 832-836.
- Laping, N. J. et al., *Mol. Pharmacol.*, 2002, 62: 58–64.
- Larisch, S. et al., *Nature Cell Biol.*, 2000, 2: 915–921.
- Larsson, J. et al., *EMBO J.*, 2001, 20: 1663–1673.
- Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. & Iavarone, A., *Nature*, 2000, 407: 592–598.
- Lavrentiadou, S. N., Hadzopoulou-Cladaras, M., Kardassis, D., and Zannis, V. I. *Biochemistry*, 1998, 38: 964-975.
- Lee I., Kim M.K., Choi E.Y., Mehl A., Jung K.C., Gil M.C., Rowe M. & Park S. H., *Blood*, 2001, 97: 3596-3604.
- Lei, J. et al., *Oncogene*, 1996, 13: 2459–2462.
- Li, J., Lee, G. I., Van Doren, S. R. and Walker, J. C., *J. Cell Sci.*, 2000, 113: 4143-4149.

- Li, J., Ning, G., and Duncan, S.A. *Genes Dev.*, 2000, 14: 464–474.
- Liberati N.T., Datto M.B., Frederick J.P., Shen X., Wong C., Rougier-Chapman E.M., and Wang X-F., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1999, Vol. 96, 4844-4849.
- Liberati, N. T., Moniwa, M., Borton, A. J., Davie, J. R. & Wang, X.-F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 22595–22603.
- Liberati, N. T., Moniwa, M., Borton, A. J., Davie, J. R. and Wang, X. F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 22595-22603.
- Lin, X., Liang, M. and Feng, X. H., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 36818-36822.
- Liu, D., Black, B. L. & Derynck, R., *Genes Dev.*, 2001, 15: 2950–2966.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J. C., Doody, J., Cárcamo, J., Harland, R. M. and Massagué, J., *Nature*, 1996, 381: 620-623.
- Liu F., Pouponnot C., and Massague J., *Genes and Development*, 1997, 11: 3157-3167.
- Liu, X., Elia, A. E., Law, S. F., Golemis, E. A., Farley, J. and Wang, T., *EMBO J.*, 2000, 19: 6759-6769.
- Liu X., Sun Y., Weinberg R.A., Lodish H.-F., *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2001, 12: 1-8.
- Liu, X. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 9139–9144.
- Lo R.S., Chen Y-G, Shi Y., Pavletich N.P., Massague J., *EMBO J.*, 1998, 17: 996-1005.
- Lo R.S., Massague J., *Nat. Cell Biol.*, 1999, 1: 472-478.
- Lopez-Rovira T., E. Chalaux, J.L. Rosa, R. Bartrons, and F. Ventura, *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, No. 37, 28937-28946.
- Lowet J.-F., Hayhurst G., Gonzalez G.J., Girard J., Decaux J.-F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 37991–38000.
- Luo K., Stroschein S.L., Wang W., Chen D., Martens E., Zhou S., Zhou Q., *Genes Dev.*, 1999, 13:2196-2206.
- Macías-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L. and Wrana, J. L., *Cell*, 1996, 87: 1215-1224.

- MacEarland E.D.C., Kenneth M. Izumi and G. Mosialos, *Oncogene*, 1999, 18, 6959-6964
- MacGrogan, D., Pegram, M., Slamon, D. and Bookstein, R., *Oncogene*, 1997, 15: 1111–1114.
- Maniatis T., 1997, *Science*, 278, 818-819.
- Markowitz, S. *et al.*, *Science*, 1995, 268: 1336–1338.
- Martin J., & Sugden B., *J. Virol.*, 1991, 65: 3246-3258.
- Martinez-Balbas M. A., Bannister A.J., Martin K., Haus-Seuffert P., Meisterernst M., and Kouzarides T., *EMBO J.*, 1998, Vol.17, No.10, pp. 2886-2893.
- Massague J., *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67: 753-791.
- Massague J., *Nature Cell Biology*, 1999, Vol.:1, E117-E119.
- Massague J., and Wotton D., *EMBO J.*, 2000, Vol.:19, 1745-1754.
- Massagué, J., Blain, S. W. and Lo, R. S., *Cell*, 2000, 103: 295-309.
- Massague', J., *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2000, 1:169–178.
- Masuyama, N., Hanafusa, H., Kusakabe, M., Shibuya, H. and Nishida, E., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 12163-12170.
- Matsuda, T., Yamamoto, T., Muraguchi, A., and Saatcioglu, F. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 42908–42914.
- McKay L. I., Cidlowski J. A., *Endocrine Reviews*, 1999, 20: 435-459.
- McKenna N. J., & O'Malley B. W., *Cell*, 2002, 108: 465-474.
- McMahon C., Suthiphongchai T., DiRenzo J., & Ewen M.E., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1999, Vol. 96, 5382-5387.
- McGonigle, S., Beall, M. J., Feeney, E. L. and Pearce, E. J., *FEBS Lett.*, 2001, 490: 65-69.
- McGonigle, S., Beall, M. J. & Pearce, E. J., *Biochemistry*, 2002, 41: 579–587.
- Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R., *J. Cell Biol.*, 1994, 127: 2021–2036.
- Mitchell T. & Sugden B., *J. Virol.*, 1995, 69: 2968-2976.

Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J. I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J. L., Miyazono, K. and Sugamura, K., *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 9346-9355.

Miyazono K., Suzuki H., and Imamura T., *Cancer Sci.*, 2003, Vo. 94, No.3, 230-234.

Mizuide M., Hara T., Furuya T., Takeda M., Kusanagi K., Inada Y., Mori M., Imamura T., Miyazawa K., Miyazono K., *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, Vol.: 278: 531-536.

Moras, D., and Gronemeyer, H., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10: 384–391.

Morén, A., Itoh, S., Moustakas, A., ten Dijke, P. and Heldin, C.-H., *Oncogene*, 2000, 19: 4396-4404.

Mori N., Morishita M., Tsukazaki T., Yamamoto N., *Int. J. Cancer*, 2003, 105: 661-668.

Mosialos G., M.Birkenbach, Ryalamanchili, T.Van Arsdale, C.Ware, and D.E. Kieff, *Cell*, 1995, Vol.80, 389-399.

Mosialos G., *seminars in CANCER BIOLOGY*, Vol. 8, 1997, 121-129.

Moustakas A., and Kardassis D., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, Vol. 95, 6733-6738.

Moustakas, A., Souchelnytskyi, S. & Heldin, C.-H. J., *Cell Sci.*, 2001, 114: 4359–4369.

Moustakas A., & Heldin C.-H., *Genes Dev.*, 2002, 16: 1867-1871.

Muraoka, R. S. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2002, 109: 1551–1559.

Myeroff, L. L. *et al.*, *Cancer Res.*, 1995, 55: 5545–5547.

Nagarajan R.P., Chen F., Li W., Vig E., Harrington M.A., Nakshatri H., Chen Y., *Biochem J.*, 2000, 15;348, 591-596.

Nagy L., Kao H. Y., Chakravarti D., Lin R.J., Hassig C.A., Ayer D.E., Schreiber S.L., & Evans R.M., *Cell*, 1997, 89: 373-380.

Nakao A., Afrakhte M., Moren A., Nakayama T., Christian J.L., Heuchel R., Itoh S., Kawabata M., Heldin N.E., Heldin C.H., & ten Dijke P., *Nature*, 1997, 389: 631-635.

Nicol R., Stavnezer E., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, Vol.: 273: 3588-3597.

Nishihara A., Hanai J., Imamura T., Miyazono K., and Kawabata M., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol.: 274, No. 40: 28716-28723.

- Norton, J. D., *J. Cell Sci.*, 2000, 113: 3897–3905.
- Oft, M. *et al.*, *Genes Dev.*, 1996, 10: 2462–2477.
- Oft, M., Heider, K. H. & Beug, H., *Curr. Biol.*, 1998, 8: 1243–1252.
- Oh, S. P. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 2626–2631.
- Onate S.A., Tsai S.Y., Tsai M. J., & O'Malley B.W., *Science*, 1995, 270: 1354-1357.
- Panopoulou E., Gillooly D.J., Wrana J.L., Zerial M., Stenmark H., Murphy C. and Fotsis T., *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 18046-18052.
- Papazafiri P., Ogami, K., Ramji, D. P., Nicosia, A., Monaci, P., Cladaras, C., and Zannis, V. I., *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266: 5790-5797.
- Pardali, K., Kurisaki, A., Morén, A., ten Dijke, P., Kardassis, D. and Moustakas, A., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 29244-29256.
- Parks, W. T., Frank, D. B., Huff, C., Renfrew Haft, C., Martin, J., Meng, X., de Caestecker, M. P., McNally, J. G., Reddi, A., Taylor, S. I., Roberts, A. B., Wang, T. and Lechleider, R. J., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 19332-19339.
- Pierreux, C. E., Nicolas, F. J. and Hill, C. S., *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 9041-9054.
- Penheiter S.G., Mitcell H., Garamszegi N., Edens M., Dore J.J.E., and Leof E.B., *Molecular and Cellular Biology*, 2002, 22: 4750-4759.
- Perlman, R., Schiemann, W. P., Brooks, M. W., Lodish, H. F. & Weinberg, R. A., *Nature Cell Biol.*, 2001, 3: 708–714.
- Pertovaara, L. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269: 6271–6274.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A. & Oft, M., *Genes Dev.*, 2000, 14: 3093–3101.
- Pessah, M. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277: 29094–29100.
- Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H. & ten Dijke, P., *J. Cell Sci.*, 1999, 112: 4557–4568.
- Pouponnot C., Jayaraman L., and Massague J., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, Vol.: 273, 22865-22868.
- Προκόβα Β., Μ.Δ.Ε., 2000.

- Pulaski, L., Landström, M., Heldin, C.-H. and Souchelnytskyi, S., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 14344-14349.
- Qin B.Y., Lam S.S., Correia J.J., Lin K., *Genes Dev.*, 2002, 16:1950-1963.
- Rachez C., & Freedman L.P., *Curr. Opin., Cell Biol.*, 2001, 13: 274-280.
- Razani, B., Zhang, X. L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Böttinger, E. P. and Lisanti, M. P., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 6727-6738.
- Reguly T. and Wrana J.L., *Trends in Cell Biology*, 2003, Vo.13, No.5: 216-220.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A. & Massagué, J., *Genes Dev.*, 1995, 9: 1831–1845.
- Roberts, A. B. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 4167–4171.
- Rogatsky I., Zarembek K.A., & Yamamoto K.R., *EMBO J.*, 2001, 20: 6071-6083.
- Shao, D., and Lazar, M.A., *J. Clin. Invest.*, 1999, 103: 1617–1618.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K. and Watanabe, K., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 17871-17877.
- Schiemann, W. P., Pfeifer, W. M., Levi, E., Kadin, M. E. & Lodish, H. F., *Blood*, 1999, 94: 2854–2861.
- Schuster, N. & Kriegstein, K., *Cell Tissue Res.*, 2002, 307: 1–14.
- Schutte, M. *et al.*, *Cancer Res.*, 1996, 56: 2527–2530.
- Seoane, J. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2001, 3:400–408.
- Seoane, J., Le, H. V. & Massagué, J., *Nature*, 2002, 419: 729–734.
- Sheppard K.A., D.W.Rose, Z.K.Haque, R.Kurokawa, E.McInerney, S.Westin, D.Thanos, M.G.Rosenfeld, C.K.Glass, and T.Collins, *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19: 6367-6378.
- Shen X., Hu P.P., Liberati N.T., Datto M.B., Frederick J.P., and Wang X-F., *Molecular Biology of the Cell*, 1998, Vol. 9, 3309-3319.
- Shen, X. *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 15362–15368.
- Shi Y., Hata A., Lo R.S., Massague J., Pavletich N.P., *Nature*, 1997, 388: 87-93.

- Shi, Y. *Bioessays*, 2001, 23: 223-232.
- Shi Y., & Massague J., *Cell*, 2003, 113: 685-700.
- Shimo, T. *et al.*, *Oncology*, 2001, 61: 315–322.
- Shin, I., Bakin, A. V., Rodeck, U., Brunet, A. & Arteaga, C. L., *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12: 3328–3339.
- Shinagawa T., Dong H.D., Xu M., Maekawa T., Ishii S., *EMBO J.*, 2000, 19:2280-2291.
- Shinagawa T., Nomura T., Colmenares C., Ohira M., Nakagawara A., Ishii S., *Oncogene*, 2001, 20:8100-8108.
- Shioda T., Lechleider R.J., Dunwoodie S.L., Li H., Yahata T., de Caestecker M.P., Fenner M.H., Roberts A.B., Isselbacher K.J., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, 95: 9785-9790.
- Shull, M. M. *et al.*, *Nature*, 1992, 359: 693–699.
- Siegel, P. M., Shu, W. & Massague, J., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 278: 35444–35450.
- Siegel, P. M. & Massague, J., *Nature Rev.*, 2003, 3: 807-820.
- Sillett, H. K., Cruickshank, S. M., Southgate, J. & Trejdosiewicz, L. K., *Immunology*, 2001, 102: 310–316.
- Sladek FM, Zhong W, Lai E, Darnell JE Jr., *Genes Dev.*, 1990, 4: 2353-2365.
- Sladek, F.M., *Receptor*, 1993, 3: 223–232.
- Sladek, F.M., Ruse, M.D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S.M., and Stallcup, M.R., *Mol. Cell. Biol.*, 1999, 19: 6509–6522.
- Song, C.Z., Tian, X., and Gelehrter, T.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 11776–11781.
- Soutoglou, E., Katrakili, N., and Talianidis, I., *Mol. Cell*, 2000, 5: 745–751
- Staller, P. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2001, 3: 392–399.
- Stearns, M. E., Garcia, F. U., Fudge, K., Rhim, J. & Wang, *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5: 711–720.
- Sternglanz R., & Schindelin H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 8807–88018.

- Stroschein S.L., Wang W., Zhou S., Zhou Q., Luo K., *Science*, 1999, 286: 771-774.
- Stroschein, S. L., Bonni, S., Wrana, J. L. and Luo, K. *Genes Dev.*, 2001, 15: 2822-2836.
- Sun Y., Liu X., Eaton E.N., Lane W.S., Lodish H.F., Weinberg R.A., *Mol. Cell*, 1999, 4: 499-509.
- Sun Y., Liu X., Ng-Eaton E., Lodish H.-F., Weinberg R.A., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1999, 96: 12442-12447.
- Sylla B.S., S.C. Hung, D.M. Davidson, E. Hatzivassiliou, N.L. Malinin, D. Wallach, T.D. Gilmore, E.D. Kieff, and G. Mosialos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol.: 95, 10106-10111.
- Tachibana, I. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1997, 99: 2365–2374.
- Tada, K., Inoue, H., Ebisawa, T., Makuuchi, M., Kawabata, M., Imamura, T. and Miyazono, K., *Genes Cells*, 1999, 4: 731-741.
- Takagi, Y. *et al.*, *Gastroenterology*, 1996, 111: 1369–1372.
- Takanashi M., J. Li, M. Shirakata, S. Mori, and K. Hirai, *Arch. Virol.*, 1999, 144: 241-257
- Talianidis, I., Tambakaki, A., Toursounova, J., and Zannis, V. I., *Biochemistry*, 1995, 34: 10298-10309.
- Tang, Y. *et al.*, *Science*, 2003, 299: 574–577.
- Tarapore P., Richmond C., Zheng G., Cohen S.B., Kelder B., Kopchick J., Kruse U., Sippel A.E., Colmenanes C., Stavnezer E., *Nucleic. Acids Res.*, 1997, 25: 3895-3903.
- Taraviras S, Monaghan AP, Schutz G, & Kelsey G., *Mech. Dev.*, 1994, 48: 67-79.
- ten Dijke, P., Miyazono, K. and Heldin, C.-H., *Trends. Biol. Sci.*, 2000, 25: 64-70.
- Thiery, J. P., *Nature Rev. Cancer*, 2002, 2: 442–454.
- Ting A.T., F. Pimentel-Muinos, and B. Seed, *EMBO J.*, 1996, 15: 6189-6196.
- Tomita, S. *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 1999, 53: 33–39.
- Torre-Amione, G. *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 1486–1490.
- Tsai, M.J., and O'Malley, B.W., *Annu.Rev. Biochem.*, 1994, 63: 451–486.

- Tsuchida, K., Matsuzaki, T., Yamakawa, N., Liu, Z. and Sugino, H., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2001, 180: 25-31.
- Tsukazaki T., Chiang T.A., Davison A.F., Attisano L., Wrana J.L., *Cell*, 1998, 95: 779-791.
- Turner B.M. and O'Neill L.P., *Semin. Cell Biol.*, 1995, 6: 229-236.
- Tuxhorn, J. A., McAlhany, S. J., Yang, F., Dang, T. D. & Rowley, D., *Cancer Res.*, 2002, 62: 6021–6025.
- Tzamelis, I., and Zannis, V. I., *The Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271: 8402-8415.
- Uchida, K. *et al.*, *Cancer Res.*, 1996, 56: 5583–5585.
- Valderrama-Carvajal, H. *et al.*, *Nature Cell Biol.*, 2002, 4: 963–969.
- Vermeulen L., Wilde G. D., Notebaert S., Berghe W. V., & Haegeman G., *Biochemical Pharmacology*, 2002, 64: 963-970.
- Vinals, F. & Pouysse'gur, J., *Mol. Cell. Biol.*, 2001, 21: 7218–7230.
- Viollet B, Kahn A, & Raymondjean M., *Mol Cell Biol*, 1997, 17: 4208-4219.
- Waite K., & Eng C., *Nature Rev.*, 2003, 4: 763-773.
- Wakefield, L. M. & Roberts, A. B., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002, 12: 22–29.
- Wan, M. *et al.*, *EMBO Rep.*, 2002, 3:171–176.
- Wang, D. *et al.*, *Cancer Res.*, 2000, 60: 4507–4512.
- Wang W., Mariani F.V., Harland R.M., Luo K., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2000, 97: 14393-14399.
- Wang, X. J., Liefer, K. M., Tsai, S., O'Malley, B. W. & Roop, D. R., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, 96: 8483–8488.
- Wang, X. J., *Microsc. Res. Tech.*, 2001, 52: 420–429.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M. and Nishida, E., *EMBO Rep.* 2000, 1: 176-182.
- Watt A. J., Garrison W.D., & Duncan S.A., *Hepatology*, 2003, 1249-1253.

- Wicks, S. J., Lui, S., Abdel-Wahab, N., Mason, R. M. and Chantry, A., *Mol. Cell. Biol.*, 2000, 20: 8103-8111.
- Wong C., Rougier-Chapman E.M., Frederick J.P., Datto M.B., Liberati N.T., Li J-M., and Wang X-F., *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 1821-1830.
- Wotton, D., Lo, R. S., Lee, S. and Massagué, J., *Cell*, 1999, 97: 29-39.
- Wu G., Chen Y.G., Ozdamar B., Gyuricza C. A., Chong P.A., Wrana J.L., Massague J., & Shi Y., *Science*, 2000, 287: 92-97.
- Wu, J. W., Fairman, R., Penry, J. and Shi, Y., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 20688-20694.
- Wu J.W., Krawitz A.R., Chai J., Li W., Zhang F., Luo K., Shi Y., *Cell*, 2002, 111: 357-367.
- Wurthner, J. U., Frank, D. B., Felici, A., Green, H. M., Cao, Z., Schneider, M. D., McNally, J. G., Lechleider, R. J. and Roberts, A. B., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 19495-19502.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I. and Lodish, H. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 7853-7858.
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C. and Lodish, H. F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 39404-39410.
- Xiao Z., et al., *Oncogene*, 2003,22:1057-1069.
- Xiao Z., Brownawell A. M., Macara I.G., Lodish H.F., *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, Vol.: 278, No. 36: 34245-34252.
- Xu, G., Chakraborty, C., & Lala, P.K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, 287: 47-55.
- Xu, L., Chen, Y. G. and Massagué, J., *Nat. Cell. Biol.*, 2000, 2: 559-562.
- Xu, L., Kang, Y., Col, S. & Massagué, J., *Mol. Cell*, 2002, 10:271-282.
- Xu L., Alarcon C., Col S., Massague J., *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, Vol.: 278, No. 43: 42569-42577.
- Xu, J. and Attisano, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97:4820-4825.

- Yakymovych, I., ten Dijke, P., Heldin, C.-H. and Souchelnytskyi, S., *FASEB J.*, 2001, 15: 553-555.
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M. and Miyazono, K., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274: 703-709.
- Yamaguchi, K. et al., *EMBO J.*, 1999, 18: 179-187.
- Yanagi Y., Suzawa M., Kawabata M., Miyazono K., Yanagisawa J., and Kato S., *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, Vol.: 274, No. 19, 12971-12974.
- Yanagisawa J., Yanagi Y., Masuhiro Y., Suzawa M., Watanabe M., Kashiwagi K., Toriyabe T., Kawabata M., Miyazono K., and Kato S., *Science*, 1999, Vol.:283, 1317-1321.
- Yang X.-T., Ogryzko V.V., Nishikawa J., Howard B., and Nakatani Y., *Nature*, 1996, 382:319-324.
- Yang, Y. A. et al., *J. Clin. Invest.*, 2002, 109: 1607-1615.
- Yao, D., Dore', J. J. Jr & Leof, E. B., *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 13149-13154.
- Jiang G, Nepomuceno L, Yang Q, Sladek FM., *Arch Biochem Biophys*, 1997, 340:1-9.
- Yin, J. J., et al., *J. Clin. Invest.*, 1999, 103: 197-206.
- Yoon J. C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn C.R., Granner D.K., Newgard C. B., & Spiegelman B. M., *Nature*, 2001, 413: 131-138.
- Yu, L., Hebert, M. C. & Zhang, Y. E., *EMBO J.*, 2002, 21: 3749-3759.
- Yue, J. & Mulder, K. M., *Methods Mol. Biol.*, 2000, 142: 125-131.
- Zannis, V.I., Kan, H.Y., Kritis, A., Zanni, E.E., and Kardassis, D., *Curr. Opin. Lipidol.*, 2001, 12: 181-207.
- Zhang Y., Musci T., & Derynck R., *Curr. Biol.*, 1997, 7: 270-276.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D. J., Hemmati-Brivanlou, A. and Derynck, R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 974-979.
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J. L. and Thomsen, G. H., *Nature*, 1999, 400: 687-693.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ