

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Διδακτορική Διατριβή

**«Μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων των μικρών Rho
GTPασών RhoA και RhoB σε βλαστικά κύτταρα : ο ρόλος του
Μετασχηματίζοντα Αυξητικού Παράγοντα β (TGFβ)»**

Ειρήνη Νομικού

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Χ. ΣΤΟΥΡΝΑΡΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Χρήστος Στουρνάρας, Ομότιμος Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτρης Καρδάσης, Καθηγητής Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Γεώργιος Σουρβίνος, Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ανδρονίκη Κρετσόβαλη, Ερευνήτρια IMBB, ΙΤΕ

Γεώργιος Μπερτσιάς, Επίκουρος Καθηγητής Ρευματολογίας-Κλινικής Ανοσολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευαγγελία Παπακωνσταντή, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Χρήστος Τσατσάνης, Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Χαραλαμπόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους βοήθησαν για να ολοκληρωθεί αυτή η δουλειά, ουσιαστικά όλους όσους γνώρισα τα τέσσερα χρόνια του διδακτορικού μου στον τομέα της Βιοχημείας, αλλά και σε άλλα εργαστήρια και τομείς, στην Ιατρική και στο ΙΤΕ.

Θέλω να ευχαριστήσω τη Βέτα, την Άννα, τη Μαρία Δασκαλάκη, τη Νεφέλη, την Αθηνά, τη Μελίνα, τον Δημήτρη, την Κατερίνα, την Αντωνία, την Έφη, την Μαρία Κανάκη, την Νικολέτα, την Δήμητρα, την Νάντια, την Ελίνα, τη Γαλάτεια, την Χριστιάννα και την Κωνσταντίνα από το εργαστήριο της κυρίας Κρετσόβαλη και την Αγγελική, την Ιωάννα και την Έλενα από το εργαστήριο του κυρίου Μαυροθαλασσίτη.

Θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Στουρνάρα για τη συμμετοχή του στην πρόοδο της δουλειάς μου και την καλή του διάθεση. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Σουρβίνο για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή της διατριβής μου και τη διαθεσιμότητά του.

Θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής για τον χρόνο τους και τις παρατηρήσεις τους. Τον κύριο Μπερτσια, τον κύριο Χαραλαμπόπουλο, τον κύριο Τσατσάνη, την κυρία Παπακωνσταντή και την κυρία Κρετσόβαλη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ τον κύριο Καρδάση για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω αυτό το διδακτορικό. Με βοήθησε να μάθω τον τρόπο να σκέφτομαι και να εργάζομαι πάνω σε ένα ερευνητικό θέμα. Είμαι ευγνώμον γι' αυτό, η εμπειρία ήταν πολύτιμη.

Σας ευχαριστώ όλους για τη συνάντηση αυτή μέσα από την καρδιά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	11
ABSTRACT.....	13
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
Εμβρυογένεση και βλαστικά κύτταρα.....	17
Μεταγραφικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων.....	20
Βλαστικά κύτταρα και καρκίνος.....	24
Οικογένεια των μικρών RHO GTPασών.....	25
Rho υπο-οικογένεια.....	25
Ρύθμιση της ενεργότητας των Rho πρωτεϊνών.....	28
Μεταγραφική ρύθμιση της RhoA.....	31
Μεταγραφική ρύθμιση της RhoB.....	33
Rho πρωτεΐνες και βλαστικά κύτταρα.....	35
Rho πρωτεΐνες και καρκίνος.....	36
Η οικογένεια του TGF.....	37
Δράσεις της οικογένειας του TGFβ.....	37
Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ.....	38
Οι πρωτεΐνες Smad.....	40
Ο ρόλος του TGFβ στην EMT.....	42
Ο ρόλος του TGFβ στη διαδικασία της διαφοροποίησης.....	43
Ο ρόλος της EMT στη διαδικασία της διαφοροποίησης.....	43
Ο ρόλος του TGFβ στον καθορισμό του κυτταρικού τύπου (cell fate determination)	47
Διαφορές στη δράση των μελών της οικογένειας του TGFβ στον άνθρωπο και το ποντίκι.....	49

Δράση των Smad πρωτεϊνών στη διαδικασία της διαφοροποίησης.....	51
ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	53
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	55
Υλικά.....	57
Μέθοδοι.....	58
Κυτταροκαλλιέργειες.....	58
Παραγωγή LIF.....	59
Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών.....	59
Αντίδραση DNάσης.....	60
Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription).....	60
PCR	61
Real Time PCR.....	61
Παροδικές επιμολύνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections).....	63
Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal.....	64
Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay).....	64
Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel).....	65
Κατασκευή πλασμιδίων.....	65
Εξαγωγή DNA από gel αγαρόζης.....	68
Καθαρισμός PCR προϊόντος (PCR clean-up)	69
Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction).....	69
Competent cells.....	70
Μετασηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B E.coli (transformation).....	71
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας (Midi prep)	71
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (Mini prep)	73

Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων.....	73
Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford-Lowry.....	74
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης-Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)	74
Κατασκευή λέντι-ιών.....	75
Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)	78

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....81

Σύγκριση φυσιολογικών και καρκινικών βλαστικών κυττάρων.....83

Μεταγραφική ρύθμιση των Rho πρωτεϊνών στα βλαστικά κύτταρα.....85

Σύγκριση επιπέδων έκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB στα βλαστικά και καρκινικά κύτταρα.....	85
Ο υποκινητής της RhoA ρυθμίζεται από ένα συνδυασμό αρνητικών και θετικών ρυθμιστικών στοιχείων στα βλαστικά κύτταρα.....	88
Μεταλλάξεις στο CCAAT box μείωσαν την βασική ενεργότητα του υποκινητή της RhoA.....	94
Η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85/-53 είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση της RhoB στα βλαστικά κύτταρα.....	96
Μεταλλάξεις στο CCAAT box μείωσαν την βασική ενεργότητα του υποκινητή της RhoB.....	98
Τα γονίδια των Rho υπόκεινται σε αυτορρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα.....	99

Ο ρόλος του TGFβ στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων : η ρύθμιση των Rho γονιδίων.....104

Επώαση των κυττάρων CGR8 με TGFβ1 και/ή υπερέκφραση των Smad 3/4 υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (παρουσία LIF).....	104
Επώαση των κυττάρων CGR8 με TGFβ1 και/ή υπερέκφραση των Smad 3/4 υπό συνθήκες διαφοροποίησης (απουσία LIF).....	107
Επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα SB-431542 απουσία LIF.....	111
Αποσιώπηση της RhoB	116

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....119

Μεταγραφική ρύθμιση των Rho πρωτεϊνών στα βλαστικά κύτταρα.....121

Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB στα φυσιολογικά και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα.....121

Ρυθμιστικά μεταγραφικά στοιχεία των γονιδίων RhoA και RhoB.....123

Ο ρόλος του στοιχείου CCAAT.....124

Τα γονίδια των Rho υπόκεινται σε αυτορρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα.....125

Ο ρόλος του TGFβ στη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και στη ρύθμιση των Rho γονιδίων.....127

Συμπεράσματα.....132

Βιβλιογραφία.....134

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της διατριβής ήταν να μελετηθούν οι μηχανισμοί μεταγραφικής ρύθμισης των μικρών Rho GTPασών RhoA και RhoB καθώς και ο πιθανός ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών στα βλαστικά κύτταρα.

Οι μικρές Rho GTPάσες εμπλέκονται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διαδικασίες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους μεταξύ των οποίων και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Η διαταραχή στη ρύθμισή τους μπορεί να οδηγήσει σε ασθένειες όπως ο καρκίνος. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε μία λειτουργική ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων RhoA και RhoB προκειμένου να εντοπιστούν ρυθμιστικά στοιχεία που είναι σημαντικά για την μεταγραφική τους ρύθμιση σε φυσιολογικά (CGR8) και καρκινικά (P-19) βλαστικά κύτταρα. Αρχικά παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της RhoA είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά της RhoB και στις δύο εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές όπως επίσης και σε διάφορες καρκινικές σειρές. Η διαφορά αυτή οφείλεται, έστω εν μέρει, στη διαφορά που υπάρχει στις ενεργότητες των αντίστοιχων υποκινητών. Λειτουργική ανάλυση των υποκινητών έδειξε ότι οι εγγύς περιοχές και των δύο περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία που είναι σημαντικά για την ενεργότητα τους. Συγκεκριμένα, και οι δύο υποκινητές περιέχουν CCAAT boxes, η μετάλλαξη των οποίων μείωσε σημαντικά την ενεργότητα τους υποδεικνύοντας μία κοινή ρύθμιση των δύο γονιδίων από παράγοντες που προσδέονται στο CCAAT box. Τέλος, βρέθηκε ότι και τα δύο γονίδια υπόκεινται σε μεταγραφική αυτορρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα και ότι αυτή η αυτορρύθμιση απαιτεί την ενεργότητα GTPάσης των Rho πρωτεϊνών στην περίπτωση της RhoB.

Ο TGFβ αποτελεί μέλος της οικογένειας των μετασηματοδοτικών αυξητικών παραγόντων στην οποία ανήκουν οι Ινχιμπίνες, η Ακτιβίνη, η AMH, οι BMPs, οι GDFs και ο παράγοντας Nodal. Γενικά, οι TGFs δρουν ως μορφογόνοι παράγοντες κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης παρέχοντας πληροφορίες για τον καθορισμό των αξόνων και τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς εξειδικευμένους κυτταρικούς τύπους. Αρχικά μελετήθηκε η πιθανότητα ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα και παρατηρήθηκε ότι αυτή δεν ήταν δυνατή υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας, δηλαδή παρουσία του παράγοντα LIF

ο οποίος διατηρεί τα κύτταρα πολυδύναμα. Συγχρόνως, υπό αυτές τις συνθήκες δεν ήταν δυνατή η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων από τον TGFβ. Αντίθετα, η ελάττωση του παράγοντα LIF επέτρεψε την ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ υποδηλώνοντας ότι το μονοπάτι του παράγοντα LIF ανταγωνίζεται αυτό του TGFβ. Ακόμα, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του TGFβ στη διαδικασία της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων επιχειρήθηκε η καταστολή του, σε συνδυασμό με την πλήρη απουσία του LIF. Οι παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η καταστολή του TGFβ επέτρεψε τη διατήρηση της πολυδύναμης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων παρά την απουσία του LIF έναντι των καλλιιεργειών ελέγχου που παρουσίασαν μεσοδερμική διαφοροποίηση. Ωστόσο, υπό αυτές τις συνθήκες δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων της RhoA και της RhoB.

Συμπερασματικά, παρά τις διαφορές στην έκφραση των γονιδίων της RhoA και της RhoB στα βλαστικά κύτταρα διαπιστώθηκε ότι οι υποκινητές τους ρυθμίζονται από κοινούς μηχανισμούς. Παρόλα αυτά, κάποιες πτυχές της ρύθμισης τους, όπως η αυτορρύθμιση, διαφέρουν ανάμεσα στα φυσιολογικά και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Είναι σημαντικό, επίσης, ότι η ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ είναι δυνατή μόνο σε συνθήκες που επιτρέπουν τη διαφοροποίηση. Ωστόσο, ενώ η καταστολή του TGFβ επέτρεψε τη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων, δεν είχε καμία επίδραση στη ρύθμιση των Rho γονιδίων. Η κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την έκφραση των Rho GTPασών στα βλαστικά κύτταρα είναι απαραίτητη προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στις λειτουργίες των βλαστικών αλλά και των καρκινικών κυττάρων με τα οποία μοιράζονται πολλές ομοιότητες.

ABSTRACT

The aim of the present work was studying the transcriptional regulation mechanisms of the small RhoA and RhoB Rho GTPases as well as the possible role of the TGF β signaling pathway in regulating the expression of these genes in stem cells.

Small GTPases of the Rho subfamily have been implicated in many physiological and pathological processes in various cell types including embryonic stem cells, and their deregulation may lead to diseases such as cancer. In the present study we have performed a functional analysis of the promoters of the RhoA and the RhoB genes in order to identify regulatory elements that are important for their transcriptional control in normal (CGR8) and cancer (P-19) embryonic stem cells. We first showed that the mRNA levels of RhoA were significantly higher compared with the mRNA levels of RhoB in both embryonic stem cell lines as well in various cancer cell lines and this difference could be accounted for, at least in part, by differences in the activities of the corresponding promoters. A deletion analysis of the RhoA and RhoB promoters in CGR8 and P-19 cells revealed that the proximal regions of both promoters appear to contain regulatory elements that are critical for their activity. Notably, both proximal promoters contain CCAAT boxes and mutagenesis of these elements decreased significantly the activity of both promoters suggesting a coordinated regulation of the two genes by CCAAT box binding factors. Finally, we showed that both genes are subject to transcriptional autoregulation in stem cells and in the case of RhoB, this autoregulation requires the GTPase activity of the Rho proteins.

TGF β is a member of the transforming growth factor family, including Inhibins, Activin, AMH, BMPs, GDFs and Nodal. Generally, TGFs act as morphogens during embryogenesis providing positional information for axons determination. First of all, we examined the possible TGF β induction of the RhoB gene in normal mouse stem cells which was not feasible under standard culture conditions, in the presence of LIF factor which preserve stem cell pluripotency. Concomitantly, under those conditions stem cells were not possible to differentiate by TGF β . On the contrary, reduction of LIF allowed transcriptional induction of the RhoB gene by TGF β , implying that LIF and TGF β pathways act in opposing ways. Subsequently, we tried to repress TGF β pathway

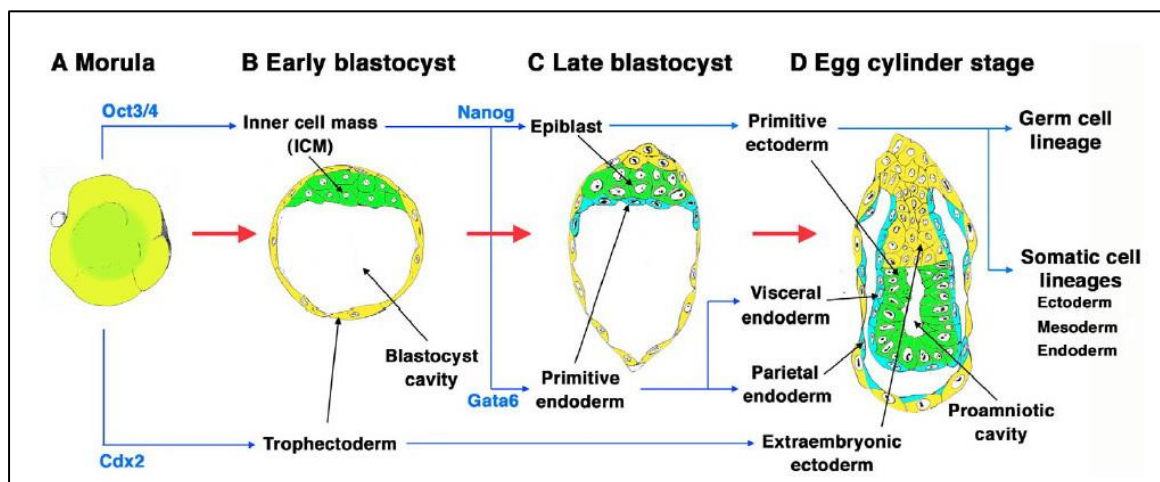
in complete absence of LIF factor in order to investigate the role of TGF β in the differentiation process. We observed that inhibition of the TGF β pathway allowed pluripotency maintenance of the stem cells despite LIF absence, opposite to control cells that were committed to mesodermal differentiation. However, under those conditions there was no alteration in the transcriptional regulation of Rho genes.

In summary, despite the difference in the levels of expression of the RhoA and RhoB genes in mouse embryonic stem cells, their promoters are regulated by common mechanisms. However, certain aspects of RhoA and RhoB regulation, especially their autoregulation, differ among normal and cancer stem cells. Furthermore, TGF β induction of the RhoB gene was possible only in differentiation culture conditions. Although TGF β inhibition allowed stem cell pluripotency maintenance, RhoA and RhoB gene expression was not altered. Understanding the mechanisms that control the transcription of Rho GTPases in stem cells is necessary in order to clarify their role in stem cell functions as well as in cancer cells that share many features with stem cells.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Εμβρυογένεση και βλαστικά κύτταρα

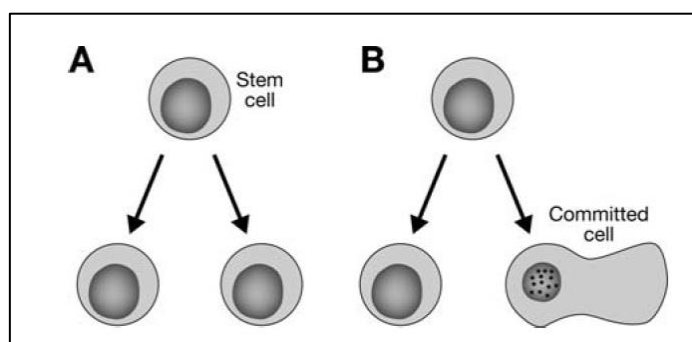
Η εμβρυογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα έμβρυο σχηματίζεται και αναπτύσσεται. Μετά τη γονιμοποίηση, το ζυγωτό υφίσταται διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις χωρίς ακόμα τα κύτταρα να διαφοροποιούνται, οδηγώντας στη δημιουργία ενός πολυκύτταρου εμβρύου. Καθώς το έμβρυο αναπτύσσεται, η εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) παράγει δύο διακριτές κυτταρικές σειρές: το εξωεμβρυϊκό ενδόδερμα (Εικ.1 C, γαλάζιο), από το οποίο παράγονται οι εξωεμβρυϊκοί ιστοί, και την επιβλάστη (Εικ.1 C, πράσινο) που θα δώσει το αρχέγονο εκτόδερμα (primitive ectoderm) από το οποίο θα αναπτυχθεί το έμβρυο (1).



Εικόνα 1 : Η ανάπτυξη του εμβρύου του ποντικού πριν και μετά την εμφύτευση. Συγκεκριμένοι μεταγραφικοί παράγοντες είναι απαραίτητοι για τη διαφοροποίηση διαφορετικών εμβρυϊκών κυτταρικών σειρών. Η επιβλάστη προκύπτει μετά την εμφύτευση, από την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM) (1).

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESCs) του ποντικού προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης (ICM) που προκύπτει έπειτα από πέντε αυλακώσεις του ζυγωτού (2). Τα ESCs δεν είναι ομογενής πληθυσμός, καθώς παρουσιάζουν ετερογένεια στην έκφραση γονιδίων-δεικτών που είναι τυπικοί για αυτά. Η ετερογένεια αυτή είναι πιθανό να παρουσιαστεί ακόμα και ανάμεσα στα κύτταρα της ίδιας αποικίας (3-6). Ένα από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ESCs είναι η αυτο-ανανέωση (self-renewal), δηλαδή η δυνατότητά τους να υφίστανται συμμετρικές κυτταρικές διαιρέσεις χωρίς να διαφοροποιούνται με σκοπό την

παραγωγή πανομοιότυπων θυγατρικών κυττάρων. Επίσης, τα κύτταρα αυτά είναι πολυδύναμα, δηλαδή μπορούν να διαφοροποιούνται και στα τρία γεννητικά στρώματα (germ layers), το εκτόδερμα, το μεσόδερμα και το ενδόδερμα και έχουν τη δυνατότητα να συνεισφέρουν σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του εμβρύου κατόπιν εμφύτευσής τους σε έμβρυα-ξενιστές (7). Συνεπώς, ένα βλαστικό κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί συμμετρικά (Εικ. 2 Α) παράγοντας δύο πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα ή ασύμμετρα (Εικ. 2 Β), παράγοντας ένα βλαστικό κύτταρο και ένα κύτταρο που θα διαφοροποιηθεί (8).

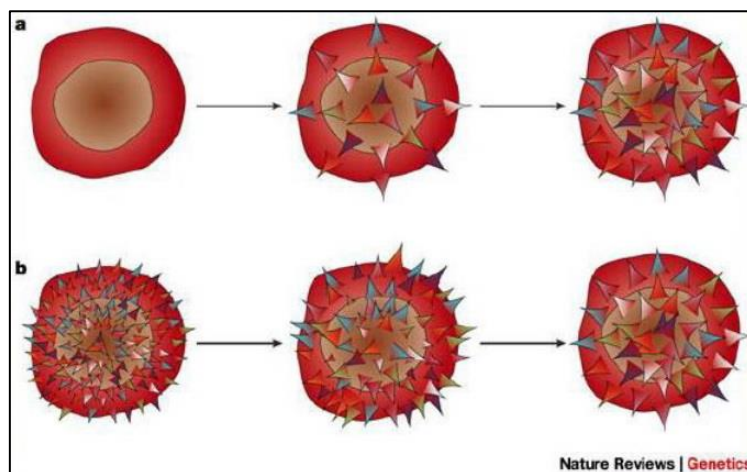


Εικόνα 2 : Συμμετρική και ασύμμετρη διαίρεση των βλαστικών κυττάρων.

Όπως αναφέρεται και παρακάτω, τα mESC (mouse Embryonic Stem Cells) και τα hESC (human Embryonic Stem Cells) διαφέρουν ως προς τις απαιτήσεις τους σε εξωτερικούς παράγοντες προκειμένου να διατηρηθούν πολυδύναμα. Μία πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι ότι τα κύτταρα αυτά αντιπροσωπεύουν διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, καθώς τα mESC αντιστοιχούν στα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM), ενώ τα hESC αντιστοιχούν στο στάδιο της επιβλάστης, που είναι και πιο όψιμο στάδιο (9). Τα hESC μοιάζουν περισσότερο με έναν άλλο τύπο βλαστικών κυττάρων ποντικού, τα EpiSC, που προέρχονται από το στάδιο της επιβλάστης του εμβρύου του ποντικού (Εικ.1) και τα οποία καλλιεργούνται παρουσία Fgf2 και Ακτιβίνης όπως και τα hESC (10).

Βασικό χαρακτηριστικό των βλαστικών κυττάρων είναι ότι βρίσκονται σε μία “εν δυνάμει” κατάσταση, η οποία δεν χαρακτηρίζεται από την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (Εικ. 3α). Αντίθετα, τα βλαστοκύτταρα μπορεί να εκφράζουν σε χαμηλά επίπεδα πολλά διαφορετικά γονίδια (Εικ. 3β) και κατά τη διάρκεια της

διαφοροποίησης επιλέγεται η έκφραση ορισμένων από αυτά προκειμένου το κύτταρο να ακολουθήσει έναν συγκεκριμένο χαρακτήρα (cell fate) (11).



Εικόνα 3 : Μοτίβα γονιδιακής έκφρασης κατά τη μετάβαση ενός βλαστικού κυττάρου σε μία πιο ώριμη κατάσταση. α) Σύμφωνα με το πρώτο μοτίβο, ένα βλαστικό κύτταρο βρίσκεται σε μια “εν δυνάμει” κατάσταση και η διαφοροποίησή του συνεπάγεται την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων (που υποδεικνύονται από προεξοχές διαφορετικών χρωμάτων) β) μία αντίθετη πιθανότητα είναι ότι τα βλαστικά κύτταρα εκφράζουν πολλά γονίδια σε χαμηλά επίπεδα (μικρές προεξοχές) και ότι η έκφραση πολλών από αυτά μειώνεται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, με την έκφραση μιας μικρής ομάδας γονιδίων να αυξάνεται (υποδεικνύονται από μεγάλες προεξοχές)

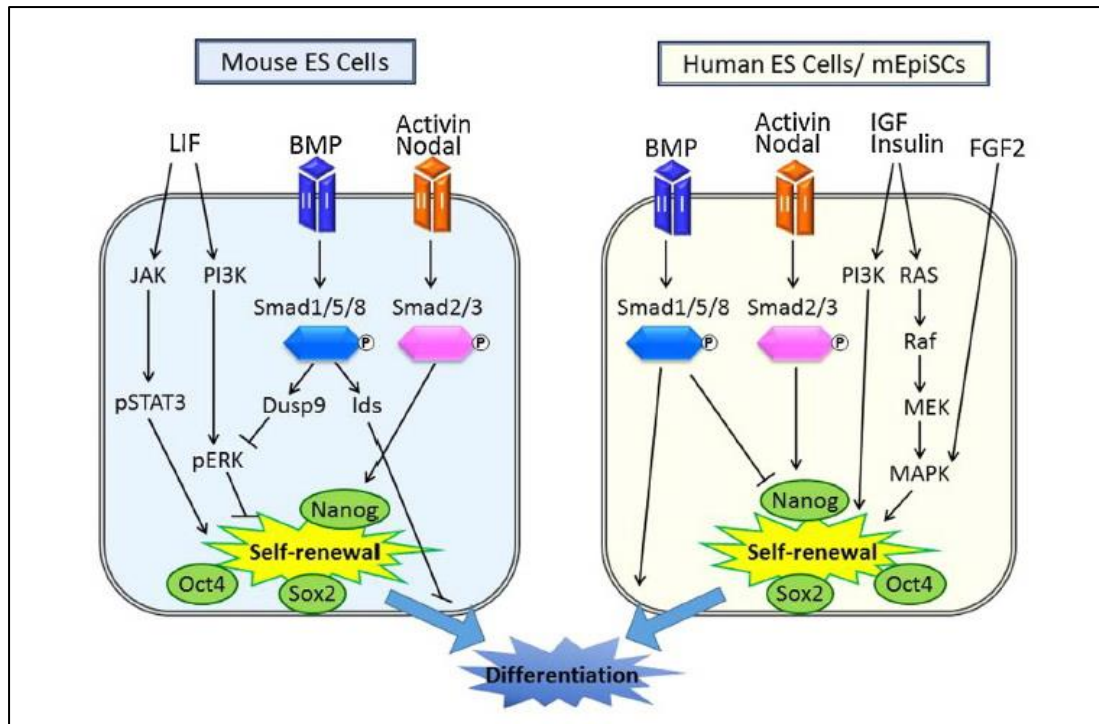
Στην βλαστοκύστη, τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα έχουν πολύ αργό ρυθμό πολλαπλασιασμού, με χρόνο διπλασιασμού 64-65 ώρες (12). Παρόλα αυτά, η ανάπτυξή τους επιταχύνεται μετά την εμφύτευση και ο χρόνος διπλασιασμού μειώνεται σε 11-12 ώρες την ημέρα 5.5 (E5.5), 9-10 ώρες την E6.0 και 4-5 ώρες την E6.5 (13). Σε συνθήκες απουσίας ορού, τα mESCs πολλαπλασιάζονται πολύ αργά όπως τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας (ICM) στην αρχή της καλλιέργειας, αλλά η ανάπτυξή τους επιταχύνεται μετά τον σχηματισμό μικρών αποικιών περίπου πέντε ημέρες αργότερα (14). Υπό ιδανικές συνθήκες, τα mESCs διαιρούνται συμμετρικά κάθε 12 ώρες. Τα βλαστικά κύτταρα έχουν ένα ταχύ κυτταρικό κύκλο με μία ασυνήθιστα μικρή φάση G1, πιθανόν λόγω απουσίας έκφρασης του γονιδίου του ρετινοβλαστώματος (Rb) (15).

Μεταγραφικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων

Όσον αφορά στους εξωγενείς παράγοντες που απαιτούνται κατά την καλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων προκειμένου αυτά να διατηρούνται πολυδύναμα, έχουν αναγνωριστεί δύο διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας: 1) οι καλλιέργειες που εξαρτώνται από τον LIF (Leukaemia Inhibiting Factor) και τον BMP4, ο οποίος βρίσκεται στον ορό και 2) οι καλλιέργειες που εξαρτώνται από τους παράγοντες Fgf2 και TGFβ/Activin/Nodal (Εικ. 4). Τα mESC εξαρτώνται από τις συνθήκες της πρώτης κατηγορίας, ενώ τα hESC από τις συνθήκες της δεύτερης.

Για τα mESCs ο παράγοντας LIF παίζει τον κύριο ρόλο στην αναστολή της διαφοροποίησης (16,17). Ο LIF ανήκει στην οικογένεια των ιντερλευκινών-6 και προσδέεται σε έναν ετεροδιμερή υποδοχέα που αποτελείται από τον υποδοχέα LIF-β (LIFRβ) και την υπομονάδα gp130. Η πρόσδεση στον υποδοχέα του προκαλεί την ενεργοποίηση του μονοπατιού Jak/Stat. Ο Stat3 συνεργάζεται με τους παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog ρυθμίζοντας την πολυδυναμία (18,19). Επιπλέον, ο BMP4, που ενεργοποιεί τις Smad1/5/8, ρυθμίζει την έκφραση των helix-loop-helix (HLH) αναστολέων της διαφοροποίησης Id1-3 (Inhibitor of differentiation) καταστέλλοντας τη διαφοροποίηση (20). Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι οι Smad1/5/8 συνεργάζονται επίσης με τους κύριους παράγοντες που καθορίζουν την πολυδυναμία Oct4, Nanog, Sox2 και Stat3 (18).

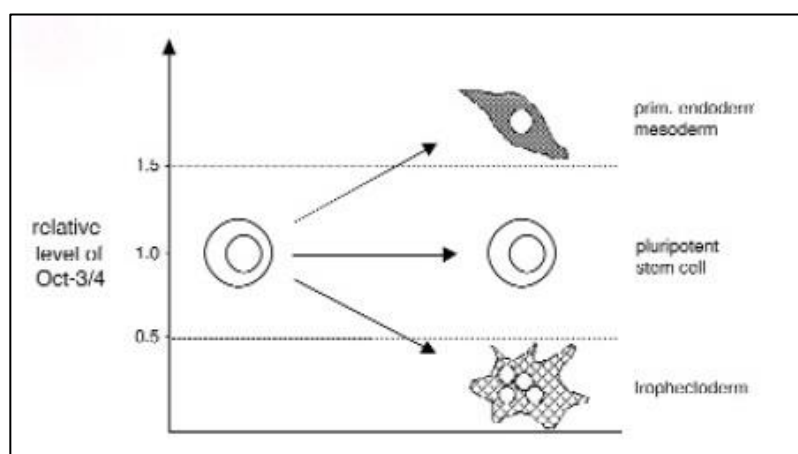
Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο c-Myc είναι ένας πιθανός στόχος του Stat3 (21). Ο HLH μεταγραφικός παράγοντας c-Myc είναι γνωστό ότι επιταχύνει τον κυτταρικό κύκλο, δρώντας μέσω της μεταγραφικής ενεργοποίησης της κυκλίνης E επάγοντας την μετάβαση από την G1 στην S φάση (22). Η υπερέκφραση μίας συστασιακά ενεργής μορφής του c-Myc καθιστά τη δυνατότητα της αυτό-ανανέωσης των mESCs ανεξάρτητη του LIF. Αντίθετα, η υπερέκφραση μίας επικρατούσας αρνητικής μορφής του c-Myc επάγει τη διαφοροποίηση (21).



Εικόνα 4 : Σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την αυτό-ανανέωση και τη διαφοροποίηση των mESCs και hESCs (23).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Oct4, που κωδικοποιείται από το γονίδιο Pou5f1, είναι επίσης ένας ζωτικής σημασίας ρυθμιστής της πολυδυναμίας (24). Προκειμένου να διατηρηθεί η πολυδυναμία είναι απαραίτητη μία κρίσιμη ποσότητα του Oct4, καθώς η αύξηση της έκφρασής του κατά δύο φορές προκαλεί διαφοροποίηση προς αρχέγονο ενδόδερμα και μεσόδερμα, ενώ η καταστολή του προκαλεί την αποδιαφοροποίηση προς τροφοεκτόδερμα (Εικ. 5). Ωστόσο, ο ρόλος του Oct4 είναι περισσότερο περίπλοκος καθώς συνεργάζεται με διάφορους άλλους παράγοντες όπως τον Sry-related Sox-2 και τον Rox-1. Η ποσότητα του Oct4 σε σχέση με αυτούς τους παράγοντες είναι κρίσιμη. Παρόλο που ο παράγοντας LIF είναι απαραίτητος για την πολυδυναμία, δεν δρα διατηρώντας την έκφραση του Oct4, καθώς τα κύτταρα διαφοροποιούνται μεν απουσία LIF, τα επίπεδα έκφρασης όμως του Oct4 διατηρούνται. Η αφαίρεση του LIF ή η αύξηση του Oct4 έχουν πανομοιότυπες συνέπειες για συγκεκριμένα γονίδια-στόχους και άρα για το επίπεδο διαφοροποίησης των κυττάρων. Είναι πιθανό ότι η ενεργοποίηση του Stat3 από τον LIF είναι απαραίτητη για την επαγωγή της έκφρασης ενός συμπαραγόντα του Oct4 όπως του Rox-1. Η δέσμευση αυτού του παράγοντα από την περίσσεια του Oct4 ή η

καταστολή του που ακολουθεί την αφαίρεση του LIF οδηγεί σε παρόμοιο αποτέλεσμα σχετικά με το επίπεδο πολυδυναμίας των κυττάρων. Ο παράγοντας Oct4 δρα ως “gatekeeper” που καταστέλλει τη διαφοροποίηση και “κλειδώνει” την ικανότητα για πολυδυναμία (25).



Εικόνα 5 : Συσχετισμός μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του Oct4 και του βαθμού πολυδυναμίας (25).

Το γονίδιο Nanog κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα που εκφράζεται σε όλα τα πολυδύναμα κύτταρα της ICM. Η υπερέκφραση του Nanog, όπως συμβαίνει και με το γονίδιο Klf2 (26), σε mESCs μπορεί να τα διατηρήσει πολυδύναμα απουσία LIF (27). Η έκφραση του Nanog ελέγχεται εν μέρει από τον Oct4 και τον Sox2 (28) και προσδέεται στο γονιδίωμα στις ίδιες θέσεις με αυτούς τους παράγοντες (29). Η λειτουργία του Nanog δεν περιορίζεται στην αναστολή της διαφοροποίησης προς ενδόδερμα, καθώς το Nanog μπορεί να αναστείλει τη νευρική και μεσοδερμική διαφοροποίηση υπό διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας (20,30). Έχει αναφερθεί ότι το Nanog αλληλεπιδρά με την Smad1 προκειμένου να καταστείλει την έκφραση του Brachyury και των γονιδίων-στόχων του BMP (31,32).

Ο μεταγραφικός παράγοντας Sox2 κατέχει μία σημαντική θέση στο δίκτυο των μεταγραφικών παραγόντων που καθορίζουν τη διατήρηση της πολυδυναμίας, καθώς η λειτουργία του είναι να διατηρήσει τα απαραίτητα επίπεδα του Oct4 (33,34).

Τα περισσότερα γονίδια που είναι ειδικά για τα βλαστικά κύτταρα περιέχουν ενισχυτές με θέσεις πρόσδεσης για τον Oct4 και τον Sox2 (28,35).

Οι Takahashi και Yamanaka αναφέρουν ότι η επαγωγή της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων Oct4, Sox2, c-Myc και Klf4 σε σωματικά κύτταρα (ινοβλάστες) είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή επαγόμενων πολυδύναμων κυττάρων (iPS). Ένεση αυτών των κυττάρων σε βλαστοκύστες ποντικών οδήγησε στη δημιουργία χιμαιρικών εμβρύων (36). Το γονίδιο Klf4 είναι ογκογονίδιο και η υπερέκφραση του σε mESCs μειώνει την ικανότητά τους να διαφοροποιηθούν προς εμβρυϊκά σωματίδια (τα εμβρυϊκά σωματίδια-EBs-είναι σφαιρικοί σχηματισμοί που δημιουργούνται όταν τα εμβρυϊκά κύτταρα καλλιεργούνται σε εναιώρημα, και περιέχουν διαφοροποιημένα κύτταρα και των τριών βλαστικών στρωμάτων) (37). Οι τέσσερις αυτοί παράγοντες θεωρείται ότι εγκαθιστούν την πολυδυναμία σε σωματικά κύτταρα καθώς το c-Myc επάγει την αντιγραφή του DNA, χαλαρώνοντας τη δομή της χρωματίνης, πράγμα που επιτρέπει στον Oct4 να προσεγγίσει τα γονίδια-στόχους που επάγουν την πολυδυναμία.

Τα iPS έχουν παρόμοιο γονιδιακό προφίλ με τα mESCs. Είναι ενδιαφέρον ότι το Nanog δεν απαιτείται εξωγενώς προκειμένου να επαχθεί η πολυδυναμία αλλά επίσης δεν ενεργοποιείται πάντα από αυτούς τους τέσσερις παράγοντες. Προφανώς η συνεισφορά του Nanog στη διατήρηση της πολυδυναμίας εξαρτάται κάθε φορά από το περιβάλλον. Σχετικά με το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ, έχει αναφερθεί ότι η καταστολή της Smad2 υποκαθιστά την εξωγενή ανάγκη για c-Myc και Sox2, αλλά όχι και των δύο, κατά την παραγωγή iPS κυττάρων από ινοβλάστες ποντικού (38). Συνολικά, τα γονίδια Oct4/Sox2/Nanog παίζουν κυρίαρχο ρόλο στην επιλογή του συνόλου των γονιδίων που εκφράζονται στα βλαστικά κύτταρα, ενώ ο c-Myc ρυθμίζει την αποδοτικότητα με την οποία τα γονίδια αυτά μεταγράφονται (29).

Βλαστικά κύτταρα και καρκίνος

Όπως είναι γνωστό τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (cancer stem cells-CSCs) είναι καρκινικά κύτταρα που έχουν ιδιότητες των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων, δηλαδή την ικανότητά για αυτό-ανανέωση και διαφοροποίηση. Είναι πιθανό ότι αυτά τα κύτταρα παραμένουν στον όγκο, αποτελώντας έναν διακριτό πληθυσμό, και προκαλούν υποτροπή και μετάσταση παράγοντας νέους όγκους (15,39,40). Τα κύτταρα P-19 που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, είναι βλαστικά κύτταρα που προέρχονται επίσης από όγκο. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα CSCs μοιράζονται κοινές ιδιότητες με τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, όπως ταχύ ρυθμό πολλαπλασιασμού, παρόμοιες μεταβολικές ανάγκες, αναστολή της διαφοροποίησης, έλλειψη αναστολής λόγω κυτταρικής επαφής, γενωμική αστάθεια, όπως επίσης υψηλή ενεργότητα τελομεράσης, υψηλή έκφραση ογκογονιδίων όπως το c-Myc και το Klf4 και σημαντικές ομοιότητες στο συνολικό μοτίβο έκφρασης, στην έκφραση χαρακτηριστικών microRNA (miRNA) καθώς και στο επιγενετικό τους προφίλ (41). Ωστόσο χρειάζεται περισσότερη έρευνα προκειμένου να διασαφηνιστούν περισσότερο αυτές οι ομοιότητες. Δεδομένων των παραπάνω, είναι πιθανό οι δύο κυτταρικοί τύποι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή δηλαδή τα φυσιολογικά εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα CGR8 και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα P-19 να έχουν ομοιότητες και σε επίπεδο μεταγραφικής ρύθμισης, όπως θα δούμε παρακάτω για τα γονίδια της RhoA και της RhoB.

Τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα είναι δυνητικά ογκογόνα, παράγοντας κακοήθεις όγκους και τερατώματα όταν ενίονται σε ανοσοκατεσταλμένα ποντίκια. Η δυνατότητα αυτή είναι και το πιο ακριβές τεστ για να αποδειχτεί ότι τα κύτταρα είναι πολυδύναμα. Ο επαναπρογραμματισμός (reprogramming) των σωματικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μετά από επαγωγή σε αυτά ογκογονιδίων όπως το c-Myc και το Klf4 υποδηλώνει επίσης την κοινή προέλευση των βλαστικών και των καρκινικών κυττάρων (42). Όλο και περισσότερες έρευνες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι όγκοι περιέχουν κύτταρα που έχουν δυνατότητα αυτό-ανανέωσης σε διάφορους πληθυσμούς. Η κλινική σημασία των CSCs ενισχύεται από μελέτες που αποδεικνύουν ότι τα CSCs είναι ανθεκτικά στην συμβατική χημειοθεραπεία και τις

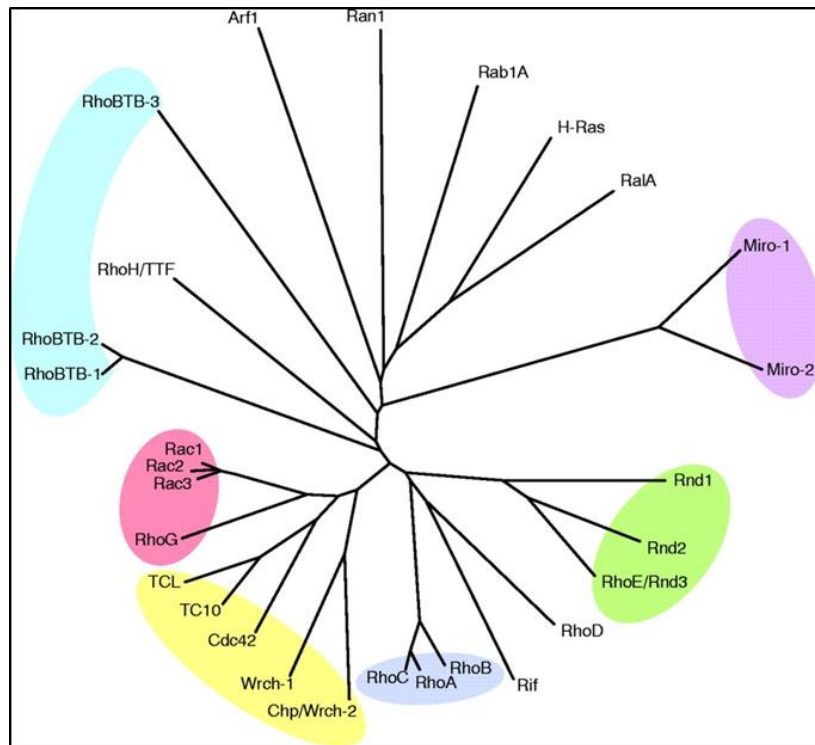
ακτινοβολίες. Είναι πιθανό ότι τα CSCs είναι η πηγή των καρκινικών μεταστάσεων, παράγοντας περισσότερα βλαστικά κύτταρα που παραμένουν αδιαφοροποίητα μέσω της αυτό-ανανέωσης. Μετά τη χημειοθεραπεία κάποιοι ασθενείς υποτροπιάζουν λόγω του εμπλουτισμού των CSCs που είναι ανθεκτικά στη θεραπεία. Συνεπώς, τα CSCs θεωρούνται ένας σημαντικός στόχος για νέες αντικαρκινικές θεραπείες (43).

Οικογένεια των μικρών RHO GTPασών

Rho υπο-οικογένεια

Στην ευρύτερη οικογένεια των Rho περιλαμβάνονται 22 μέλη που αποτελούν 8 υποοικογένειες. Οι Rac, Cdc42 και Rho υποοικογένειες είναι οι πιο καλά μελετημένες (44). Οι Rho GTPάσες αποτελούν μία ξεχωριστή οικογένεια της υπεροικογένειας των Ras μικρών GTPασών και εντοπίζονται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Περίπου το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες είτε ρυθμίζουν είτε ρυθμίζονται από τα μέλη της οικογένειας των Rho. Το δομικό χαρακτηριστικό που διαχωρίζει τις Rho πρωτεΐνες από τις άλλες μικρές GTPάσες είναι η “Rho insert domain” που βρίσκεται ανάμεσα στο πέμπτο β πτυχωτό φύλλο και την τέταρτη α έλικα. Οι περισσότερες Rho πρωτεΐνες είναι μικρές (190-250 αμινοξέα) και αποτελούνται μόνο από την περιοχή της GTPάσης και από τις μικρές αμινοτελικές και καρβοξυτελικές περιοχές. Παρόλα αυτά κάποια μέλη της οικογένειας περιέχουν επιπλέον περιοχές και μπορεί να αποτελούνται από περισσότερα από 700 αμινοξέα (44).

Οι πρωτεΐνες RhoA, RhoB και RhoC έχουν υψηλή αμινοξική ομολογία (~85%) με τη μεγαλύτερη απόκλιση να εμφανίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Όσον αφορά στην περιοχή της GTPάσης έχουν περίπου 30% αμινοξική ομολογία με τις Ras



Εικόνα 6 : Ανθρώπινες Rho GTPάσες. Φυλογενετικό δέντρο των Rho GTPασών και εκπροσώπων κάποιων Ras GTPασών. Φυλογενετική ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των 22 μελών της οικογένειας δείχνει ότι η οικογένεια μπορεί να διαιρεθεί αδρά σε έξι κύριους κλάδους (51).

πρωτεΐνες και 40-95% ομολογία με τα άλλα μέλη της οικογένειας. Παρά τις ομοιότητες τους, έχουν κάποιες λειτουργικές διαφορές, κυρίως λόγω των διαφορών που συναντώνται στα 15 αμινοξέα της καρβοξυτελικής τους περιοχής (44).

Τα περισσότερα μέλη της οικογένειας δρουν ως μοριακοί διακόπτες, μεταβαίνοντας από την GTP-ενεργή στην GDP-ανενεργή μορφή τους. Όταν ενεργοποιηθούν, οι Rho GTPάσες προσδένουν διάφορα μόρια-τελεστές (effectors) και πυροδοτούν σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν διάφορες κυτταρικές λειτουργίες όπως η απόπτωση, ο κυτταρικός κύκλος, η κυτταρική προσκόλληση, η μεταγραφική ρύθμιση, η ρύθμιση του κυτταρικού σχήματος και η κυτταρική μετανάστευση μέσω αλλαγών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (45). Εμπλέκονται, επίσης, στη ρύθμιση της πολικότητας των κυττάρων, στις διακυτταρικές

αλληλεπιδράσεις αλλά και στην αλληλεπίδραση των κυττάρων με το υπόστρωμά τους, όπως επίσης και στη ρύθμιση της ενδοκύττωσης και της εξωκύττωσης (46). Ακόμα, οι Rho GTPάσες παίζουν ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις όπως στη μετανάστευση των κυττάρων κατά τη διήθηση και τη μετάσταση στον καρκίνο, στη φλεγμονή και στην επούλωση των τραυμάτων (47).

Το αμινοτελικό άκρο των Rho πρωτεϊνών περιλαμβάνει την πλειονότητα των αμινοξέων που εμπλέκονται στην πρόσδεση και στην υδρόλυση του GTP καθώς και τις περιοχές Switch I και II που αποτελούνται από δύο θηλιές (loops). Οι διαφορές στη διαμόρφωση ανάμεσα στην GTP- και την GDP-προσδεδεμένη μορφή εντοπίζεται κυρίως σε αυτές τις περιοχές, με τις οποίες αλληλεπιδρούν οι πρωτεΐνες-τελεστές. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αμινοξέα που είναι σημαντικά για την καταλυτική ενεργότητα των Rho GTPασών είναι συντηρημένα και στις τρεις ισομορφές των Rho (48,49).

Υπάρχουν 20 γονίδια που κωδικοποιούν για τις Rho GTPάσες στο ανθρώπινο γονιδίωμα (50). Στον άνθρωπο, τον αρουραίο και το ποντίκι τα γονίδια των τριών Rho εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα (51). Το γονίδιο της RhoA είναι μεγαλύτερο και περιέχει περισσότερα εξώνια και εσώνια από αυτό της RhoC, γι' αυτό τον λόγο έχει προταθεί ότι το γονίδιο της RhoC προέκυψε λόγω ατελούς διπλασιασμού του γονιδίου της RhoA. Το γονίδιο της RhoB είναι κατά πολύ μικρότερο και περιέχει μόνο ένα εξώνιο, καθώς προέκυψε πιθανώς από αντίστροφη μεταγραφή (52).

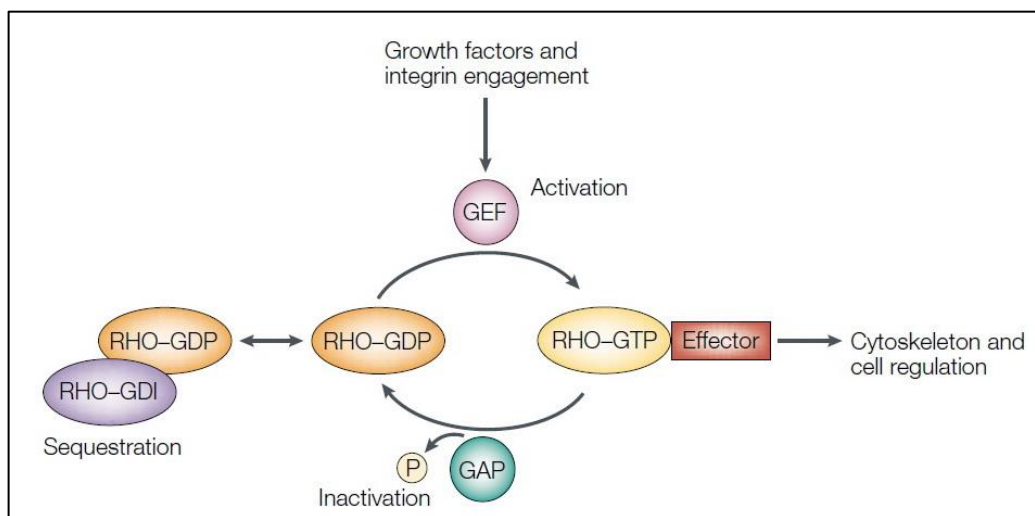
Μελέτες για τον κυτταρικό εντοπισμό GFP-σημασμένων Rho πρωτεϊνών σε ζώντα κύτταρα οδήγησαν στην παρατήρηση ότι ακόμα και πολύ συγγενικές Rho μπορεί να εντοπίζονται σε πολύ διαφορετικά τμήματα του κυττάρου (44,45). Παρά την υψηλή αμινοξική ομολογία τους (~85%), οι Rho πρωτεΐνες έχουν διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες, εν μέρει, λόγω της διαφορετικής κυτταρικής τους εντόπισης. Η RhoA είναι κυρίως κυτταροπλασματική και εν μέρει προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη, η RhoB είναι προσδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη (F-μορφή) και στα ενδομεμβρανικά κυστίδια (GG-μορφή), συγκεκριμένα στα όψιμα ενδοσώματα (53,54). Η RhoC είναι κυτταροπλασματική και σχετίζεται με περιπυρηνικές δομές.

Γενικά, ο ρόλος των Rho πρωτεϊνών είναι να μεταφέρουν τα σήματα από την εξωκυττάρια ουσία μέσω των ιντεγκρινών και του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Επίσης, συμμετέχουν στη φάση της μίτωσης επιδρώντας στα νημάτια της ακτίνης και στην οργάνωση των μικροσωληνίσκων (55). Η RhoA επάγει το σχηματισμό ινιδίων του στρες και εστιών προσκόλλησης ελέγχοντας την συσταλτικότητα της ακτινομυοσίνης. Για αυτό το λόγο, η RhoA ρυθμίζει το κυτταρικό σχήμα, την προσκόλληση και την κινητικότητα. Το mRNA και η πρωτεΐνη της RhoB είναι και τα δύο ασταθή, σε αντίθεση με αυτά της RhoA. Η έκφραση της RhoB αυξάνεται κατά τη διάρκεια των G1 και S φάσεων ασκώντας ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Είναι, επίσης, γνωστό ότι η RhoB έχει ογκοκατασταλτικό ρόλο και ότι η έκφρασή της είναι μειωμένη στον καρκίνο (44). Σε πολλούς όγκους τα επίπεδα της RhoB μειώνονται κατά την πορεία εξέλιξης του όγκου, ενώ η υπερέκφρασή της μπορεί να αναστείλει την μετανάστευση των κυττάρων, την διείσδυση και τη μετάσταση. Συγκεκριμένα, η RhoB-GG μορφή είναι αυτή που ασκεί την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την απόπτωση (54). Η RhoB παίζει ρόλο στον κυτταρικό κύκλο καταστέλλοντας την κυκλίνη B1 και την αντίστοιχη κινάση Cdk1 (56). Αντίθετα, η RhoA καταστέλλει την έκφραση του γονιδίου p21^{WAF1} που ευθύνεται για την αναστολή του κυτταρικού κύκλου (57).

Ρύθμιση της ενεργότητας των Rho πρωτεϊνών

Η ρύθμιση των Rho πρωτεϊνών εξαρτάται από τους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (GEFs, guanine nucleotide exchange factors) οι οποίοι επάγουν την αντικατάσταση του GDP με GTP και τις δύο οικογένειες καταστολέων: τις πρωτεΐνες που ενεργοποιούν την ενεργότητα της GTPάσης (GAPs, GTPase-activating proteins) και τους αναστολείς αποδέσμευσης νουκλεοτιδίων γουανίνης (GDIs, guanine nucleotide dissociation inhibitors) (Εικ. 7). Οι GAPs επάγουν την υδρόλυση του GTP, ενώ οι GDIs προσδένουν το καρβοξυτελικό άκρο (C-terminal prenyl group) των Rho πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες με GDP εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με την μεμβράνη, απομονώνοντάς τες στο κυτταρόπλασμα και

εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδρασή τους με τα μόρια-στόχους. Οι GEFs και οι GAPs προσδένονται στις περιοχές Switch I και II.



Εικόνα 7 : Οι Rho GTPάσες δρουν ως μοριακοί διακόπτες. Οι GEFs επάγουν την αντικατάσταση του GDP με GTP, ενώ οι GAPs και GDIs δρουν ως καταστολείς των Rho (57).

Η οικογένεια των GEF αποτελείται από περίπου 70 μέλη και η οικογένεια των GAP αποτελείται από περίπου 80 μέλη. Επιπλέον, εκτός των χαρακτηριστικών περιοχών τους (GEF/GAP domains), αυτές οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στην αλληλουχία τους αλλά και στη δομή αυτών των περιοχών. Ακόμα, υπάρχουν τρεις καλά χαρακτηρισμένες RhoGDIs (α-γ), και προτείνεται ότι και μερικές άλλες πρωτεΐνες έχουν δράση GDI για τις Rho πρωτεΐνες. Οι GDIs έχουν διαφορετική συγγένεια σύνδεσης για τις διαφορετικές Rho και είναι γνωστό ότι ένα μεγάλο μέρος των Rho πρωτεϊνών που υπάρχουν σε ένα κύτταρο προσδένονται και απενεργοποιούνται από τις GDIs. Επίσης, αρκετές πρωτεΐνες δεσμεύουν τις GDIs ρυθμίζοντας έτσι τη σύνδεσή τους με τις Rho, απελευθερώνοντάς τες, για παράδειγμα, σε περιοχές της μεμβράνης όπου χρειάζονται. Αυτή η ποικιλομορφία αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι οι Rho GTPάσες ρυθμίζονται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους (44,58).

Οι Rho πρωτεΐνες μπορούν να πρενυλιωθούν μετα-μεταφραστικά στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Συγκεκριμένα, η πλειονότητα των Rho έχουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο μία CAAX αλληλουχία (C=κυστεΐνη, A=αλειφατικό, X=οποιοδήποτε αμινοξύ) η οποία ισοπρενυλιώνεται. Αυτό τους επιτρέπει να

συνδεθούν με την πλασματική μεμβράνη και έτσι να αλληλεπιδράσουν με άλλες πρωτεΐνες και να τις ενεργοποιήσουν. Οι λιπιδικές ομάδες που προστίθενται στις Rho είναι τα ισοπρενοειδή geranylgeranyl (GG) και farnesyl (F). Συγκεκριμένα, στη πρωτεΐνη RhoB μπορεί να προστεθεί είτε μία F είτε μία GG ομάδα, ενώ οι RhoA και RhoC πρωτεΐνες βρίσκονται μόνο στη -GG μορφή (48). Παρόλο που η προσθήκη μίας GG ομάδας επάγει μία πιο ισχυρή σύνδεση με τη μεμβράνη, ο τύπος του ισοπρενοειδούς δεν φαίνεται να συνεισφέρει στη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, εκτός ίσως από την περίπτωση της RhoB. Η ισοπρενυλίωση δεν είναι από μόνη της αρκετή για να καθορίσει τον κυτταρικό εντοπισμό των Rho. Ωστόσο, η ισοπρενυλίωση της RhoB καθορίζει τον χρόνο ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης, καθώς η μεταλλαγμένη της μορφή που δεν ισοπρενυλιώνεται και είναι κυτταροπλασματική είναι αξιοσημείωτα πιο σταθερή από την αντίστοιχη αγρίου τύπου (46,59).

Κάποια μέλη τροποποιούνται επιπρόσθετα από την προσθήκη ενός παλμιτικού οξέος στα κατάλοιπα κυστεΐνης που βρίσκονται ακριβώς πριν το στοιχείο CAAX στο καρβοξυτελικό άκρο. Η προσθήκη του παλμιτικού οξέος μπορεί επίσης να επηρεάσει την αναγνώριση από τις GDIs, όπως στην περίπτωση της RhoB όπου εμποδίζει την αναγνώρισή της από την RhoGDI-α και, επομένως, επηρεάζει τη θέση της στο κύτταρο. Κάποιες Rho στερούνται του στοιχείου CAAX, πράγμα που ενισχύει επίσης την λειτουργική ποικιλομορφία που χαρακτηρίζει ακόμα και πολύ συγγενικές Rho πρωτεΐνες. Το σύνολο των παραπάνω τροποποιήσεων για τη RhoB δικαιολογείται από το γεγονός ότι το mRNA της είναι ασταθές, και επομένως είναι απαραίτητη η υψηλού βαθμού μετα-μεταφραστική ρύθμισή της (60).

Σύμφωνα με παλαιότερες μελέτες, έχει δειχθεί η συμμετοχή πυρηνικών GEFs στην ενεργοποίηση των Rho πρωτεϊνών ως απάντηση στο γονοτοξικό στρες (61-63). Οι GEFs Ect2 και Net1 είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της RhoB και την επαγωγή της απόπτωσης ως απόκριση σε βλάβη του DNA σε καρκινικά κύτταρα μαστού και τραχήλου (63). Η Net1, επίσης, ενεργοποιεί την RhoA ως απόκριση σε βλάβη του DNA σε κύτταρα HeLa και HEK293 (61,62).

Σχετικά με την ρύθμιση της RhoA, έχει δειχθεί ότι η έλλειψη του παράγοντα p53 σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού επάγει μία μετάβαση από έναν επιμήκη, ατρακτοειδή κυτταρικό τύπο σε σφαιρικό στον οποίο παρατηρείται υψηλή

σηματοδότηση του μονοπατιού RhoA-ROCK καθώς και αυξημένος διεισδυτικός φαινότυπος (64). Επιπλέον, η GEFH1, μία GEF που ενεργοποιεί την RhoA, ενεργοποιείται σε κύτταρα οστεοσαρκώματος τα οποία εκφράζουν μία μεταλλαγμένη μορφή του p53, επιταχύνοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (65). Τέλος, το γονίδιο hPTTG1 (human pituitary tumour-transforming gene 1) ενεργοποιεί την GEFH1 οδηγώντας σε μετάσταση στον καρκίνο του μαστού (66).

Σχετικά με την πρωτεϊνική ρύθμιση της RhoB, έχει δειχθεί ότι σε ανθρώπινα ηπατικά καρκινικά κύτταρα, το μονοπάτι neddylation-CRL αλληλεπιδρά με την RhoB και επάγει την ουβικιτινίωσή και την αποικοδόμησή της (67). Σε HEK293T και HeLa κύτταρα, η βλάβη του DNA ενεργοποιεί το ATR/Chk1 μονοπάτι οδηγώντας σε αποικοδόμηση της Smurf1 λιγάσης και ως εκ τούτου, στην συσσώρευση της RhoB και στην επαγωγή της απόπτωσης (68). Ακόμα, το PCA (Protocatechuic acid), ένας αντιοξειδωτικός παράγοντας, καταστέλλει το μονοπάτι Ras/Akt/NF-κB αυξάνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα και την ενεργότητα της RhoB σε ανθρώπινα κύτταρα γαστρικού καρκινώματος οδηγώντας στην αναστολή της μετάστασης (69).

Μία ακόμα τροποποίηση των Rho GTPασών που έχει καταγραφεί είναι η γλυκοζυλίωσή τους. Οι γλυκοζυλιωμένες Rho-GTPάσες είναι προσδεμένες με GTP και δεν μπορούν να προσδεθούν στον κυτταροπλασματικό GDI-I οπότε και παραμένουν στις μεμβράνες. Η σταθερότητα των Rho πρωτεϊνών εξαρτάται από τον διαφορετικό εντοπισμό τους στα μεμβρανικά σωματίδια. Η μονογλυκοζυλίωση των Rho από τις τοξίνες TcdA (clostridium difficile toxin A) και TcdB οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της RhoB σε NIH 3T3 ινοβλάστες, ενώ αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για την RhoA κατόπιν επίδρασης με TcdB (70).

Μεταγραφική ρύθμιση της RhoA

Ένας μεταγραφικός παράγοντας που έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της RhoA είναι ο παράγοντας Myc. Ο Myc αλληλεπιδρά με τον παράγοντα Skp2 για την επαγωγή της μεταγραφής της RhoA επιστρατεύοντας τους

παράγοντες Miz1 και p300 στον υποκινητή της. Υπερέκφραση του συμπλόκου Myc-Skr2-Miz1 έχει βρεθεί σε μεταστατικούς καρκίνους και σχετίζεται με την έκφραση της RhoA. Η έλλειψη αυτών των στοιχείων επηρεάζει την έκφραση της και αναστέλλει, επίσης, την κυτταρική μετανάστευση, διήθηση και μετάσταση σε καρκίνο μαστού. Οι Chan et al έδειξαν ότι ο Myc προσδένεται στα δύο εγγύς E-boxes του υποκινητή της RhoA σε κύτταρα 293T. Επίσης, η αποσιώπηση του Myc μείωσε την έκφραση της RhoA σε κύτταρα Rat1, ενώ η υπερέκφρασή του οδήγησε σε αύξησή της σε κύτταρα MDA-MB-231 (71).

Δύο άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την έκφραση της RhoA είναι οι STAT6 και NF-κB. Οι Goto et al (72) έδειξαν ότι μεταλλάξεις στις εγγύς θέσεις πρόσδεσης των παραγόντων STAT6 και NF-κB μείωσε την ενεργότητα του υποκινητή της RhoA, υποδεικνύοντας ότι οι STAT6 και NF-κB είναι σημαντικοί για την επαγωγή της έκφρασής της από την IL-13 και τον TNF-α σε ανθρώπινα λεία μυϊκά κύτταρα βρόγχων. Και οι δύο αποτελούν κυτοκίνες μείζονος σημασίας στην παθογένεση του αλλεργικού βρογχικού άσματος. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν από τους Chiba et al (73) οι οποίοι έδειξαν ότι ο υποκινητής της RhoA στον επίμυ περιέχει μία θέση πρόσδεσης για τον παράγοντα STAT6 και ότι η έκφραση της RhoA σχετίζεται πιθανώς με το μονοπάτι IL-13-JAK1-STAT6 στους λείους μύες των βρόγχων σε ασθματικούς επίμυες.

Ο μεταγραφικός παράγοντας GCF2 (GC-binding factor 2) λειτουργεί ως μεταγραφικός καταστολέας που προσδένεται σε GC πλούσιες περιοχές των υποκινητών. Ο παράγοντας αυτός δρα στη ρύθμιση της έκφρασης της RhoA με αποτέλεσμα την αποδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης σε καρκινικά κύτταρα (74). Ο ATF-1 (Activating Transcription Factor 1), επίσης, προσδένεται στο εγγύς στοιχείο CRE (cAMP-response element) του υποκινητή της RhoA επάγοντας την έκφρασή της σε Swiss 3T3 ινοβλάστες και αορτικά λεία μυϊκά κύτταρα (75). Οι Kaarbø et al αναφέρουν ότι η ενεργότητα του υποκινητή της RhoA αυξάνεται κατά τη διαφοροποίηση εμβρυϊκών καρκινικών κυττάρων προς καρδιομυοκύτταρα υπογραμμίζοντας ότι πολλά στοιχεία πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (FLI , TG1F, E2F, AHR-ARNT, AP4, H1F-1, AP2, ZF5 και NF1) που ανιχνεύονται στον υποκινητή της RhoA εμπλέκονται είτε στην πρώιμη καρδιακή ανάπτυξη είτε/και στην πρώιμη εμβρυογένεση (76). Τέλος, υπάρχουν κάποια miRNAs που στοχεύουν τη

RhoA, όπως τα miR-31, miR-125a-3p, miR-133a και miR-155 (77-81), ενώ το miR-151 καταστέλλει την έκφραση της RhoGDIα, με αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργοποίηση της RhoA (82).

Μεταγραφική ρύθμιση της RhoB

Η RhoB, σε αντίθεση με τη RhoA και την RhoC, συνήθως υποεκφράζεται σε ανθρώπινους καρκίνους και η έκφρασή της σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με την επιθετικότητα του καρκίνου. Η RhoB δρα ως ογκοκαταστολέας καθώς ενεργοποιείται ως απόκριση σε πολλά ερεθίσματα στρες όπως η βλάβη του DNA ή η υποξία και έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου, την διήθηση και έχει αποπτωτική δράση. Έχει βρεθεί ότι μετασηματισμένα κύτταρα που έχουν έλλειψη στην RhoB δεν οδηγούνται σε απόπτωση μετά από βλάβη στο DNA, ενώ η εκτοπική έκφραση της πρωτεΐνης διασώζει το φαινότυπο. Πιθανώς ο ρόλος της RhoB στην απόπτωση ασκείται μέσω της αναστολής της κινάσης Akt (protein kinase B) που επάγει την επιβίωση των κυττάρων (54,83,84). Η έκφραση της RhoB ρυθμίζεται από εξωκυτταρικά ερεθίσματα όπως η υπεριώδης ακτινοβολία (85-87), οι αυξητικοί παράγοντες (ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας και ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων σε ινοβλάστες Rat-2) (88), οι κυτοκίνες και τα ογκογονίδια (84-88). Η RhoB είναι σχετικά ασταθής με χρόνο ημίσειας ζωής για το mRNA 20 λεπτά και 2 ώρες για την πρωτεΐνη (60,89).

Ο υποκινητής της RhoB ρυθμίζεται από τις Rho GTPάσες. Οι μικρές GTPάσες Rac αυξάνουν την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB σε ινοβλάστες, ενώ η συστασιακά ενεργή RhoA την καταστέλλει. Το γονίδιο της RhoB υπόκειται επίσης σε αυτορρύθμιση, καθώς η αγρίου τύπου RhoB καταστέλλει την ενεργότητα του υποκινητή της. Ωστόσο, η Cdc42 δεν επηρεάζει την ενεργότητα του υποκινητή ενώ η Rho-GDI την επάγει έντονα (85).

Ο TGFβ-1 επάγει τη μεταγραφή της RhoB μέσω ενεργοποίησης των κυτταροπλασματικών Smad3/4 και MEK/ERK μονοπατιών σε ανθρώπινα HaCaT κερατινοκύτταρα. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού MEK/ERK απαιτείται για την πρόσδεση της Smad3 σε μία νέα, μη κλασική, θέση πρόσδεσης στον εγγύς υποκινητή

της RhoB, η οποία αλληλοεπικαλύπτεται με ένα ρυθμιστικό στοιχείο CCAAT στο οποίο προσδένεται συστασιακά ο μεταγραφικός παράγοντας Nuclear Factor Y (90). Ο NFY (Nuclear transcription factor Y) αποτελεί ένα τριμερές σύμπλοκο (NFYA, NFYB και NFYC) που προσδένεται στα στοιχεία CCAAT των υποκινητών πολλών γονιδίων. Η πρόσδεση του στο DNA χαρακτηρίζεται από υψηλή ειδικότητα και συγγένεια. Ο NFY δρα καθιστώντας την χρωματίνη προσβάσιμη σε άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (91,92). Οι πρωτεΐνες C/EBP (CCAAT enhancer binding brotein) αλληλεπιδρούν επίσης με το στοιχείο CCAAT (93).

Το στοιχείο CCAAT παίζει επίσης ρόλο στη ρύθμιση της RhoB και από άλλους παράγοντες, όπως στην καταστολή της από την αποακετυλάση της ιστόνης 1 (HDAC1) και στην επαγωγή της από τον ATF-2 και την p38 MAPK. Η p38 MAPK επιστρατεύει τους παράγοντες c-Jun και p300 στο CCAAT box και οδηγεί στην επαγωγή της έκφρασης της RhoB μετά από επίδραση με UV ακτινοβολία (83,87,94).

Η RhoB επάγεται, ακόμα, από ένα σύνολο αντικαρκινικών φαρμάκων όπως το KR28, τους αναστολείς FTIs (farnesyltransferase inhibitors) και GGTIs (geranylgeranyltransferase inhibitors), τον παράγοντα NSC126188 και την TSA που αποτελεί αναστολέα της HDAC (95-102). Το ίδιο συμβαίνει με φαρμακευτικούς παράγοντες όπως η N-methyl-N-nitrosourea (MNU), η σισπλατίνη, η υδροξουρία, η δεξαμεθαζόνη και το γαλλικό οξύ (86,103). Η έκφραση της RhoB ρυθμίζεται επίσης από ογκογονίδια τα οποία την καταστέλλουν. Τέτοια γονίδια είναι τα H-Ras, N-Ras, K-Ras, EGFR και ErbB2 (84,104). Επίσης, αναφέρεται ότι η υπερέκφραση της RhoB μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στη εξέλιξη του καρκίνου του προστάτη σε μία ανεξάρτητη από τα ανδρογόνα μορφή (105). Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι ο υποκινητής της περιέχει ποικίλο αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR) οι οποίες φαίνεται να παίζουν ρόλο στη μεταγραφική καταστολή του γονιδίου (106). Επίσης, η χρωματινική δομή του υποκινητή της RhoB αλλάζει κατά τη διάρκεια της γήρανσης με ιστοειδικό τρόπο, μέσω της δράσης της HDAC1 (107). Τέλος, τα miRNA-21 και miR-19 καταστέλλουν την έκφραση της RhoB (108-111).

Rho πρωτεΐνες και βλαστικά κύτταρα

Οι Rho GTPases φαίνεται να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο κατά την εμβρυογένεση ελέγχοντας την οργάνωση του κυτταροσκελετού (112,113). Η απώλεια της ενεργότητας των τριών Rho μέσω της RhoGDI προκαλεί εμβρυϊκό θάνατο στους ποντικούς κατά την εμβρυϊκή ημέρα E7, λόγω ατελούς γαστριδίωσης και αδυναμίας μετανάστευσης των κυττάρων. Αντίθετα, οι ποντικοί που έχουν έλλειψη της RhoB πρωτεΐνης είναι βιώσιμοι και γόνιμοι. Οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς και δεν είναι τόσο γόνιμοι όσο οι αγρίου τύπου. Ωστόσο, δεν είναι ακόμα γνωστό εάν οι διαφορές αυτές οφείλονται σε προβλήματα στη μετακίνηση ή στην επιβίωση των κυττάρων (48).

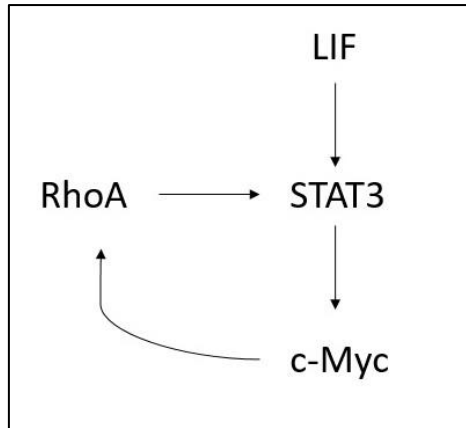
Στα βλαστικά κύτταρα τα επίπεδα έκφρασης της RhoA καθορίζουν την πορεία της διαφοροποίησής τους (lineage commitment) καθώς η RhoA ρυθμίζει το κυτταρικό σχήμα (76,114). Σε παλαιότερη μελέτη είχε δειχθεί ότι η RhoA είναι άφθονη σε αδιαφοροποίητα μεσεγχυματικά εμβρυϊκά κύτταρα ποντικού και ότι τα επίπεδά της πέφτουν κατά τη διάρκεια της μυογένεσης. Η υψηλή έκφραση της RhoA είναι απαραίτητη για τη διατήρηση του στρογγυλού σχήματος των αδιαφοροποίητων κυττάρων (115). Επίσης, αναφέρεται ότι η μετακίνηση των κυττάρων της τροφοβλάστης και η προσκόλλησή της στο ενδομήτριο εξαρτάται από τις Rho πρωτεΐνες και, κυρίως, από την RhoA. Η καταστολή της RhoA εμποδίζει τη μετανάστευση των κυττάρων της τροφοβλάστης. Οι εστίες προσκόλλησης μεταξύ της τροφοβλάστης και του ενδομητρίου περιέχουν υψηλές ποσότητες RhoA και F-ακτίνης κοντά στην πλασματική μεμβράνη. Συνεπώς, η RhoA παίζει σημαντικό ρόλο κατά τα πρώτα στάδια της εμφύτευσης στον άνθρωπο (116). Τέλος, οι Rho πρωτεΐνες είναι σημαντικές κατά την διαδικασία σύμπτυξης του εμβρύου (compaction) που συμβαίνει στο στάδιο των οκτώ κυττάρων του εμβρύου του ποντικού καθορίζοντας την κυτταρική πολικότητα (117,118).

Rho πρωτεΐνες και καρκίνος

Είναι γνωστό ότι οι Rho πρωτεΐνες εμπλέκονται στην καρκινογένεση. Η πιο συνηθισμένη διαταραχή αναφορικά με τις Rho GTPάσες είναι η υπερέκφρασή τους, η οποία εξαρτάται από τα διαφορετικά μικροπεριβάλλοντα των όγκων και γι' αυτό το λόγο είναι αναστρέψιμη (119). Παρόλο που ρυθμίζονται αυστηρά, είναι πιθανό η ρύθμισή τους να διαταραχτεί στον καρκίνο. Η τροποποίηση της ενεργότητάς τους μπορεί να οδηγήσει σε μετάσταση διαταράσσοντας τη συνέχεια της επιθηλιακής δομής, αυξάνοντας έτσι την κινητικότητα των κυττάρων και επάγοντας την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μάζας (57).

Στα καρκινικά κύτταρα, η έκφραση και η ενεργότητα των RhoA, B, και C αλλάζει με διαφορετικούς τρόπους. Υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η έκφραση της RhoA και της RhoC αυξάνεται σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπινων καρκίνων (58,120). Η αποσιώπηση του γονιδίου της RhoC σε μοντέλο ποντικού μειώνει την κινητικότητα των κυττάρων του όγκου και τη μετάσταση (121). Επίσης, έχει παρατηρηθεί αυξημένη RhoC σε παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα (122) και μαζί με την RhoA σε καρκινώματα ωοθηκών, καθώς και σε μεταστατικούς και όψιμου σταδίου όγκους (123). Η RhoA αυξάνεται σε διάφορους ανθρώπινους όγκους όπως αυτούς του εντέρου, του μαστού και του πνεύμονα όπου η εξέλιξη του καρκίνου συνοδεύεται από αύξηση της πρωτεΐνης της RhoA (124).

Ως γνωστόν η κατάσταση της πολυδυναμίας (stemness), που χαρακτηρίζει τα βλαστικά κύτταρα, είναι μία κυτταρική κατάσταση που ανακύπτει επίσης και στον καρκίνο. Μία ένδειξη που συνδέει την δράση της RhoA με την κατάσταση πολυδυναμίας είναι η επαγόμενη από την RhoA φωσφορυλίωση του Stat3 (Εικ. 8). Ο Stat3 είναι ο κύριος παράγοντας μέσω του οποίου δρα ο παράγοντας LIF, ο οποίος είναι απαραίτητος κατά την καλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων προκειμένου αυτά να διατηρούνται πολυδύναμα (58).



Εικόνα 8 : Η RhoA φωσφορυλιώνει την Stat3. Μία πιθανή σύνδεση της RhoA με την κατάσταση πολυδυναμίας είναι η φωσφορυλίωση του Stat3 (58). Συγχρόνως, είναι γνωστό ότι ο παράγοντας Myc ρυθμίζει την έκφραση της RhoA (71).

Η οικογένεια του TGF

Δράσεις της οικογένειας του TGFβ

Η οικογένεια του TGFβ περιλαμβάνει περισσότερα από 30 μέλη: τον TGFβ, την Ακτιβίνη (Activin), τον παράγοντα Nodal, τους BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), την AMH (Anti-Müllerian hormone) και τους GDFs (growth and differentiation factors). Πρόκειται για κυτοκίνες με ευρεία δράση που εμπλέκονται στη μορφογένεση πολλών οργάνων και στην ομοιόσταση ενήλικων ιστών. Τα μέλη της οικογένειας, που βρίσκονται τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα ασπόνδυλα, εκφράζονται σε διάφορους ιστούς και λειτουργούν κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής προκαλώντας ποικίλες βιολογικές αποκρίσεις. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην αυτό-ανανέωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, στη γαστριδίωση, στην διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό, στη διατήρηση της πολυδυναμίας και στην οργανογένεση. Επίσης παίζουν ρόλο στην ομοιόσταση των ενήλικων ιστών (125).

Ο TGFβ ρυθμίζει την κυτταρική προσκόλληση και δρα προσελκύοντας τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα. Δεδομένης της ευρείας δράσης του, η ελαττωματική έκφρασή του σχετίζεται με ένα μεγάλο εύρος παθολογικών καταστάσεων όπως οι

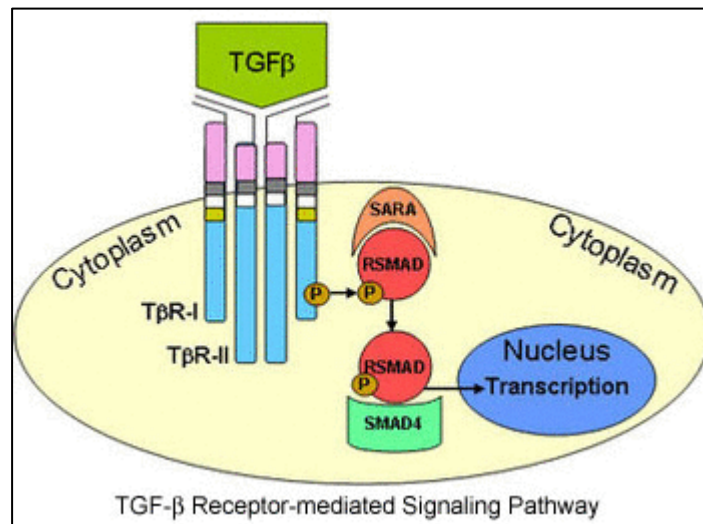
αυτοάνοσες, οι καρδιαγγειακές, οι ινωτικές ασθένειες, καθώς και ο καρκίνος (125). Είναι γνωστό ότι στον καρκίνο ο TGFβ έχει διττό ρόλο καθώς έχει κατασταλτικό ρόλο σε πρώιμα στάδια της καρκινογένεσης και ογκογόνο δράση σε πιο όψιμα στάδια του καρκίνου, αφού καταστέλει το ανοσοποιητικό σύστημα. Από τα μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι του TGFβ, αυτά που είναι πιο συχνά μεταλλαγμένα σε ανθρώπινους καρκίνους είναι η πρωτεΐνη Smad4, και ο υποδοχέας τύπου II. Οι δράσεις του TGFβ εξαρτώνται από τον κυτταρικό τύπο καθώς και το περιβάλλον του κυττάρου (126).

Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ

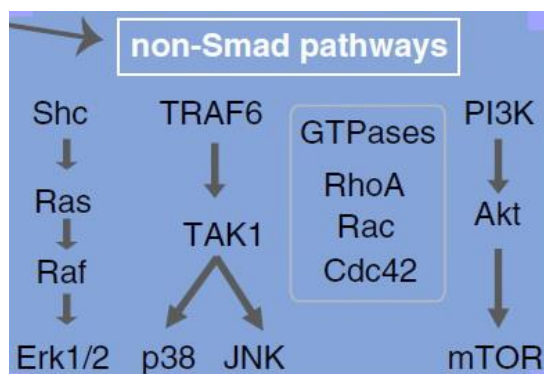
Τα μέλη της οικογένειας του TGFβ υπόκεινται σε έλεγχο σε πολλαπλά επίπεδα. Όλα τα μέλη της οικογένειας μεταφράζονται ως μεγαλύτερα πολυπεπτίδια. Οι πρόδρομες μορφές (latency associated proteins ή LAPs) κάποιων μελών, όπως οι TGFβs, τα καθιστούν ανενεργά και επάγουν την αλληλεπίδρασή τους με κατασταλτικές πρωτεΐνες (latent TGF binding proteins ή LTBP) (127).

Η μεταγωγή του σήματος στον πυρήνα γίνεται μέσω του σχηματισμού ενός συμπλέγματος που αποτελείται από τους υποδοχείς τύπου I (TRI/ ALK 5) και τύπου II (TRII). Οι υποδοχείς αποτελούν κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Υπάρχουν επτά υποδοχείς τύπου I και πέντε τύπου II. Μετά από διέγερση με τον TGFβ, ο συνδέτης έρχεται σε επαφή με τον TRII και στη συνέχεια το σύμπλεγμα υποδοχέα-συνδέτη έρχεται σε επαφή με τον TRI. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα τετραμερές σύμπλοκο όπου ο TRII φωσφορυλιώνει τον TRI και τον ενεργοποιεί. Ακολούθως ο TRI φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες Smads (Εικ. 9).

Εκτός από τις πρωτεΐνες Smad, ο TGFβ ενεργοποιεί και άλλα, ανεξάρτητα μονοπάτια (Εικ. 10). Το μονοπάτι Ras–Raf–MEK–Erk MAPK ενεργοποιείται από τον TGFβ μέσω τυροσινικής φωσφορυλίωσης της ShcA από τον TβR1 χάρη στη διπλή ειδικότητα κινάσης του υποδοχέα. Ο TGFβ επίσης επάγει τη σηματοδότηση από τις p38 και JNK MAPK κινάσες. Επιπλέον, ρυθμίζει τη δράση των μικρών GTPασών Rho, Rac και Cdc42 που ρυθμίζουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού και την γονιδιακή έκφραση. Τέλος, ο TGFβ επάγει την ενεργοποίηση της Akt μέσω της PI3K, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί μονοπάτια που παίζουν ρόλο στην κυτταρική επιβίωση και ανάπτυξη, στην μετανάστευση και στη διαδικασία της διήθησης (40).



Εικόνα 9 : Σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ. Οι συνδέτες προσδένονται στους υποδοχείς του TGFβ, ο υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I, ο οποίος με τη σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις R-Smads.



Εικόνα 10 : Ο TGFβ ενεργοποιεί και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια εκτός των Smad (40).

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (90) έχει δειχθεί ότι ο TGFβ ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είτε άμεσα ενεργοποιώντας το μονοπάτι RhoA/B/ROCK/LIMK2/cofilin, είτε μακροπρόθεσμα επάγοντας το γονίδιο της μικρής RhoB GTPάσης από Smad και non-Smad (MEK/ERK) μονοπάτια σε ινοβλάστες και HaCaT κερατινοκύτταρα.

Οι πρωτεΐνες Smad

Οι πρωτεΐνες Smad χωρίζονται σε τρεις υπο-οικογένειες ανάλογα με τη λειτουργία τους: τις Smad που ρυθμίζονται από τον υποδοχέα (R-Smads), τις Smads διαμεσολάβησης (Co-Smads), και τις ανασταλτικές Smads (I-Smads). Κάθε R-Smad έχει ένα μοτίβο SXS στο καρβοξυτελικό της άκρο και κάθε κατάλοιπο σερίνης αποτελεί στόχο του TRI. Ανάμεσα στις R-Smads, οι Smad2 και Smad3 φωσφορυλιώνονται από τους ALK4, TRI(ALK5), και ALK7 και μετάγουν τα σήματα των TGFβ και Activin/Nodal. Οι ALK1, ALK2, ALK3, και ALK6 ενεργοποιούν τις Smad1, Smad5 και Smad8 που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του BMP.

Μετά την ενεργοποίηση από τον TGFβ, οι R-Smads σχηματίζουν ένα τριμερές σύμπλοκο με την Co-Smad, Smad4. Στη συνέχεια το σύμπλοκο συσσωρεύεται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζει την έκφραση διαφόρων γονιδίων-στόχων του TGFβ. Η έκφραση των I-Smads, δηλαδή των Smad6 και Smad7, επάγεται από τα μέλη της οικογένειας του TGFβ. Οι I-Smads εμποδίζουν τις R-Smads να φωσφορυλιωθούν από

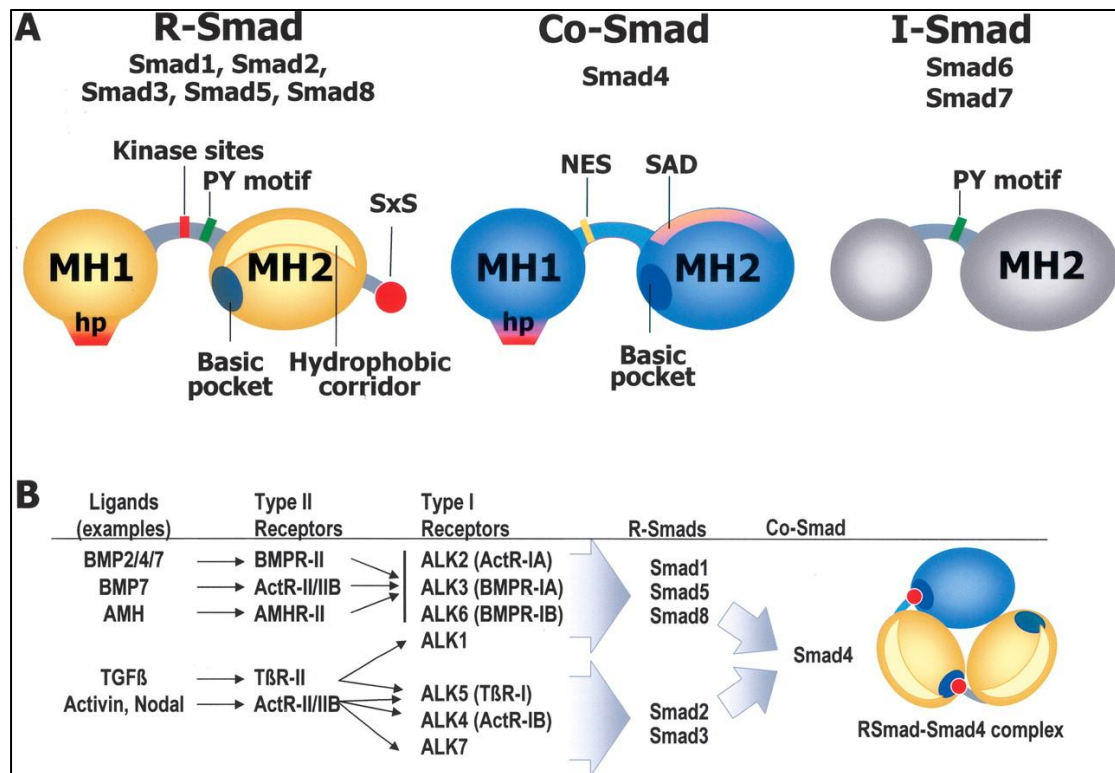
τον TRI, τερματίζοντας έτσι το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ. Η Smad7 ασκεί ανασταλτική δράση τόσο στο μονοπάτι του TGFβ όσο και στο μονοπάτι του BMP, ενώ η Smad6 μπλοκάρει μόνο το δεύτερο. Συγκεκριμένα, η Smad7 μπλοκάρει τη φωσφορυλίωση των R-Smads από τον TRI και οδηγεί στην ουβικιτινίωση του υποδοχέα και στην αποικοδόμησή του από τις λιγάσες ουβικιτίνης Smurf1 και Smurf2.

Τα αμινοτελικά άκρα των Co-Smad και R-Smad (περιοχές MH1) μπορούν να προσδεθούν στην 5'-AGAC-3' αλληλουχία του DNA, γνωστή ως Smad Binding Element (SBE). Εφόσον οι Smads από μόνες τους έχουν ασθενή συγγένεια πρόσδεσης στο DNA, είναι απαραίτητοι και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες για την αλληλεπίδραση με το DNA. Επειδή οι συμπληρωματικοί αυτοί παράγοντες έχουν διαφορετική λειτουργία ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, οι πρωτεΐνες Smad μπορούν να ρυθμίσουν τη μεταγραφή πλήθους γονιδίων με διαφορετικούς τρόπους. Επιπλέον, εκτός των μεταγραφικών παραγόντων, οι Smads μπορούν να αλληλεπιδράσουν και με τροποποιητές της χρωματίνης (128,129).

Οι R-Smads και η Smad4 περιλαμβάνουν δύο πολύ καλά συντηρημένες περιοχές, τις MH1 (Mad Homology Domain 1) και MH2, οι οποίες βρίσκονται στο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο αντίστοιχα (Εικ. 11). Οι δύο αυτές περιοχές χωρίζονται από μία λιγότερο συντηρημένη συνδετική περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης (linker region). Εκτός από την Smad2, η οποία δεν μπορεί να προσδεθεί στο DNA, οι περιοχές MH1 των Smad είναι υπεύθυνες για την πρόσδεσή τους στο DNA. Η ενδιάμεση περιοχή φωσφορυλιώνεται από κινάσες όπως οι MAPKs, η GSK3b και οι CDKs και με αυτόν τον τρόπο μεταφέρει ερεθίσματα από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η περιοχή MH2 μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις Smads με τον υποδοχέα ή με άλλες Smads, είτε με μεταγραφικούς παράγοντες, συνενεργοποιητές και συνκαταστολείς (130).

Σχετικά με την Smad4, φαίνεται να έχει ιδιαίτερο ρόλο ανάμεσα στις Smads λόγω ενός στοιχείου πλούσιου σε κατάλοιπα προλίνης στην συνδετική περιοχή της [Smad4 activation domain (SAD)], το οποίο είναι υπεύθυνο για τη συναρμολόγηση και τη μεταγραφική ενεργοποίηση διαφόρων συμπλοκών Smad-DNA. Η δράση του

SAD, επιπλέον, εξαρτάται από την αλληλεπίδρασή του με την ακετυλοτρανσφεράση p300 (131).



Εικόνα 11 : Οι πρωτεΐνες Smad και τα δομικά τους στοιχεία. (A) Οι πρωτεΐνες Smad αποτελούνται από δύο συντηρημένες περιοχές, MH1 και MH2, και μία μεταβλητή συνδετική περιοχή. Οι RSmads και η Smad4 περιέχουν στην MH1 περιοχή μία β-έλικα για την πρόσδεση τους στο DNA. Οι I-Smads στερούνται της περιοχής MH1. Στις R-Smads και I-Smads η συνδετική περιοχή περιέχει ένα μοτίβο PY (Pro-Tyr) το οποίο αναγνωρίζεται από τις λιγάσες ουβικιτίνης. Η συνδετική περιοχή της Smad4 περιέχει ένα μοτίβο πυρηνικής εξόδου (NES). Η περιοχή MH2 αλληλεπιδρά με τον TR1 (basic pocket) στην περίπτωση των RSmads, αλλά είναι υπεύθυνη και για τον ολιγομερισμό τόσο μεταξύ των RSmads όσο και μεταξύ RSmad/Smad4. Στην περιοχή MH2 των RSmads υπάρχει μία υδρόφοβη περιοχή που χρησιμεύει ως θέση πολλαπλών αλληλεπιδράσεων. **(B)** Παραδείγματα μελών της οικογένειας του TGFβ και η σχέση τους με τους υποδοχείς τύπου II, τύπου I, τις RSmads και την Co-Smad. Το σχήμα απεικονίζει ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο των Smad που αποτελείται από δύο RSmads και μία Smad4 (φαίνεται μόνο η περιοχή MH2) (132).

Ο ρόλος του TGFβ στην EMT

Είναι γνωστό ότι ο TGFβ ασκεί θετικό ρόλο στην διαδικασία της EMT (Epithelial Mesenchymal Transition). Η EMT μπορεί να θεωρηθεί ως μία διαδικασία διαφοροποίησης ή μορφογένεσης μέσω της οποίας δημιουργούνται κατά την εμβρυογένεση νέοι τύποι ιστών. Συγχρόνως η EMT συμβάλλει στην παθογένεση

ασθενειών όπως ο μεταστατικός καρκίνος και η ίνωση. Ο TGFβ επάγει την EMT, κατά την οποία τα στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους επιθηλιακά κύτταρα χάνουν την πολικότητά τους και αποκτούν μεσεγχυματικό και μεταναστευτικό φαινότυπο (125). Σε όλα τα *in vitro* μοντέλα για την EMT ο TGFβ καταστέλλει διάφορες επιθηλιακές πρωτεΐνες, όπως η E-cadherin, η ZO-1 και κάποιες κερατίνες και επάγει την έκφραση μεσεγχυματικών πρωτεϊνών όπως η φμπρονεκτίνη, η α-ακτίνη των λείων μυϊκών κυττάρων και η βιμεντίνη. Επίσης, σύμφωνα με μοντέλα ποντικών, τα καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν ασυνήθιστα υψηλές δόσεις ενεργού TGFβ, ο οποίος ευαισθητοποιεί τόσο τα καρκινικά όσο και τα γειτονικά κύτταρα. Αυτό επιτρέπει στα κύτταρα να ξεφύγουν από την αρχικά κατασταλτική επίδραση του TGFβ, οδηγώντας στην EMT (133).

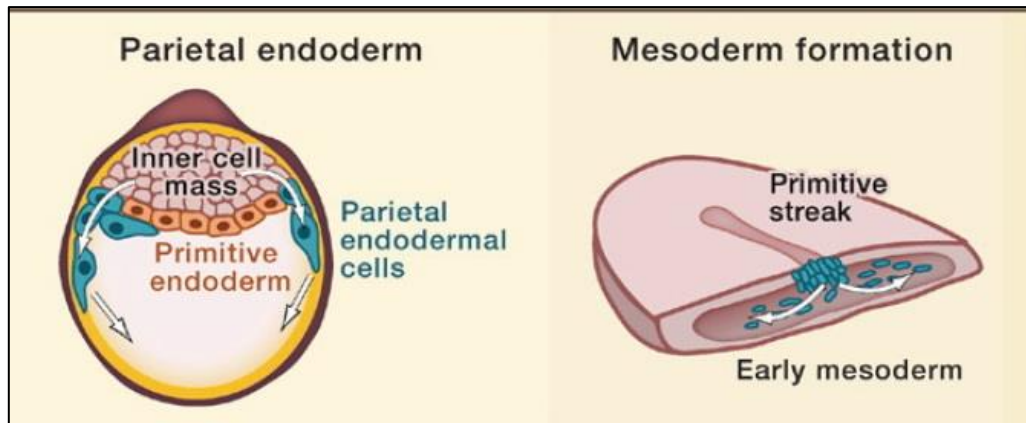
Κατά την εξέλιξη του καρκίνου, η διαδικασία της EMT προσδίδει κακοήθεις ιδιότητες στα καρκινικά κύτταρα συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας και της διεισδυτικότητας. Τα φυσιολογικά και τα μετασχηματισμένα επιθηλιακά κύτταρα που έχουν υποστεί EMT αποκτούν ιδιότητες βλαστικών κυττάρων. Αυτή η σύνδεση ανάμεσα στην EMT και τις βλαστοκυτταρικές ιδιότητες απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο είναι πιθανή η δημιουργία κακοήθων βλαστικών κυττάρων στον καρκίνο (134,135).

Ο ρόλος του TGFβ στη διαδικασία της διαφοροποίησης

Ο ρόλος της EMT στη διαδικασία της διαφοροποίησης

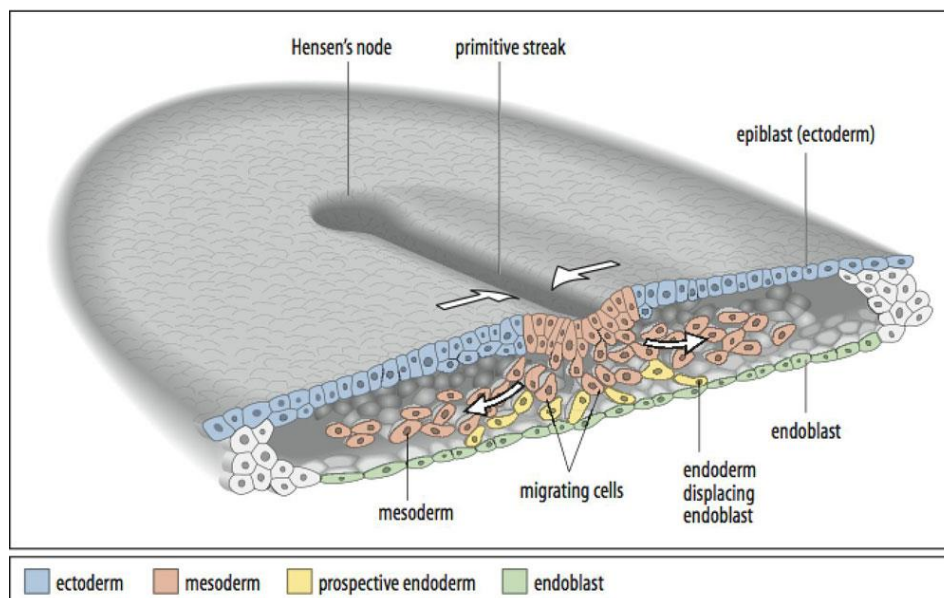
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η διαδικασία της EMT συνδέεται με την επαγωγή της μετάστασης στον καρκίνο. Ωστόσο, κατά τη διαδικασία της εμβρυογένεσης η EMT είναι απαραίτητη για τον καθορισμό του κυτταρικού τύπου (cell fate determination) προκειμένου να επιτευχθεί η οργανογένεση. Πρωτογενής EMT συμβαίνει κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, ακόμη και πριν από την εμφύτευση,

κατά το σχηματισμό του πλευρικού ενδοδέρματος (Εικ. 12) (136). Στη συνέχεια EMT πραγματοποιείται στο στάδιο της γαστριδίωσης (Εικ. 12).



Εικόνα 12 : Επιθηλιομεσεγγυματική μετάβαση κατά την εμβρυογένεση. Πρωτογενής EMT συμβαίνει νωρίς κατά την εμβρυογένεση, ακόμα και πριν την εμφύτευση όπως κατά τον σχηματισμό του πλευρικού ενδοδέρματος (parietal endoderm) στο ποντίκι. Η πρώτη EMT μετά την εμφύτευση είναι αυτή που συμβαίνει από τα μεσοδερμικά προγονικά κύτταρα κατά τη γαστριδίωση (136).

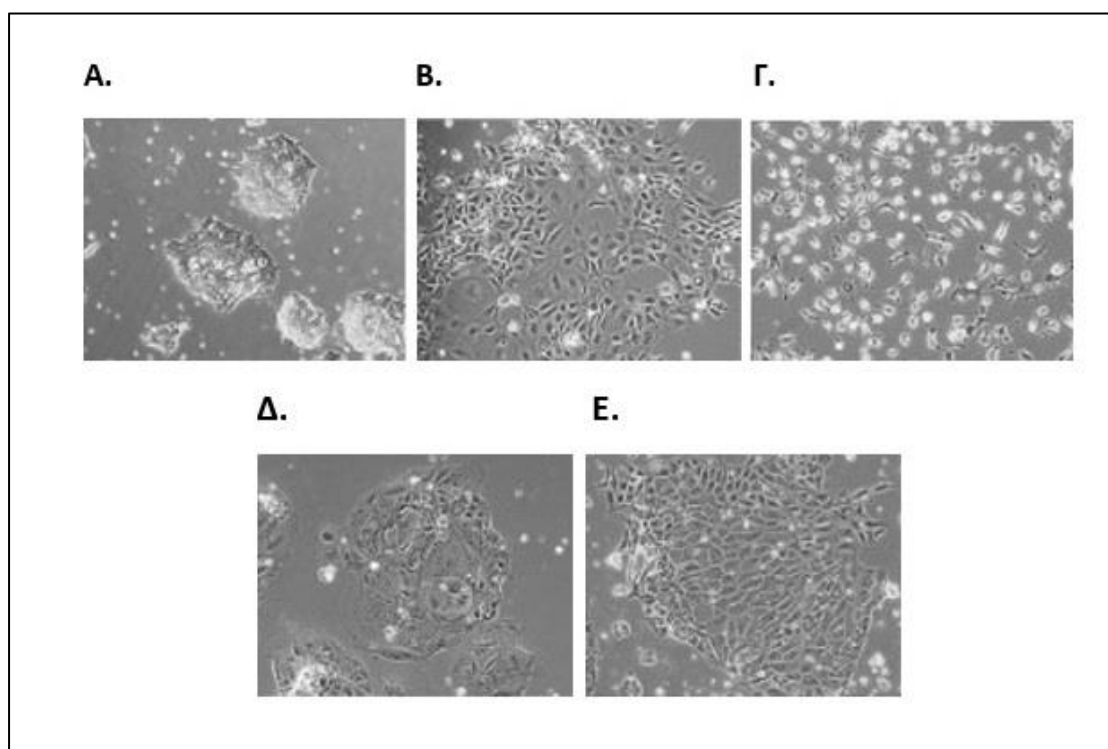
Αρχικά σχηματίζεται μία παροδική δομή που ονομάζεται αρχική γραμμή (primitive streak) κατά μήκος της οποίας μεταναστεύουν μη διαφοροποιημένα κύτταρα της επιβλάστης και εγκαθίστανται σε νέες περιοχές του εμβρύου οι οποίες θα εξελιχθούν σε μεσόδερμα και ενδόδερμα (Εικ. 13).



Εικόνα 13 : Μετανάστευση των κυττάρων της επιβλάστης για τον σχηματισμό του μεσοδέρματος (ροζ) και του ενδοδέρματος (κίτρινο).

Η παραγωγή του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος εξαρτάται από την επιτυχή ολοκλήρωση της EMT και τη μετανάστευση των κυττάρων μακριά από την αρχική γραμμή. Μέσω της EMT τα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα μετατρέπονται σε κινητικά κύτταρα (137). Τα κύτταρα που θα παραμείνουν στην επιβλάστη θα δώσουν το επιφανειακό και το νευρικό εκτόδερμα (138).

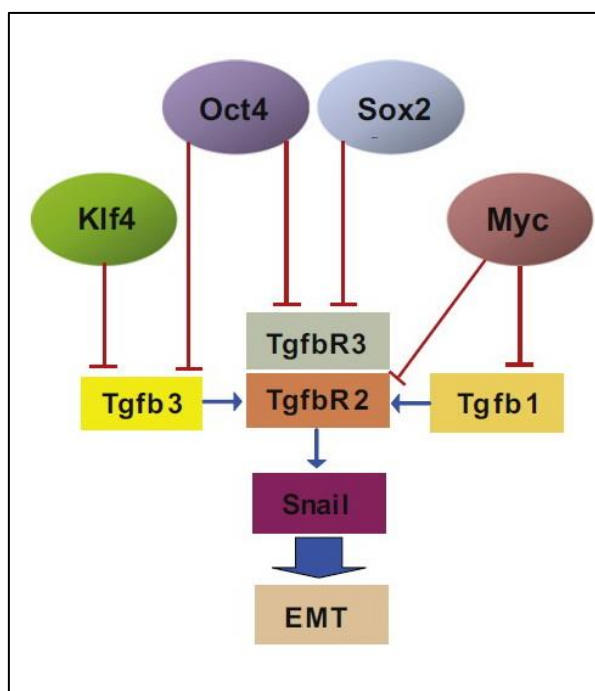
Η οπίσθια, η μέση και η πρόσθια περιοχή της αρχικής γραμμής παρουσιάζουν διαφορετική γονιδιακή έκφραση καθώς και διαφορετικές αναπτυξιακές δυνατότητες. Το ενδόδερμα αναπτύσσεται από τα κύτταρα της επιβλάστης που μεταναστεύουν στην πιο πρόσθια περιοχή της αρχικής γραμμής (Εικ. 14). Σε αντίθεση με το μεσόδερμα και το ενδόδερμα, το εκτόδερμα προέρχεται από την πρόσθια περιοχή της επιβλάστης που δεν εισέρχεται στην αρχική γραμμή.



Εικόνα 14 : Διαφοροποίηση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού. Α. αδιαφοροποίητα ES **Β.** πρωτογενή ενδοδερμικά κύτταρα **Γ.** πλευρικά ενδοδερμικά κύτταρα **Δ.** τροφοβλαστικά κύτταρα (trophoblast giant cells) **ΣΤ.** τροφοβλαστικά κύτταρα (trophoblast stem cells) (1).

Αναλύσεις έκφρασης έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας του TGFβ είναι σημαντικά για τα παραπάνω αναπτυξιακά στάδια. Η οικογένεια του TGFβ παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων όσο και στη διαφοροποίησή τους προς διάφορους κυτταρικούς τύπους ελέγχοντας την έκφραση κύριων ρυθμιστικών γονιδίων (23). Επιπλέον, η κατά τόπους έκφραση των αναστολέων του μονοπατιού συνεισφέρει στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των τριών βλαστικών στρωμάτων (7).

Τέλος, είναι γνωστό ότι η καταστολή του TGFβ είναι απαραίτητη προκειμένου να παραχθούν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα [induced pluripotent stem cells (iPSCs)]. Οι ινοβλάστες, που είναι αποτέλεσμα EMT, μπορούν να επαναπρογραμματιστούν προς iPSCs μέσω εξωγενών μεταγραφικών παραγόντων (Εικ. 15). Ο επαναπρογραμματισμός απαιτεί την αντίστροφη διαδικασία (MET:mesenchymal-to-epithelial transition) που προκύπτει από την καταστολή της EMT. Για να γίνει αυτό, είναι απαραίτητη η καταστολή της έκφρασης του TGFβ1 και του υποδοχέα του TRII. Δεδομένων των παραπάνω, η αναστολή του Alk5 και η Smad7 μπορεί να υποκαταστήσει τους παράγοντες Sox2 και c-Myc κατά την παραγωγή των iPSCs (139).



Εικόνα 15 : Ο επαναπρογραμματισμός ινοβλαστών προς iPSCs απαιτεί την καταστολή της EMT. Εξωγενείς παράγοντες καταστέλλουν τον TGFβ εμποδίζοντας έτσι την EMT (139).

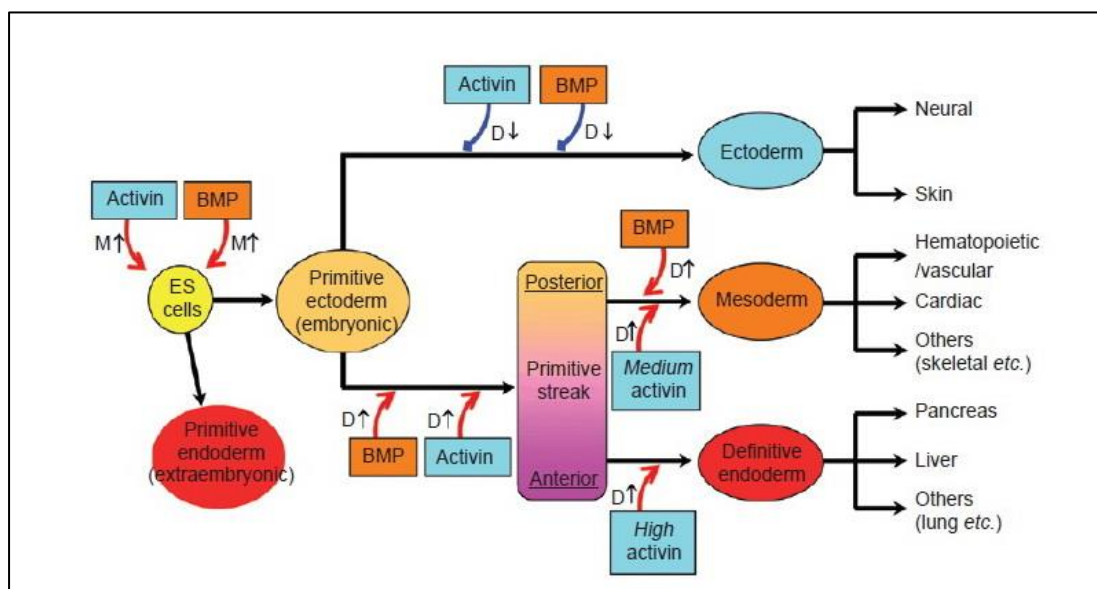
Ο ρόλος του TGFβ στον καθορισμό του κυτταρικού τύπου (cell fate determination)

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα μέλη της οικογένειας του TGFβ εμπλέκονται στη διαδικασία της πρώιμης εμβρυογένεσης και στη διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων. Συγκεκριμένα, δρουν ως μορφογόνα παρέχοντας πληροφορίες για τον καθορισμό των αξόνων, αρχικά, αλλά και του τύπου των κυττάρων που θα σχηματιστούν στη συνέχεια (cell fate), των ιστών και ολόκληρων των οργάνων (128). Ο καθορισμός των αξόνων εξαρτάται από την ποσότητα, τον χρόνο και τον τόπο έκκρισης (διαβάθμιση κλίσης) των παραγόντων αυτών. Το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ ασκεί κατά κύριο λόγο μεταγραφικό έλεγχο σε ομοιοστατικά γονίδια.

Ο ρόλος των μελών της οικογένειας του TGFβ αποδεικνύεται σε πολλές μελέτες διαφοροποίησης (Εικ. 16). Για παράδειγμα η προσθήκη BMP σε συνθήκες απουσίας ορού οδήγησε στο σχηματισμό μεσοδερμικών κυττάρων (134). Η ενεργοποίηση του Nodal έπειτα από προσθήκη Ακτιβίνης προκάλεσε τον σχηματισμό κυττάρων της πρόσθιας περιοχής της αρχικής γραμμής, και τον επακόλουθο σχηματισμό ενδοδέρματος ή μεσοδέρματος ανάλογα με τη συγκέντρωση της Ακτιβίνης. Το μεσόδερμα σχηματίζεται παρουσία BMP και μεσαίων επιπέδων Ακτιβίνης και Nodal, ενώ αντίθετα η διαφοροποίηση προς ενδόδερμα επάγεται από υψηλά επίπεδα Ακτιβίνης και Nodal απουσία ορού. Παρά τον ρόλο της Ακτιβίνης και του Nodal στη διατήρηση της πολυδυναμίας των ESCs, οι παράγοντες αυτοί δρουν επάγοντας τη διαφοροποίηση προς μεσενδόδερμα, τον κοινό πρόγονο του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος (140). Σε αντίθεση με τους παράγοντες Ακτιβίνη/Nodal, ο BMP επάγει τον σχηματισμό του οπίσθιου πληθυσμού των κυττάρων της αρχικής γραμμής.

Τα νευρικά κύτταρα καθώς και το δέρμα προέρχονται από το εκτόδερμα. Ο σχηματισμός του εκτοδέρματος αναφέρεται συχνά ως το “προεπιλεγμένο” (default) μονοπάτι, αφού το νευροεκτόδερμα αναπτύσσεται αυτόματα απουσία ορού ή οποιουδήποτε επαγωγικού παράγοντα. Η συνεργιστική δράση του Noggin (αναστολέας του BMP) με τον SB-431542 (αναστολέας της Ακτιβίνης, του TGFβ και του Nodal) αρκεί για να επάγει τη νευρική διαφοροποίηση σε hESCs και iPSCs

(141,142). Συγκεκριμένα για τον BMP είναι γνωστό ότι αναστέλλει την νευρική διαφοροποίηση στα πρώιμα στάδια της γαστριδίωσης, ενώ την επάγει σε πιο όψιμα στάδια. Επίσης, ενεργοποιεί το σχηματισμό επιδερμικών κυττάρων από mESCs (149). Τέλος, σχετικά με τον ρόλο του BMP κατά την εμβρυογένεση, αναφέρεται ότι ποντίκια χωρίς τον υποδοχέα του BMP (ALK-3) παρουσιάζουν μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων της επιβλάστης (143).



Εικόνα 16 : Ο ρόλος των μελών της οικογένειας του TGFβ στη διατήρηση και διαφοροποίηση των ESCs. Τα βέλη προς τα πάνω υποδεικνύουν την επαγωγή, ενώ τα βέλη προς τα κάτω την αναστολή από τα μέλη της οικογένειας στη διατήρηση (M) και στη διαφοροποίηση (D) των ESCs και των παραγώγων τους (134).

Η παραγωγή καρδιομυοκυττάρων από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος πολλών ερευνητικών ομάδων, καθώς θα έχει μεγάλη κλινική σημασία για τη θεραπεία καρδιακών ασθενειών όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η Ακτιβίνη και ο BMP4 έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση hESCs προς καρδιομυοκύτταρα (144) καθώς επάγουν τον σχηματισμό μεσοδερμικών κυττάρων τα οποία στη συνέχεια θα διαφοροποιηθούν προς καρδιακά κύτταρα. Η δράση τους είναι καθοριστικής σημασίας όταν προστίθενται σε πρώιμο στάδιο της διαφοροποίησης. Επίσης, ο παράγοντας Nodal μαζί με τον TGFβ2 επάγουν τον σχηματισμό πρόδρομων καρδιακών κυττάρων από εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα σε πρώιμο στάδιο (145).

Ακόμη, υπάρχουν λίγες μελέτες σχετικά με τη δράση του TGFβ στα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα CGR8 και τη διαφοροποίηση αυτών προς καρδιομυοκύτταρα. Επώαση των CGR8 με TGFβ1 ή BMP2 οδήγησε σε αυξημένη έκφραση μεσοδερμικών και καρδιακών γονιδίων-δεικτών, όπως του γονιδίου Brachyury (16,134,146). Σε άλλη μελέτη, ο TGFβ2 και όχι οι TGFβ1 και TGFβ3, αύξησε τον πολλαπλασιασμό εμβρυοειδών σωματιδίων (EBs) όπως επίσης και τη διαφοροποίησή τους σε ρυθμικά κύτταρα. Σε 17 ημέρες, το 49% των EBs που είχαν επωαστεί με τον TGFβ2 εμφάνισαν ρυθμό (147). Τέλος, η ενεργοποίηση της Smad2 από τους παράγοντες Nodal/Cripto είναι απαραίτητη για την επαγωγή της πρώιμης ενδοδερμικής και μεσοδερμικής διαφοροποίησης. Αντίθετα, σε όψιμο στάδιο οι παράγοντες TGFβ/Ακτιβίνη ρυθμίζουν αρνητικά την καρδιομυογένεση μέσω της ενεργοποίησης της Smad2 (148).

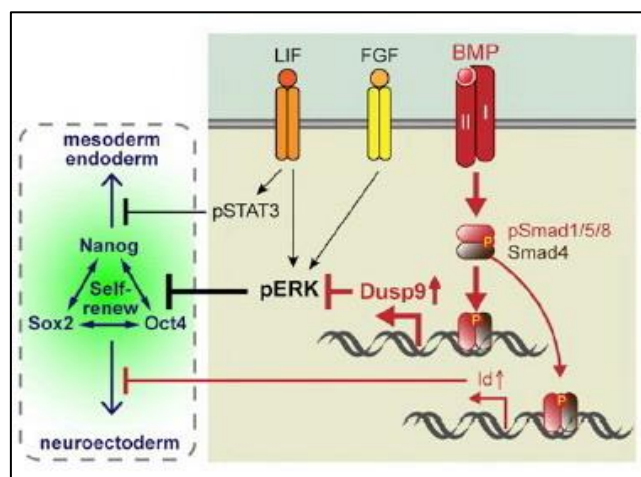
Σχετικά με τη διαφοροποίηση προς ενδόδερμα, οι Gouon-Evans et al. (149) δημιούργησαν έναν πληθυσμό ενδοδερμικών προγονικών κυττάρων καλλιεργώντας mESCs παρουσία Ακτιβίνης και απουσία ορού και διαφοροποίησαν περαιτέρω τα κύτταρα προς ηπατικά με BMP4, Ακτιβίνη και FGF (fibroblast growth factor). Επίσης, οι Shiraki et al. (150) πέτυχαν διαφοροποίηση προς παγκρεατικά κύτταρα χρησιμοποιώντας BMP4 και Ακτιβίνη σε διάφορα βήματα της διαδικασίας.

Διαφορές στη δράση των μελών της οικογένειας του TGFβ στον άνθρωπο και το ποντίκι

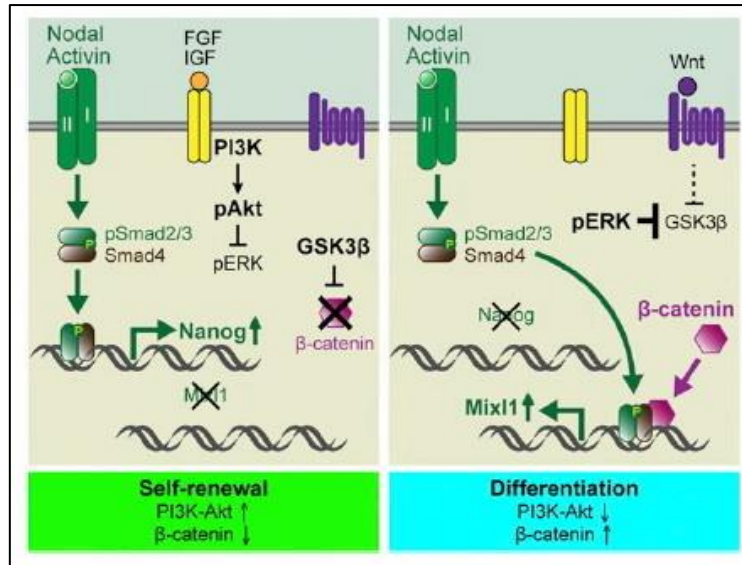
Το αν τα ESCs θα παραμείνουν πολυδύναμα ή όχι εξαρτάται από ενδογενείς αλλά και εξωγενείς παράγοντες. Στους ενδογενείς παράγοντες περιλαμβάνονται η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών καθώς και κυρίαρχοι μεταγραφικοί παράγοντες όπως οι Tcf3, Nanog, Oct4, και Sox2. Οι εξωγενείς παράγοντες, ωστόσο, που καθορίζουν την διατήρηση της πολυδυναμίας διαφέρουν μεταξύ των mESCs και hESCs. Για τα mESCs είναι απαραίτητοι οι παράγοντες LIF και BMP (Εικ. 17, 18), ενώ τα hESCs χρειάζονται τον παράγοντα FGF (fibroblast growth factor) και τη σηματοδότηση Ακτιβίνης/Nodal (151).

Στα mESCs ο LIF καταστέλλει τη διαφοροποίηση προς μεσόδερμα και ενδόδερμα, ενώ ο BMP καταστέλλει τη διαφοροποίηση προς νευροεκτόδερμα (20). Το σημείο σύγκλισης των δύο παραγόντων είναι η ρύθμιση του ERK (extracellular signal-regulated kinase). Η δράση του ERK είναι σημαντική στη ρύθμιση της διαφοροποίησης καθώς χαμηλή ενεργότητα διατηρεί την ικανότητα αυτό-ανανέωσης των ESCs (152), ενώ υψηλή ενεργότητα του ERK οδηγεί σε διαφοροποίηση (Εικ. 17, 18) (153). Συγκεκριμένα, ο LIF ενεργοποιεί το μονοπάτι του ERK μέσω του gp130 στα mESCs (154) και ο BMP το αναστέλλει επάγοντας την έκφραση της *Dusp9* οδηγώντας σε μία ισορροπημένη ενεργότητα του ERK και διασφαλίζοντας έτσι την πολυδυναμία των κυττάρων (Εικ. 17) (155).

Συνεπώς, ο BMP είναι σημαντικός για τη διατήρηση της πολυδυναμίας μόνο στα ποντίκια. Οι αντίθετοι ρόλοι του BMP στα εμβρυϊκά κύτταρα του ποντικού και του ανθρώπου οφείλονται πιθανώς στα αναπτυξιακά στάδια τα οποία αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα αυτά. Τα hESCs θεωρούνται αντίστοιχα με τα κύτταρα της επιβλάστης, ενώ τα mESCs μοιάζουν περισσότερο με την εσωτερική κυτταρική μάζα που θεωρείται μία πιο αρχέγονη κατάσταση (naive state) (22).



Εικόνα 17 : Ο LIF και ο BMP συνεργάζονται για να διατηρήσουν την αυτό-ανανέωση των mESCs. Οι υποδοχείς τυροσινικής κινάσης, όπως οι FGFs, ενεργοποιούν τυπικά το μονοπάτι MAPK/ERK και επάγουν τη διαφοροποίηση. Ο BMP επάγει τις Smad1/5/8. Ένας από τους κεντρικούς στόχους του είναι μία φωσφατάση του ERK, η *Dusp9*. Η *Dusp9* καταστέλλει την ενεργότητα του ERK υποστηρίζοντας την πολυδυναμία. Μέσω της ταυτόχρονης ενεργοποίησης του γονιδίου *Id* από τον BMP και του STAT3 από τον LIF, αυτοί οι δύο παράγοντες επάγουν περαιτέρω την πολυδυναμία αναστέλλοντας την νευροεκτοδερμική και μεσενδοδερμική διαφοροποίηση αντίστοιχα (127).



Εικόνα 18 : Η Ακτιβίνη, ο Nodal και το μονοπάτι PI3K/Akt συνεργάζονται για να διατηρήσουν την πολυδυναμία στα hESCs. Οι Ακτιβίνη και ο Nodal επάγουν τις Smad2/3 και ένα γονίδιο-κλειδί για τα ESCs, το Nanog. Η ενεργοποίηση του PI3K/Akt επιτυγχάνεται μέσω αυξητικών παραγόντων όπως FGF και IGFs, πράγμα που οδηγεί σε καταστολή του ERK. Όταν η σηματοδότηση μέσω PI3K/Akt μειώνεται, ο ERK ενεργοποιείται και καταστέλλει την κίνηση GSK3b. Αυτό οδηγεί στην σταθεροποίηση της β-κατενίνης, η οποία αλληλεπιδρά με τις pSmad2/3-Smad4 επάγοντας τη μεταγραφή γονιδίων που επάγουν τη διαφοροποίηση (127).

Δράση των Smad πρωτεϊνών στη διαδικασία της διαφοροποίησης

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που επιβεβαιώνουν τον ρόλο των Smad πρωτεϊνών στην εμβρυογένεση. Έμβρυα ποντικών στα οποία είχε γίνει αποσιώπηση της Smad 4 εμφάνισαν ελλιπή πολλαπλασιασμό των κυττάρων της επιβλάστης και καθυστερημένη ανάπτυξη της ICM (156). Οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 εκφράζονται στο έμβρυο του ποντικού από το στάδιο των τεσσάρων κυττάρων και καθορίζουν την πορεία της διαφοροποίησης με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Συγκεκριμένα, η Smad2 εκφράζεται σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες στο πρώιμο έμβρυο από ό, τι η Smad3. Ποντίκια ελλιπή για τις δύο πρωτεΐνες στερούνται μεσοδέρματος και αποτυγχάνουν να μπουν στο στάδιο της γαστριδίωσης (157-159).

Σε ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της πρώιμης διαφοροποίησης, η σηματοδότηση από τις Smad 2/3 μειώνεται ενώ η σηματοδότηση από τις Smad 1/5 ενεργοποιείται. Επίσης, έλλειψη του υποδοχέα του TGFβ που μεσολαβεί τη σηματοδότηση από τις Smad 1/5 προκαλεί μειωμένο πολλαπλασιασμό

των κυττάρων της επιβλάστης στο ποντίκι (158). Η φωσφορυλίωση των Smad2/3 επάγει την έκφραση του γονιδίου Nanog και είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ICM του εμβρύου του ποντικού. Ωστόσο, αναφέρεται ότι η ενεργοποίησή του δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της πολυδυναμίας των mESCs, αλλά η αναστολή του μονοπατιού από τον SB-431542 είχε ως αποτέλεσμα τη μειωμένη έκφραση γονιδίων-δεικτών πολυδυναμίας (158,160). Οι Vallier et al. αναφέρουν πως η Ακτιβίνη και ο Nodal ενδέχεται να διατηρούν την πολυδυναμία σε hESCs χωρίς να επάγουν τη μεσενδοδερμική διαφοροποίηση. Μετά την αναστολή του μονοπατιού από τον SB-431542, παρατήρησαν ότι αυξάνεται έντονα η έκφραση του γονιδίου SIP1 (Smad-interacting protein 1). Όταν το μονοπάτι είναι ενεργό, οι Smad2/3 μαζί με το Nanog και τον Oct4 καταστέλλουν την έκφραση του SIP1. Αντίθετα, όταν το μονοπάτι καταστέλλεται, η αυξημένη SIP1 καταστέλλει περαιτέρω τα υφιστάμενα επίπεδα της Ακτιβίνης και του Nodal, μειώνοντας έτσι την ικανότητά τους να επάγουν τη διαφοροποίηση (160).

Ο παράγοντας Nodal εμπλέκεται επίσης στη διατήρηση των χαρακτηριστικών των ESCs. Στο ποντίκι, ο Nodal εκφράζεται σε όλη την επιβλάστη πριν το στάδιο της γαστριδίωσης και στη συνέχεια περιορίζεται ταχέως στο οπίσθιο τμήμα του εμβρύου σημαίνοντας έτσι την περιοχή που θα σχηματιστεί η αρχική γραμμή (primitive streak) (157). Έμβρυα ποντικών ελλειπτικών για τον παράγοντα Nodal ή για τις Smad2/3 σχηματίζουν μία πολύ μικρή επιβλάστη με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Oct4 (10,14). Στα hESCs η σηματοδότηση από τους Nodal/pSmad2/3 και η αναστολή της GSK3b είναι επαρκείς για τη διατήρηση της πολυδυναμίας (161).

Τέλος, σε άλλη μελέτη, η αναστολή του μονοπατιού Ακτιβίνης/Nodal/TGFβ από την Smad7 ή τον SB-431542 μείωσε δραματικά τον πολλαπλασιασμό εμβρυϊκών κυττάρων ποντικού χωρίς να μειώσει την πολυδυναμία τους. Αντίθετα, η αναστολή του BMP δεν είχε παρόμοια αποτελέσματα. Σε καλλιέργεια απουσία ορού η προσθήκη Ακτιβίνης ή Nodal, αλλά όχι TGFβ ή BMP, αύξησε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων χωρίς να επηρεάζει την πολυδυναμία τους, υποδηλώνοντας ότι οι ενδογενείς παράγοντες Ακτιβίνη και Nodal προάγουν την αυτό-ανανέωση των κυττάρων (162).

ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών μεταγραφικής ρύθμισης των μικρών Rho GTPασών RhoA και RhoB. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων σε φυσιολογικά (CGR8) και καρκινικά (P-19) βλαστικά κύτταρα καθώς και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επίσης, επιχειρήθηκε μία λειτουργική ανάλυση των υποκινητών των δύο γονιδίων προκειμένου να εντοπιστούν πιθανά ρυθμιστικά στοιχεία που είναι σημαντικά για την μεταγραφική τους ρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα. Τέλος, διερευνήθηκε η πιθανότητα μεταγραφικής αυτορρύθμισης των RhoA και RhoB γονιδίων.

Ένας ακόμα στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη του πιθανού ρόλου του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ στη ρύθμιση της έκφρασης των RhoA και RhoB γονιδίων στα βλαστικά κύτταρα. Αρχικά μελετήθηκε η πιθανότητα ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα. Στη συνέχεια διερευνήθηκαν οι συνθήκες υπό τις οποίες ο TGFβ ήταν δυνατόν να επάγει τη διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων και, ακόμα, οι πιθανές μεταβολές στην έκφραση των RhoA και RhoB γονιδίων κατά τη διαφοροποίηση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Τα θρεπτικά υλικά KnockOut DMEM , α-MEM , Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), τα αμινοξέα NEAA, η L-glutamine, τα αντιβιοτικά penicillin/streptomycin, η β-mercaptoethanol, η trypsin/EDTA , το ένζυμο DNase I (Amplification Grade) και τα dNTPs αγοράστηκαν από την Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA). Ο ορός Hyclone Research Grade Fetal Bovine Serum, South American Origin αγοράστηκε από την GE Healthcare και ο κοινός ορός Fetal bovine serum (FBS) αγοράστηκε από την SIGMA-ALDRICH. Το Attractene Transfection Reagent αγοράστηκε από την Qiagen. Τα περιοριστικά ένζυμα και η T4 DNA ligase αγοράστηκαν από την Minotech (Ηράκλειο, Ελλάδα) ή από τα New England Biolabs (Beverly, MA). Το ένζυμο Go Taq DNA πολυμεράση, το luciferase assay system, το Cell culture lysis 5x reagent και η M-MLV Reverse Transcriptase αγοράστηκαν από την Promega (Madison, WI). Τα NucleoSpin Gel/PCR Clean-up system και NucleoBond PC για καθαρισμό πλασμιδιακού DNA αγοράστηκαν από την MACHEREY-NAGEL. Το RNAiso Plus reagent για την απομόνωση RNA και οι Random Primers αγοράστηκαν από την Takara. Το KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix αγοράστηκε από την Kapa Biosystems (Wilmington, MA). Όλα τα υπόλοιπα ολιγονουκλεοτίδια κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο μικροχημείας του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του ΙΤΕ ή από την Eurofins genomics. Ο καταστολέας C3 transferase αγοράστηκε από την Cytoskeleton, Inc. (Denver). Ο Recombinant Human TGFβ1 αγοράστηκε από την R&D Systems. Το αντίσωμα Nanog αγοράστηκε από την Cell Signaling. Ο αναστολέας SB-431542 αγοράστηκε από την SIGMA-ALDRICH.

Μέθοδοι

Κυτταροκαλλιέργειες

Τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού CGR8 ήταν ευγενική προσφορά της Δρ. Α Κρετσόβαλη, ΙΤΕ, Ηράκλειο) καλλιεργήθηκαν σε KnockOut DMEM (Thermo Fisher Scientific) παρουσία 15% ορού (Hyclone), 1% NEAA, 2 mM L-γλουταμίνη, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 0.1 mM β-μερκαπτοαιθανόλη and Leukemia inhibitory factor (LIF, 2μl/ml) σε τρυβλία επωασμένα προηγουμένως με 0.1% διάλυμα ζελατίνης. Τα κύτταρα αραιώνονταν (split) κάθε 2-3 ημέρες με χρήση διαλύματος τρυψίνης (trypsin-EDTA). Για την επώαση με τον αναστολέα C3, κύτταρα CGR8 καλλιεργήθηκαν απουσία LIF για 48 ώρες. Ο C3 (0.1 μg/ml) προστέθηκε για 4h (26h μετά την απομάκρυνση του LIF) ή για 18h (30h μετά την απομάκρυνση του LIF). Τα εμβρυονικά καρκινικά κύτταρα P-19 ήταν ευγενική προσφορά της Δρ. Π. Παπαζαφείρη, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Αθήνα). Τα P-19 καλλιεργήθηκαν σε α-MEM (Thermo Fisher Scientific) παρουσία 10% ορού, 1% NEAA, 2 mM L-γλουταμίνη, πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αραιώνονταν (split) κάθε 2-3 ημέρες.

Τα ηπατικά κύτταρα HepG2 καθώς και τα νεφρικά κύτταρα πιθήκου COS-7 καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glucose) με 10% FBS και 2% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα επιθηλιακά κύτταρα μαστού MCF 10A καλλιεργήθηκαν σε DMEM/F12 με 1% L- γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 5% heat-inactivated horse serum, 100 ng/mL τοξίνη της χολέρας, 10 mg/mL ινσουλίνη, 20 ng/mL EGF and 0.5 mg/mL υδροκορτιζόνη. Τα MCF7 κύτταρα που προέρχονται από αδενοκαρκίνωμα μαστού καλλιεργήθηκαν σε high glucose DMEM, 10% FBS, 16 ng/ml ινσουλίνη και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα καρκινικά κύτταρα μαστού MDA.MB.231 καλλιεργήθηκαν σε high glucose DMEM, 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη DU145 και του παχέος εντέρου HCT116 καλλιεργήθηκαν σε RPMI 1640 με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα καρκινικά κύτταρα πνεύμονα H1299 καλλιεργήθηκαν σε high glucose DMEM με 10% FBS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όλες οι κυτταρικές σειρές καλλιεργήθηκαν σε 37 °C και 5% CO₂.

Παραγωγή LIF

Η παραγωγή του LIF έγινε με επιμόλυνση του πλασμιδίου που περιέχει το αντίστοιχο γονίδιο σε κύτταρα COS-7 με την μέθοδο της Attractene. Σε 300.000 κύτταρα COS-7 προστίθενται 10 ml θρεπτικού. Παρασκευάζεται μείγμα που περιέχει 300ml θρεπτικού χωρίς αντιβιοτικό, 15 ml Attractene Reagent και 4 μg DNA το οποίο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια το μείγμα προστίθεται στάγδην στα κύτταρα. Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού, προσθήκη 5 ml νέου θρεπτικού και τα κύτταρα αφήνονται σε συνθήκες καλλιέργειας για 5 ημέρες χωρίς καμία περαιτέρω αλλαγή του θρεπτικού. Το υγρό που συλλέγεται περιέχει τον LIF. Το υγρό φυγοκεντρείται και φιλτράρεται. Διατηρείται στους -80°C.

Απομόνωση RNA (RNA extraction) από κύτταρα θηλαστικών

Η απομόνωση του RNA πραγματοποιείται με RNAiso Plus reagent σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Takara. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων αφορούν απομόνωση από τρυβλίο 6-well.

- Αφαίρεση του θρεπτικού
- Προσθήκη 1ml 1x PBS κρούς, αποστειρωμένου και απομάκρυνση
- Προσθήκη 1ml RNAiso Plus
- Ομογενοποίηση των κυττάρων με πιπέτα και μεταφορά σε σωληνάκια 2ml
- Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 200 μl CHCl₃
- Έντονη ανακίνηση για 15 sec
- Επώαση για 5 min
- Φυγοκέντρηση: 12000 rcf για 15 min στους 4 °C
- Μεταφορά της υδατικής φάσης (~500 μl) σε σωληνάκι 1,5ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπανόλης και ανακίνηση
- Επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκέντρηση στις 12000 rcf για 10 min στους 4°C και αφαίρεση του υπερκειμένου
- Προσθήκη 1ml 75% Et-OH και σύντομη ανακίνηση

- Φυγοκέντρηση στις 7500 rcf για 5 min στους 4 °C, αφαίρεση του υπερκλειμένου
- Στέγνωμα της πελλέτας στον απαγωγό για 5 min
- Επαναδιάλυση σε 50 μl WFI

Η συγκέντρωση του RNA μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm στο μηχάνημα Infinite M200 PRO multimode reader (TECAN).

Αντίδραση DNάσης

Για να αποφευχθεί η πιθανότητα να υπάρχει εναπομείναν γενωμικό DNA στο RNA που απομονώθηκε, τα δείγματα RNA επώζονται με DNάση πριν την αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας (Thermo Fisher Scientific) , παρασκευάζεται στον πάγο μίγμα από : 1μg RNA, 1 μl 10x DNAase I Reaction Buffer, 1 μl DNase I και WFI μέχρι τελικού όγκου 10 μl. Το μίγμα επώζεται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Προστίθεται 1 μl EDTA σε κάθε δείγμα και το ένζυμο απενεργοποιείται στους 65°C για 10 min.

Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription)

Η αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες της Promega για τη χρήση του ενζύμου M-MLV Reverse Transcriptase.

- Ανάμιξη:
 - o 2 μg RNA
 - o 1 μg Random Primers ή Oligo dT
 - o H₂O μέχρι τελικού όγκου 13.4 μl
- 5 min στους 70°C
- Σύντομη επώαση στον πάγο
- Σύντομη φυγοκέντρηση
- Προσθήκη:
 - o 5 μl 5x buffer
 - o 5 μl dNTPs (10mM)
 - o 0.62 μl RNase OUT
 - o 1 μl M-MLV Reverse Transcriptase

- Ανάμιξη και σύντομη φυγοκέντρηση
- 60 min στους 40°C

Όλες οι επωάσεις γίνονται σε μηχανήμα PCR (thermal cycler). Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 25 μl. Το cDNA που παράγεται από την αντίδραση αποθηκεύεται στους -20°C.

PCR

Η PCR σε thermal cycler χρησιμοποιήθηκε για την αρχική ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων RhoA, RhoB, tubulin, Brachyury. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε: 80 ng cDNA, 1 μl από τον κάθε εκκινητή (10 pmol/μl), 5 μl X Green GoTaq Reaction Buffer, 1.5 μl MgCl₂ (25mM), 3 μl dNTPs (2mM), 0.3 μl GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase, ddH₂O.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ακόλουθο :

1. 94°C για 4 min
2. 94°C για 30 s
3. 58-60°C για 30 s
4. 72°C για 20 s
5. 31-37 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 72°C για 5 min
7. 4°C

Για την RhoA, την RhoB και την τουμπουλίνη η θερμοκρασία του annealing ήταν 60°C, ενώ για το Brachyury 58°C.

Real Time PCR

Οι Real Time PCR πραγματοποιήθηκαν στο μηχανήμα Step-OnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το StepOne Software v2.3. Το πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το παρακάτω:

1. 95°C για 20 s
2. 95°C για 0.03 s
3. 60-62°C για 0.30 s
4. Επανάληψη των βημάτων 2-3 για 44 κύκλους

5. 95°C για 0.15 s

Για το γονίδιο της mRhoA η θερμοκρασία του annealing ήταν 61 °C, για την mRhoB 62 °C και για όλα τα υπόλοιπα γονίδια 60 °C

Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε: 2 ng cDNA , 0.15 μl από τον κάθε εκκινητή (10 pmol/μl), 7.5 μl KAPA SYBR Green Mix, 2.2 μl WFI.

Τα σχετικά επίπεδα όλων των γονιδίων που μετρήθηκαν με Real Time PCR κανονικοποιήθηκαν με βάση τα επίπεδα έκφρασης της τουμπουλίνης (για τα γονίδια ποντικού) και της ακτίνης (για τα ανθρώπινα γονίδια). Οι κανονικοποιημένες τιμές Ct (threshold cycle) ομαλοποιήθηκαν με βάση τη συνθήκη ελέγχου (control) για κάθε δείγμα. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την μέθοδο ΔΔCt. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 :

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
mRhoA Fw	TTTCTGTCCAAATGTGCC
mRhoA Rev	TGCCATATCTCTGCCTTCTC
mRhoB Fw	ATAAGCGAACTTTGTGCCTG
mRhoB Rev	CACTGGGTGTCAAACAATGG
mTubulin Fw	CCGGACAGTGTGGCAACCAGATCGG
mTubulin Rev	TGGCCAAAAGGACCTGAGCGAACGG
hRhoA Fw	CTCGTTAGTCCACGGTCTGG
hRhoA Rev	CAGCCATTGCTCAGGCAAC
hRhoB Fw	TGCAACTGACTTGGGGAGG
hRhoB Rev	GACAGGCACAAAGTTCGCTT
hActin Fw	CGGCATCGTCACCAACTG
hActin Rev	GGCACACGCAGCTCATTG

Παροδικές επιμόλυνσεις κυτταρικών σειρών (transient transfections)

Οι παροδικές επιμόλυνσεις έγιναν αρχικά με τη μέθοδο της συγκατακρήμνισης $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ με τα εκάστοτε κατάλληλα πλασμίδια : τα CGR8 κύτταρα αραιώνονται σε 300.000 κύτταρα ανά well 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 μίγμα που περιέχει κατάλληλη ποσότητα πλασμιδίων αναφοράς και έκφρασης ή/και DNA συμπλήρωσης (pcDNA), 2 μg πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, 31μl CaCl_2 2M και 195 μl ddH₂O (WFI). Η ποσότητα του συνολικού DNA δεν υπερβαίνει τα 12 μg. Σε κάθε περίπτωση, το μίγμα προστίθεται 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 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12 mM dextrose). Το διάλυμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10-15 λεπτά, για να προστεθεί ακολούθως στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Στην περίπτωση συγκατακρήμνισης σε 6-well, κάθε δείγμα μοιράζεται ισόποσα σε δύο wells. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες.

Μετά την αλλαγή του κοινού ορού σε FBS (Hyclone) το οποίο ήταν ειδικό για την καλλιέργεια των βλαστικών κυττάρων, ήταν απαραίτητη η αλλαγή της τεχνικής παροδικής επιμόλυνσης. Συνεπώς, στο μεγαλύτερο τμήμα της διατριβής χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Attractene. Τα CGR8 και P-19 κύτταρα αραιώνονται σε 100.000 κύτταρα με 1.5 ml θρεπτικού ανά well (6-well) την προηγούμενη μέρα της επιμόλυνσης. Για την επιμόλυνση των κυττάρων παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει 1.2 μg συνολικού DNA, 4.5 μl attractene και 100 μl θρεπτικού. Για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης προστίθεται στο μίγμα 0.4 μg του πλασμιδίου που φέρει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min και, κατόπιν, προστίθεται στάγδην στο τρυβλίο με τα κύτταρα. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16-18 ώρες, αλλαγή θρεπτικού και επώαση για άλλες 24 ώρες.

Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal

Για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κανονικοποίησης β-γαλακτοσιδάσης. Για τον σκοπό αυτό το μίγμα της επιμόλυνσης περιέχει και πλασμίδιο-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης υπό τον υποκινητή του Cytomegalovirus (pCMVβ-gal). Η β-γαλακτοσιδάση είναι ένα ένζυμο που διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Το ONPG είναι ένα δομικό ανάλογο της λακτόζης, το οποίο διασπάται από τη β-γαλακτοσιδάση δίνοντας ένα κίτρινο προϊόν. Για την μέτρηση αυτή ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- έκπλυση των κυττάρων με 1ml κρύο PBS (η έκπλυση γίνεται στον πάγο)
- προσθήκη 150 μl 1x Cell Culture Lysis Buffer (Promega)
- συλλογή των κυττάρων με ξύστρο και τοποθέτηση στον πάγο
- επώαση των δειγμάτων στους -80°C για 20 min και, κατόπιν, τοποθέτησή τους στον πάγο μέχρι να ξεπαγώσουν (~25 min)
- φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 στροφές στους 4°C

Για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) χρησιμοποιήθηκαν 30 μl κυτταρικού εκχυλίσματος (υπερκεείμενο) και 170 μl μίγματος που αποτελείται από 149 μl P-buffer (0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3), 44 μl ONPG (8 mg/ml o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside σε 0.1 M sodium phosphate buffer) και 2 μl Salt 100x (3M KCl, 1M MgCl₂, β-μερκαπτοαιθανόλη, H₂O). Οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων λαμβάνονται στα 410 nm και βάση αυτών υπολογίζεται η συγκέντρωση της β-γαλακτοσιδάσης. Η διαδικασία γίνεται στο μηχάνημα Infinite M200 PRO multimode reader (TECAN).

Μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay)

Η εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του υποκινητή γίνεται με τη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (Luciferase assay). Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly) και που εκφράζεται

στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν. Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται 60μl κυτταρικού εκχυλίσματος και 60μl υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης σε κάθε δείγμα μετράται στο λουμινόμετρο (illuminometer).

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης (agarose gel)

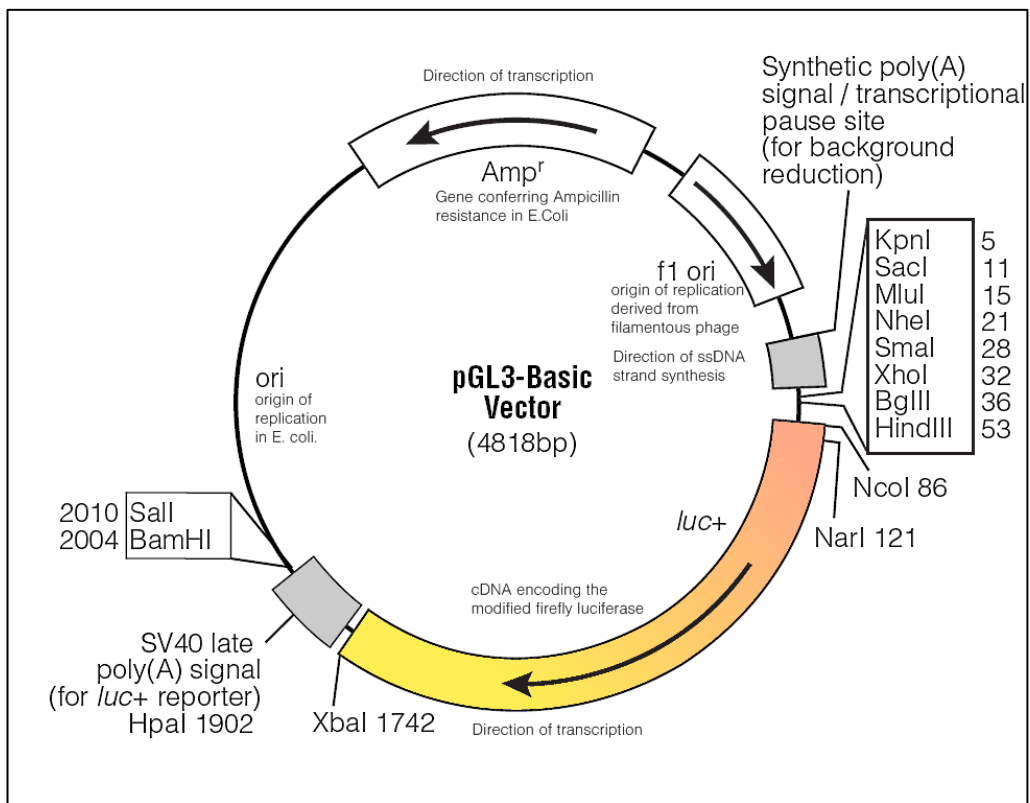
Για τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα αγαρόζης 1-2%. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής : Σε κωνική φιάλη των 200 ml φέρονται 100ml TAE 1x (50xTAE : 2M Tris HCl pH 7.5, 2mM EDTA, οξικό οξύ για ρύθμιση του pH) και 1-2 g αγαρόζης. Το μείγμα βράζεται μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη, αφήνεται να κρυώσει, οπότε και προστίθενται 3 μl Midori (για τη χρώση του 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.

Κατασκευή πλασμιδίων

Τα πλασμίδια αναφοράς που φέρουν περιοχές του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoA : (-819/+166) RhoA-luc, (-594/+166) RhoA-luc, (-493/+166) RhoA-luc, (-334/+166) RhoA-luc, (-202/+166) RhoA-luc, (-103/+166) RhoA-luc, (-76/+166) RhoA-luc, (-58/+166) RhoA-luc και (-39/+166) RhoA-luc κατασκευάστηκαν ακολουθώντας τα παρακάτω βήματα:

- πολλαπλασιασμός των αντίστοιχων τμημάτων (inserts) με τη βοήθεια αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)
- ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης και αφαίρεση των ζωνών από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας (περιγράφεται παρακάτω)
- PCR clean-up (περιγράφεται παρακάτω)
- Διπλή πέψη του φορέα pGL3 basic με τα ένζυμα KpnI-HindIII*, ηλεκτροφόρηση, απομόνωση από το πήκτωμα αγαρόζης και/ή PCR clean-up

- Διπλή πέψη των τμημάτων του υποκινητή (inserts) με τα ένζυμα KpnI-HindIII* και PCR clean-up
- Αντίδραση σύνδεσης (περιγράφεται παρακάτω)
- Transformation με το προϊόν της αντίδρασης αλλά και με το προϊόν της πέψης (control)
- Mini prep
- Πέψη των προϊόντων που προέκυψαν από το mini prep και ηλεκτροφόρηση
- Transformation για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας πλασμιδίου (midi prep)
- Διπλή πέψη για το προϊόν του midi prep



Εικόνα 19 : Ο πλασμιδιακός φορέας pGL3. Τα cDNA της αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης μορφής της RhoA κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις KpnI και HindIII. Τα τμήματα -76/+166 και -58/+166 της RhoA κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις NheI και HindIII.

* για τα πλασμίδια -76/+166 και -58/+166 η πέψη του φορέα και του τμήματος του υποκινητή έγινε με τα ένζυμα NheI και HindIII

Το πρόγραμμα της PCR για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του υποκινητή (-594/+166), (-493/+166) και (-334/+166) είναι το ακόλουθο:

1. 94°C για 4 min
2. 94°C για 30 s
3. 58°C για 45 s
4. 72°C για 1 min
5. 34 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 72°C για 5 min
7. 4°C

Για τα τμήματα του υποκινητή (-202/+166) και (-39/+166) το πρόγραμμα ήταν:

1. 94°C για 4 min
2. 94°C για 30 s
3. 61°C για 45 s
4. 72°C για 23 s
5. 35 φορές επανάληψη των σταδίων 2-4
6. 72°C για 5 min
7. 4°C

Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε: 100 ng **DNA** [ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο (-819/+166) RhoA-luc], 1.5 μl από τον κάθε **εκκινητή** (10 pmol/μl)[είτε 1 μl για τα τμήματα (-202/+166) (-103/+166) και (-39/+166)], 2.5 μl **10X Taq Reaction Buffer**, 1.5 μl **MgCl₂** (25mM)[είτε 1 μl για το τμήμα (-39/+166)] , 2 μl **dNTPs** (2mM), 0.2 μl **Taq Polymerase** (Thermo), ddH₂O.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό των τμημάτων του υποκινητή της RhoA φαίνονται στον Πίνακα 2.

Τα πλασμίδια αναφοράς για τον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB : (-1605/+86) RhoB-luc, (-726/+86) RhoB-luc, (-227/+86) RhoB-luc, (-85/+19) RhoB-luc, (-53/+19) RhoB-luc και (-726/+86) CCAAT mut RhoB-luc έχουν περιγραφεί προηγουμένως (90).

Στο πλασμίδιο αναφοράς (-819/+166) RhoA-luc εισήχθησαν σημειακές μεταλλάξεις στο στοιχείο CCAAT με τη χρήση ειδικών PCR εκκινητών. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν “back-to-back”. Ο πρόσθιος εκκινητής περιέχει μία διπλή

αντικατάσταση, η οποία περιγράφηκε προηγουμένως (90), καταστρέφοντας έτσι το CCAAT box.

Πίνακας 2 :

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία
-594/ hRhoA-Fw	AATGGTACCGCCCACGGAGGTTTCGTA
-493/ hRhoA-Fw	AAAGGTACCCACCAACCACAGCAGCAG
-334/ hRhoA-Fw	CTTGGTACCGGGGTACTGTCCACCGTAGT
-202/ hRhoA-Fw	CAGGGTACCGGAGTATTAACCGCGCAC
-103/ hRhoA-Fw	AAAGGTACCGGAGTTCCTGGTATGCC
-76/ hRhoA-Fw	TGCGCTAGCCTGCAATGATTGGTTAAGGGT
-58/ hRhoA-Fw	TGAGCTAGCGGTTTTGCTTTTAGGGCGTG
-39/ hRhoA-Fw	TAAGGTACCGGACGGGCTCCTGAGCAATA
+166 /hRhoA-Rev	GCGAAGCTTACCAGACCGTGGACTAACGA
hRhoA mut CCAAT- Fw	CGGCTGCAATGAgTcGTTAAGGGTTTTGC

Εξαγωγή DNA από gel αγαρόζης

Οι πλασμιδιακοί φορείς (vectors) αλλά και τα ενθέματα (inserts), τα οποία προκύπτουν ύστερα από πέψεις με τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ηλεκτροφορούνται σε παρασκευαστικό πήκτωμα αγαρόζης και οι ζώνες αφαιρούνται από το πήκτωμα με τη βοήθεια χειρουργικής λεπίδας (νυστέρι) με χρήση λάμπας UV.

Ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Ζύγιση του τμήματος και μεταφορά του σε καθαρό tube
- Προσθήκη 200 µl διαλύματος NTI για κάθε 100 mg gel αγαρόζης < 2 % (για gel αγαρόζης > 2 % διπλασιάζεται ο όγκος του διαλύματος)
- Επώαση του δείγματος για 5–10 min στους 50 °C
- Ανάδευση (vortex) του δείγματος κάθε 2–3 min μέχρι την πλήρη διάλυση του gel

Στη συνέχεια ακολουθούνται τα βήματα που περιγράφονται παρακάτω για τον καθαρισμό PCR προϊόντος από το στάδιο της τοποθέτησης της κολώνας PCR Clean-up σε tube συλλογής (2 mL).

Καθαρισμός PCR προϊόντος (PCR clean-up)

Ο καθαρισμός προϊόντων PCR γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας (MACHEREY-NAGEL):

- Για πολύ μικρά δείγματα (< 30 μl) προστίθεται νερό μέχρι τα 100 μl.
- Αναμιγνύεται ένας όγκος δείγματος με δύο όγκους διαλύματος NT1
- Τοποθέτηση μίας κολώνας PCR Clean-up σε ένα tube συλλογής (2 mL) και τοποθέτηση 700μl δείγματος
- Φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 στροφές
- Απόρριψη του υπολειπόμενου διαλύματος (η διαδικασία επαναλαμβάνεται εάν υπάρχει επιπλέον ποσότητα δείγματος)
- Προσθήκη 700μl διαλύματος NT3 (x2)
- Φυγοκέντρηση για 30 s στις 11.000 στροφές
- Απόρριψη του υπολειπόμενου διαλύματος
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 11.000 στροφές για την απομάκρυνση του διαλύματος NT3
- Επώαση της κολώνας για 2–5 min στους 70 °C με ανοιχτό καπάκι
- Τοποθέτηση της κολώνας σε νέο tube (1.5 ml)
- Προσθήκη 20-30 μl διαλύματος NE (20 μl για τα inserts και 30 μl για τον φορέα)
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min
- Φυγοκέντρηση για 1 min στις 11.000 στροφές

Αντίδραση σύνδεσης (ligation reaction)

Οι αντιδράσεις σύνδεσης πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 10 μl. Το συνολικό DNA κυμαινόταν στα 20-30 ng για το φορέα και, ανάλογα με τη σχέση μεγέθους φορέα/insert, περίσσεια DNA του insert. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε το DNA

του πλασμιδιακού φορέα και του insert, ένζυμο T4 DNA ligase και 1x του αντίστοιχου ρυθμιστικού διαλύματος. Η αντίδραση είχε διάρκεια ~16 ώρες (overnight) και έγινε στους 4 °C.

Competent cells

Για την παρασκευή των competent cells, τα οποία είναι επιδεκτικά στον μετασχηματισμό, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- Καλλιέργεια μίας αποικίας (single colony) σε 5 ml θρεπτικού LB στους 37 °C για 16-18 ώρες υπό ανάδευση
- Μεταφορά 2.5 ml αυτής σε νέα φλάσκα με 150 ml θρεπτικού LB
- Ανάδευση στους 25 °C μέχρι την κατάλληλη τιμή οπτικής πυκνότητας ($OD_{600}=0.4$), περίπου για 6 ώρες
- Τοποθέτηση των κυττάρων στον πάγο για 10 min
- Μεταφορά σε καινούρια falcon
- Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min στους 4 °C
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση της πελλέτας σε 75 ml παγωμένο TB (10 mM Pipes-KOH pH 6.7, 15 mM $CaCl_2$, 0.25 M KCl, 55 mM $MnCl_2$)
- Τοποθέτηση στον πάγο για 10 min
- Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min στους 4 °C
- Απόρριψη του υπερκείμενου
- Επαναδιάλυση της πελλέτας σε 15 ml παγωμένο TB
- Προσθήκη 1.125 ml DMSO
- Τοποθέτηση στον πάγο για 10 min
- Τοποθέτηση των κυττάρων σε μικρότερα tubes (aliquots), ψύξη με υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80 °C

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων DH10B E.coli (transformation)

Παρασκευάζεται μίγμα 50μl βακτηριακών κυττάρων DH10B (competent cells) (ή 100 μl σε περίπτωση αντίδρασης σύνδεσης) και του συνόλου της αντίδρασης σύνδεσης ή της κατάλληλης ποσότητας αραιωμένου πλασμιδιακού DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Το μίγμα αφήνεται στον πάγο για 30 min. Κατόπιν υφίσταται θερμικό σοκ στους 42°C για 45 sec. Στη συνέχεια, στο μείγμα προστίθενται 900 μl θρεπτικού LB (LB : 1% bactotryptone, 0.5% bacto yeast extract, 1%NaCl). Το τρυβλίο Pertι με θρεπτικό LB-άγαρ και αντιβιοτικό αμπικιλίνη (100μg/ml) όπου θα αναπτυχθεί η καλλιέργεια, έχει ήδη τοποθετηθεί σε επωαστήρα 37°C για να αποκτήσει την κατάλληλη θερμοκρασία. Στη περίπτωση του πλασμιδίου απλώνεται 100 μl καλλιέργειας στο τρυβλίο με τη βοήθεια αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου. Στη περίπτωση της αντίδρασης σύνδεσης το δείγμα φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές για 5 min, αφαιρούνται ~900 μl LB και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται στο θρεπτικό που έχει μείνει και κατόπιν απλώνεται στο τρυβλίο. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 16 - 18 ώρες (overnight).

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεσαίας κλίμακας (Midi prep)

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο, όπου έχει γίνει το striking ή ο μετασχηματισμός, με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε βακτηριακό γυάλινο σωλήνα ο οποίος περιέχει 2 ml LB-αμπικιλίνη, για 5-7 ώρες, στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια η μικρή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φλάσκα με 200ml LB-αμπικιλίνη και επωάζεται για 16-18 ώρες στους 37°C. Η καλλιέργεια κατανέμεται σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml και φυγοκεντρείται για 30 min στους 4°C στις 3500 στροφές. Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA χρησιμοποιήθηκαν κολώνες MACHEREY-NAGEL, βάσει των οδηγιών της κατασκευάστριας εταιρείας οι οποίες συνοπτικά είναι οι εξής :

- Στην πελέτα προστίθενται 4ml διαλύματος S1 (MACHEREY-NAGEL) το οποίο περιέχει RNase A

- Επαναδιάλυση της πελλέτας με πιπέτα
- Προσθήκη 4ml διαλύματος S2 και ανακίνηση 6-8 φορές
- Επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 2– 3 min
- Προσθήκη 4ml διαλύματος S3 (4 °C) και ανακίνηση 6-8 φορές μέχρι να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές μίγμα
- Επώαση του διαλύματος στον πάγο για 5 min
- Εξיסορρόπηση της κολώνας με το διάλυμα N2, το οποίο αφήνεται να διέλθει από την κολώνα
- Φυγοκέντρηση του βακτηριακού διαλύματος για 10 min στις 13000rpm στους 4 °C
- Τοποθέτηση φίλτρου σε χωνί και διάβρεξή του με σταγόνες από το διάλυμα N2
- Το βακτηριακό διάλυμα αφήνεται να διέλθει από το φίλτρο
- Το καθαρό διάλυμα φορτώνεται σε κολώνα
- Πλύσιμο της κολώνας με 10ml διαλύματος N3 για 2 φορές
- Έκλουση του διαλύματος με 5ml διαλύματος N5
- Προσθήκη 3.5 ml ισοπροπανόλης και ανακίνηση
- Το μίγμα μοιράζεται σε 6 μικρότερα tubes
- Φυγοκέντρηση για 30 min στις 13000 rpm στους 4 °C
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Προσθήκη 0.5 ml 70% αιθανόλης/tube και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000rpm
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και στέγνωμα της πελέτας στον απαγωγό για 10 min
- Επαναδιάλυση σε 20μl διαλύματος TE/tube

Η συγκέντρωση του πλασμιδίου μετράται με φωτομέτρηση στα 260 nm στο μηχάνημα Infinite M200 PRO multimode reader (TECAN).

Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μικρής κλίμακας (Mini prep)

Κάθε αποικία λαμβάνεται από το τρυβλίο, όπου έχει γίνει το striking ή ο μετασχηματισμός, με αποστειρωμένη οδοντογλυφίδα και καλλιεργείται σε βακτηριακό γυάλινο σωλήνα ο οποίος περιέχει 2 ml LB-αμπικιλίνη, για 16-18 ώρες, στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Συνήθως επιλέγονται 6-10 αποικίες. Στη συνέχεια ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

- Μεταφορά 1 ml σε νέο tube και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 1 min
- Απόρριψη του υπερκειμένου
- Επαναδιάλυση σε 0.3 ml S1 (MACHEY-NAGEL)
- Προσθήκη 0.3 ml S2 και ήπια ανάδευση
- Επώαση του διαλύματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min
- Προσθήκη 0.3 ml S3 και ήπια ανάδευση
- Επώαση του διαλύματος στον πάγο για 5-10 min
- Φυγοκέντρηση για 10 min στις 13000 rpm
- Προσθήκη 0.8 ml ισοπροπανόλης σε νέα tubes
- Προσθήκη του υπερκείμενου στα tubes που περιέχουν ισοπροπανόλη
- Ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 5 min
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 13000 rpm
- Απόρριψη του υπερκείμενου
- Προσθήκη 0.5 ml 70% αιθανόλης σε κάθε tube και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση για 5 min στις 13000 rpm
- Απόρριψη του υπερκείμενου με πιπέτα Gilson
- Στέγνωμα της πελλέτας στον απαγωγό για 10 min
- Επαναδιάλυση σε 40μl διαλύματος TE και ελαφρύ χτύπημα (flicking)

Απομόνωση πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων

Η συλλογή των κυττάρων τα οποία είτε επώασθηκαν με TGFβ παρουσία ή μη αναστολέων είτε επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης

πραγματοποιείται με την εξής διαδικασία : Γίνεται έκπλυση των κυττάρων με παγωμένο PBS διάλυμα και στη συνέχεια αφού προστεθεί 1ml PBS, αποκόλληση αυτών με ξύστρο Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 5000 στροφές για 5 λεπτά στους 4°C, αναρρόφηση και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος λύσης CO-IP (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton-X-100, παρουσία αναστολέων της πρωτεόλυσης). Τα δείγματα αφήνονται να ανακινούνται για 30 λεπτά στους 4°C και κατόπιν φυγοκεντρώνται στις 13000rpm για 5 λεπτά, στους 4°C.

Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών κατά Bradford-Lowry

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών του εκάστοτε δείγματος έγινε στο μηχάνημα Infinite M200 PRO multimode reader (TECAN) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας (Bio-Rad). Για κάθε δείγμα παρασκευάζεται μίγμα 5 μl δείγματος, 25 μl διαλύματος A (στο οποίο προηγουμένως έχει προστεθεί το διάλυμα S: 20 μl διαλύματος S ανά 1 ml διαλύματος A) και 200 μl διαλύματος B. Το μίγμα αφήνεται σε σκοτεινό περιβάλλον για 15 min και ακολουθεί φωτομέτρηση στα 750 nm.

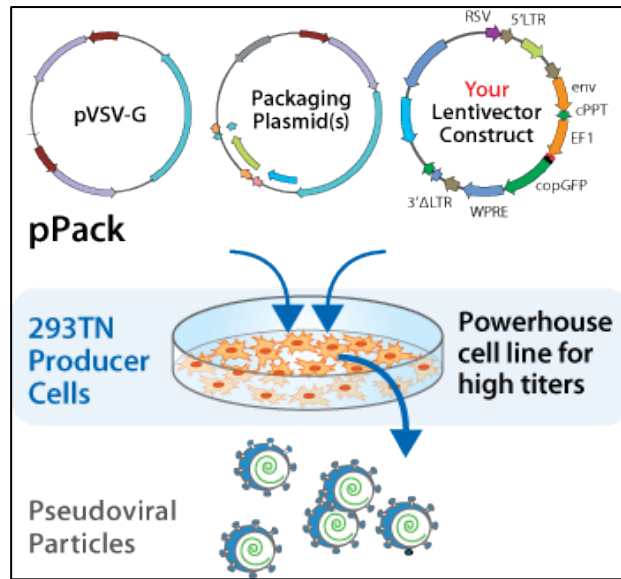
Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης-Ανοσοαποτύπωση (Western Blot)

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 [0.25M Tris-HCl pH 6.8, 8% w/v SDS, 20% glycerol, 0.04% w/v bromophenol blue, 0.4 M DTT] και τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 100 °C. Χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα πολυακρυλαμίδης 10.% [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 μl, TEMED 1.5 μl. Running gel: ddH₂O 4 ml, 30% acrylamide 3.3 ml, running buffer (Tris 1.5 M, SDS 0.4%, pH 8.8) 2.5 ml, 10% APS 100 μl, TEMED 3.5 μl]. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε διάλυμα 1x TGS (1L 10x TGS : 30.3 g Tris, 144.2 g Glycine, 10 g SDS, pH 8.3), στα 25 mA και με χρήση της συσκευής Bio-Rad

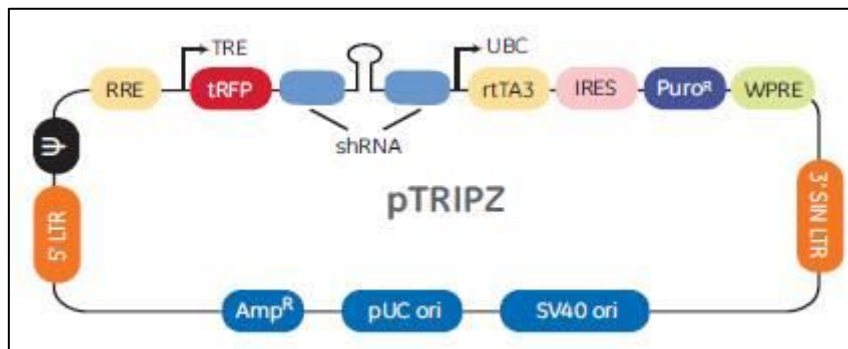
Protean electroblot. Η ίδια συσκευή χρησιμοποιήθηκε και για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβάνες νιτροκυτταρίνης με Transfer Buffer [H₂O, 10% 10x TGS, 20% methanol]. Ακολουθεί σε ορισμένες περιπτώσεις χρώση των πρωτεϊνών με χρωστική Ponceau S (0.1% w/v Ponceau S, 5% Acetic acid) για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και 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]. Οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των πρωτεϊνών μπλοκάρονται με εκπλύσεις με διάλυμα 5% ημιαποβουτηρωμένου γάλακτος σε TBS-T για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επώάζονται O/N με το αντίσωμα, που ανιχνεύει τον επιθυμητό επίτοπο, σε κατάλληλη αραιώση σε διάλυμα γάλακτος. Ακολούθως, οι μεμβράνες εκπλένονται 3 φορές με διάλυμα TBS-T, 10 min τη φορά, σε θερμοκρασία δωματίου. Η επώαση των μεμβρανών σε κατάλληλο, δευτερεύον αντίσωμα HRP αραιωμένο 1: 10.000 σε TBS-T γίνεται και πάλι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν γίνονται 3 εκπλύσεις των 10 min η κάθε μία με TBS-T, και μία έκπλυση των 5 min με TBS, όλες σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών γίνεται χρησιμοποιώντας το σύστημα χημειοφωσφορισμού (ECL Western blotting kit) και εκθέτοντας τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης στο μηχάνημα ChemiDoc™ XRS+ System (BioRad) για διάφορα χρονικά διαστήματα.

Κατασκευή λέντι-ιών

Η παραγωγή των ιών έγινε σε κύτταρα HEK 293T. Τα κύτταρα στρώνονται σε τρυβλία p-100 και την επόμενη μέρα επιμολύνονται με τη μέθοδο της Attractene με μείγμα των κατάλληλων πλασμιδίων. Συγκεκριμένα, το μείγμα αποτελείται από το πλασμίδιο που εκφράζει το RhoB shRNA, το pVSV-G (που εκφράζει την VSV-G πρωτεΐνη του ιικού φακέλου) και το pΔ8.1 (που περιέχει τα δομικά γονίδια που απαιτούνται για το πακετάρισμα του ιού) (Εικ. 20). Ο φορέας του RhoB shRNA είναι το πλασμίδιο pTRIPZ (Εικ. 21).

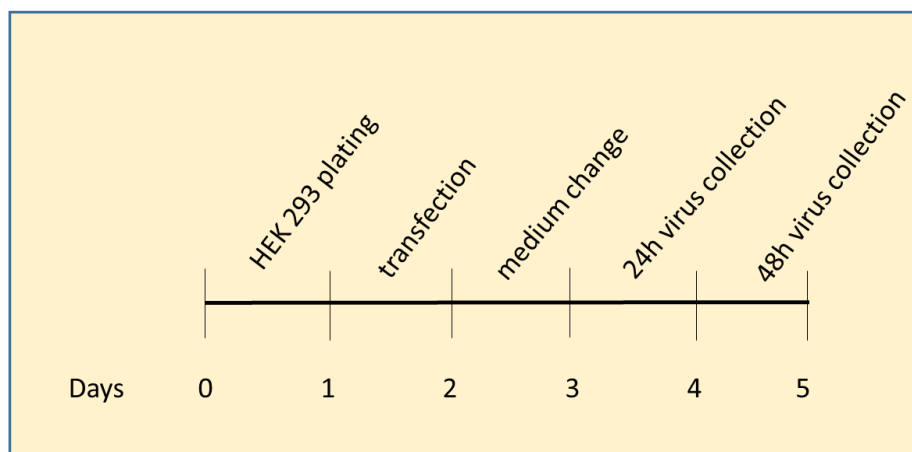


Εικόνα 20 : Κατασκευή λέντι-ιών. Κύτταρα HEK 293T επιμολύνονται με το πλασμίδιο pVSV-G, το οποίο εκφράζει την VSV-G πρωτεΐνη του ιικού φακέλου, το pΔ8.1 (packaging plasmid), το οποίο περιέχει τα δομικά γονίδια που απαιτούνται για το πακετάρισμα του ιού και το construct, το πλασμίδιο που εκφράζει το RhoB shRNA.



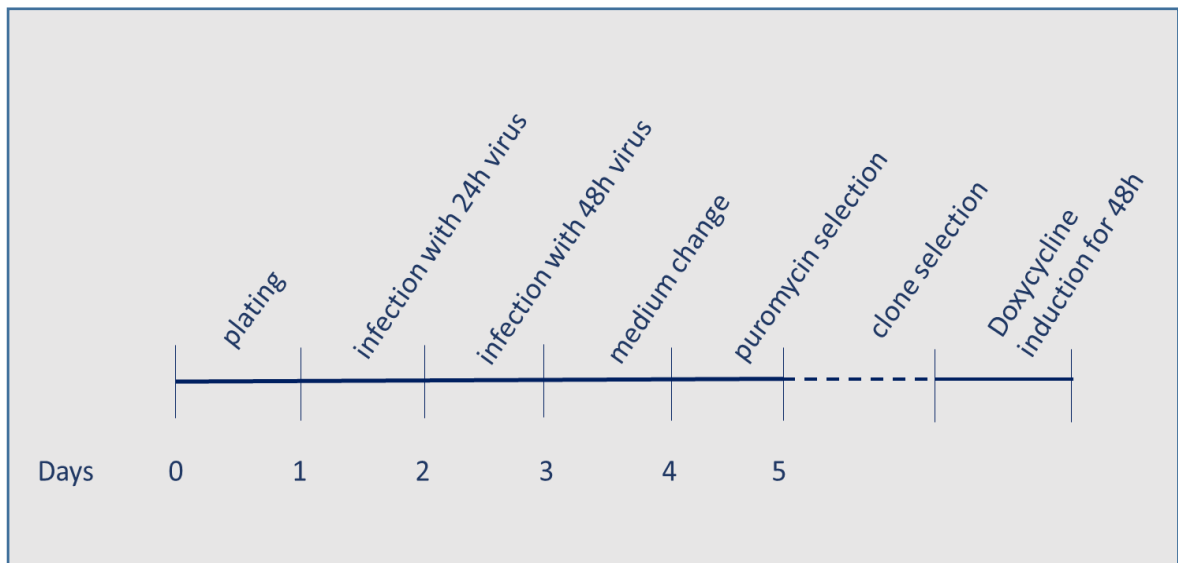
Εικόνα 21 : Σχηματική αναπαράσταση του λεντι-ικού πλασμιδίου pTRIPZ. TRE: Tetracycline-inducible promoter (υποκινητής επαγόμενος από την τετρακυκλίνη), tRFP: TurboRFP reporter (γονίδιο TurboRFP για τον οπτικό εντοπισμό της διαμόλυνσης και της έκφρασης του shRNA), shRNA: microRNA-προσαρμοσμένο shRNA (βασισμένο στο miR-30) για γονιδιακή στόχευση, UBC: Human ubiquitin C promoter (υποκινητής για σταθερή έκφραση του rtTA3 και του γονιδίου αντοχής στην πουρομυκίνη). rtTA3: Reverse tetracycline-transactivator 3 (για της εξαρτώμενη από την τετρακυκλίνη επαγωγή του υποκινητή TRE), PuroR: Puromycin resistance (γονίδιο αντοχής στην πουρομυκίνη για επιλογή κυτταρικού πληθυσμού). IRES: Internal ribosomal entry site (επιτρέπει την έκφραση του rtTA3 και του γονιδίου πουρομυκίνης σε ένα μετάγραφο) 5' LTR: 5' long terminal repeat, 3' SIN LTR 3' self-inactivating long terminal repeat (για αυξημένη λεντι-ική ασφάλεια), Ψ Psi packaging sequence (για το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος με τη χρήση λεντι-ικών συστημάτων πακεταρίσματος), RRE: Rev response element (επαυξάνει το ιικό τίτλο), WPRE: Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (προάγει την έκφραση του transgene στα κύτταρα στόχους) *Dharmacon™*.

Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού και το υπερκείμενο της καλλιέργειας που περιέχει τον ιό συλλέγεται σε 24 και 48 ώρες από την αλλαγή. Το υπερκείμενο φιλτράρεται με φίλτρο 0,45 μm και φυλάσσεται στους -80°C. Το χρονοδιάγραμμα της κατασκευής του ιού φαίνεται στην εικόνα 22.



Εικόνα 22 : Διαδικασία παραγωγής του ιού.

Για τη διαδικασία της μόλυνσης, κύτταρα CGR8 στρώνονται σε 6-well και ακολουθούν δύο διαδοχικές μολύνσεις με τον ιό που συλλέχθηκε στις 24 και στις 48 ώρες. Οι μολύνσεις γίνονται ανά εικοσιτετράωρο. Μετά την τελευταία μόλυνση γίνεται αλλαγή με απλό θρεπτικό για άλλες 24 ώρες και στη συνέχεια γίνεται επιλογή των κλώνων που έχουν μολυνθεί με πουρομυκίνη. Αφού περάσει κατάλληλο χρονικό διάστημα, έτσι ώστε οι αποικίες να είναι σε κατάλληλο μέγεθος, γίνεται συλλογή μεμονωμένων αποικιών και ανακαλλιέργεια αυτών σε 24-well. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι το πλασμίδιο που φέρει το RhoB shRNA παρέχει την επαγόμενη έκφρασή του παρουσία δοξυκυκλίνης καθώς φέρει ένα tetracycline response element (TRE). Συγχρόνως με την έκφραση του shRNA, το TRE επάγει επίσης την έκφραση του γονιδίου TurboRFP. Το TurboRFP και το shRNA αποτελούν μέρος ενός κοινού μεταγράφου, επιτρέποντας έτσι τον οπτικό έλεγχο των κυττάρων που εκφράζουν το shRNA. Το χρονοδιάγραμμα της διαδικασίας της μόλυνσης των κυττάρων CGR8 φαίνεται στην εικόνα 23.



Εικόνα 23 : Διαδικασία μόλυνσης των κυττάρων με τον λέντι-ιό TRIPZshRhoB.

Στην κυτταρική σειρά που παράχθηκε με τον παραπάνω τρόπο παρατηρήθηκε αποσιώπηση του γονιδίου της RhoB κατά 50% έπειτα από επώαση των κυττάρων με δοξυκυκλίνη (2μg/ml) για 48 ώρες.

Έμμεσος ανοσοφθορισμός πρωτεϊνών σημασμένων με επίτοπο (Indirect Immunofluorescence)

Σε κάθε πείραμα ανοσοφθορισμού ακολουθείται η παρακάτω προετοιμασία των κυττάρων (σε τρυβλία 6-well):

- Αποστείρωση της καλυπτρίδας και της λαβίδας σε 100% Et-OH και φλόγα και τοποθέτηση της καλυπτρίδας στο πηγαδάκι
- Επώαση με διάλυμα ζελατίνης 0,1% για τα κύτταρα CGR8
- Αφαίρεση του διαλύματος (aspiration)
- Πλύσιμο με θρεπτικό
- Προσθήκη θρεπτικού και κατάλληλου αριθμού κυττάρων (~300.000 κύτταρα/well)

Για την ανίχνευση του κυτταροσκελετού της ακτίνης πραγματοποιήθηκε χρώση **ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης** : μετά από επώαση των κυττάρων για κατάλληλα χρονικά διαστήματα ακολουθεί η διαδικασία της χρώσης (οι ποσότητες αναφέρονται σε 6-well). Τα κύτταρα εκπλένονται με PBS και ακολουθεί μονιμοποίηση των κυττάρων (fixing) με 1.5 ml διαλύματος 3% π-formaldehyde (PFA) σε PBS για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς ανακίνηση. Οι μεμβράνες των κυττάρων γίνονται διαπερατές με χρήση 1.5 ml διαλύματος [0.3% Triton-x-100 (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), 0.3% BSA σε PBS] για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς ανάδευση). Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1.5 ml διαλύματος [20 mM γλυκίνης, 1% BSA σε PBS]. Στη δεύτερη έκπλυση αφήνουμε τα κύτταρα με το διάλυμα για 15 min. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με διάλυμα 1% BSA σε PBS και blocking με το ίδιο διάλυμα (1.5 ml) για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαζονται με 200 μl ροδαμίνης- φαλλοϊδίνης, η οποία έχει αραιωθεί 1:100 σε διάλυμα 1% BSA σε PBS για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον. Ακολουθούν 3 εκπλύσεις με διάλυμα PBS-BSA. Στη συνέχεια οι καλυπτρίδες με τα κύτταρα αποκολλώνται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους, στις οποίες έχει προστεθεί μία σταγόνα διαλύματος μονιμοποίησης DAPI.

Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών **E-cadherin**, **ZO-1** και **α-SMA** ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία κατόπιν της επώασης των κυττάρων με TGFβ1:

Ακολουθούνται τα βήματα που περιγράφηκαν παραπάνω έως το στάδιο του blocking και στη συνέχεια τα κύτταρα επώαζονται για μία ώρα με το αντίστοιχο αντίσωμα σε αραιώση 1:100. Ακολουθούν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα PBS-BSA και επώαση για μία ώρα με αντίσωμα FITCH (1:200) για μία ώρα σε σκοτεινό περιβάλλον.

Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης **Nanog** ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Αναρρόφηση του θρεπτικού
- Έκπλυση με PBS
- Προσθήκη 4% PFA για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς ανάδευση)

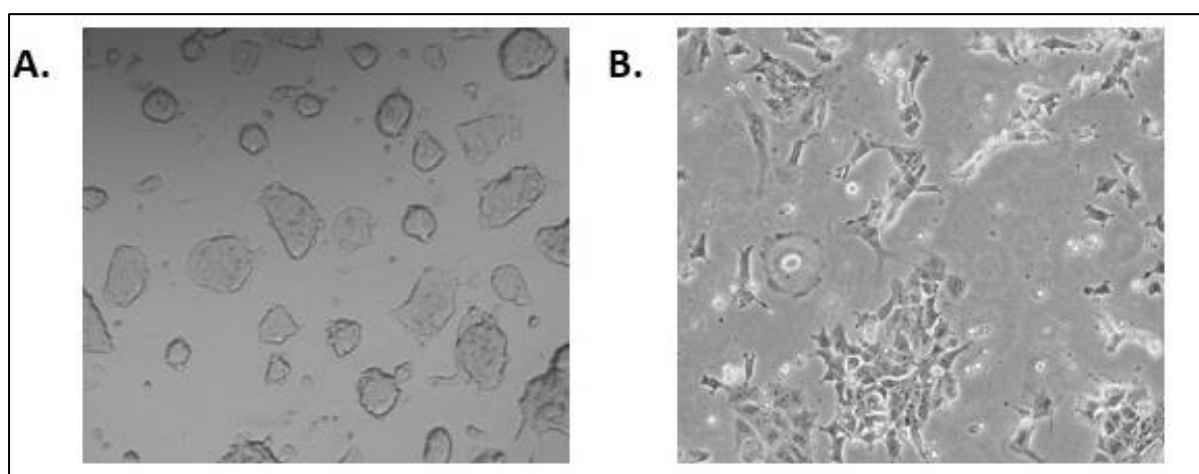
- Έκπλυση των κυττάρων με PBS 3 x 3 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση
- Προσθήκη PBS-Triton 0,5% για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (χωρίς ανάδευση)
- Έκπλυση των κυττάρων με TBS-Tween 0,05% 3 x 3 min σε θερμοκρασία δωματίου υπό συνεχή ανάδευση
- Προσθήκη μίγματος blocking 5 % BSA σε TBS-Tween 0,05%
- Επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με το 1^ο αντίσωμα σε 2.5% BSA σε TBS-Tween 0,05% O/N στους 4°C σε αραιώση 1:1000
- Έκπλυση των κυττάρων με TBS-Tween 0,05% 3 x 3 min σε θερμοκρασία δωματίου
- Επώαση με το 2^ο αντίσωμα Alexa-Fluor 550 σε 1x TBS σε αραιώση 1:500 για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό περιβάλλον
- Έκπλυση των κυττάρων με TBS-Tween 0,05% 3 x 3 min σε θερμοκρασία δωματίου

Σε κάθε περίπτωση τα όρια επαφής καλυπτρίδας - αντικειμενοφόρου στεγανοποιούνται με Manot. Τα δείγματα είναι καλό να μείνουν για 30 min-μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια διατηρούνται στους 4°C, σε σκοτεινό περιβάλλον, ενώ η παρατήρησή τους γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού LEICA DMLB και η φωτογράφιση τους με LEICA DC 300F digital camera χρησιμοποιώντας Zeiss Plan-neofluar 40x/0.75 φακούς.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

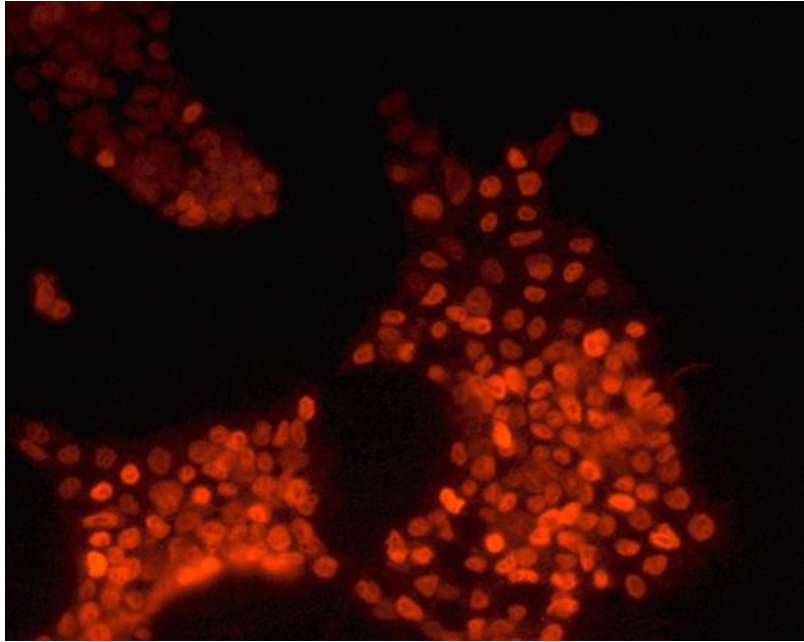
Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι βλαστικών κυττάρων: τα φυσιολογικά εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα CGR8 (Εικ. 24 Α) και τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα P-19 (Εικ. 24 Β). Τα CGR8 προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα ενός αρσενικού εμβρύου στο προ-εμφυτευτικό στάδιο ηλικίας 3.5 ημερών (163). Η διαφοροποίηση των CGR8 αναστέλλεται, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως από τον παράγοντα LIF, και καθορίζεται μεταγραφικά από τους



Εικόνα 24 : Βλαστικά κύτταρα ποντικού. (A) CGR8, (B) P-19.

παράγοντες Oct4, Sox2, and Nanog (Εικ. 25). Τα κύτταρα είναι μικρά και σχηματίζουν στρογγυλές, θολωτές, “διαθλαστικές” (refractile) αποικίες στις οποίες συνδέονται στενά. Επίσης, η καλλιέργεια των CGR8 απαιτεί τη χρήση υποστρώματος (ζελατίνης).

Η κυτταρική σειρά P-19 (Εικ. 24 Β) χρησιμοποιείται ως μοντέλο μελέτης της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων (164). Αποτελείται από κύτταρα τερατοκαρκινώματος που προέρχονται από εμβρυϊκό καρκίνωμα ποντικού του στελέχους C3H/He (165). Ένα έμβρυο ποντικού ηλικίας 7.5 ημερών εμφυτεύθηκε αρχικά σε όρχεις επάγοντας τη δημιουργία όγκου. Στη συνέχεια, αδιαφοροποίητα κύτταρα, τα οποία είναι τα P-19, απομονώθηκαν από αυτόν τον αρχικό όγκο.



Εικόνα 25 : Έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της πρωτεΐνης Nanog. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση πολυδυναμίας πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της πρωτεΐνης Nanog που αποτελεί κλασικό δείκτη πολυδυναμίας των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

Τα P-19 διαφοροποιούνται με τους ίδιους μηχανισμούς με τους οποίους διαφοροποιούνται και τα φυσιολογικά εμβρυϊκά κύτταρα και είναι πολυδύναμα εφόσον μπορούν να διαφοροποιηθούν και στα τρία βλαστικά δέρματα, δηλαδή ενδόδερμα, μεσόδερμα και εκτόδερμα. Επίσης, είναι η πιο καλά χαρακτηρισμένη κυτταρική σειρά εμβρυϊκού καρκινώματος που μπορεί να διαφοροποιηθεί σε καρδιακά και νευρικά κύτταρα έπειτα από διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες (76,166). Τα P-19 εκφράζουν επίσης κύριους μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν την πολυδυναμία όπως οι Oct4 και Nanog. Ακόμη, δεν χρειάζονται ειδικούς καλλιεργητικούς παράγοντες αλλά ούτε και υπόστρωμα ζελατίνης για να παραμείνουν πολυδύναμα. Αναφέρεται ότι η αλληλεπίδραση των κυττάρων με το υπόστρωμά τους τα διατηρεί σε αδιαφοροποίητη κατάσταση απουσία εξωτερικών ερεθισμάτων (167). Τέλος, σε αντίθεση με τα CGR8, έχουν επιθηλιακή μορφολογία.

Παρά τις διαφορές τους, είναι γνωστό ότι όλα τα βλαστικά κύτταρα είναι δυναμικά ογκογόνα. Κάποια βλαστικά κύτταρα μπορεί να δημιουργήσουν όγκους κατόπιν μεταμόσχευσης. Είναι προφανές ότι η ιδιότητα της πολυδυναμίας έχει άμεση

σχέση με το σχηματισμό όγκων ιδιαίτερα στην περίπτωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων.

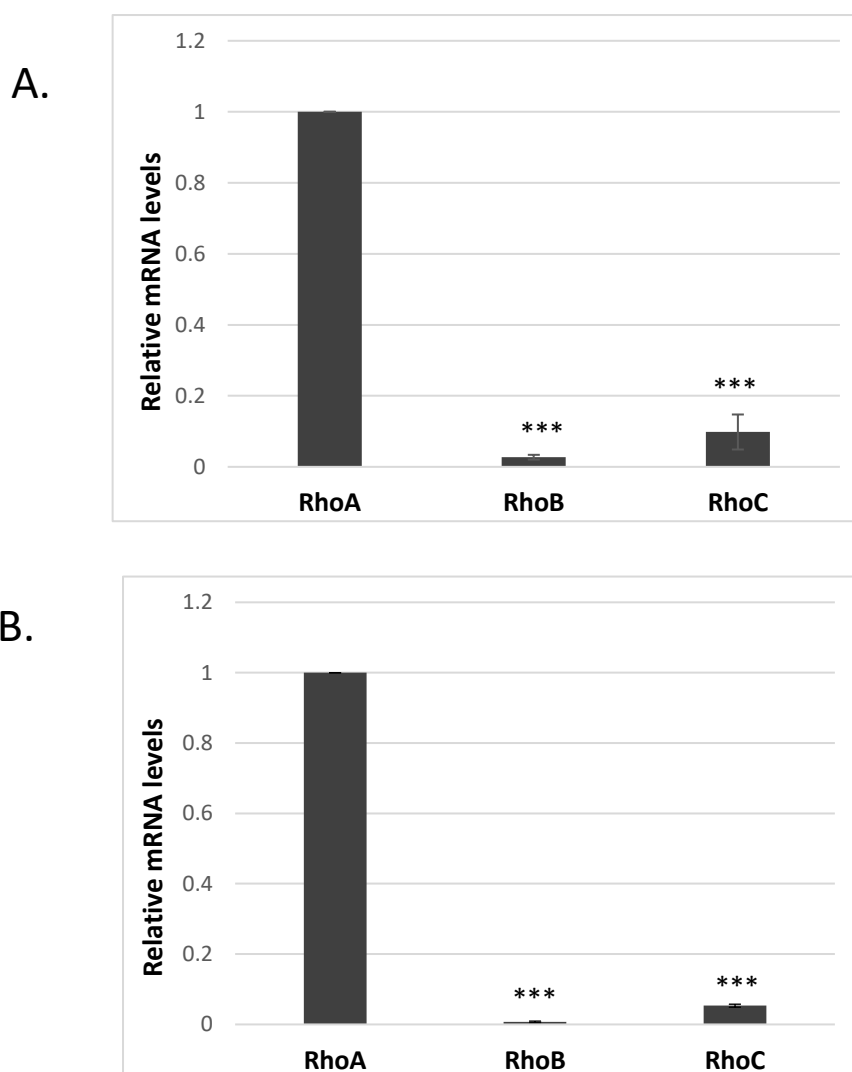
Σχετικά με τη μορφολογία τους, τα CGR8 μεγαλώνουν προς τα πάνω (Εικ. 24 Α) σχηματίζοντας σφιχτά δεμένες αποικίες με αποτέλεσμα τα κύτταρα να μην είναι σε θέση να μεταναστεύουν, τουλάχιστον υπό την παρουσία του LIF για όσο παραμένουν πολυδύναμα. Τα κύτταρα χάνουν την πολυδυναμία τους και αποκτούν περισσότερο ατρακτοειδή μορφή όταν καλλιεργούνται απουσία LIF τουλάχιστον για 36-48 ώρες (Εικ. 51). Σε αυτή την κατάσταση είναι πιο ευαίσθητα σε εξωτερικούς παράγοντες όπως αυξητικοί παράγοντες, οι οποίοι επάγουν την διαφοροποίηση ή αναστολές όπως η C3 τρανσφεράση (168). Αντίθετα, τα P-19 έχουν ατρακτοειδή μορφή (Εικ. 24 Β), δεν σχηματίζουν σφιχτές αποικίες και δεν μεγαλώνουν προς τα πάνω. Επιπλέον, βρίσκονται σε πιο όψιμο στάδιο της διαφοροποίησης εφόσον προέρχονται από εμφύτευση εμβρύου 7.5 ημέρας σε αντίθεση με τα CGR8 που προέρχονται από εσωτερική κυτταρική μάζα 3.5 ημερών. Επίσης, οι δύο κυτταρικοί τύποι αφορούν σε διαφορετικό κυτταρικό ιστό και, άρα, μικροπεριβάλλον αφού τα CGR8 προέρχονται από τη βλαστοκύστη ενώ τα P-19 προέρχονται από τερατοκαρκίνωμα όρχεων.

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ RHO ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Σύγκριση επιπέδων έκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB στα βλαστικά και καρκινικά κύτταρα

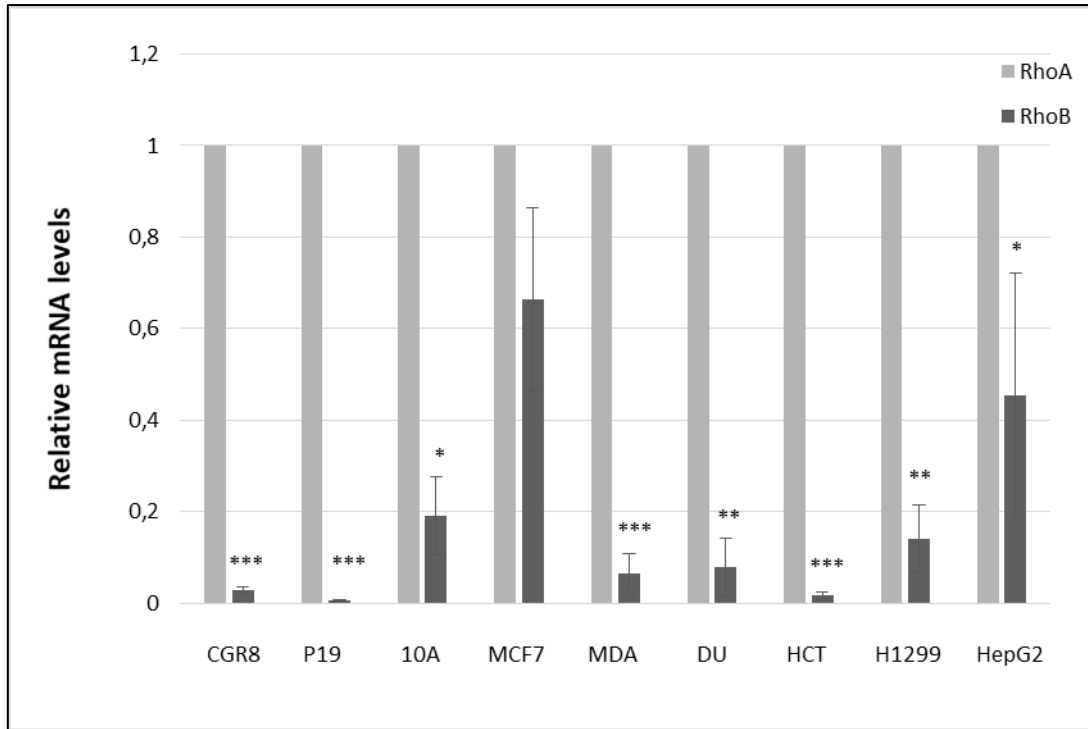
Αρχικά, μετρήθηκαν τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των RhoA και RhoB στις δύο κυτταρικές σειρές: CGR8 και P-19. Όπως φαίνεται (Εικ. 26) τα επίπεδα mRNA της RhoA είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά της RhoB και στις δύο σειρές (η αναλογία RhoA/RhoB mRNA είναι 38 και 172 στα CGR8 και στα P-19 κύτταρα αντίστοιχα). Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτής της σχέσης, μετρήθηκαν τα σχετικά επίπεδα

έκφρασης των δύο γονιδίων και σε άλλες καρκινικές σειρές (Εικ. 27), και βρέθηκε ότι τα επίπεδα έκφρασης της RhoA είναι σημαντικά υψηλότερα από αυτά της RhoB στις περισσότερες σειρές που εξετάστηκαν. Επίσης, μετρήθηκαν οι σχετικές ενεργότητες των υποκινητών τους. Όπως φαίνεται (Εικ. 28) ο (-819/+166) RhoA υποκινητής παρουσιάζει μεγαλύτερη ενεργότητα από τον (-726/+86) RhoB και στις δύο κυτταρικές σειρές. Είναι πιθανό ότι η RhoA εκφράζεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τη RhoB, εν μέρει, λόγω των διαφορών στις ενεργότητες των υποκινητών τους.

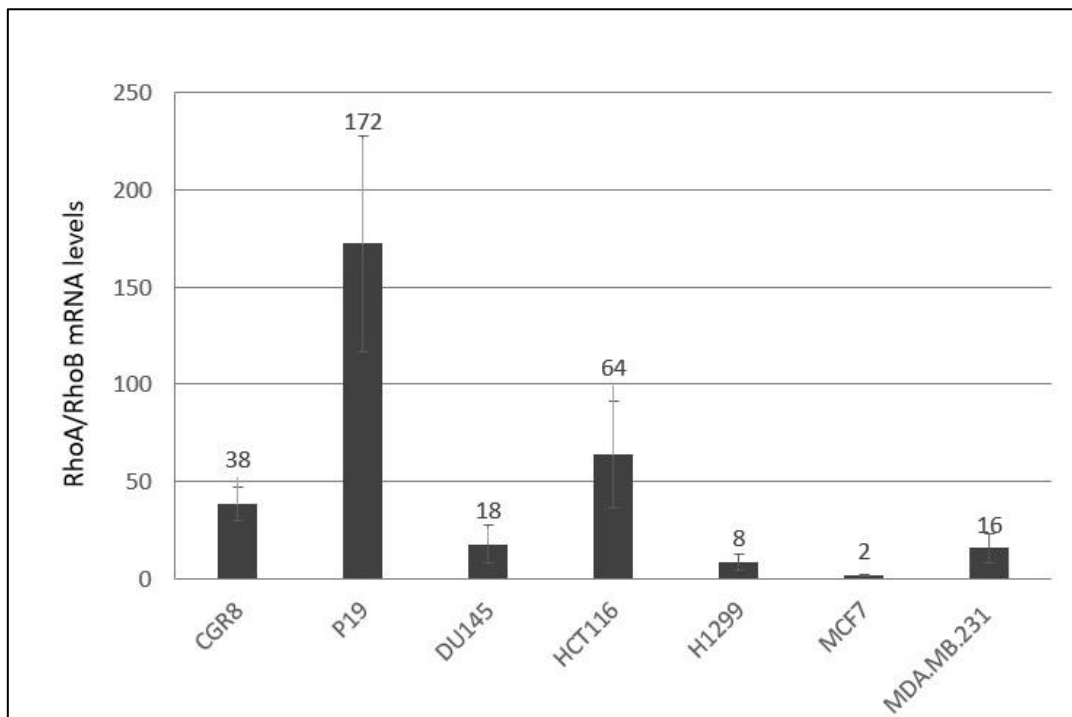


Εικόνα 26 : Συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων των Rho σε βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 (A) και P-19 (B) καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικές συνθήκες, έγινε απομόνωση του συνολικού RNA και μετρήθηκαν τα επίπεδα mRNA των RhoA, RhoB και RhoC με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμπουλίνης. Στην εικόνα παρατίθεται η μέση τιμή (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα (***, $p < 0.001$).

A.

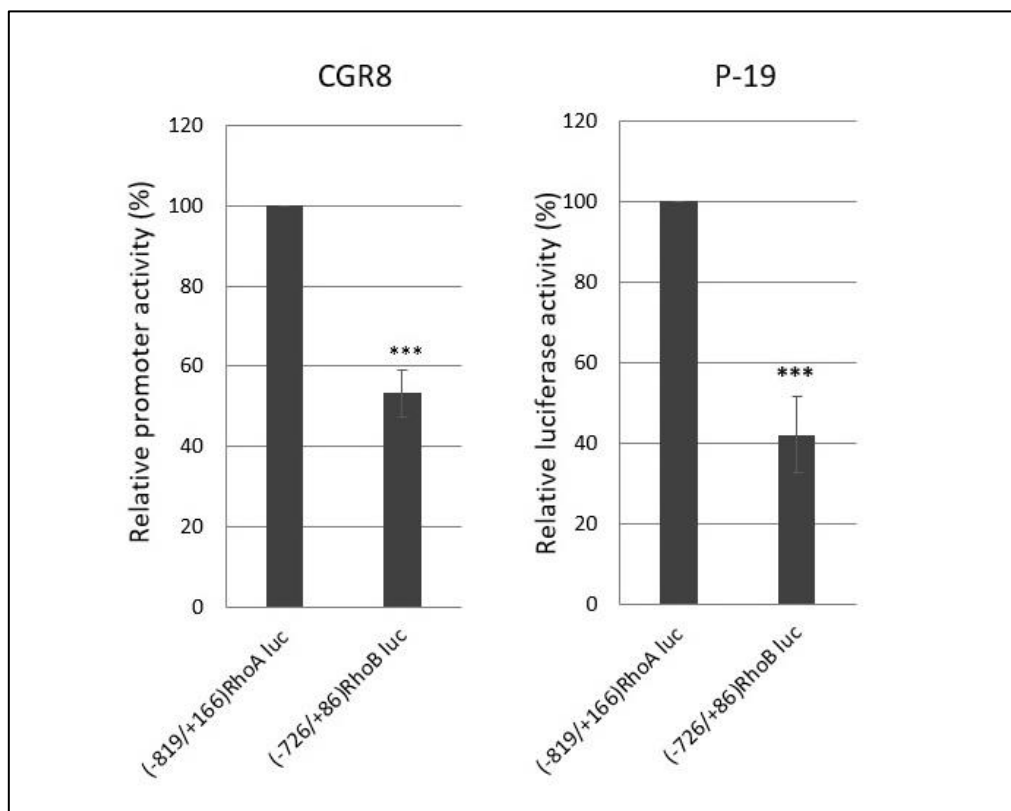


B.



Εικόνα 27 : Συγκριτική ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB σε βλαστικά κύτταρα και καρκινικές κυτταρικές σειρές. (A) Στην εικόνα παρατίθενται τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων. Το συνολικό RNA από τις κυτταρικές σειρές που υποδεικνύονται απομονώθηκε και μετρήθηκαν τα επίπεδα των RhoA και RhoB mRNA με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμπουλίνης στην περίπτωση των mESCs και της ακτίνης σε όλες τις άλλες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Το διάγραμμα δείχνει τη μέση τιμή (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα (B) Η αναλογία RhoA/RhoB mRNA

παρατίθεται ως η μέση τιμή (\pm SD) από τρία ανεξάρτητα πειράματα (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

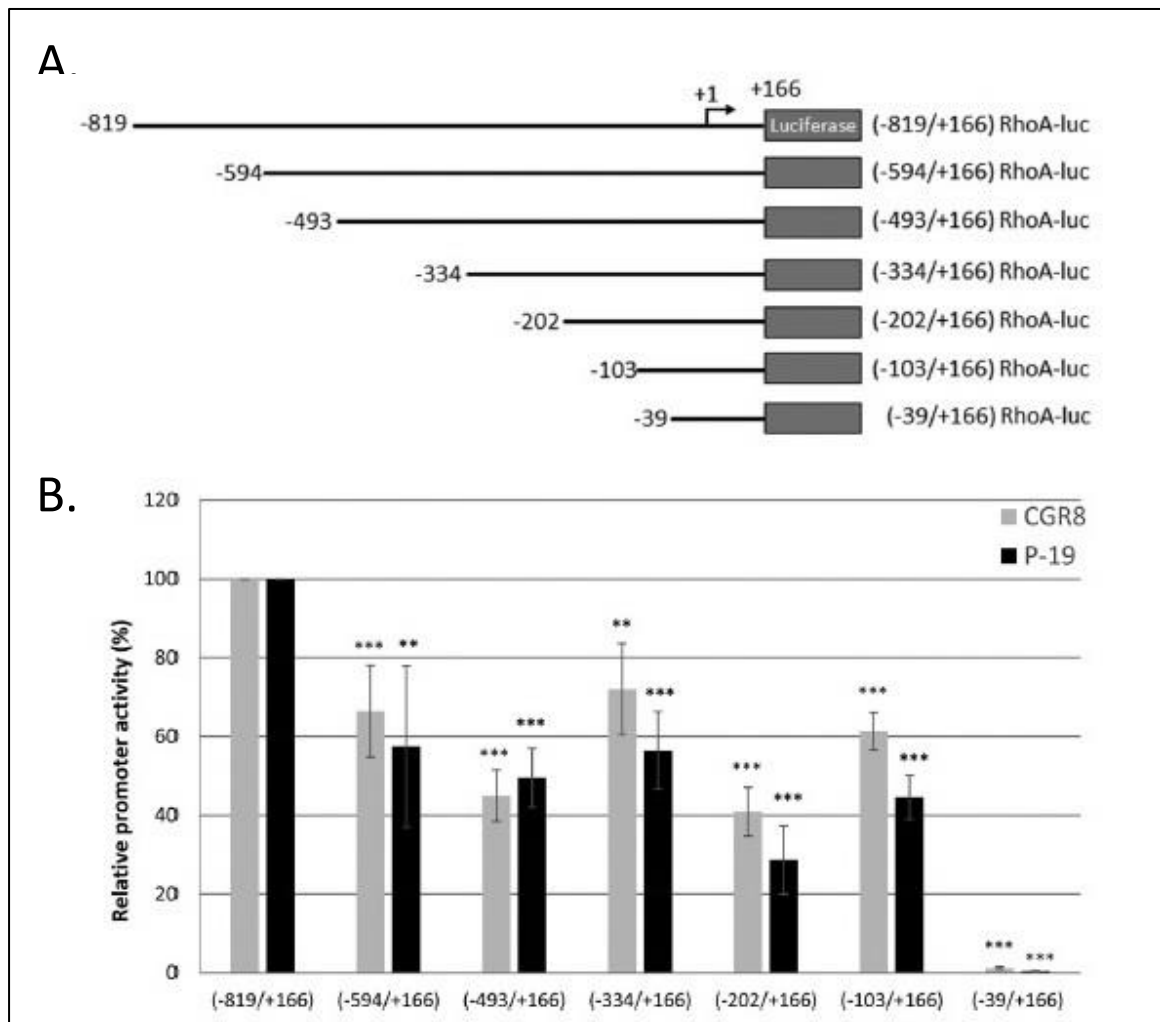


Εικόνα 28 : Συγκριτική ανάλυση των RhoA και RhoB υποκινητών στα βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς (-819/+166) RhoA-luc και (-726/+86) RhoB-luc (0.05 μ g) μαζί με έναν φορέα έκφρασης της β -γαλακτοσιδάσης (0.4 μ g) που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε δείγμα για την κανονικοποίηση της ποικιλότητας της επιμόλυνσης. Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης που αποτελούν τους μέσους όρους (\pm SD) τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$).

Ο υποκινητής της RhoA ρυθμίζεται από ένα συνδυασμό αρνητικών και θετικών ρυθμιστικών στοιχείων στα βλαστικά κύτταρα

Προκειμένου να χαρτογραφήσουμε τις περιοχές του υποκινητή της RhoA που είναι σημαντικές στην μεταγραφική του δράση, κατασκευάσαμε πλασμίδια που έφεραν τα παρακάτω τμήματα του υποκινητή της RhoA : -819/+166, -594/+166, -493/+166, -334/+166, -202/+166, -103/+166 και -39/+166 σε σύντηξη με το γονίδιο της λουσιφεράσης (Εικ. 29 A) τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα παροδικών επιμολύνσεων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 29 B η απαλοιφή του

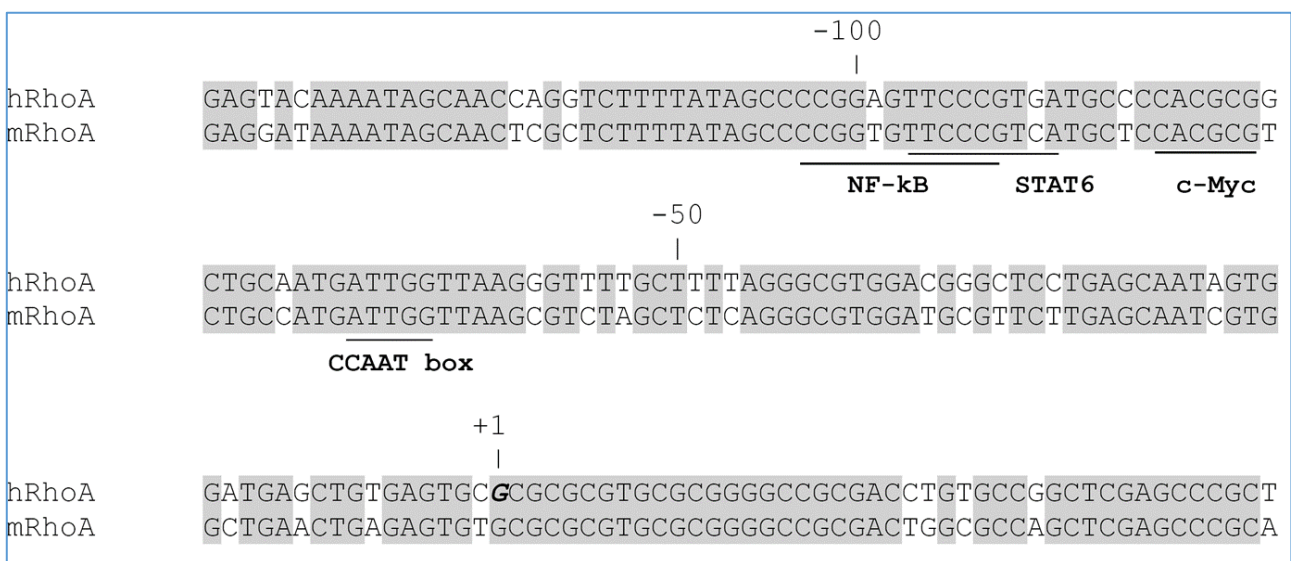
τμήματος μεταξύ των νουκλεοτιδίων -594 και -493 μείωσε αναλογικά την ενεργότητα του υποκινητή από 65% σε 45% αντίστοιχα σε σχέση με την ενεργότητα του τμήματος -819/+166 στα κύτταρα CGR8 υποδεικνύοντας την παρουσία θετικών ρυθμιστικών στοιχείων στην περιοχή -819/-493. Περαιτέρω απαλοιφή του υποκινητή στη θέση -334 αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή υποδεικνύοντας ότι η απαλοιφή απομάκρυνε αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία της γονιδιακής έκφρασης. Μία σημαντική πτώση της ενεργότητας παρατηρήθηκε με την απαλοιφή της περιοχής -103 έως -39, υποδηλώνοντας ότι είναι πιθανό να υπάρχουν θετικά ρυθμιστικά στοιχεία σε αυτή την περιοχή. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην κυτταρική σειρά P-19.



Εικόνα 29 : Η εγγύς περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -103 και -39 είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του υποκινητή της RhoA στα βλαστικά κύτταρα. (A) Σχηματική αναπαράσταση των 5'ελλείψεων του (-819/+166) υποκινητή της RhoA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης της εικόνας B (B) Κύτταρα CGR8

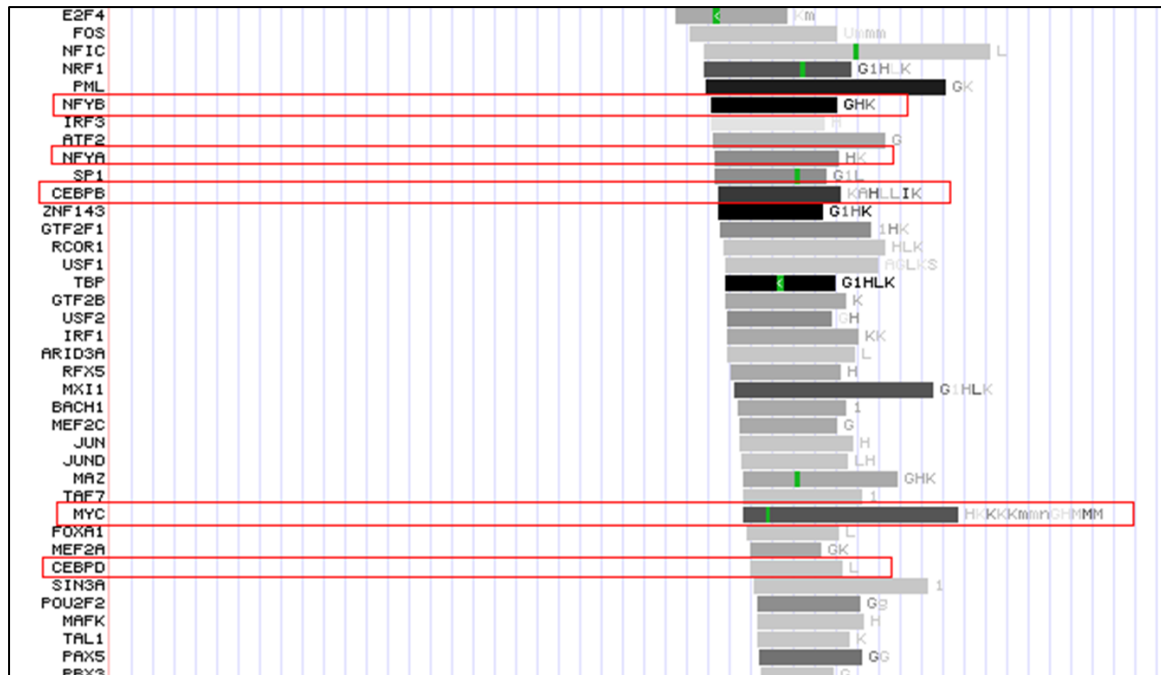
και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoA-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.1 μg). Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης. Η κανονικοποίηση της επιμόλυνσης έγινε με την δοκιμασία της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον πλασμιδιακό φορέα pCMVβ-gal (0.4 μg), με τον οποίο επιμολύνθηκε κάθε δείγμα που αναλύθηκε. Οι τιμές αποτελούν μέσους όρους τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (**, p<0.01, ***, p < 0.001).

Το εγγύς τμήμα του υποκινητή της RhoA περιέχει στοιχεία πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB, STAT6 και c-Myc. Αυτά τα στοιχεία είναι αρκετά συντηρημένα στον άνθρωπο και στο ποντίκι (Εικ. 30). Η ίδια περιοχή περιέχει επίσης



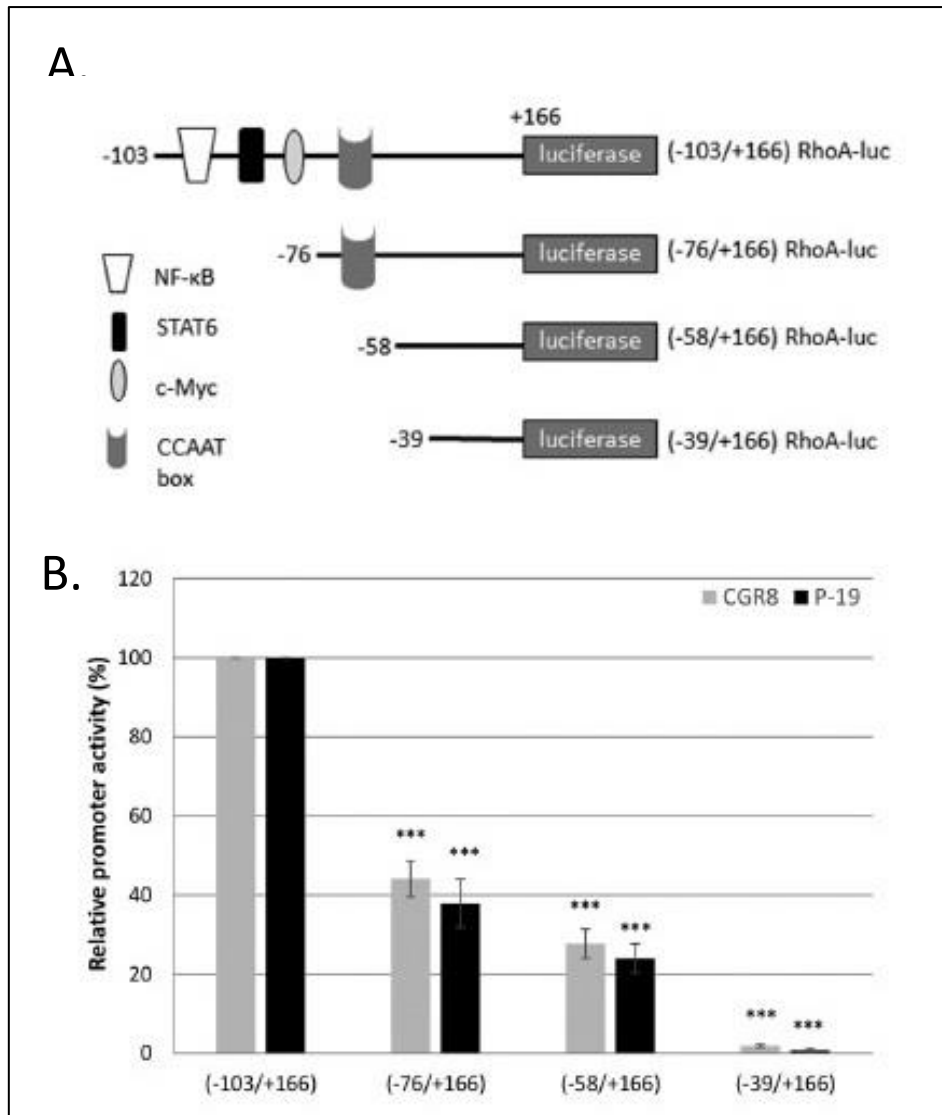
Εικόνα 30 : Ομολογία της κοντινής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της RhoA στον άνθρωπο και το ποντίκι. Στην εικόνα σημειώνονται οι θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες NF-κB, STAT6, c-myc καθώς και το ανεστραμμένο CCAAT box.

ένα ανεστραμμένο CCAAT box στη θέση -68/-64 που αποτελεί και θέση πρόσδεσης για παράγοντες όπως οι NFY και οι C/EBPs. Έχει δειχθεί παλαιότερα ότι σε αυτό το CCAAT box προσδέεται με χαμηλή συγγένεια ο μεταγραφικός παράγοντας NFYA (90). Η πρόσδεση των παραγόντων NFYA, NFYB, CEBPB και CEBPD στον υποκινητή της RhoA επιβεβαιώνεται και από πειράματα CHIP-seq (Εικ. 31).



Εικόνα 31 : Βιοπληροφορική ανάλυση της περιοχής -819/+166 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoA. Για να αναγνωριστούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στον υποκινητή της RhoA χρησιμοποιήθηκε το UCSC genome data. Τα CHIP seq data λήφθηκαν από το πρόγραμμα UCSC browser χρησιμοποιώντας το ENCODE with Factorbook Motifs project. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Feb. 2009(GRCh37/hg19) genome assembly. UCSC link: <http://genome.ucsc.edu/>

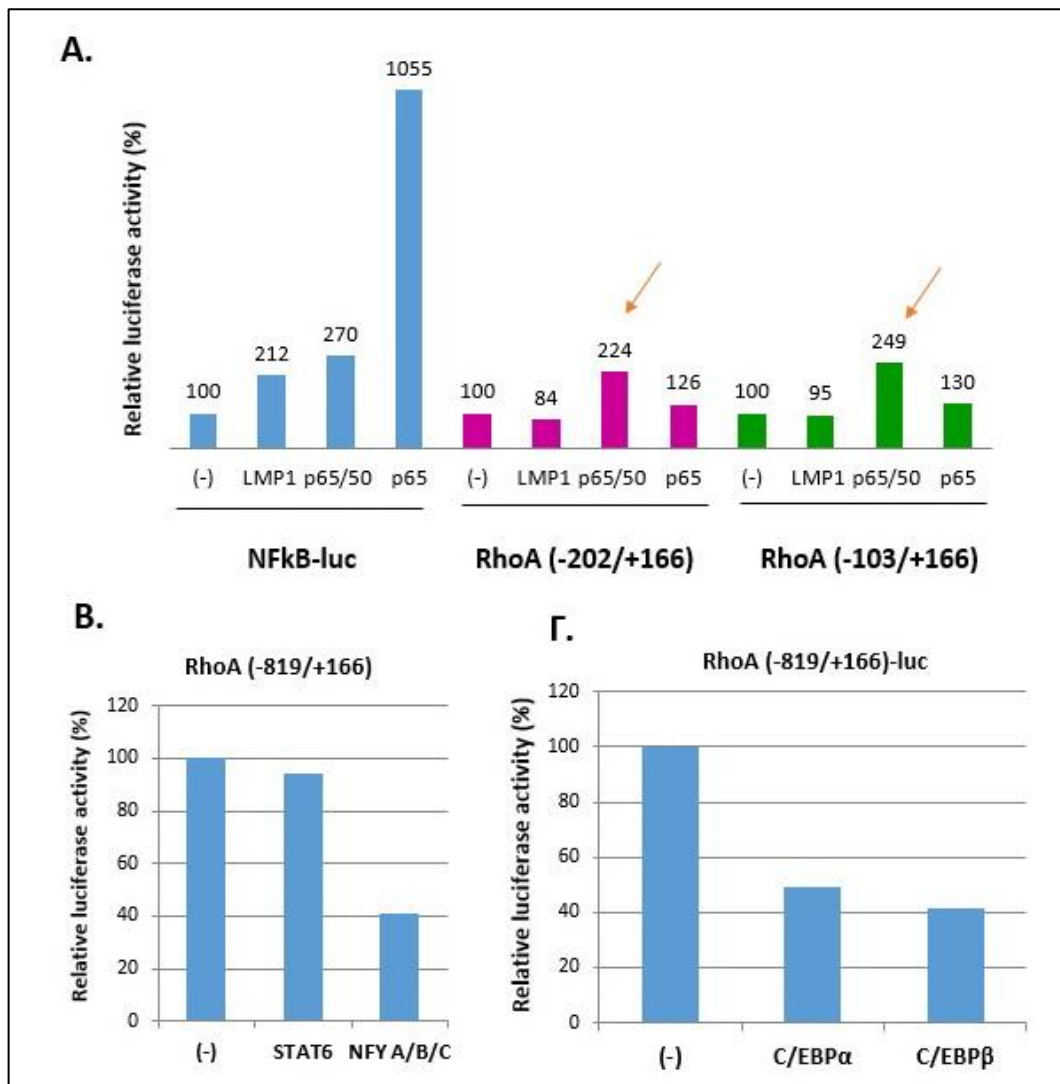
Όπως φαίνεται και στη εικόνα 32 Β, απαλοιφή της περιοχής του υποκινητή που περιέχει τα σημεία πρόσδεσης για τους παράγοντες NF-kB, STAT6 και c-Myc οδήγησε σε μείωση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 60%, ενώ η απαλοιφή του CCAAT box οδήγησε σε περαιτέρω μείωση κατά 75%. Παρόμοιο μοτίβο παρατηρήθηκε και στα κύτταρα P-19.



Εικόνα 32 : Οι θέσεις πρόσδεσης των παραγόντων NF-κB, STAT6, c-Myc καθώς και το CCAAT box συνεισφέρουν στην ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoA στα βλαστικά κύτταρα. (A) Σχηματική αναπαράσταση των 5'ελλείψεων του (-103/+166) υποκινητή της RhoA που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης της εικόνας B (B) Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoA-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.1 μg). Το διάγραμμα δείχνει τους μέσους όρους (±SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων , που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης (***, $p < 0.001$).

Παρά τα παραπάνω ευρήματα, πειράματα επιμόλυνσης με πλασμίδιο αναφοράς για τον υποκινητή της RhoA παρουσία φορέων έκφρασης των παραγόντων c-myc, STAT6, C/EBPα, C/EBPβ και NFY (Εικ. 33 Β, Γ) δεν προκάλεσε αλλαγή στην ενεργότητα του υποκινητή. Η μόνη περίπτωση στην οποία παρατηρήθηκε ενεργοποίηση ήταν κατά την υπερέκφραση των παραγόντων p65/50, η οποία

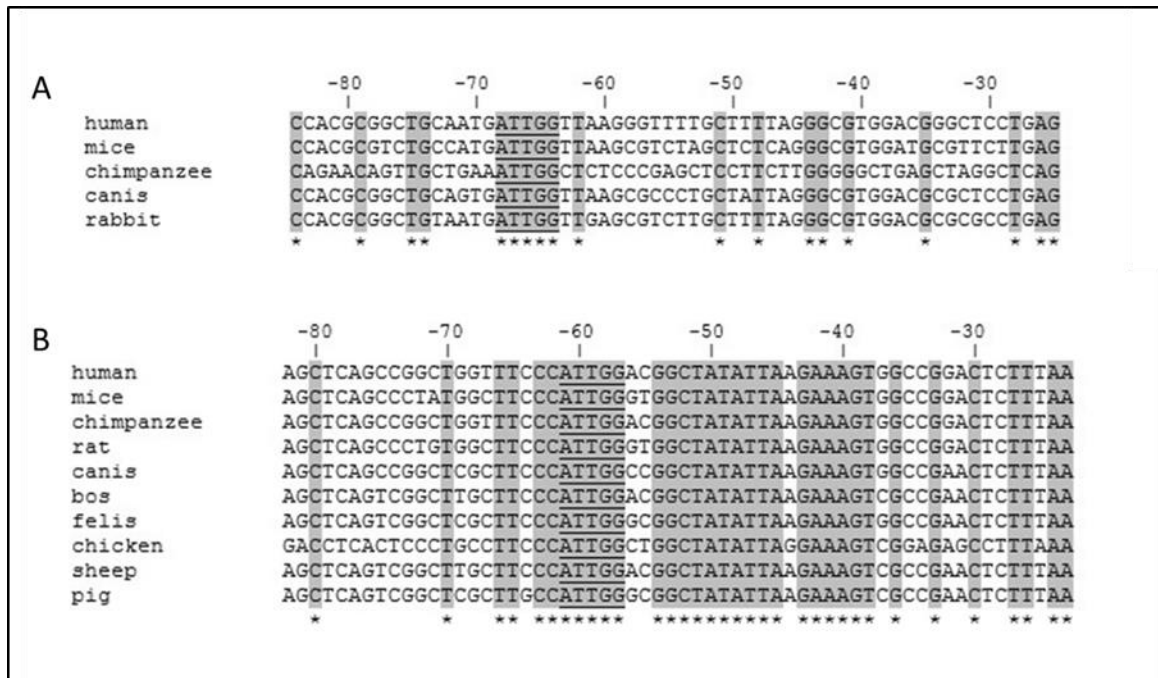
προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά δύο φορές (Εικ. 33 Α). Οι p65 και p50 αποτελούν υπομονάδες του συμπλόκου του NF-κB.



Εικόνα 33 : Η υπερέκφραση των παραγόντων NFκB, STAT6, NFY και C/EBPs δεν προκάλεσε αλλαγή στην ενεργότητα του υποκινητή της RhoA, πλην των παραγόντων p65/50. Κύτταρα CGR8 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα NFκB-luc και RhoA-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται μαζί με φορείς έκφρασης για τον NFκB (Α), τους παράγοντες STAT6, NFY (Β) και C/EBPs (Γ).

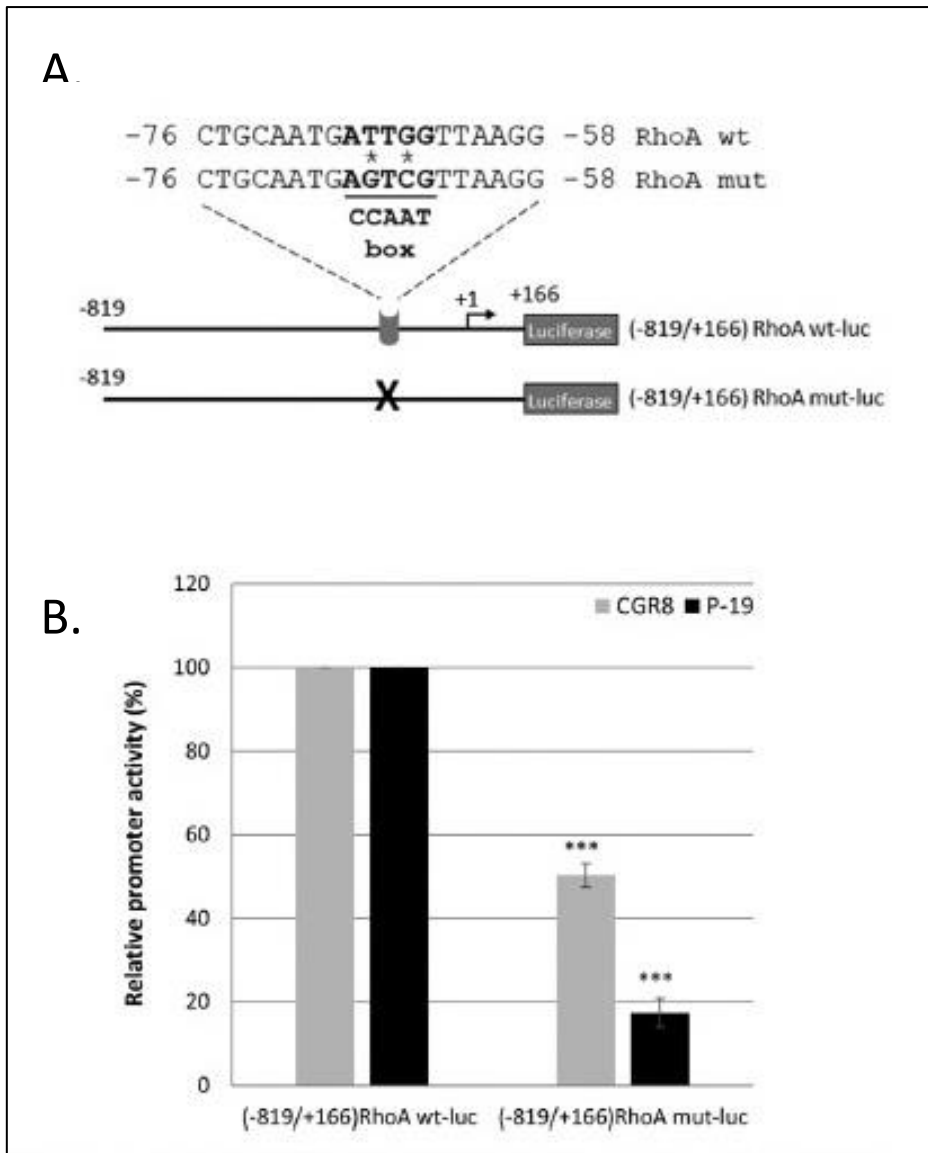
Μεταλλάξεις στο CCAAT box μείωσαν την βασική ενεργότητα του υποκινητή της RhoA

Το ανεστραμμένο CCAAT box στο εγγύς τμήμα του υποκινητή της RhoA στη θέση -68/-64 είναι συντηρημένο στα θηλαστικά (Εικ. 34 Α). Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος αυτού του στοιχείου στη ρύθμιση του γονιδίου της RhoA στα



Εικόνα 34 : Το στοιχείο CCAAT box είναι συντηρημένο στα θηλαστικά. (Α) Ομολογία της περιοχής -84/-25 του υποκινητή της RhoA στον άνθρωπο, το ποντίκι, τον χιμπατζή, τον σκύλο και τον λαγό. (Β) Ομολογία της περιοχής -82/-23 του υποκινητή της RhoB στον άνθρωπο, το ποντίκι, τον χιμπατζή, τον αρουραίο, τον σκύλο, την αγελάδα, τη γάτα, το κοτόπουλο, το πρόβατο και το γουρούνι. Τα ανεστραμμένα CCAAT boxes στις θέσεις -68/-64 για τη RhoA και -61/-57 για τη RhoB υπογραμμίζονται στην εικόνα.

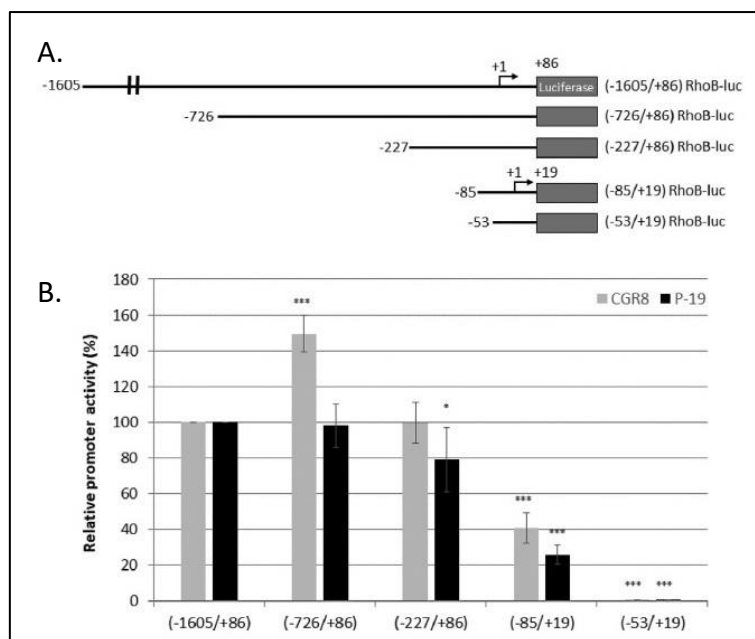
βλαστικά κύτταρα, εισήχθησαν σε αυτό δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις (Εικ. 35 Α). Οι μεταλλάξεις στο CCAAT box μείωσαν τη βασική ενεργότητα του υποκινητή κατά 55% και 82% αντίστοιχα στις δύο κυτταρικές σειρές (Εικ. 35 Β). Συνεπώς, είναι πιθανό ότι στο στοιχείο αυτό προσδένονται παράγοντες που μπορεί να παίζουν θετικό ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση του γονιδίου της RhoA στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 35 : Το CCAAT box παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoA. (A) Σχηματική αναπαράσταση του αγρίου τύπου (-819/+166) υποκινητή της RhoA και του αντίστοιχου τμήματος που φέρει μεταλλάξεις στο CCAAT box. Δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις υποδεικνύονται με αστερίσκους. (B) Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoA-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.05 μg). Το διάγραμμα δείχνει τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης (***, $p < 0.001$).

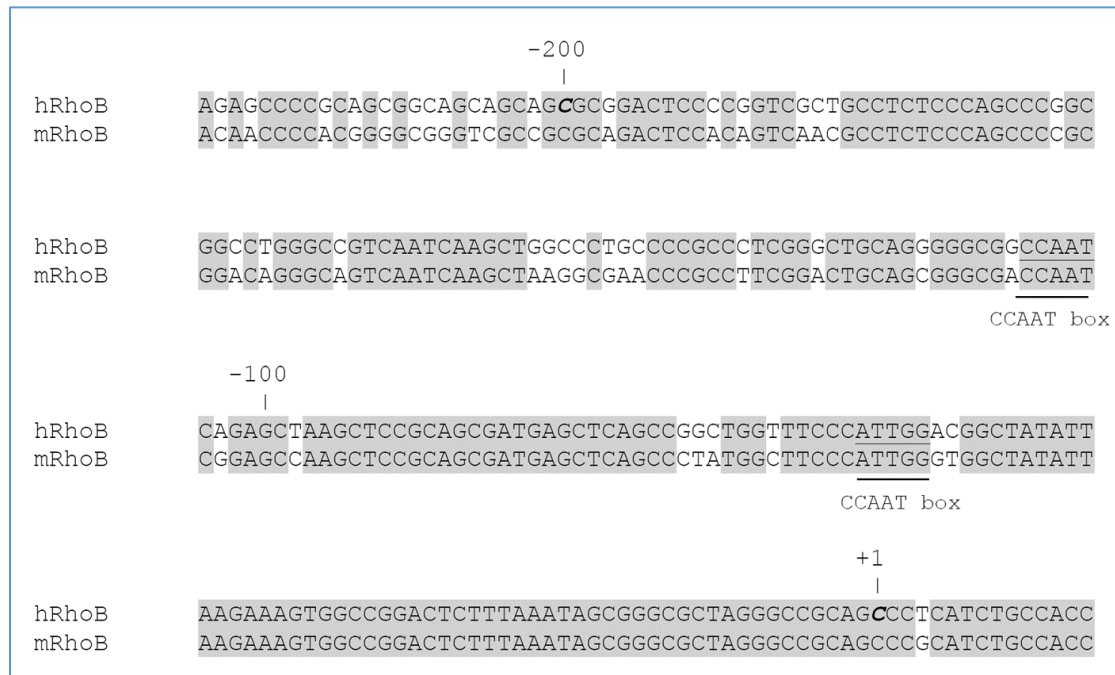
Η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85/-53 είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση της RhoB στα βλαστικά κύτταρα

Προκειμένου να διερευνηθεί ποιες περιοχές είναι σημαντικές για την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB, χρησιμοποιήθηκαν πλασμίδια αναφοράς με διαδοχικές απαλοιφές του 5' άκρου του υποκινητή της RhoB στις θέσεις: -1605, -726, -227, -85 και -53 (Εικ. 36 A). Τα πλασμίδια αυτά κατασκευάστηκαν από την Ε. Βασιλάκη στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής. Τα πλασμίδια εισήχθησαν στα κύτταρα με την τεχνική της παροδικής επιμόλυνσης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 36 B, η απαλοιφή της περιοχής μεταξύ των νουκλεοτιδίων -1605 και -227 δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργότητα του υποκινητή. Αντίθετα, απαλοιφή στη θέση -85 και -53 μείωσε σημαντικά και κατήργησε την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -227 και -53 είναι απαραίτητη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου στα βλαστικά κύτταρα. Παρόμοια αποτελέσματα λήφθησαν και για τα κύτταρα P-19.



Εικόνα 36 : Η εγγύς περιοχή μεταξύ των νουκλεοτιδίων -85 και -53 είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB στα βλαστικά κύτταρα. (A) Σχηματική αναπαράσταση των 5' ελλείψεων του (-1605/+86) υποκινητή της RhoB που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα παροδικής επιμόλυνσης της εικόνας B (B) Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoB-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.1 μg). Το διάγραμμα δείχνει τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης (*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$).

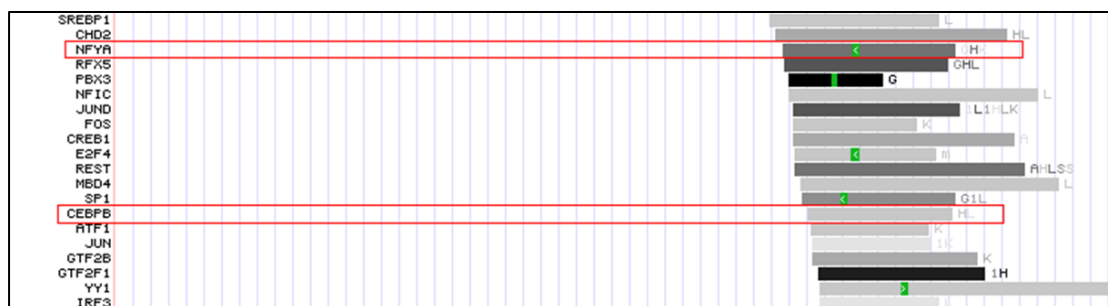
Ο υποκινητής της RhoB περιέχει δύο CCAAT boxes στις θέσεις -109/-105 και -60/-56 τα οποία είναι πλήρως συντηρημένα στα θηλαστικά (Εικ. 37). Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (90) είχε δειχθεί ότι μετάλλαξη του εγγύς



Εικόνα 37 : Ομολογία της κοντινής περιοχής του υποκινητή του γονιδίου της RhoB στον άνθρωπο και το ποντίκι. Στην εικόνα σημειώνονται οι θέσεις των δύο CCAAT boxes.

CCAAT box μείωσε σημαντικά τη βασική ενεργότητα του υποκινητή στα κύτταρα HepG2. Επίσης, στην ίδια μελέτη επιβεβαιώθηκε η πρόσδεση του παράγοντα NFY στο

στοιχείο CCAAT. Η πρόσδεση των παραγόντων NFYB και CEBPB υποστηρίζεται επίσης από CHIP-seq data (Εικ. 38).

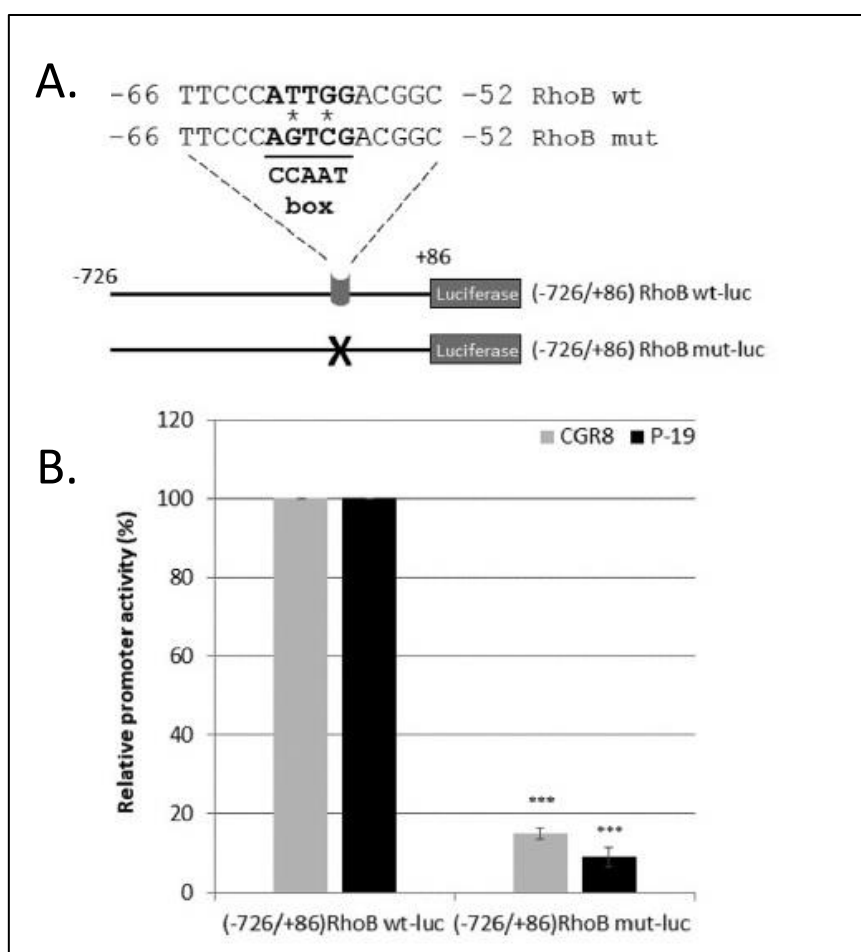


Εικόνα 38 : Βιοπληροφορική ανάλυση της περιοχής -1605/+86 του υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου της RhoB. Για να αναγνωριστούν οι μεταγραφικοί παράγοντες που προσδένονται στον υποκινητή της RhoB χρησιμοποιήθηκε το UCSC genome data. Τα CHIP seq data λήφθησαν από το πρόγραμμα UCSC browser χρησιμοποιώντας το ENCODE with Factorbook Motifs project. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το Feb. 2009(GRCh37/hg19) genome assembly. UCSC link: <http://genome.ucsc.edu/>

Μεταλλάξεις στο CCAAT box μείωσαν την βασική ενεργότητα του υποκινητή της RhoB

Για να διερευνηθεί ο ρόλος του CCAAT box στη ρύθμιση του υποκινητή της RhoB, εισήχθησαν στα κύτταρα πλασμίδια αναφοράς που έφεραν τον αγρίου τύπου -726/+86 RhoB υποκινητή ή το αντίστοιχο τμήμα που περιείχε σημειακές μεταλλάξεις στο στοιχείο CCAAT. Τα αποτελέσματα (Εικ. 39) έδειξαν ότι και στις δύο κυτταρικές σειρές οι μεταλλάξεις στο CCAAT box μείωσαν σημαντικά τη βασική ενεργότητα του υποκινητή (κατά 85% και 91% στα CGR8 και P-19 αντίστοιχα). Όπως φαίνεται επίσης και από το πείραμα της εικόνας 36, η σημασία των CCAAT boxes στην μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB φαίνεται και από την μείωση της ενεργότητας που ακολουθεί την απαλοιφή της περιοχής που περιέχει αυτά τα δύο στοιχεία. Συνολικά, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη και των δύο υποκινητών δείχνουν ότι τα δύο γονίδια ενδέχεται να ρυθμίζονται από κοινούς μεταγραφικούς

παράγοντες οι οποίοι προσδέονται στα στοιχεία CCAAT που υπάρχουν και στους δύο υποκινητές.

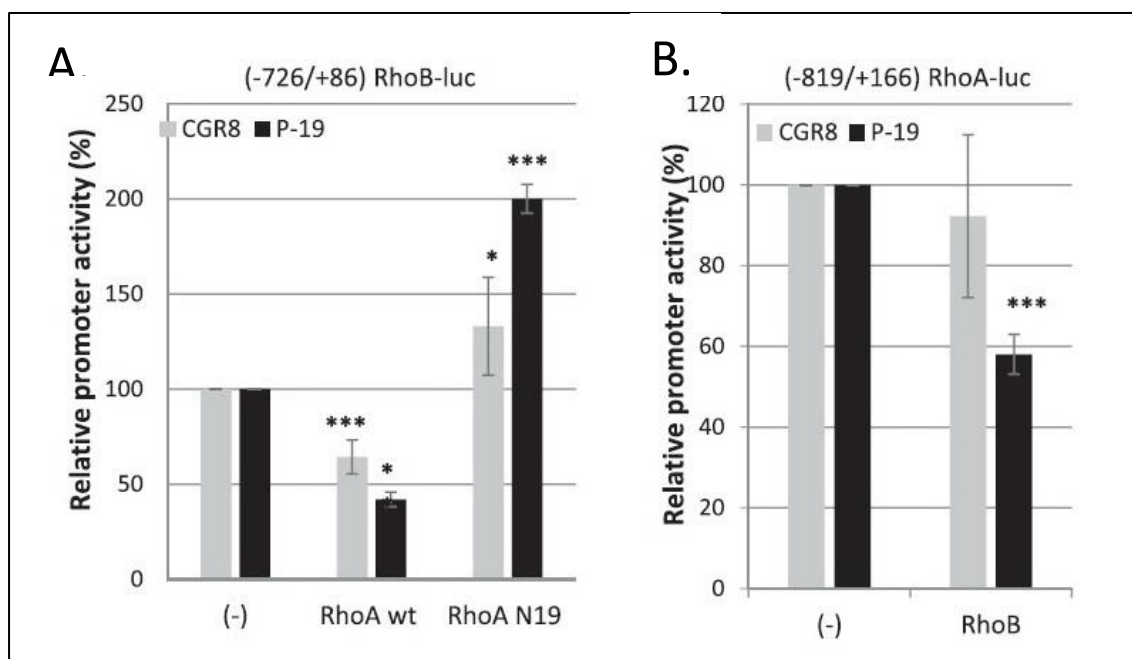


Εικόνα 39 : Το CCAAT box παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB. (A) Σχηματική αναπαράσταση του αγρίου τύπου (-726/+86) υποκινητή της RhoB και του αντίστοιχου τμήματος που φέρει μεταλλάξεις στο CCAAT box. Δύο νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις υποδεικνύονται με αστερίσκους. (B) Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoB-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.05 μg). Το διάγραμμα δείχνει τους μέσους όρους (±SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστικότητας της λουσιφεράσης (***, $p < 0.001$).

Τα γονίδια των Rho υπόκεινται σε αυτορρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα

Για να διερευνηθεί το ενδεχόμενο αυτορρύθμισης των γονιδίων των Rho στα βλαστικά κύτταρα, κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-726/+86) RhoB-luc παρουσία και απουσία πλασμιδίων έκφρασης του

αγρίου τύπου της RhoA και της επικρατούσας αρνητικής μορφής RhoAN19. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 40 A, η υπερέκφραση της αγρίου τύπου RhoA κατέστειλε ενώ η υπερέκφραση της επικρατούσας αρνητικής μορφής της RhoA αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB στα CGR8 και P-19 κύτταρα.

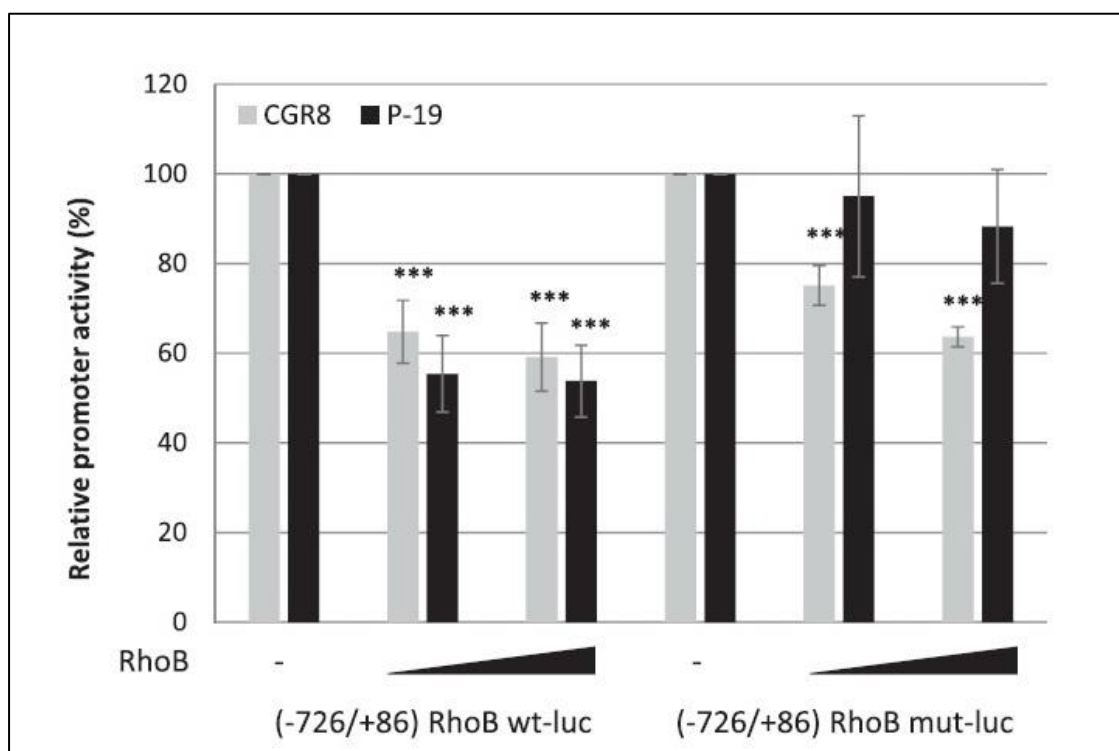


Εικόνα 40 : Τα γονίδια RhoA και RhoB υπόκεινται σε αυτορρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα. (A) Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τον αγρίου τύπου (-726/+86) υποκινητή της RhoB (0.05 μ g) μαζί με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης για την RhoA και την επικρατούσα αρνητική μορφή της RhoA N19 (0.75 μ g). (B) Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με πλασμίδιο αναφοράς RhoA-luc (-819/+166) (0.05 μ g) παρουσία ή απουσία ενός φορέα έκφρασης για την RhoB (0.75 μ g). Τα διαγράμματα δείχνουν τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης (*, $p < 0.05$, ***, $p < 0.001$).

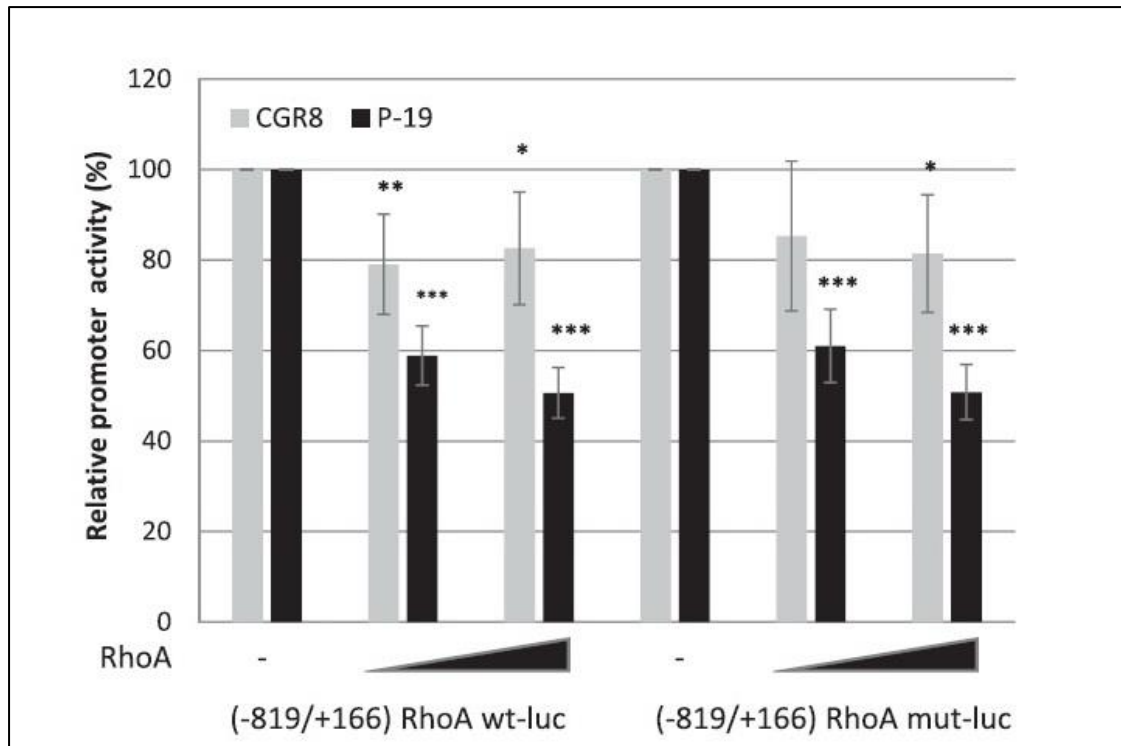
Ο υποκινητής της RhoA ρυθμίζεται, επίσης, από την RhoB. Η υπερέκφραση της αγρίου τύπου RhoB δεν είχε καμία επίδραση στην ενεργότητα του (-819/+166) RhoA υποκινητή στα κύτταρα CGR8 (Εικ. 40 B), ενώ αντίθετα, η υπερέκφραση της RhoB στα κύτταρα P-19 ανέστειλε την ενεργότητα του (-819/+166) RhoA υποκινητή (Εικ. 40 B).

Στη συνέχεια, διερευνήθηκε ο πιθανός ρόλος των κοντινών CCAAT boxes στη διαδικασία αυτορρύθμισης των γονιδίων της RhoA και της RhoB. Η υπερέκφραση της RhoB ανέστειλε την ενεργότητα του υποκινητή της στα CGR8 και P-19 κύτταρα με

δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικ. 41), ενώ η μετάλλαξη στο RhoB CCAAT box δεν είχε καμία επίδραση στη διαδικασία της αυτορρύθμισης στα CGR8 αλλά κατάργησε την αυτορρύθμιση στα P-19. Παρομοίως, η RhoA ανέστειλε την ενεργότητα του (-819/+166) RhoA υποκινητή στα κύτταρα CGR8 με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (Εικ. 42) και αυτή η καταστολή ήταν πιο έντονη στα κύτταρα P-19. Η μετάλλαξη του CCAAT box στον υποκινητή της RhoA δεν είχε καμία επίδραση στην αυτορρύθμιση της RhoA σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές (Εικ. 42).



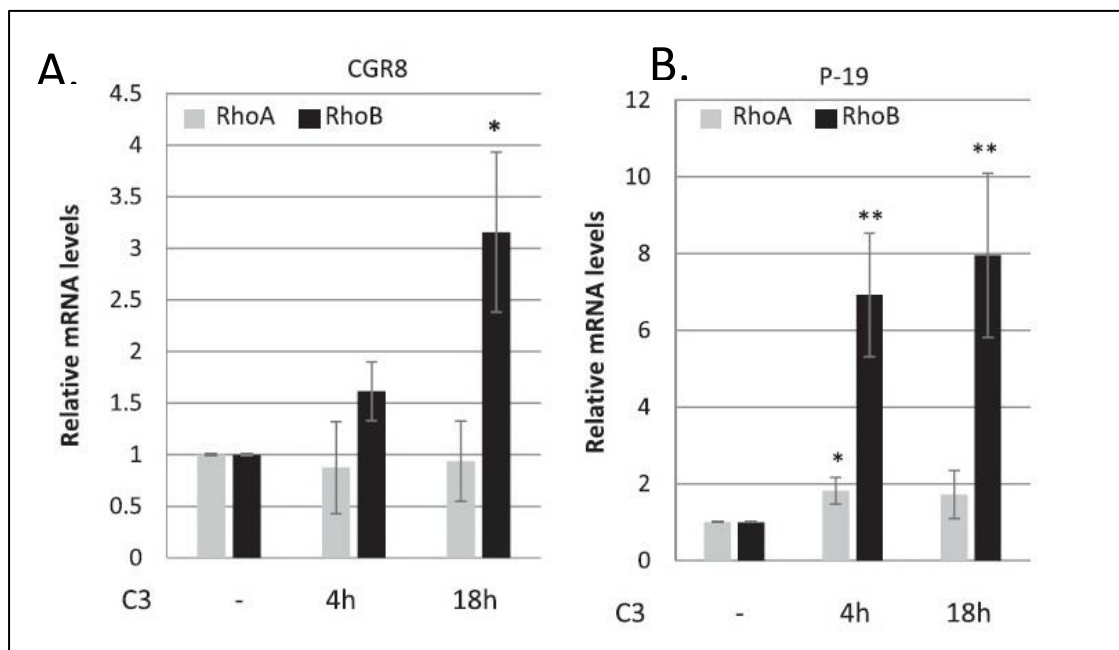
Εικόνα 41 : Ο ρόλος του στοιχείου CCAAT στην αυτορρύθμιση της RhoB. Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoB-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.05 μg) μαζί με αυξανόμενες ποσότητες ενός φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου μορφής της RhoB (0.35 μg και 0.75 μg). Τα διαγράμματα δείχνουν τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης (***, $p < 0.001$).



Εικόνα 42 : Ο ρόλος του στοιχείου CCAAT στην αυτορρύθμιση της RhoA. Κύτταρα CGR8 και P-19 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα RhoA-luc πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται (0.05 μg) μαζί με αυξανόμενες ποσότητες ενός φορέα έκφρασης της αγρίου τύπου μορφής της RhoA (0.35 μg και 0.75 μg). Τα διαγράμματα δείχνουν τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν, των κανονικοποιημένων τιμών της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$).

Προκειμένου να διερευνηθεί εάν η αυτορρύθμιση των Rho απαιτεί δράση GTPάσης, χρησιμοποιήθηκε ο καταστολέας των Rho C3 τρανσφεράση (169). Ο καταστολέας C3 καταστέλλει τη δράση των Rho μέσω ADP ριβοζυλίωσης της Ασπαραγίνης 41 η οποία είναι συντηρημένη και στις τρεις Rho. Σε παλαιότερη μελέτη αναφέρεται ότι ο C3 μείωσε την διακυτταρική επαφή των P-19 κυττάρων κατά τη διαδικασία της νευρογένεσης που επάγεται από ρετινοϊκό οξύ (RA). Παρόλα αυτά, αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα δεν επώαστηκαν με RA. Αυτό σημαίνει ότι παραμένοντας πολυδύναμα, τα κύτταρα εμφάνισαν αντίσταση στη διάσπαση κατά την επώαση με τον καταστολέα C3 (168). Δεδομένου αυτού, και σε αυτή τη μελέτη επιλέχθηκε να γίνει η επώαση των βλαστικών κυττάρων με τον C3 σε συνθήκες διαφοροποίησης (απουσία LIF). Όπως φαίνεται στην εικόνα 43, ο C3 αναστολέας προκάλεσε αύξηση των επιπέδων mRNA της RhoB αλλά όχι της RhoA με χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Πιο έντονη ήταν η αύξηση των επιπέδων της RhoB στα

κύτταρα P-19, ενώ η έκφραση της RhoA δεν επηρεάστηκε. Οι παρατηρήσεις αυτές συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα, επιβεβαιώνοντας τον μηχανισμό αυτορρύθμισης στην έκφραση της RhoB τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 43 : Η αυτορρύθμιση των RhoA και RhoB απαιτεί την δράση GTPάσης των Rho. Κύτταρα CGR8 (A) ή P-19 (B) επώαστηκαν με τον αναστολέα των Rho C3 (0.1 μg/μl) για 4 h ή 18 h. Απομονώθηκε το συνολικό RNA των κυττάρων και τα επίπεδα των RhoA και RhoB mRNA μετρήθηκαν με qPCR. Οι τιμές κανονικοποιήθηκαν σε σχέση με τα mRNA επίπεδα της τουμπουλίνης. Τα διαγράμματα δείχνουν τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$).

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGFβ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ : Η ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ RHO ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ενας από τους σκοπούς της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί ο δυνητικός ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ στη ρύθμιση της έκφρασης των ανθρώπινων γονιδίων της RhoA και της RhoB στα βλαστικά κύτταρα.

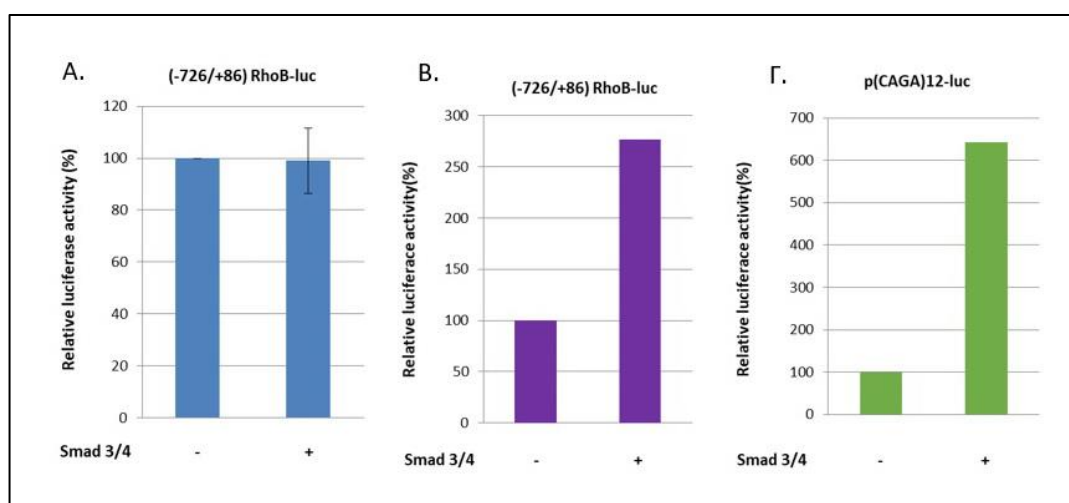
Επώαση των κυττάρων CGR8 με TGFβ1 και/ή υπερέκφραση των Smad 3/4 υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας (παρουσία LIF)

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (90) είχε αποδειχθεί η επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της RhoB σε ινοβλάστες και HaCaT κερατινοκύτταρα. Δεδομένου αυτού, επιχειρήθηκε και στην παρούσα μελέτη η ενεργοποίηση της RhoB από τον TGFβ και στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα CGR8.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 44, η υπερέκφραση των παραγόντων Smad3/4 απέτυχε να ενεργοποιήσει τον υποκινητή της RhoB στα κύτταρα CGR8 (A), σε αντίθεση με την ενεργοποίηση που παρατηρήθηκε στα κύτταρα HepG2 (B). Ωστόσο, οι παράγοντες Smad3/4 πέτυχαν να αυξήσουν στα κύτταρα CGR8 την ενεργότητα του συνθετικού υποκινητή ρ(CAGA)₁₂, ο οποίος φέρει 12 διαδοχικές θέσεις πρόσδεσης (CAGA) των πρωτεϊνών Smad (Γ).

Δεδομένου ότι ο TGFβ1 εμπλέκεται στη διαδικασία της διαφοροποίησης (40,128,134) επιχειρήθηκε η επαγωγή της διαφοροποίησης και στα κύτταρα CGR8. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις TGFβ1, αλλά και σε διάφορες συνθήκες ορού προκειμένου να επιτευχθεί κάποιου βαθμού διαφοροποίηση. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επώαστηκαν με 2.5-5 ng/ml TGFβ1 σε 3.5% FBS για 24h ενώ προηγουμένως είχαν καλλιεργηθεί σε 3.5% , 7.5% ή 15% FBS. Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις ορού επιλέχθηκαν προκειμένου τα κύτταρα να καλλιεργηθούν σε

συνθήκες απουσίας ορού (serum starvation) αφενός, και αφετέρου επειδή ο ορός είναι ένας παράγοντας που επάγει από μόνος του διαφοροποίηση.

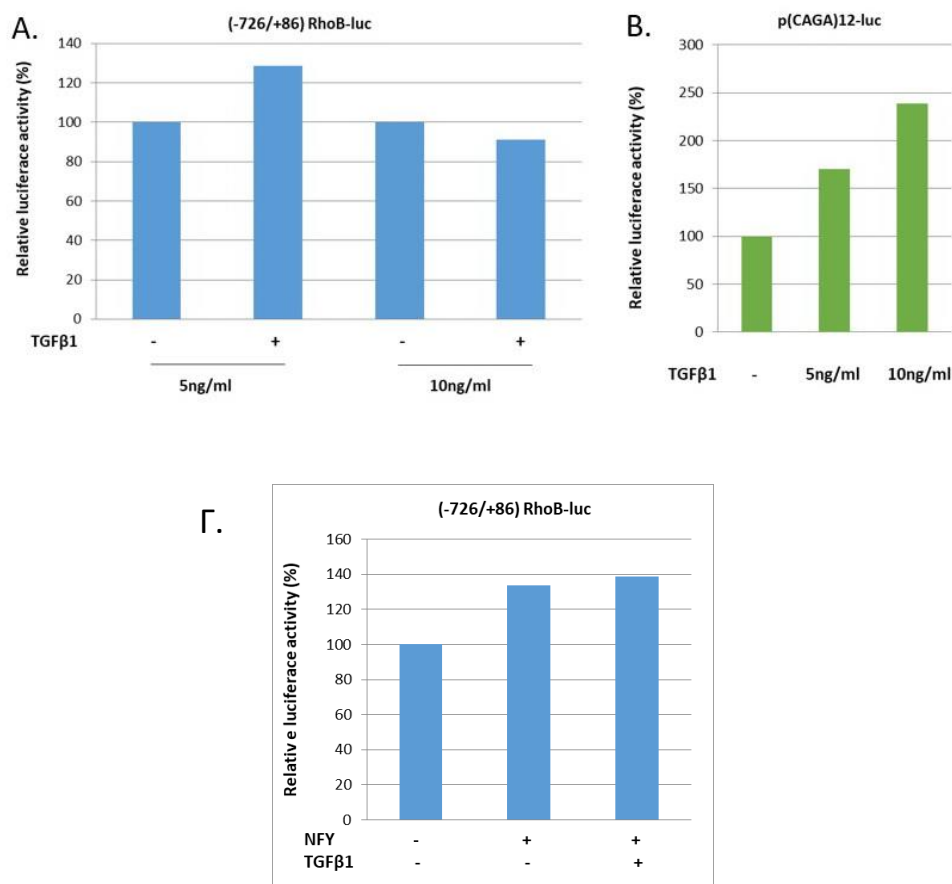


Εικόνα 44 : Στα βλαστικά κύτταρα το γονίδιο της RhoB δεν ενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες Smad. (A, Γ) Κύτταρα CGR8 και (B) HepG2 επιμολύνθηκαν παροδικά με τα πλασμίδια αναφοράς που υποδεικνύονται μαζί με φορείς έκφρασης των πρωτεϊνών Smad 3/4.

Σε καμία από αυτές τις περιπτώσεις δεν διαπιστώθηκε διαφοροποίηση αφού δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου Brachyury, που αποτελεί γονίδιο-δείκτη της διαφοροποίησης (170) αλλά και του γονιδίου Jun-B, που αποτελεί δείκτη έκφρασης του TGFβ1.

Στις ίδιες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν παροδικές επιμολύνσεις των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων CGR8 με το πλασμίδιο αναφοράς για τον υποκινητή της RhoB παρουσία TGFβ. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ώρες σε 3.5 % FBS παρουσία 5ng/ml ή 10ng/ml TGFβ1 (Εικ. 45 A). Κατά τα πειράματα αυτά ο TGFβ δεν αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB. Επιμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή ρ(CAGA)12 παρουσία 5ng/ml ή 10ng/ml TGFβ είχε ως αποτέλεσμα μία ήπια αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή (Εικ. 45 B). Συν-επιμόλυνση των κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης για τον παράγοντα

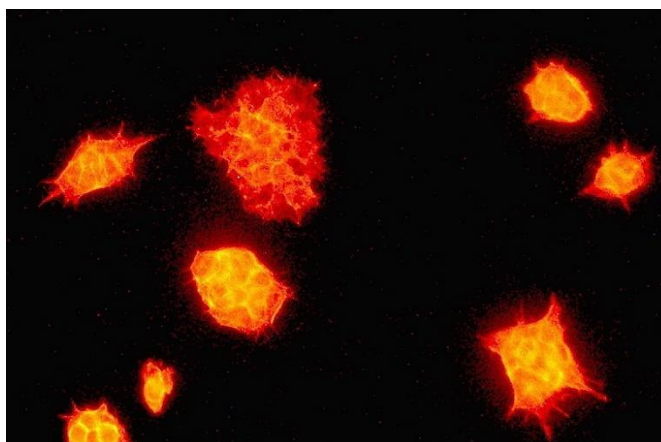
NFY παρουσία 10ng/ml TGFβ δεν αύξησε, επίσης, την ενεργότητα του υποκινητή (Εικ. 45 Γ)



Εικόνα 45: Το γονίδιο της RhoB δεν ενεργοποιείται από τον TGFβ στα βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 επιμολύνθηκαν παροδικά με το πλασμίδιο αναφοράς (-726/+86) RhoB-luc (A) και p(CAGA)12-luc (B) παρουσία αυξανόμενων ποσοτήτων TGFβ1 (5 ng/ml και 10 ng/ml). (Γ) Κύτταρα CGR8 επιμολύνθηκαν παροδικά με το (-726/+86) RhoB-luc πλασμίδιο αναφοράς παρουσία ενός φορέα έκφρασης για τον NFY και παρουσία TGFβ1 (5 ng/ml).

Αξίζει εδώ να αναφερθεί ότι το γονίδιο PAI-1, που αποτελεί δείκτη ενεργότητας του TGFβ1, δεν εκφράζεται στα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα CGR8. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η προσπάθεια να μελετηθεί ο κυτταροσκελετός στα κύτταρα CGR8 δεν ήταν εύκολη, καθώς τα κύτταρα μεγαλώνουν εις ύψος με αποτέλεσμα να μην είναι διακριτά τα ινίδια της ακτίνης (Εικ. 46). Η χρώση για δείκτες της επιθηλιομεσεγχυματικής μετάβασης (EMT), όπως η E-

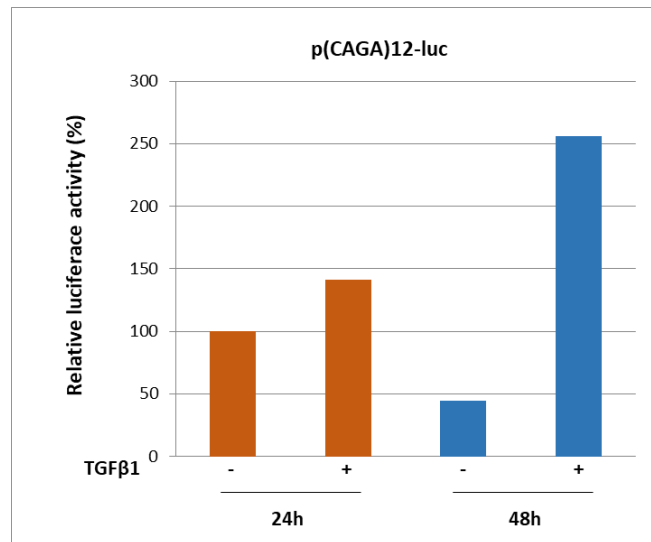
cadherin, ZO-1 και α -SMA παρουσία και απουσία TGF β 1 δεν είχε επίσης κάποιο σημαντικό αποτέλεσμα.



Εικόνα 46 : Χρώση της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοιδίνη σε κύτταρα CGR8. Τα κύτταρα μεγαλώνουν εις ύψος με αποτέλεσμα να μην είναι διακριτές πιθανές αλλαγές στα ινίδια της ακτίνης.

Επώαση των κυττάρων CGR8 με TGF β 1 και/ή υπερέκφραση των Smad 3/4 υπό συνθήκες διαφοροποίησης (απουσία LIF)

Στη συνέχεια των πειραμάτων πρέπει να αναφερθεί ότι οι παροδικές επιμόλυνσεις έγιναν με τη μέθοδο της Attractene. Επίσης, η καλλιέργεια γίνεται με την προσθήκη μικρότερης ποσότητας LIF (2 έναντι 4 μ l/ml) στο μέσο καλλιέργειας. Ακόμα, προκειμένου να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι του TGF β , ελαττώθηκε περαιτέρω η προσθήκη του παράγοντα LIF στο μέσο καλλιέργειας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Συγκεκριμένα τα κύτταρα αναπτύχθηκαν για 24 ή 48 ώρες σε 3.5 % FBS παρουσία 3.5% LIF (δηλαδή 0,07 μ l/ml) και επώαστηκαν με 5ng/ml TGF β για 24 ώρες. Επιμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή p(CAGA)₁₂ είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 2.5 φορές στην περίπτωση της 48ωρης απομάκρυνσης του LIF (Εικ. 47-μπλε διάγραμμα).

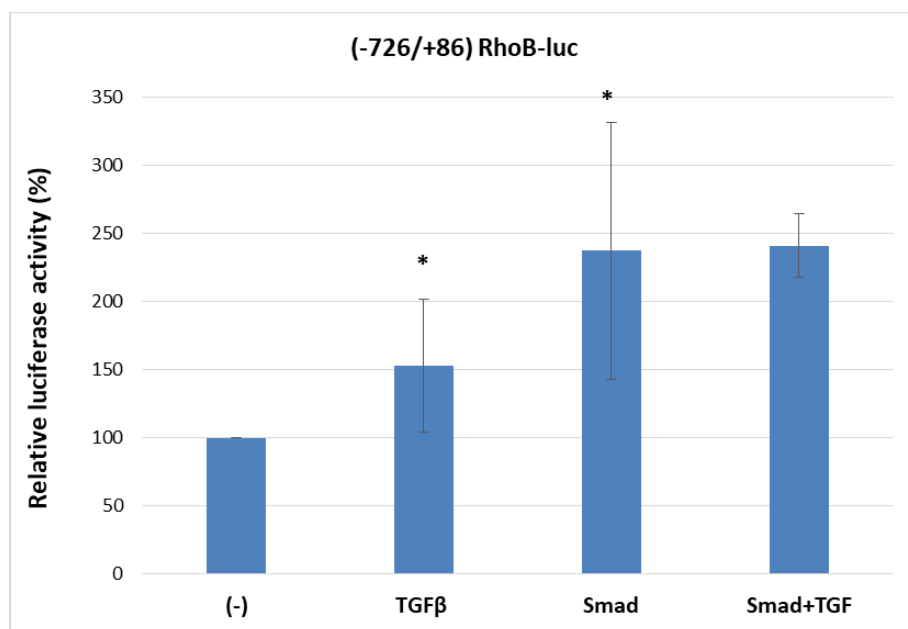


Εικόνα 47 : Η απομάκρυνση του παράγοντα LIF από το καλλιεργητικό μέσο επέτρεψε την ενεργοποίηση του μονοπατιού του TGFβ στα βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 αναπτύχθηκαν για 24 και 48 ώρες σε 3.5 % FBS παρουσία 3.5% LIF (δηλαδή 0,07 μl/ml) και επώαστηκαν με 5ng/ml TGFβ1 για 24 ώρες. Επιμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς του συνθετικού υποκινητή p(CAGA)12-luc είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 2.5 φορές στην περίπτωση της 48ωρης απομάκρυνσης του LIF.

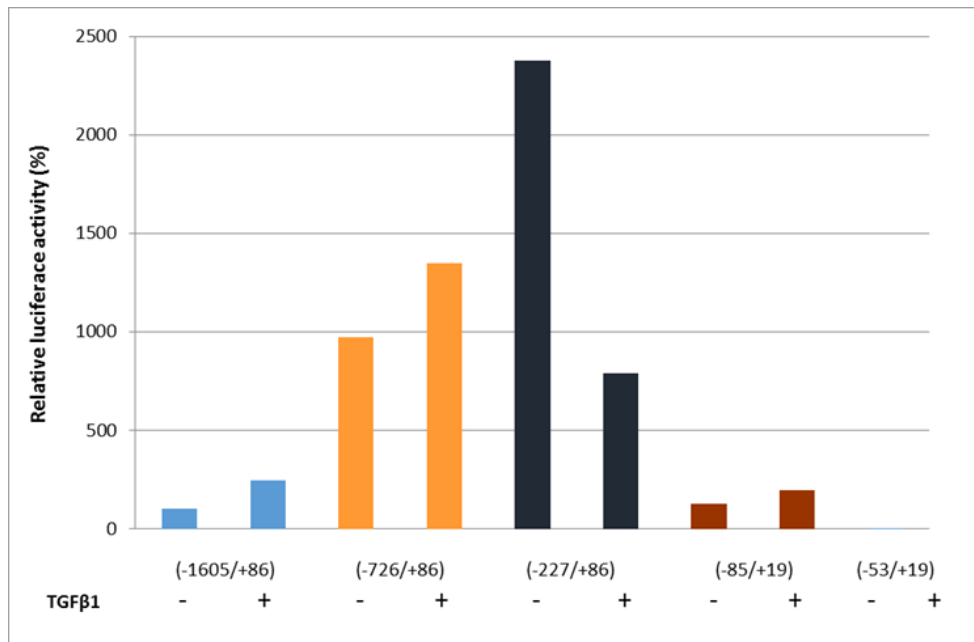
Ακολουθώς, υπό τις ίδιες συνθήκες η επώαση των κυττάρων με TGFβ1 (5ng/ml) για 24 ώρες και η υπερέκφραση των παραγόντων Smad3/4 πέτυχαν μία ήπια αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB (Εικ.48). Επίσης, επιμόλυνση με πλασμίδια αναφοράς που φέρουν όλες τις ελλείψεις του υποκινητή της RhoB παρουσία TGFβ αύξησε σε όλες τις περιπτώσεις (πλην του τμήματος -227/+86) την ενεργότητα του υποκινητή (Εικ. 49). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και κατά την υπερέκφραση των παραγόντων Smad3/4.

Είναι γνωστό ότι ο TGFβ επάγει διαφορετικές αποκρίσεις στους διαφορετικούς τύπους κυττάρων ανάλογα με τους μεταγραφικούς παράγοντες με τους οποίους συνεργάζεται. Είναι γνωστό επίσης ότι η Smad3 καταλαμβάνει το γονιδίωμα μαζί με τον Oct4 στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (171) και ότι η Smad4 προσδέεται στον υποκινητή του γονιδίου Oct4 (146). Συγκεκριμένα αναφέρεται ότι ο Oct4 οδηγεί την πρόσδεση της Smad3 στα γονίδια-στόχους του TGFβ. Ωστόσο, η

συνεπιμόλυνση των κυττάρων με τον παράγοντα Oct4 δεν αύξησε περαιτέρω την ενεργότητα του υποκινητή.

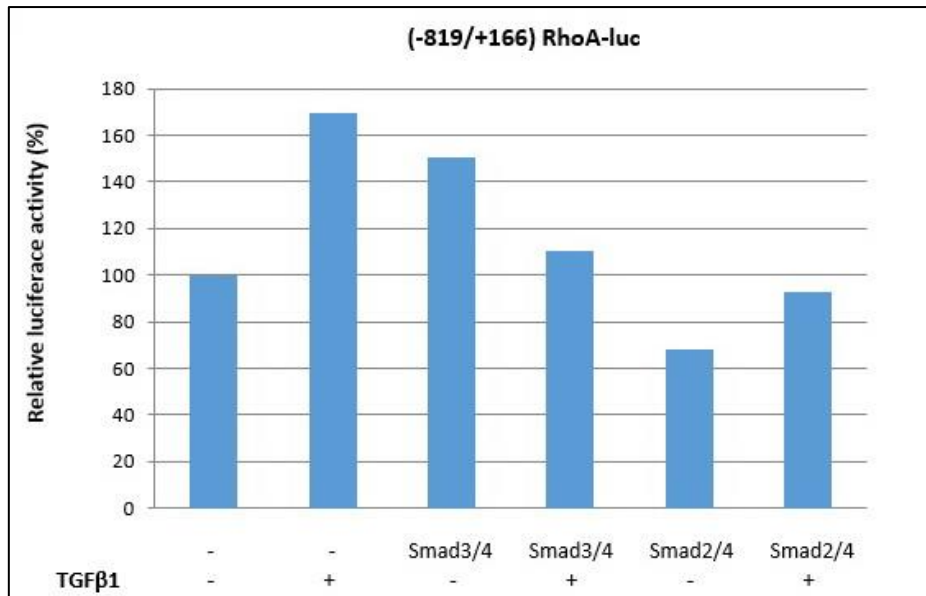


Εικόνα 48 : Η απομάκρυνση του παράγοντα LIF από το καλλιεργητικό μέσο επέτρεψε μία ήπια ενεργοποίηση της RhoB από τον TGFβ1 στα βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε 3.5 % FBS παρουσία 3.5% LIF (δηλαδή 0,07 μl/ml) και επώαστηκαν με 5ng/ml TGFβ1 για 24 ώρες, είτε επιμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης για τις πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 (*, $p < 0.05$).



Εικόνα 49 : Επιμόλυνση των κυττάρων CGR8 με πλασμίδια αναφοράς για τον υποκινητή της RhoB παρουσία TGFβ1. Η επιμόλυνση των κυττάρων σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης LIF (0,07 μl/ml) με πλασμίδια που φέρουν τις 5' ελλείψεις του υποκινητή της RhoB παρουσία TGFβ1 (5ng/ml) αύξησε σε όλες τις περιπτώσεις (πλην του τμήματος -227/+86) την ενεργότητα του υποκινητή.

Τέλος, παροδική επιμόλυνση των βλαστικών κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς RhoA-luc (-819/+166) παρουσία 5ng/ml TGFβ1 για 24 ώρες έδειξε ήπια αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή, που όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικ. 50). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και κατά την υπερέκφραση των παραγόντων Smad3/4. Η Smad2 δεν φαίνεται να επιδρά στην ενεργότητα του υποκινητή. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες καλλιέργειας 3.5 % FBS και 3.5% LIF για 48 ώρες.

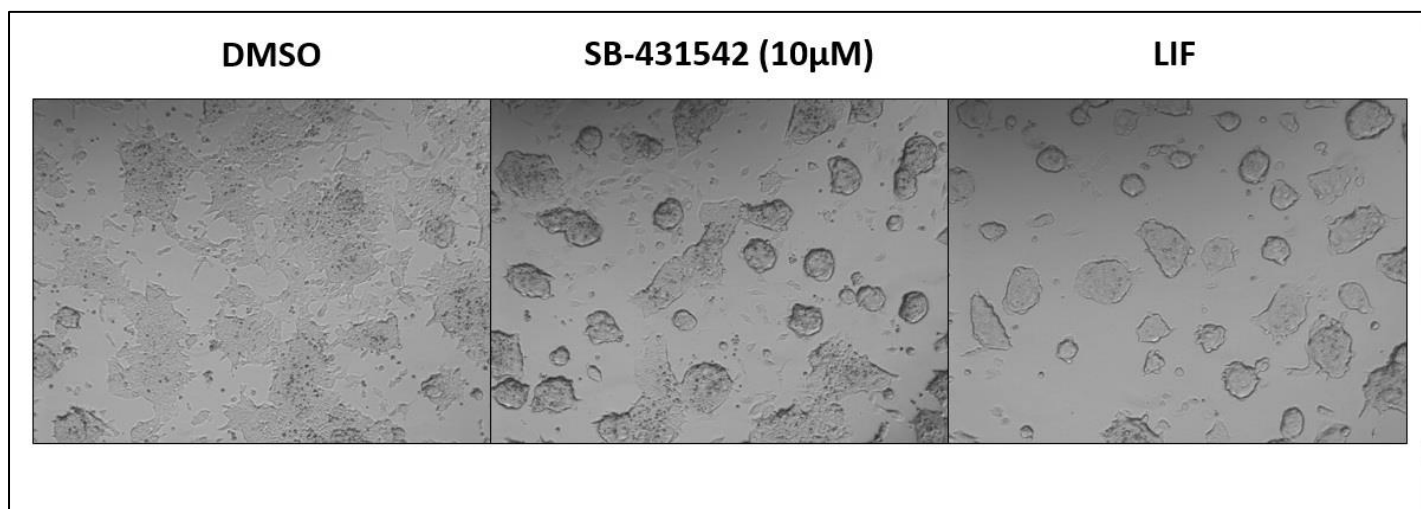


Εικόνα 50 : Το μονοπάτι του TGFβ δεν ενεργοποιεί τη RhoA στα βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 επιμολύνθηκαν με το RhoA-luc (-819/+166) πλασμίδιο αναφοράς και ταυτόχρονα έγινε υπερέκφραση των παραγόντων Smad, παρουσία και απουσία TGFβ1 (5ng/ml). Το πείραμα έγινε σε συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης LIF (0,07 μl/ml).

Επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα SB-431542 απουσία LIF

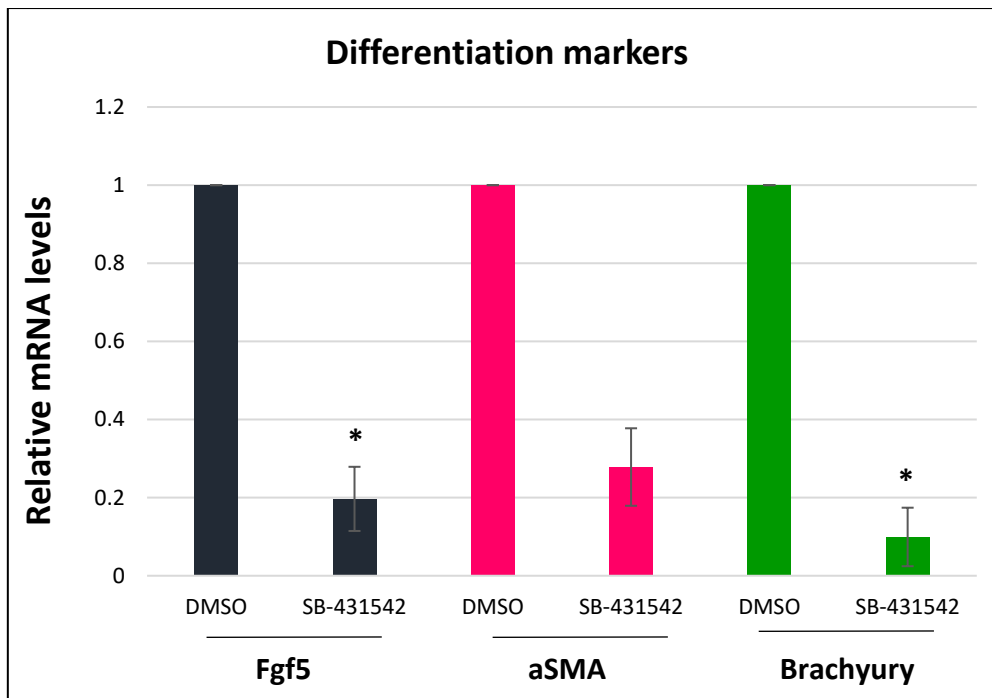
Είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι ο TGFβ επάγει την διαφοροποίηση πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων προς μεσοδερμικά κύτταρα (16,146-148). Προκειμένου να επιτευχθεί η κυτταρική διαφοροποίηση από τον TGFβ, τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία 15% FBS και πλήρους απουσίας LIF, παρουσία DMSO ή SB-431542 (10μM). Ο SB-431542 είναι αναστολέας της σηματοδότησης του TGFβ, της Ακτιβίνης και το παράγοντα Nodal. Κατά τα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε διατήρηση της μορφολογίας των βλαστικών κυττάρων παρουσία του SB-431542

υποδηλώνοντας ότι η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ οδηγεί στην διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων (Εικ. 51).

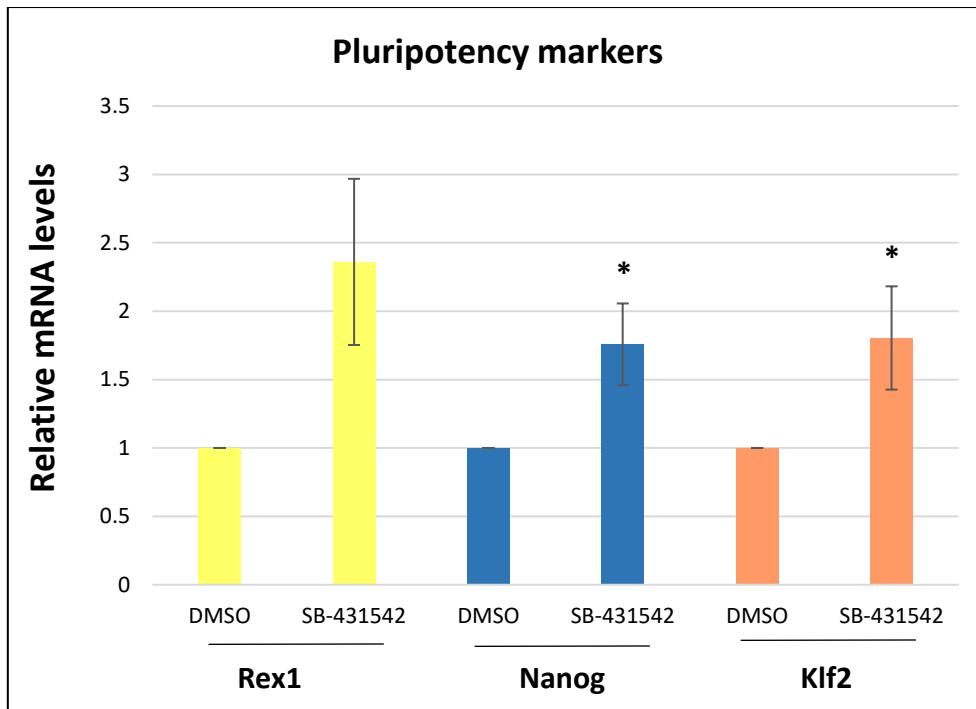


Εικόνα 51 : Ο αναστολέας του TGF SB-431542 επιτρέπει τη διατήρηση της πολυδυναμίας στα βλαστικά κύτταρα. Κύτταρα CGR8 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία 15% FBS και πλήρους απουσίας LIF, παρουσία DMSO ή SB-431542 (10μM). Παρουσία του αναστολέα SB-431542 τα κύτταρα διατηρούν την μορφολογία που έχουν υπό κανονικές συνθήκες καλλιέργειας παρουσία LIF.

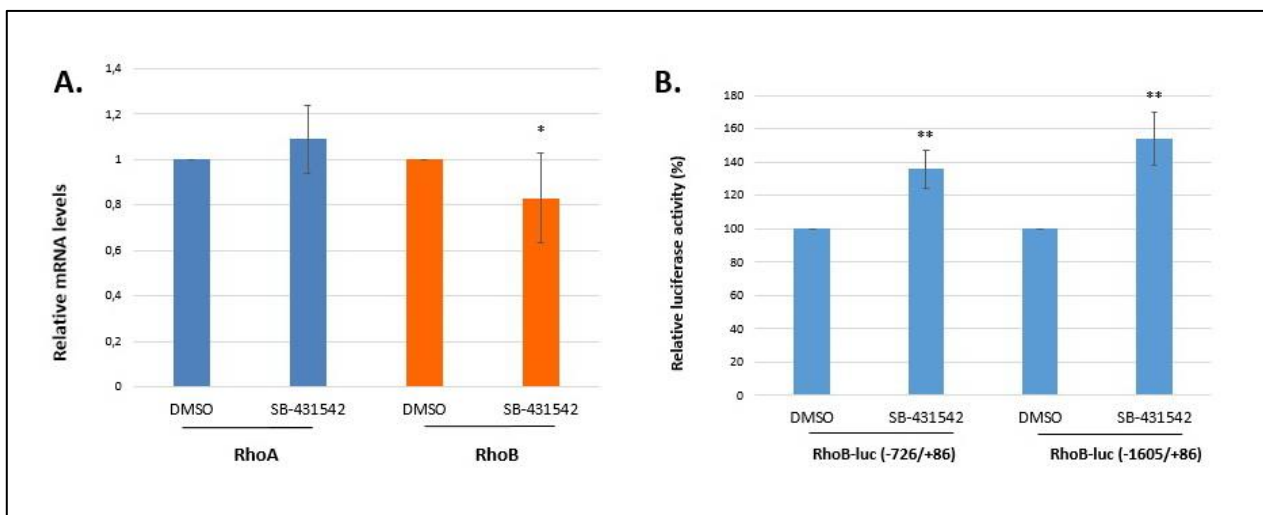
Το παραπάνω εύρημα υποστηρίζεται και από τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-δεικτών διαφοροποίησης όπως τα Brachyury, Fgf5 και α-SMA (Εικ. 52) καθώς και γονιδίων-δεικτών πολυδυναμίας Nanog, Klf2 και Rex1 (Εικ. 53) (6,26,172,173). Όπως φαίνεται και από τις εικόνες, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που υποδηλώνουν διαφοροποίηση μειώθηκαν παρουσία του αναστολέα, ενώ το αντίθετο συνέβη για τα γονίδια που υποδηλώνουν πολυδυναμία. Στο πείραμα αυτό φαίνεται ότι παρά την επίτευξη κάποιου βαθμού διαφοροποίησης, τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της RhoA και της RhoB δεν αλλάζουν (Εικ. 54 A). Επίσης, επιμόλυνση των κυττάρων με τα πλασμίδια αναφοράς -1605/+86 και -726/+86 για τον υποκινητή της RhoB παρουσία του αναστολέα υπό τις παραπάνω συνθήκες οδηγεί σε μία ήπια αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή (Εικ. 54 B).



Εικόνα 52 : Ο SB-431542 αναστέλλει τη διαδικασία της διαφοροποίησης στα βλαστικά κύτταρα CGR8 όπως φαίνεται από τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων-δεικτών. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία 15% FBS και πλήρους απουσίας LIF, παρουσία DMSO ή SB-431542 (10μM). Το συνολικό RNA απομονώθηκε και τα επίπεδα mRNA των γονιδίων Fgf5, a-SMA και Brachyury μετρήθηκαν με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμπουλίνης. Το διάγραμμα δείχνει τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, $p < 0.05$).



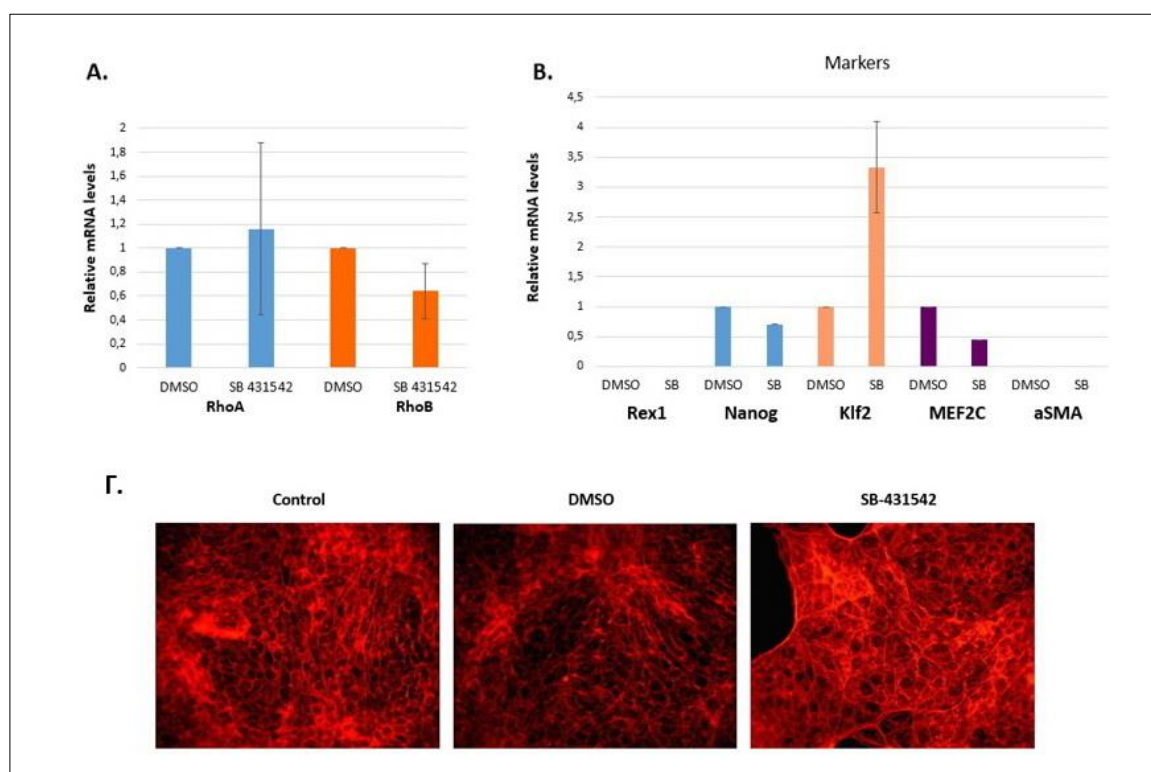
Εικόνα 53 : Ο SB-431542 ευνοεί τη διατήρηση της πολυδυναμίας στα βλαστικά κύτταρα CGR8 όπως φαίνεται από τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων-δεικτών. Τα κύτταρα επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία 15% FBS και πλήρους απουσίας LIF, παρουσία DMSO ή SB-431542 (10μM). Το συνολικό RNA απομονώθηκε και τα επίπεδα mRNA των γονιδίων Rex1, Nanog και Klf2 μετρήθηκαν με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμποουλίνης. Το διάγραμμα δείχνει τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, $p < 0.05$).



Εικόνα 54 : Η καταστολή του μονοπατιού του TGFβ δεν προκαλεί αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB. (A) Κύτταρα CGR8 επωάστηκαν για 48 ώρες παρουσία 15% FBS και πλήρους απουσίας LIF, παρουσία DMSO ή SB-431542 (10μM). Το συνολικό RNA απομονώθηκε και τα επίπεδα mRNA των RhoA και RhoB μετρήθηκαν με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμποουλίνης.

(B) Κύτταρα CGR8 επιμολύνθηκαν με πλασμίδια αναφοράς για τον υποκινητή της RhoB υπό τις παραπάνω συνθήκες. Στο διάγραμμα φαίνονται οι τιμές της % σχετικής δραστηριότητας της λουσιφεράσης που αποτελούν τους μέσους όρους (\pm SD) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$).

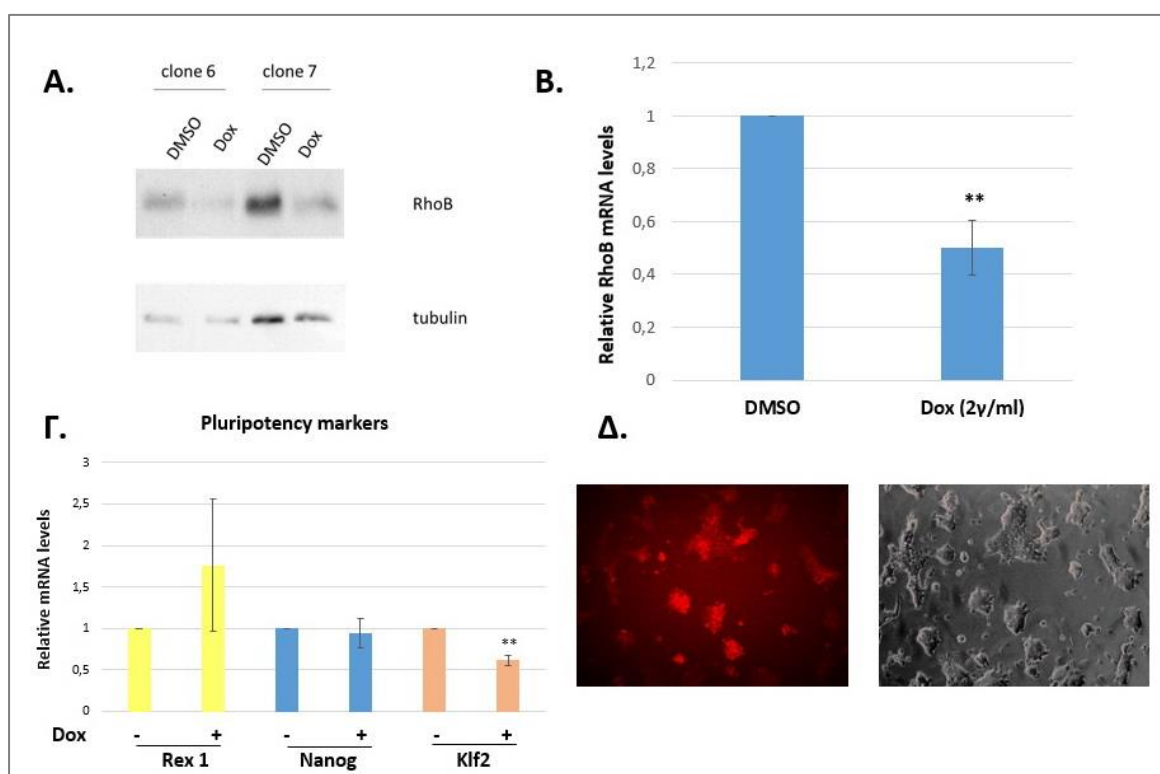
Το παραπάνω πείραμα επαναλήφθηκε στα κύτταρα P-19. Ωστόσο η επώαση με τον αναστολέα SB-431542 δεν είχε επίδραση στη διαδικασία διαφοροποίησης σε αυτά τα κύτταρα (Εικ. 55). Η χρήση του καταστολέα δεν είχε σαφή επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-δεικτών της πολυδυναμίας και της διαφοροποίησης. Επίσης, η χρήση του SB-431542 δεν επέφερε καμία αλλαγή στον κυτταροσκελετό των κυττάρων P-19 (Εικ. 55 Γ). Βεβαίως, τα κύτταρα αυτά αντιπροσωπεύουν ένα πιο όψιμο στάδιο της εμβρυογένεσης, επομένως είναι πιθανό να απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για τη διαφοροποίησή τους αλλά και η χρήση διαφορετικών γονιδίων-δεικτών, λόγω της διαφορετικής προέλευσης αυτών των κυττάρων αλλά και του σταδίου της εμβρυογένεσης στο οποίο αφορούν.



Εικόνα 55 : Η καταστολή του μονοπατιού του TGFβ στα κύτταρα P-19 δεν επηρέασε τη διαδικασία διαφοροποίησής τους. Κύτταρα P-19 επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία DMSO ή SB-431542 (10μM). Το συνολικό RNA απομονώθηκε και τα επίπεδα mRNA των RhoA, RhoB (A) και των γονιδίων-δεικτών (B) μετρήθηκαν με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμπουλίνης. (Γ) Χρώση της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοιδίνη.

Αποσιώπηση της RhoB

Τέλος, προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή συμμετοχή της RhoB στη διαδικασία της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, επιχειρήθηκε η καταστολή της μέσω λέντι-ιών (Εικ. 56). Με την επιμόλυνση των κυττάρων CGR8 με λέντι-ιούς που έφεραν το ειδικό shRNA για την αποσιώπηση της RhoB δημιουργήσαμε δύο σταθερούς CGR8 κλώνους (Εικ. 56 Α) στους οποίους η έκφραση της RhoB μειωνόταν κατά 50% παρουσία δοξυκυκλίνης (Εικ. 56 Β). Στη συνέχεια προκειμένου να μελετηθεί ο πιθανός ρόλος της RhoB στη διαδικασία της διαφοροποίησης, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων δεικτών πολυδυναμίας παρουσία και απουσία δοξυκυκλίνης, δηλαδή υπό κανονική και μειωμένη έκφραση της RhoB αντίστοιχα (Εικ. 56 Γ). Ωστόσο, από τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών δεν ήταν δυνατόν να διεξαχθεί κάποιο ασφαλές συμπέρασμα. Φαίνεται ότι η αποσιώπηση της RhoB δεν επηρεάζει τη διαδικασία της διαφοροποίησης.



Εικόνα 56 : Η αποσιώπηση της RhoB δεν επηρεάζει τον βαθμό διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων CGR8. (Α) Ανάλυση ανοσοαποτύπωσης σε κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με 2 μ g/ml δοξυκυκλίνης για 48 ώρες μετά από μόλυνση με λέντι-ιούς για το

RhoB shRNA. Ίσες ποσότητες δειγμάτων από δύο διαφορετικούς κλώνους αναλύθηκαν με τη χρήση αντισωμάτων τα οποία αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες της RhoB και της τουμπουλίνης. Το συνολικό RNA απομονώθηκε και τα επίπεδα mRNA της RhoB (B) καθώς και των γονιδίων-δεικτών της πολυδυναμίας (Γ) μετρήθηκαν με RT-PCR. Τα επίπεδα mRNA κανονικοποιήθηκαν με βάση το αντίστοιχο mRNA της τουμπουλίνης (**, $p < 0.01$). (Δ) Επιβεβαίωση της έκφρασης του ιού στο ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού. Παρουσία δοξυκυκλίνης επάγεται, εκτός από το RhoB shRNA, η έκφραση του γονιδίου TurboRFP καθιστώντας έτσι δυνατό τον οπτικό έλεγχο των κυττάρων που εκφράζουν το shRNA. Τα κύτταρα που φαίνονται στην εικόνα είχαν προηγουμένως επωαστεί με 2 $\mu\text{g/ml}$ δοξυκυκλίνης για 48 ώρες.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ RHO ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε αρχικά μία λειτουργική ανάλυση των υποκινητών των ανθρώπινων γονιδίων της RhoA και της RhoB προκειμένου να διερευνηθούν ρυθμιστικά στοιχεία που είναι σημαντικά για την μεταγραφική τους ρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα. Ένας βασικός στόχος ήταν να διερευνηθούν πιθανές ομοιότητες και διαφορές στη ρύθμιση των δύο γονιδίων στα φυσιολογικά (CGR8) έναντι των καρκινικών (P-19) εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων, όπως επίσης και να αξιολογηθεί ο φυσιολογικός ρόλος ρυθμιστικών στοιχείων που είχαν προηγουμένως αναγνωριστεί σε άλλα κυτταρικά συστήματα.

Όπως είναι γνωστό, τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα είναι καρκινικά κύτταρα που μοιράζονται ιδιότητες των φυσιολογικών βλαστικών κυττάρων. Οι δύο κυτταρικές σειρές διαφέρουν σε πολλά σημεία. Τα φυσιολογικά εμβρυϊκά κύτταρα CGR8 προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα ενός αρσενικού εμβρύου ηλικίας 3.5 ημερών (163) και η διαφοροποίηση τους αναστέλλεται από τον παράγοντα LIF. Αντίθετα, η κυτταρική σειρά P-19 αποτελείται από κύτταρα τερατοκαρκινώματος που ανήκουν σε ένα πιο όψιμο στάδιο της εμβρυογένεσης (165). Ωστόσο, και οι δύο κυτταρικοί τύποι διαφοροποιούνται με τους ίδιους μηχανισμούς και αποτελούνται από πολυδύναμα κύτταρα εφόσον μπορούν να διαφοροποιηθούν και στα τρία βλαστικά δέρματα.

Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων RhoA και RhoB στα φυσιολογικά και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα

Σχετικά με τα βασικά επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της RhoA ήταν υψηλά, ενώ τα επίπεδα της RhoB ήταν σχεδόν μη ανιχνεύσιμα. Συγκεκριμένα, η αναλογία RhoA/RhoB mRNA στα CGR8 και στα P-19 κύτταρα ήταν 38 και 172 αντίστοιχα. Παρόλα αυτά, αυτή η σημαντική διαφορά στα σχετικά επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων δεν φαίνεται να είναι ειδική για τα βλαστικά κύτταρα, εφόσον παρατηρείται και σε άλλες καρκινικές σειρές (Εικ. 27). Τα ευρήματα αυτά συμφωνούν και με μελέτες που δείχνουν ότι η έκφραση της RhoA

είναι υψηλή, ενώ η έκφραση της RhoB μειώνεται στον καρκίνο. Συγκεκριμένα, η έκφραση της RhoA είναι υψηλή σε ένα σύνολο ανθρώπινων καρκίνων όπως του εντέρου, του μαστού και των πνευμόνων (124). Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA, της συνολικής πρωτεΐνης και της ενεργότητας της RhoA σε επτά γαστρικές καρκινικές κυτταρικές σειρές και σε αδιαφοροποίητα δείγματα ιστών γαστρικού καρκίνου είναι σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα μη καρκινικά (174). Η RhoA υπερεκφράζεται επίσης σε πλακώδη καρκινικά κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινους ιστούς της περιοχής του κεφαλιού και του λαιμού (175). Επίσης, η RhoA είναι υψηλή σε όγκους βλαστικών κυττάρων όρχεων (germ cells), ενώ οι RhoB και RhoC δεν ανιχνεύονται σε αυτούς τους όγκους, πράγμα που παρατηρείται εν μέρει και στην παρούσα μελέτη (176). Είναι σημαντικό εδώ να σημειωθεί ότι το εμβρυϊκό καρκίνωμα είναι συχνά παρόν σε όγκους όρχεων (177) και ότι τα γεννητικά κύτταρα (germ cells) μπορούν να επαναπρογραμματιστούν προς πολυδύναμα κύτταρα χωρίς γενετική τροποποίηση (6). Ακόμα, η RhoA μπορεί να ενεργοποιήσει τον παράγοντα STAT3, μέσω του οποίου δρα ο παράγοντας LIF, σε εμβρυϊκούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs) (178). Τέλος, αναφέρεται ότι η υπερέκφραση του c-Myc προσδίδει ιδιότητες σε καρκινικά κύτταρα που ομοιάζουν με αυτές της RhoA (179).

Συγχρόνως, υπάρχουν αρκετές αναφορές που επιβεβαιώνουν τα υψηλά επίπεδα έκφρασης των Rho, κυρίως της RhoA, και στα βλαστικά κύτταρα. Η RhoA έχει υψηλή έκφραση στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης καθώς και σε αποδιαφοροποιημένα πρόδρομα κύτταρα (115). Το γεγονός ότι η έκφραση της RhoA είναι υψηλή τόσο στα καρκινικά όσο και στα βλαστικά κύτταρα έχει οδηγήσει στην υπόθεση της προέλευσης των όγκων από βλαστικά κύτταρα. Είναι πιθανό ότι η έκφραση των Rho είναι υψηλή σε αδιαφοροποίητα, μεταστατικά κύτταρα και μειώνεται παράλληλα με τη διαδικασία της διαφοροποίησης (58). Μία ακόμα ομοιότητα ανάμεσα στα καρκινικά και τα βλαστικά κύτταρα αναφορικά με τις Rho είναι τα χαμηλά επίπεδα της RhoB. Είναι ευρέως γνωστό ότι η RhoB δρα ως ογκοκαταστολέας και η έκφρασή της μειώνεται με την πρόοδο της εξέλιξης του όγκου (180). Η υπερέκφρασή της ανταγωνίζεται την κυτταρική μετανάστευση, την ανάπτυξη του όγκου και τη μετάσταση (120).

Ο λόγος για την αυξημένη έκφραση της RhoA στα βλαστικά κύτταρα είναι ακόμα άγνωστος. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της RhoA στα αδιαφοροποίητα βλαστικά κύτταρα οφείλεται στην έλλειψη ινιδίων του στρες σε αυτά σε σύγκριση με τα διαφοροποιημένα κύτταρα που έχουν έναν καλά ανεπτυγμένο κυτταροσκελετό. Όπως συμβαίνει και στα πρόδρομα κύτταρα των λείων μυών (115), τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε μία κατάσταση “ετοιμότητας” (“stand-by” state) για να μεταναστεύσουν προκειμένου να εποικήσουν την αρχέγονη γραμμή (primitive streak) και να διαφοροποιηθούν κατά τη διαδικασία της γαστριδίωσης. Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα της RhoA θα μπορούσαν να παρέχουν στα βλαστικά κύτταρα την δυνατότητα να αποκτήσουν ινίδια του στρες για να μετακινηθούν άμεσα κατόπιν του κατάλληλου ερεθίσματος.

Ρυθμιστικά μεταγραφικά στοιχεία των γονιδίων RhoA και RhoB

Χρησιμοποιώντας ένα σύνολο πλασμιδίων για τους υποκινητές των RhoA και RhoB, επιβεβαιώσαμε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων αυτών απαιτεί τις εγγύς περιοχές (-103 /-39) και (-85/-53) των υποκινητών της RhoA και της RhoB αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η μικρή κοντινή περιοχή (-103 /-39) του υποκινητή της RhoA περιλαμβάνει στοιχεία πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT6, NF-κB και Myc (71,72) όπως επίσης, και ένα ανεστραμμένο CCAAT box το οποίο αποτελεί θέση πρόσδεσης για τους μεταγραφικούς παράγοντες NFY και τις C/EBPs. Ωστόσο, κανένας από αυτούς τους παράγοντες δεν αύξησε την ενεργότητα του υποκινητή της RhoA, πλην των παραγόντων p65/50. Σχετικά με την περιοχή που απαιτείται για την ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB, η περιοχή (-85/-53) περιλαμβάνει ένα ανεστραμμένο CCAAT box. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, είχε δειχθεί ότι η ίδια περιοχή είναι απαραίτητη και επαρκής για την μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB από τις πρωτεΐνες Smad σε HepG2 κύτταρα (90).

Ο ρόλος του στοιχείου CCAAT

Ένα από τα στοιχεία που συναντώνται πιο συχνά σε υποκινητές και ενιχυτές γονιδίων ειδικών για τα βλαστικά κύτταρα είναι το CCAAT box (181). Χρησιμοποιώντας μία μεγάλη σειρά πλασμιδίων που περιείχαν τμήματα των υποκινητών της RhoA και της RhoB, επιβεβαιώθηκε ότι οι εγγύς περιοχές και των δύο υποκινητών περιέχουν ρυθμιστικά στοιχεία που είναι απαραίτητα για την ενεργότητα τους στα βλαστικά κύτταρα. Και οι δύο υποκινητές περιέχουν ανεστραμμένα CCAAT boxes που αποτελούν θέσεις πρόσδεσης για παράγοντες όπως οι NFY και CEBP (Εικ. Chir 31, 38). Για να αναλυθεί περαιτέρω ο ρόλος των CCAAT boxes στην μεταγραφική ρύθμιση των Rho, εισήχθησαν δύο σημειακές μεταλλάξεις σε αυτά τα στοιχεία και βρέθηκε ότι αυτές οι μεταλλάξεις μείωσαν την ενεργότητα και των δύο υποκινητών στα φυσιολογικά αλλά και στα καρκινικά βλαστικά κύτταρα (Εικ. 35, 39). Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με αποτελέσματα προηγούμενων μελετών του εργαστηρίου μας (90) όπου οι ίδιες μεταλλάξεις κατέστειλαν τόσο τη βασική όσο και την επαγόμενη από τις πρωτεΐνες Smad ενεργοποίηση του υποκινητή της RhoB σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοβλαστώματος HepG2. Επίσης, οι μεταλλάξεις στο CCAAT box ανέστειλαν την πρόσδεση των Smad3 και NF- γ παραγόντων στον υποκινητή καταστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του υποκινητή από αυτούς τους παράγοντες.

Και άλλες μελέτες, επίσης, επιβεβαιώνουν τον σημαντικό ρόλο του CCAAT box στην μεταγραφική ρύθμιση της RhoB : α) η μεταλλαξιγένεση του εγγύς CCAAT box εμπόδισε την επαγωγή της έκφρασης της RhoB από γονοτοξικό στρες σε ινοβλάστες NIH 3T3 (87) β) το εγγύς CCAAT box είναι σημαντικό για την καταστολή της μεταγραφής της RhoB από την HDAC1 (histone deacetylase 1) σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα (83) γ) η επαγόμενη από την υπεριώδη ακτινοβολία έκφραση της RhoB μεσολαβείται από την πρόσδεση του ATF2 (Activating Transcription Factor 2) μέσω του NFY στο εγγύς CCAAT box του υποκινητή της RhoB σε κύτταρα Jurkats (94) και δ) η p38 MAPK εμπλέκεται στην επαγωγή της έκφρασης της RhoB από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) μέσω των CCAAT boxes σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (95). Με τον ίδιο τρόπο, επίσης, η p38 MAPK ρυθμίζει την επαγόμενη από την UV ακτινοβολία έκφραση της RhoB, η οποία διαμεσολαβείται

από την πρόσδεση της c-Jun και της p300 στο απομακρυσμένο CCAAT box του υποκινητή σε κύτταρα Jurkat (94).

Σε αντίθεση με το CCAAT box της RhoB που είναι καλά χαρακτηρισμένο, το CCAAT box της RhoA δεν έχει μελετηθεί. Στην παρούσα μελέτη επιβεβαιώνεται ότι αυτό το στοιχείο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της RhoA στα βλαστικά κύτταρα. Οι παράγοντες που προσδένονται σε αυτό το στοιχείο στα βλαστικά κύτταρα δεν είναι γνωστοί. Μελέτες που έχουν καταχωρηθεί σε ChiP-Seq βάσεις δεδομένων δείχνουν ότι οι παράγοντες NFY και CEBP προσδένονται σε αυτή την περιοχή (Εικ. 31). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι οι Dolfini et al (181) έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της μικρής ισομορφής του NF-YA (NF-YAs) είναι υψηλά στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα των ποντικών και μειώνονται μετά τη διαφοροποίηση. Επίσης, αναφέρεται ότι η πρόσδεση του NF-Y είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του παράγοντα Nanog στο DNA.

Έχει ενδιαφέρον ότι σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (90) έχει δειχθεί ότι από μόνη της η αλληλουχία CCAAT δεν είναι αρκετή για υψηλής συγγένειας πρόσδεση του NFYA και ότι γι' αυτό είναι απαραίτητες, επιπλέον, παρακείμενες (flanking) ακολουθίες. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από τη σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που περιβάλλουν τα CCAAT boxes στον υποκινητή της RhoB και της RhoA. Βρέθηκε ότι η συγγένεια του NFYA για το RhoB CCAAT box (5' GTCCAATGGG 3') είναι κατά πολύ υψηλότερη από αυτήν για τον CCAAT box της RhoA (5' AACCAATCAT 3') (90). Σύμφωνα με τα παραπάνω, λοιπόν, είναι πιθανό διαφορετικοί παράγοντες, ειδικοί για τα βλαστικά κύτταρα, να προσδένονται στο CCAAT box των δύο υποκινητών και να ρυθμίζουν τη δράση τους ως απάντηση σε διαφορετικά εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα.

Τα γονίδια των Rho υπόκεινται σε αυτορρύθμιση στα βλαστικά κύτταρα

Στην παρούσα μελέτη, δείξαμε ότι η ενεργότητα των υποκινητών της RhoA και της RhoB υπόκειται σε αυτορρύθμιση από τις Rho πρωτεΐνες. Οι παρατηρήσεις οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα: α) η υπερέκφραση της RhoA αναστέλλει την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB και της RhoA και αυτή η αναστολή είναι πιο

έντονη στα P-19 κύτταρα β) η υπερέκφραση της RhoB αναστέλλει την ενεργότητα του υποκινητή της RhoA μόνο στα κύτταρα P-19 και της RhoB εξίσου και στις δύο κυτταρικές σειρές γ) το CCAAT box του υποκινητή της RhoB είναι απαραίτητο για την αυτορρύθμιση μόνο στα P-19 κύτταρα ενώ το CCAAT box του υποκινητή της RhoA δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αυτορρύθμιση. Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι το κυτταρικό περιβάλλον αλλά και οι παρακείμενες στο CCAAT box αλληλουχίες του υποκινητή είναι καίριοι παράγοντες που καθορίζουν τον βαθμό και την ειδικότητα της αυτορρύθμισης των Rho σε μεταγραφικό επίπεδο.

Προκειμένου να διερευνηθεί περαιτέρω ο μηχανισμός αυτορρύθμισης, χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας C3 exoenzyme, μία τοξίνη που προέρχεται από το βακτήριο *C. Botulinum* και αναστέλλει την ενεργότητα των Rho μέσω ADP ριβοζυλίωσής τους (169). Ο αναστολέας C3 αύξησε τα επίπεδα mRNA του γονιδίου της RhoB, αλλά όχι της RhoA, με χρονο-εξαρτώμενο τρόπο. Περισσότερο έντονη ήταν η αύξηση των επιπέδων της RhoB από τον αναστολέα στα κύτταρα P-19 ενώ η έκφραση της RhoA δεν άλλαξε. Σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, υπάρχουν, επίσης, κάποιες μελέτες που αναφέρουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης της RhoB κατόπιν επώασης με C3 (97,182). Αξίζει να σημειωθεί ότι, όπως παρατηρήθηκε και στην περίπτωση των βλαστικών κυττάρων, ο αναστολέας προκαλεί αλλαγή του σχήματος των κυττάρων σε ένα πιο στρογγυλό σχήμα (97,183) λόγω της αποδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της απώλειας προσκόλλησης των κυττάρων στο υπόστρωμά τους (117,184,185). Σε παλαιότερη μελέτη, τέλος, αναφέρεται ότι ο C3 μείωσε την διακυτταρική επαφή των P-19 κυττάρων κατά τη διαδικασία της νευρογένεσης και ότι η υπερέκφραση της RhoA στα κύτταρα αυτά ήταν αρκετή για να ανταγωνιστεί την επίδραση του C3 (168). Συνολικά, τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν, τουλάχιστον εν μέρει, να δικαιολογήσουν τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της RhoB σε κύτταρα που εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα την RhoA όπως τα CGR8 και τα P-19.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν σχετικά με την αυτορρύθμιση των Rho συμφωνούν και με άλλες μελέτες όπως αυτή των Fritz et al οι οποίοι ανέφεραν ότι η έκφραση της RhoB ρυθμίζεται από την Rac εφόσον η υπερέκφραση της αγρίου τύπου Rac προκάλεσε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB κατά 3.5 φορές, ενώ η υπερέκφραση μίας ιδιοστατικά ενεργούς μορφής της RhoA καθώς επίσης και μίας

αγρίου τύπου μορφής της RhoB κατέστειλε έντονα την ενεργότητα του υποκινητή της RhoB σε ινοβλάστες ποντικού. Επιπλέον, συνεπιμόλυνση της Rho-GDI, η οποία δρα ως καταστολέας των Rho πρωτεϊνών, προκάλεσε αύξηση του υποκινητή της RhoB κατά 6.4 φορές (85). Οι Ho et al ανέφεραν ότι η αποσιώπηση της RhoA προκάλεσε έντονη αύξηση της συνολικής αλλά και της ενεργής πρωτεΐνης της RhoB σε αδενοκαρκίνωμα μαστού, η οποία αύξηση διαμεσολαβήθηκε από την GDP-προσδεδεμένη μορφή της RhoA. Τα αυξημένα επίπεδα της RhoB πρωτεΐνης οφείλονταν στην διαμεσολαβουμένη από την RhoGDIα αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής της πρωτεΐνης (186). Τέλος, οι Vega et al ανέφεραν ότι η μειωμένη ενεργότητα της RhoA αύξησε τα επίπεδα της RhoB πρωτεΐνης σε PC3 προστατικά και MDA-MB-231 καρκινικά κύτταρα μαστού (182). Συνολικά τα παραπάνω ευρήματα, συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης και επιβεβαιώνουν ότι ο υποκινητή της RhoB ρυθμίζεται από τις Rho GTPάσες και υπόκειται συγχρόνως σε αυτορρύθμιση.

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ TGFβ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ RHO ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ενας από τους στόχους της παρούσας διατριβής ήταν να μελετηθεί ο δυνητικός ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ στη ρύθμιση της έκφρασης των ανθρώπινων γονιδίων της RhoA και της RhoB στα βλαστικά κύτταρα. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι το γονίδιο της RhoB, αλλά όχι της RhoA, είναι άμεσος μεταγραφικός στόχος του TGFβ. Έχει αποδειχθεί ότι η μακροπρόθεσμη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGFβ σε ινοβλάστες και HaCaT κερατινοκύτταρα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του γονιδίου της μικρής RhoB GTPάσης από Smad και non-Smad (MEK/ERK) μονοπάτια (90). Δεδομένου αυτού επιχειρήθηκε η διερεύνηση της πιθανής ενεργοποίησης του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα CGR8.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σύμφωνα με την βιβλιογραφία ο TGFβ επάγει την διαφοροποίηση των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων CGR8 προς

καρδιομυοκύτταρα. Στη μελέτη των Behfar et al κύτταρα CGR8 επωάστηκαν για 24 ώρες με TGFβ1 (2.5 ng/mL) ή BMP2 (5 ng/mL) σε συνθήκες ορού 3.5%, παρουσία LIF. Ακολούθησε ανάλυση RT-PCR η οποία έδειξε αύξηση των επιπέδων mRNA μεσοδερμικών και καρδιακών γονιδίων-δεικτών (16). Παρομοίως, επώαση των κυττάρων CGR8 για 24 ώρες με TGFβ1 (5 ng/mL) απουσία ορού οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου-δείκτη της διαφοροποίησης Brachyury (134,146). Σε άλλη μελέτη, ο TGFβ2 και όχι οι TGFβ1 και TGFβ3, αύξησε τον πολλαπλασιασμό εμβρυοειδών σωματιδίων (EBs) όπως επίσης και τη διαφοροποίησή τους σε ρυθμικά κύτταρα. Σε 17 ημέρες, 49% των EBs που είχαν επωαστεί με τον TGFβ2 εμφάνισαν ρυθμό. Το αντίστοιχο ποσοστό των κυττάρων ελέγχου ήταν 15% (147). Τέλος, αναφέρεται ότι η ενεργοποίηση της Smad2 είναι απαραίτητη για την επαγωγή της πρώιμης ενδοδερμικής και μεσοδερμικής διαφοροποίησης (148).

Ωστόσο η επανάληψη παρόμοιων πειραματικών συνθηκών, δηλαδή η επώαση των κυττάρων με 2.5-10 ng/ml TGFβ1, σε συνθήκες παρουσίας ή απουσίας ορού, σε ποικίλα χρονικά διαστήματα απέτυχε να οδηγήσει τα κύτταρα σε διαφοροποίηση αλλά και να ενεργοποιήσει το γονίδιο της RhoB στα βλαστικά κύτταρα. Παροδικές επιμολύνσεις των κυττάρων CGR8 με πλασμίδιο αναφοράς για τον υποκινητή της RhoB παρουσία TGFβ1 ή/και υπερέκφραση των πρωτεϊνών Smad 3/4 υπό τις παραπάνω συνθήκες δεν οδήγησε, επίσης, σε αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB. Παρόμοιο ήταν το αποτέλεσμα κατά την επιμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)12 είτε κατόπιν συν-επιμόλυνσης των κυττάρων με πλασμίδιο έκφρασης για τον παράγοντα NFY παρουσία TGFβ1.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία (2,3,32,38,40,127,128,134,145,157,187-189) ότι ο παράγοντας TGFβ1 παίζει ρόλο στη διαδικασία της εμβρυογένεσης *in vivo*, αλλά και στη διαδικασία της διαφοροποίησης κυτταρικών σειρών επάγοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που καθορίζουν την εξέλιξη των κυττάρων σε συγκεκριμένο κυτταρικό τύπο (cell fate determination). Δεδομένου αυτού εξετάστηκε η χρήση του TGFβ1 αλλά και του αναστολέα του SB-431542 σε καλλιεργητικές συνθήκες που επέτρεπαν τη διαφοροποίηση. Προκειμένου, δηλαδή, να φανεί η επίδραση του TGFβ1 στα βλαστικά κύτταρα, αυτός θα έπρεπε να δράσει σε συνθήκες

όπου τα κύτταρα θα είχαν προηγουμένως μπει σε διαδικασία διαφοροποίησης. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση ο TGFβ1 θα οδηγήσει σε περαιτέρω διαφοροποίηση, δηλαδή στην επαγωγή της μεσοδερμικής διαφοροποίησης, έναντι της διαφοροποίησης προς ενδόδερμα και εξώδερμα. Φαίνεται ότι υπό κανονικές (standard) συνθήκες καλλιέργειας ο παράγοντας LIF διατηρεί τα κύτταρα πολυδύναμα, και άρα όχι ευαίσθητα σε εξωτερικούς παράγοντες που είναι πιθανό να οδηγήσουν στη διαφοροποίησή τους. Συγχρόνως, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ότι είναι πιθανό η φωσφορυλιωμένη μορφή της STAT3, η οποία ενεργοποιείται από τον παράγοντα LIF, να ανταγωνίζεται τη μεσοδερμική και ενδοδερμική διαφοροποίηση, αλληλεπιδρώντας και αναστέλλοντας το σύμπλεγμα των πρωτεϊνών Smad (3,15,190). Υπάρχει, ακόμα, μια αναφορά σύμφωνα με την οποία τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα του ποντικού εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα τις πρωτεΐνες Smad2/3 και πολλά μόρια που εμπλέκονται στο μονοπάτι του TGFβ όπως τον παράγοντα Nodal, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολο να “χειριστεί” κανείς τη σηματοδότηση του TGFβ αφού η προσθήκη Ακτιβίνης στο καλλιεργητικό μέσο μπορεί να προκαλέσει μόνο μία ήπια αύξηση στην ενεργότητα των Smad2/3 (191).

Τελικά, προκειμένου τα κύτταρα να οδηγηθούν σε διαφοροποίηση, η καλλιέργεια τους έγινε με την προσθήκη μικρότερης ποσότητας LIF (2 μl/ml). Ακόμα, ελαττώθηκε περαιτέρω η προσθήκη του παράγοντα LIF στο μέσο καλλιέργειας κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Υπό αυτές τις συνθήκες η επιμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο αναφοράς p(CAGA)12 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή κατά 2.5 φορές. Ακολούθως, υπό τις ίδιες συνθήκες, η επώαση των κυττάρων με TGFβ1 (5ng/ml) και η υπερέκφραση των παραγόντων Smad3/4 πέτυχαν μία ήπια αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της RhoB. Αξίζει εδώ να αναφερθεί μία μελέτη στην οποία το γονίδιο της RhoB αποτελεί έναν ήπιας απόκρισης μεταγραφικό στόχο του TGFβ στα βλαστικά κύτταρα του ποντικού καθώς είναι πιθανόν η έκφρασή της να ελέγχεται και από άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η επώαση των κυττάρων με τον αναστολέα SB-431542 είχε ως αποτέλεσμα μία ήπια μείωση των επιπέδων έκφρασης της RhoB (191). Αναφορικά

με την ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoA, φάνηκε ότι και σε αυτές τις συνθήκες ο TGFβ1 δεν οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενεργότητας του υποκινητή της.

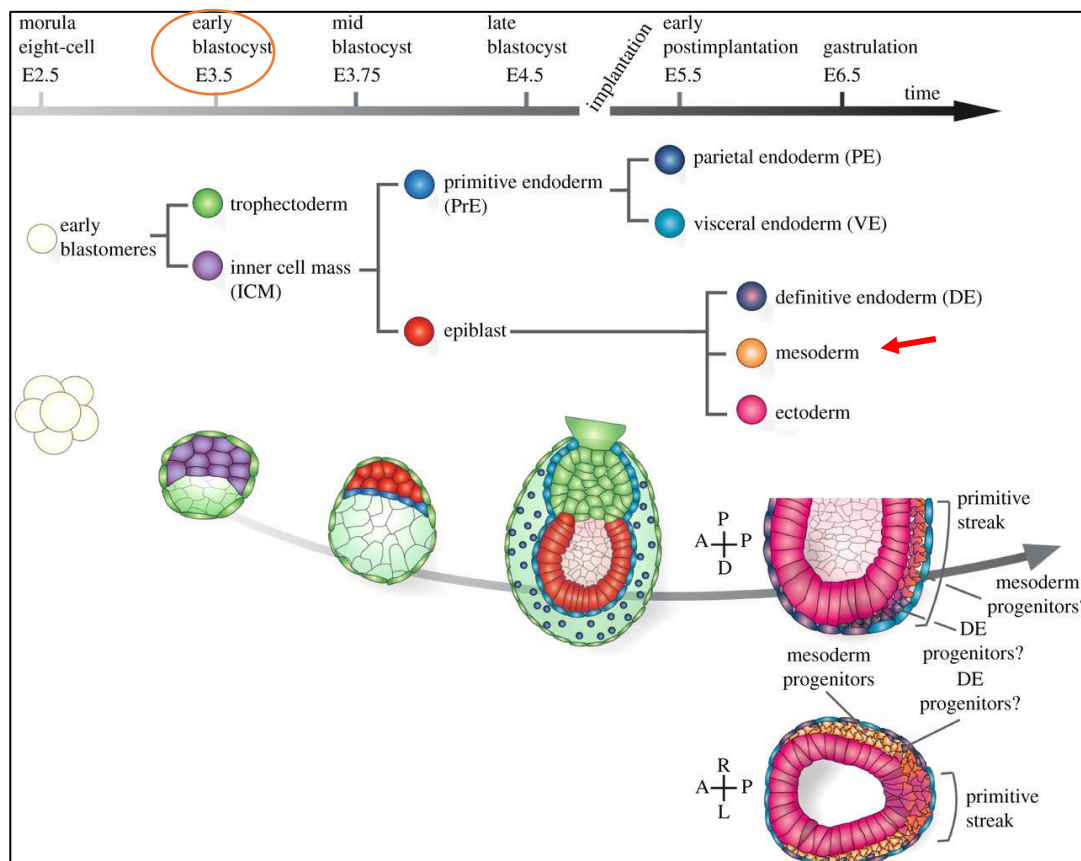
Στη συνέχεια των πειραμάτων διερευνήθηκε η δράση του καταστολέα του μονοπατιού του TGFβ, SB-431542. Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του TGFβ στη διαφοροποίηση, τα κύτταρα επώαστηκαν για 48 ώρες παρουσία 15% FBS και πλήρους απουσίας LIF, παρουσία του αναστολέα. Μία σημαντική παρατήρηση κατά την επώαση των βλαστικών κυττάρων υπό την παρουσία του SB-431542 ήταν η διατήρηση της μορφολογίας τους σε στρογγυλές αποικίες (Εικ. 51). Η μορφολογία αυτή συναντάται όταν τα βλαστικά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση πολυδυναμίας, μία κατάσταση η οποία σε φυσιολογικές συνθήκες προϋποθέτει την παρουσία του παράγοντα LIF στο καλλιεργητικό μέσο. Ωστόσο, η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η αναστολή του σηματοδοτικού μονοπατιού του TGFβ επιτρέπει τη διατήρηση της πολυδυναμίας των βλαστικών κυττάρων ακόμα και απουσία LIF.

Για να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση, εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων-δεικτών της διαφοροποίησης όπως τα Brachyury, Fgf5 και α-SMA καθώς και γονιδίων-δεικτών της πολυδυναμίας όπως τα Nanog, Klf2 και Rex1. Επιβεβαιώνοντας το γεγονός της διατήρησης της πολυδυναμίας από τον SB-431542, τα επίπεδα έκφρασης των δεικτών της διαφοροποίησης ήταν χαμηλά σε συνθήκες παρουσίας SB-431542, ενώ το αντίθετο συνέβη με τους δείκτες πολυδυναμίας. Ωστόσο, σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης της RhoA και της RhoB δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή. Ακόμα, τα αποτελέσματα αυτά ήταν ειδικά για τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα CGR8, καθώς η επώαση των καρκινικών κυττάρων P-19 με τον καταστολέα δεν φάνηκε να αλλάζει τον φαινότυπο των κυττάρων.

Σχετικά με την επιβολή συνθηκών διαφοροποίησης στα κύτταρα, δηλαδή την απομάκρυνση του παράγοντα LIF, πρέπει να αναφερθεί ότι ο LIF απομακρύνθηκε από το καλλιεργητικό μέσο για 48 ώρες καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η απομάκρυνσή του είναι μη αναστρέψιμη πέραν των 36-48 ωρών (4,17,21,170). Επίσης, είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη εμβρυοειδών σωματίων (embryoid bodies), τα οποία είναι συσσωματώματα διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων, σχηματίζονται κατόπιν αφαίρεσης του παράγοντα LIF (21). Τέλος, σύμφωνα με τη φυσιολογική διαδικασία της εμβρυογένεσης, η διαφοροποίηση των πολυδύναμων εμβρυϊκών κυττάρων (Εικ. 57) ημέρας 3.5, όπως είναι και τα CGR8, προς μεσοδερμικά

κύτταρα χρειάζεται τουλάχιστον δύο ημέρες. Αυτός είναι άλλος ένας λόγος που απαιτήθηκε η καταστολή του μονοπατιού του TGFβ για 48 ώρες.

Αναφορικά με τη χρήση του αναστολέα SB-431542 έχει δειχθεί ότι ο SB-431542 ανέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων ποντικού. Το πείραμα έγινε με προσθήκη του αναστολέα για μία εβδομάδα σε συγκέντρωση 3-10 μM (162). Σε άλλη μελέτη, επίσης, ο αναστολέας έχει χρησιμοποιηθεί για δύο ημέρες παρουσία ορού για να αναστείλει την επαγόμενη από τον TGFβ διαφοροποίηση νευρικών βλαστικών κυττάρων σε μυϊκά. Σε αυτή τη διαδικασία σημαντικό ρόλο έπαιξε η RhoA ενισχύοντας την φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών.



Εικόνα 57 : Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων διαφοροποίησης στο έμβryo του ποντικού. Κατά την εμβρυϊκή ημέρα 3.5 (E3.5), το έμβryo αποτελείται από το τροφοεκτόδερμα (πράσινο) και την εσωτερική κυτταρική μάζα (ICM, μωβ). Η ICM διαφοροποιείται στην πολυδύναμη επιβλάστη (κόκκινο) και στο πρωτογενές ενδόδερμα (μπλε). Το πρωτογενές ενδόδερμα στη συνέχεια διαφοροποιείται στο πλευρικό (PE) και σπλαχνικό (VE) ενδόδερμα και η επιβλάστη στο τελικό ενδόδερμα, το μεσόδερμα (βέλος) και το εκτόδερμα. Η κυτταρική σειρά CGR8 (κύκλος) δημιουργήθηκε από την ICM ενός αρσενικού εμβρύου ποντικού ηλικίας 3.5 ημερών (192).

Η αποσιώπηση της RhoA ανέστειλε την μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p21, που αποτελεί κλασικό δείκτη του TGFβ (172). Επίσης, στην ίδια μελέτη, διαφοροποίηση επιτυγχάνεται είτε με την προσθήκη TGFβ (5 ng/ml) απουσία ορού, είτε απουσία TGF-β παρουσία ορού. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι δύο κύριοι παράγοντες που καθορίζουν τον βαθμό διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων, εκτός φυσικά από την προσθήκη αυξητικών παραγόντων, είναι η παρουσία ή όχι του παράγοντα LIF αλλά και η προσθήκη ορού (15,193). Η παρουσία του ορού στο καλλιεργητικό μέσο είναι αρκετή για να προκαλέσει διαφοροποίηση. Για αυτό το λόγο, άλλωστε, ο ορός που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια βλαστικών κυττάρων είναι ειδικός για τη χρήση αυτή. Σε συμφωνία με τα παραπάνω βρίσκεται και μία εργασία σχετικά με τον επαναπρογραμματισμό προς βλαστικά κύτταρα. Ως γνωστόν, η υπερέκφραση των παραγόντων Sox2, Oct4, και Klf4 είναι ικανή να επαναπρογραμματίσει σωματικά κύτταρα προς βλαστικά. Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, ένα από τα μόρια (E-616452) που θα μπορούσε να αντικαταστήσει τον παράγοντα Sox2 σε αυτήν τη διαδικασία δρα καταστέλλοντας τη δράση του TGFβ με αποτέλεσμα την επαγωγή του γονιδίου Nanog (194).

Συνοψίζοντας, ο TGFβ παίζει μεν ρόλο στη διαδικασία της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων CGR8, συγκεκριμένα υπό συνθήκες απουσίας LIF, αλλά δεν επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων RhoA και RhoB κατά τη διάρκεια αυτής της βιολογικής λειτουργίας.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Δεδομένου ότι τα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα μοιράζονται αρκετές ομοιότητες με τα καρκινικά στον κύκλο ζωής τους, περιμέναμε να βρούμε ομοιότητες και στις διαδικασίες μεταγραφικής ρύθμισης όπως αυτές που καθορίζουν τη μεταγραφή των γονιδίων των Rho. Τα σχετικά επίπεδα έκφρασης των RhoA και RhoB είναι τα ίδια και οι εγγύς περιοχές των υποκινητών τους είναι σημαντικές για την μεταγραφική τους ενεργοποίηση και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επίσης, η

ενεργότητά τους εξαρτάται από παρόμοιους μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NFY. Απ' την άλλη μεριά, ωστόσο, οι δύο κυτταρικές σειρές διαφέρουν σημαντικά στο σχήμα των κυττάρων, και επομένως στον κυτταροσκελετό τους. Συνεπώς, είναι αναμενόμενο να εντοπιστούν διαφορές στα γονίδια που ελέγχουν τον κυτταροσκελετό. Για παράδειγμα, η αυτορρύθμιση της RhoA ήταν πιο έντονη στα P-19, ενώ η επίδραση με τον αναστολέα C3 είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή του γονιδίου της RhoB που ήταν όμως πιο έντονη, επίσης, στα κύτταρα P-19.

Αναφορικά με το σηματοδοτικό μονοπάτι του TGFβ στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα, φάνηκε ότι αυτό ανταγωνίζεται το μονοπάτι του παράγοντα LIF το οποίο διατηρεί την πολυδυναμία των βλαστικών κυττάρων. Τα δύο μονοπάτια έχουν αντίθετες λειτουργίες και έτσι, προκειμένου να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι του TGFβ θα πρέπει να γίνει καταστολή της πολυδυναμίας των κυττάρων. Συγκεκριμένα, σε σχέση με το ρόλο του TGFβ στη μεταγραφική ρύθμιση των Rho γονιδίων, παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση του γονιδίου της RhoB από τον TGFβ κατέστη δυνατή κατόπιν ελάττωσης του παράγοντα LIF. Συγχρόνως, η απομάκρυνση του παράγοντα LIF ήταν απαραίτητη προκειμένου να γίνει επαγωγή της διαφοροποίησης από τον TGFβ. Επίσης, η πλήρης καταστολή του μονοπατιού του TGFβ σε συνδυασμό με την πλήρη απουσία του παράγοντα LIF επέτρεψε τη διατήρηση της πολυδύναμης κατάστασης των βλαστικών κυττάρων παρά την απουσία του LIF, επιβεβαιώνοντας ότι ο TGFβ επάγει την μεσοδερμική διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων. Ωστόσο, υπό αυτές τις συνθήκες δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων της RhoA και της RhoB.

Η κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης των Rho GTPασών στα βλαστικά κύτταρα είναι πολύ σημαντική προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των πρωτεϊνών αυτών στις λειτουργίες τόσο των βλαστικών όσο και των καρκινικών κυττάρων. Είναι σημαντικό να διερευνηθεί ο ρόλος των Rho GTPασών στη διαδικασία της διαφοροποίησης των βλαστικών κυττάρων τόσο *in vivo* κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όσο και *in vitro* υπό την επίδραση αυξητικών παραγόντων όπως ο TGFβ. Δεδομένου ότι η διαδικασία της διαφοροποίησης παίζει σημαντικό ρόλο στην οντογένεση του καρκίνου, η ανακάλυψη μηχανισμών που ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση θα συντελέσει στην ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων.

Βιβλιογραφία

1. Niwa, H. (2007) How is pluripotency determined and maintained? *Development (Cambridge, England)* **134**, 635-646
2. Puceat, M. (2007) TGFbeta in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovascular research* **74**, 256-261
3. De Felici, M., Farini, D., and Dolci, S. (2009) In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. *Current stem cell research & therapy* **4**, 87-97
4. Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Ding, L., Buchholz, F., Doss, M. X., Sachinidis, A., Hescheler, J., Hummel, O., Huebner, N., Kolde, R., Vilo, J., Schulz, H., and Boeuf, H. (2009) Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC genomics* **10**, 73
5. Silva, J., and Smith, A. (2008) Capturing pluripotency. *Cell* **132**, 532-536
6. Nichols, J., and Smith, A. (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell* **4**, 487-492
7. Smith, A. G. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology* **17**, 435-462
8. Yamashita, Y. M., Jones, D. L., and Fuller, M. T. (2003) Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 1547-1550
9. Nichols, J., and Smith, A. (2011) The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* **138**, 3-8
10. Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L., and McKay, R. D. (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199
11. Zipori, D. (2004) The nature of stem cells: state rather than entity. *Nature reviews. Genetics* **5**, 873-878
12. Copp, A. J. (1978) Interaction between inner cell mass and trophectoderm of the mouse blastocyst. *I. A study of cellular proliferation* **48**, 109-125
13. Snow, M. H. L. (1977) Gastrulation in the mouse: Growth and regionalization of the epiblast. *Development* **42**, 293-303
14. Ogawa, K., Matsui, H., Ohtsuka, S., and Niwa, H. (2004) A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **9**, 471-477
15. Chambers, I., and Smith, A. (2004) Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* **23**, 7150-7160
16. Behfar, A., Zingman, L. V., Hodgson, D. M., Rauzier, J. M., Kane, G. C., Terzic, A., and Puceat, M. (2002) Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 1558-1566
17. Sekkai, D., Gruel, G., Herry, M., Moucadel, V., Constantinescu, S. N., Albagli, O., Tronik-Le Roux, D., Vainchenker, W., and Bennaceur-Griscelli, A. (2005) Microarray analysis of LIF/Stat3 transcriptional targets in embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **23**, 1634-1642
18. Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., Wong, E., Orlov, Y. L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y. H., Yeo, H. C., Yeo, Z. X., Narang, V., Govindarajan, K. R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W. K., Clarke, N. D., Wei, C. L., and Ng, H. H. (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* **133**, 1106-1117

19. Graf, U., Casanova, E. A., and Cinelli, P. (2011) The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes* **2**, 280-297
20. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292
21. Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development (Cambridge, England)* **132**, 885-896
22. Hooker, C. W., and Hurlin, P. J. (2006) Of Myc and Mnt. *Journal of cell science* **119**, 208-216
23. Itoh, F., Watabe, T., and Miyazono, K. (2014) Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Seminars in cell & developmental biology* **32**, 98-106
24. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391
25. Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* **24**, 372-376
26. Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., Morfopoulou, S., Humphreys, P., Mansfield, W., Walker, R., Tomlinson, S., and Smith, A. (2009) Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell stem cell* **5**, 597-609
27. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655
28. Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005) Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and cellular biology* **25**, 2475-2485
29. Young, R. A. (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell* **144**, 940-954
30. Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F. H., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J. C. (2006) Maintenance of embryonic stem cell pluripotency by Nanog-mediated reversal of mesoderm specification. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* **3 Suppl 1**, S114-122
31. Suzuki, A., Raya, A., Kawakami, Y., Morita, M., Matsui, T., Nakashima, K., Gage, F. H., Rodriguez-Esteban, C., and Izpisua Belmonte, J. C. (2006) Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10294-10299
32. Li, Z., and Chen, Y. G. (2013) Functions of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Experimental cell research* **319**, 113-119
33. Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995) Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes & development* **9**, 2635-2645
34. Li, Y. Q. (2010) Master stem cell transcription factors and signaling regulation. *Cellular reprogramming* **12**, 3-13
35. Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M. S., and Niwa, H. (2006) Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **26**, 7772-7782

36. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
37. Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., and Chan, R. J. (2005) Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* **105**, 635-637
38. Galvin-Burgess, K. E., and Vivian, J. L. (2011) Transforming growth factor-beta superfamily in mouse embryonic stem cell self-renewal. *Vitamins and hormones* **87**, 341-365
39. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111
40. Sakaki-Yumoto, M., Katsuno, Y., and Derynck, R. (2013) TGF-beta family signaling in stem cells. *Biochimica et biophysica acta* **1830**, 2280-2296
41. Ben-David, U., and Benvenisty, N. (2011) The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature reviews. Cancer* **11**, 268-277
42. Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Papadopoulou, N., Arampatzi, P., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A. (2015) Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World journal of stem cells* **7**, 1150-1184
43. Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., and Pestell, R. G. (2012) Cancer stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**, 2144-2151
44. Wennerberg, K., and Der, C. J. (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *Journal of cell science* **117**, 1301-1312
45. Croft, D. R., and Olson, M. F. (2011) Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling. *Transcription* **2**, 211-215
46. Wennerberg, K., Rossman, K. L., and Der, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* **118**, 843-846
47. Vega, F. M., and Ridley, A. J. (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS letters* **582**, 2093-2101
48. Wheeler, A. P., and Ridley, A. J. (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Experimental cell research* **301**, 43-49
49. Bishop, A. L., and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* **348 Pt 2**, 241-255
50. Ridley, A. J. (2013) RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *Journal of microscopy* **251**, 242-249
51. Cannizzaro, L. A., Madaule, P., Hecht, F., Axel, R., Croce, C. M., and Huebner, K. (1990) Chromosome localization of human ARH genes, a ras-related gene family. *Genomics* **6**, 197-203
52. Karnoub, A. E., Symons, M., Campbell, S. L., and Der, C. J. (2004) Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast cancer research and treatment* **84**, 61-71
53. Wherlock, M., Gampel, A., Futter, C., and Mellor, H. (2004) Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *Journal of cell science* **117**, 3221-3231
54. Huang, M., and Prendergast, G. C. (2006) RhoB in cancer suppression. *Histology and histopathology* **21**, 213-218
55. Hall, A. (2009) The cytoskeleton and cancer. *Cancer metastasis reviews* **28**, 5-14
56. Kamasani, U., Huang, M., Duhadaway, J. B., Prochownik, E. V., Donover, P. S., and Prendergast, G. C. (2004) Cyclin B1 is a critical target of RhoB in the cell suicide program triggered by farnesyl transferase inhibition. *Cancer research* **64**, 8389-8396
57. Sahai, E., and Marshall, C. J. (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nature reviews. Cancer* **2**, 133-142

58. Benitah, S. A., Valeron, P. F., van Aelst, L., Marshall, C. J., and Lacal, J. C. (2004) Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1705**, 121-132
59. Stamatakis, K., Cernuda-Morollon, E., Hernandez-Perera, O., and Perez-Sala, D. (2002) Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**, 49389-49396
60. Lebowitz, P. F., Davide, J. P., and Prendergast, G. C. (1995) Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Molecular and cellular biology* **15**, 6613-6622
61. Guerra, L., Carr, H. S., Richter-Dahlfors, A., Masucci, M. G., Thelestam, M., Frost, J. A., and Frisan, T. (2008) A bacterial cytotoxin identifies the RhoA exchange factor Net1 as a key effector in the response to DNA damage. *PLoS one* **3**, e2254
62. Dubash, A. D., Guilluy, C., Srougi, M. C., Boulter, E., Burrridge, K., and Garcia-Mata, R. (2011) The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS one* **6**, e17380
63. Srougi, M. C., and Burrridge, K. (2011) The nuclear guanine nucleotide exchange factors Ect2 and Net1 regulate RhoB-mediated cell death after DNA damage. *PLoS one* **6**, e17108
64. Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C., and Roux, P. (2007) Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *The Journal of cell biology* **178**, 23-30
65. Mizuarai, S., Yamanaka, K., and Kotani, H. (2006) Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer research* **66**, 6319-6326
66. Liao, Y. C., Ruan, J. W., Lua, I., Li, M. H., Chen, W. L., Wang, J. R., Kao, R. H., and Chen, J. H. (2012) Overexpressed hPTTG1 promotes breast cancer cell invasion and metastasis by regulating GEF-H1/RhoA signalling. *Oncogene* **31**, 3086-3097
67. Xu, J., Li, L., Yu, G., Ying, W., Gao, Q., Zhang, W., Li, X., Ding, C., Jiang, Y., Wei, D., Duan, S., Lei, Q., Li, P., Shi, T., Qian, X., Qin, J., and Jia, L. (2015) The neddylation-cullin 2-RBX1 E3 ligase axis targets tumor suppressor RhoB for degradation in liver cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **14**, 499-509
68. Wang, M., Guo, L., Wu, Q., Zeng, T., Lin, Q., Qiao, Y., Wang, Q., Liu, M., Zhang, X., Ren, L., Zhang, S., Pei, Y., Yin, Z., Ding, F., and Wang, H. R. (2014) ATR/Chk1/Smurf1 pathway determines cell fate after DNA damage by controlling RhoB abundance. *Nature communications* **5**, 4901
69. Lin, H. H., Chen, J. H., Chou, F. P., and Wang, C. J. (2011) Protocatechuic acid inhibits cancer cell metastasis involving the down-regulation of Ras/Akt/NF-kappaB pathway and MMP-2 production by targeting RhoB activation. *British journal of pharmacology* **162**, 237-254
70. Genth, H., Huelsenbeck, J., Hartmann, B., Hofmann, F., Just, I., and Gerhard, R. (2006) Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by Clostridium difficile toxin B. *FEBS letters* **580**, 3565-3569
71. Chan, C. H., Lee, S. W., Li, C. F., Wang, J., Yang, W. L., Wu, C. Y., Wu, J., Nakayama, K. I., Kang, H. Y., Huang, H. Y., Hung, M. C., Pandolfi, P. P., and Lin, H. K. (2010) Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature cell biology* **12**, 457-467
72. Goto, K., Chiba, Y., Matsusue, K., Hattori, Y., Maitani, Y., Sakai, H., Kimura, S., and Misawa, M. (2010) The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacological research* **61**, 466-472

73. Chiba, Y., Goto, K., Matsusue, K., Kimura, S., and Misawa, M. (2010) Identification and characterization of rat RhoA gene promoter. *Journal of pharmacological sciences* **112**, 467-472
74. Shen, D. W., Pouliot, L. M., Gillet, J. P., Ma, W., Johnson, A. C., Hall, M. D., and Gottesman, M. M. (2012) The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPase RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin. *Molecular pharmaceutics* **9**, 1822-1833
75. Sauzeau, V., Rolli-Derkinderen, M., Marionneau, C., Loirand, G., and Pacaud, P. (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 9472-9480
76. Kaarbo, M., Crane, D. I., and Murrell, W. G. (2013) RhoA regulation of cardiomyocyte differentiation. *TheScientificWorldJournal* **2013**, 491546
77. Mizoguchi, F., Murakami, Y., Saito, T., Miyasaka, N., and Kohsaka, H. (2013) miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. *Arthritis research & therapy* **15**, R102
78. Huang, B., Luo, W., Sun, L., Zhang, Q., Jiang, L., Chang, J., Qiu, X., and Wang, E. (2013) MiRNA-125a-3p is a negative regulator of the RhoA-actomyosin pathway in A549 cells. *International journal of oncology* **42**, 1734-1742
79. Care, A., Catalucci, D., Felicetti, F., Bonci, D., Addario, A., Gallo, P., Bang, M. L., Segnalini, P., Gu, Y., Dalton, N. D., Elia, L., Latronico, M. V., Hoydal, M., Autore, C., Russo, M. A., Dorn, G. W., 2nd, Ellingsen, O., Ruiz-Lozano, P., Peterson, K. L., Croce, C. M., Peschle, C., and Condorelli, G. (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature medicine* **13**, 613-618
80. Chiba, Y., Tanabe, M., Goto, K., Sakai, H., and Misawa, M. (2009) Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of RhoA in bronchial smooth muscle cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* **180**, 713-719
81. Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J. J., Coppola, D., Dalton, W. S., and Cheng, J. Q. (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Molecular and cellular biology* **28**, 6773-6784
82. Ding, J., Huang, S., Wu, S., Zhao, Y., Liang, L., Yan, M., Ge, C., Yao, J., Chen, T., Wan, D., Wang, H., Gu, J., Yao, M., Li, J., Tu, H., and He, X. (2010) Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI. *Nature cell biology* **12**, 390-399
83. Wang, S., Yan-Neale, Y., Fischer, D., Zeremski, M., Cai, R., Zhu, J., Asselbergs, F., Hampton, G., and Cohen, D. (2003) Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene* **22**, 6204-6213
84. Jiang, K., Sun, J., Cheng, J., Djeu, J. Y., Wei, S., and Sebt, S. (2004) Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Molecular and cellular biology* **24**, 5565-5576
85. Fritz, G., and Kaina, B. (1997) rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *The Journal of biological chemistry* **272**, 30637-30644
86. Fritz, G., Kaina, B., and Aktories, K. (1995) The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *The Journal of biological chemistry* **270**, 25172-25177
87. Fritz, G., and Kaina, B. (2001) Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic acids research* **29**, 792-798

88. Jahner, D., and Hunter, T. (1991) The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Molecular and cellular biology* **11**, 3682-3690
89. Engel, M. E., Datta, P. K., and Moses, H. L. (1998) RhoB is stabilized by transforming growth factor beta and antagonizes transcriptional activation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 9921-9926
90. Vasilaki, E., Papadimitriou, E., Tajadura, V., Ridley, A. J., Stournaras, C., and Kardassis, D. (2010) Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF-induced signaling pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 891-905
91. Oldfield, A. J., Yang, P., Conway, A. E., Cinghu, S., Freudenberg, J. M., Yellaboina, S., and Jothi, R. (2014) Histone-fold domain protein NF-Y promotes chromatin accessibility for cell type-specific master transcription factors. *Molecular cell* **55**, 708-722
92. Dolfini, D., Gatta, R., and Mantovani, R. (2012) NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **47**, 29-49
93. Ramji, D. P., and Foka, P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *The Biochemical journal* **365**, 561-575
94. Ahn, J., Choi, J. H., Won, M., Kang, C. M., Gyun, M. R., Park, H. M., Kim, C. H., and Chung, K. S. (2011) The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochemical and biophysical research communications* **409**, 211-216
95. Chung, K. S., Han, G., Kim, B. K., Kim, H. M., Yang, J. S., Ahn, J., Lee, K., Song, K. B., and Won, M. (2013) A novel antitumor piperazine alkyl compound causes apoptosis by inducing RhoB expression via ROS-mediated cAbl/p38 MAPK signaling. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **72**, 1315-1324
96. Delarue, F. L., Adnane, J., Joshi, B., Blaskovich, M. A., Wang, D. A., Hawker, J., Bizouarn, F., Ohkanda, J., Zhu, K., Hamilton, A. D., Chellappan, S., and Sebt, S. M. (2007) Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter. *Oncogene* **26**, 633-640
97. Huelsenbeck, J., Dreger, S. C., Gerhard, R., Fritz, G., Just, I., and Genth, H. (2007) Upregulation of the immediate early gene product RhoB by exoenzyme C3 from *Clostridium limosum* and toxin B from *Clostridium difficile*. *Biochemistry* **46**, 4923-4931
98. Kim, B. K., Im, J. Y., Han, G., Lee, W. J., Won, K. J., Chung, K. S., Lee, K., Ban, H. S., Song, K., and Won, M. (2014) p300 cooperates with c-Jun and PARP-1 at the p300 binding site to activate RhoB transcription in NSC126188-mediated apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* **1839**, 364-373
99. Kim, B. K., Kim, H. M., Chung, K. S., Kim, D. M., Park, S. K., Song, A., Won, K. J., Lee, K., Oh, Y. K., Lee, K., Song, K. B., Simon, J. A., Han, G., and Won, M. (2011) Upregulation of RhoB via c-Jun N-terminal kinase signaling induces apoptosis of the human gastric carcinoma NUGC-3 cells treated with NSC12618. *Carcinogenesis* **32**, 254-261
100. Won, K. J., Kim, B. K., Han, G., Lee, K., Jung, Y. J., Kim, H. M., Song, K. B., Chung, K. S., and Won, M. (2014) NSC126188 induces apoptosis of prostate cancer PC-3 cells through inhibition of Akt membrane translocation, FoxO3a activation, and RhoB transcription. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **19**, 179-190
101. Kim, B. K., Kim, D. M., Chung, K. S., Park, S. K., Choi, S. J., Song, A., Lee, K., Lee, C. W., Song, K. B., Han, G., Simon, J., Kim, H. M., and Won, M. (2011) NSC126188, a

- piperazine alkyl derivative, induces apoptosis via upregulation of RhoB in HeLa cells. *Investigational new drugs* **29**, 853-860
102. Liu, Y., Song, N., Ren, K., Meng, S., Xie, Y., Long, Q., Chen, X., and Zhao, X. (2013) Expression loss and revivification of RhoB gene in ovary carcinoma carcinogenesis and development. *PLoS one* **8**, e78417
 103. Ho, H. H., Chang, C. S., Ho, W. C., Liao, S. Y., Lin, W. L., and Wang, C. J. (2013) Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-kappaB activity. *Toxicology and applied pharmacology* **266**, 76-85
 104. Jiang, K., Delarue, F. L., and Sebt, S. M. (2004) EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* **23**, 1136-1145
 105. Tsai, H. C., Boucher, D. L., Martinez, A., Tepper, C. G., and Kung, H. J. (2012) Modeling truncated AR expression in a natural androgen responsive environment and identification of RHOB as a direct transcriptional target. *PLoS one* **7**, e49887
 106. Tovar, D., Faye, J. C., and Favre, G. (2003) Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity. *Genomics* **81**, 525-530
 107. Yoon, Y. S., Choo, J. H., Yoo, T., Kang, K., and Chung, J. H. (2007) RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner. *Biochemical and biophysical research communications* **362**, 164-169
 108. Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M. L., Colige, A., Rakic, J. M., Noel, A., Martial, J. A., and Struman, I. (2011) MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS one* **6**, e16979
 109. Connolly, E. C., Van Doorslaer, K., Rogler, L. E., and Rogler, C. E. (2010) Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Molecular cancer research : MCR* **8**, 691-700
 110. Liu, M., Tang, Q., Qiu, M., Lang, N., Li, M., Zheng, Y., and Bi, F. (2011) miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS letters* **585**, 2998-3005
 111. Glorian, V., Maillot, G., Poles, S., Iacovoni, J. S., Favre, G., and Vagner, S. (2011) HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell death and differentiation* **18**, 1692-1701
 112. Settleman, J. (2001) Rac 'n Rho: the music that shapes a developing embryo. *Developmental cell* **1**, 321-331
 113. Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., and Nordheim, A. (2002) Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *The Journal of cell biology* **156**, 737-750
 114. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., and Chen, C. S. (2004) Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental cell* **6**, 483-495
 115. Beqaj, S., Jakkaraju, S., Mattingly, R. R., Pan, D., and Schuger, L. (2002) High RhoA activity maintains the undifferentiated mesenchymal cell phenotype, whereas RhoA down-regulation by laminin-2 induces smooth muscle myogenesis. *The Journal of cell biology* **156**, 893-903
 116. Henweeer, C., Kruse, L. H., Kindhauser, F., Schmidt, M., Jakobs, K. H., Denker, H. W., and Thie, M. (2002) Adhesiveness of human uterine epithelial RL95-2 cells to trophoblast: rho protein regulation. *Molecular human reproduction* **8**, 1014-1022

117. Clayton, L., Hall, A., and Johnson, M. H. (1999) A role for Rho-like GTPases in the polarisation of mouse eight-cell blastomeres. *Developmental biology* **205**, 322-331
118. Shiokawa, S., Iwashita, M., Akimoto, Y., Nagamatsu, S., Sakai, K., Hanashi, H., Kabir-Salmani, M., Nakamura, Y., Uehata, M., and Yoshimura, Y. (2002) Small guanosine triphosphatase RhoA and Rho-associated kinase as regulators of trophoblast migration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **87**, 5808-5816
119. Gomez del Pulgar, T., Benitah, S. A., Valeron, P. F., Espina, C., and Lacal, J. C. (2005) Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **27**, 602-613
120. Adnane, J., Muro-Cacho, C., Mathews, L., Sebti, S. M., and Munoz-Antonia, T. (2002) Suppression of rho B expression in invasive carcinoma from head and neck cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 2225-2232
121. Hakem, A., Sanchez-Sweatman, O., You-Ten, A., Duncan, G., Wakeham, A., Khokha, R., and Mak, T. W. (2005) RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes & development* **19**, 1974-1979
122. Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arai, S., Imamura, M., Narumiya, S., Hiai, H., and Fukumoto, M. (1998) Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *British journal of cancer* **77**, 147-152
123. Horiuchi, A., Imai, T., Wang, C., Ohira, S., Feng, Y., Nikaido, T., and Konishi, I. (2003) Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **83**, 861-870
124. Fritz, G., Just, I., and Kaina, B. (1999) Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *International journal of cancer* **81**, 682-687
125. Weiss, A., and Attisano, L. (2013) The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **2**, 47-63
126. Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A., and Heldin, C. H. (2002) Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunology letters* **82**, 85-91
127. Oshimori, N., and Fuchs, E. (2012) The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell stem cell* **11**, 751-764
128. Massague, J., and Xi, Q. (2012) TGF-beta control of stem cell differentiation genes. *FEBS letters* **586**, 1953-1958
129. Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., and Wrana, J. L. (2003) Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology* **5**, 410-421
130. Schmierer, B., and Hill, C. S. (2007) TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 970-982
131. de Caestecker, M. P., Yahata, T., Wang, D., Parks, W. T., Huang, S., Hill, C. S., Shioda, T., Roberts, A. B., and Lechleider, R. J. (2000) The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *The Journal of biological chemistry* **275**, 2115-2122
132. Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005) Smad transcription factors. *Genes & development* **19**, 2783-2810
133. Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2007) Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer science* **98**, 1512-1520
134. Watabe, T., and Miyazono, K. (2009) Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell research* **19**, 103-115

135. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**, 704-715
136. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871-890
137. Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2008) Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development (Cambridge, England)* **135**, 2969-2979
138. Funa, N. S., Schachter, K. A., Lerdrup, M., Ekberg, J., Hess, K., Dietrich, N., Honore, C., Hansen, K., and Semb, H. (2015) beta-Catenin Regulates Primitive Streak Induction through Collaborative Interactions with SMAD2/SMAD3 and OCT4. *Cell stem cell* **16**, 639-652
139. Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., Qin, B., Xu, J., Li, W., Yang, J., Gan, Y., Qin, D., Feng, S., Song, H., Yang, D., Zhang, B., Zeng, L., Lai, L., Esteban, M. A., and Pei, D. (2010) A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell* **7**, 51-63
140. Arnold, S. J., and Robertson, E. J. (2009) Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 91-103
141. Watanabe, K., Kamiya, D., Nishiyama, A., Katayama, T., Nozaki, S., Kawasaki, H., Watanabe, Y., Mizuseki, K., and Sasai, Y. (2005) Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nature neuroscience* **8**, 288-296
142. Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology* **27**, 275-280
143. Mishina, Y., Hanks, M. C., Miura, S., Tallquist, M. D., and Behringer, R. R. (2002) Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **32**, 69-72
144. Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., O'Sullivan, C., Collins, L., Chen, Y., Minami, E., Gill, E. A., Ueno, S., Yuan, C., Gold, J., and Murry, C. E. (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotech* **25**, 1015-1024
145. Cai, W., Guzzo, R. M., Wei, K., Willems, E., Davidovics, H., and Mercola, M. (2012) A Nodal-to-TGFbeta cascade exerts biphasic control over cardiopoiesis. *Circulation research* **111**, 876-881
146. Zeineddine, D., Papadimou, E., Chebli, K., Gineste, M., Liu, J., Grey, C., Thurig, S., Behfar, A., Wallace, V. A., Skerjanc, I. S., and Puceat, M. (2006) Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Developmental cell* **11**, 535-546
147. Singla, D. K., and Sun, B. (2005) Transforming growth factor-beta2 enhances differentiation of cardiac myocytes from embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **332**, 135-141
148. Kitamura, R., Takahashi, T., Nakajima, N., Isodono, K., Asada, S., Ueno, H., Ueyama, T., Yoshikawa, T., Matsubara, H., and Oh, H. (2007) Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells. *Circulation research* **101**, 78-87

149. Gouon-Evans, V., Boussemart, L., Gadue, P., Nierhoff, D., Koehler, C. I., Kubo, A., Shafritz, D. A., and Keller, G. (2006) BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nature biotechnology* **24**, 1402-1411
150. Shiraki, N., Yoshida, T., Araki, K., Umezawa, A., Higuchi, Y., Goto, H., Kume, K., and Kume, S. (2008) Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 874-885
151. Vallier, L., Mendjan, S., Brown, S., Chng, Z., Teo, A., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Cho, C. H., Martinez, A., Rugg-Gunn, P., Brons, G., and Pedersen, R. A. (2009) Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* **136**, 1339-1349
152. Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., and Smith, A. (1999) Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental biology* **210**, 30-43
153. Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakanuma, Y., Yokota, T., Asashima, M., and Koide, H. (2004) Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* **313**, 475-481
154. Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996) Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* **5**, 449-460
155. Li, Z., and Chen, Y. G. (2012) Fine-tune of intrinsic ERK activity by extrinsic BMP signaling in mouse embryonic stem cells. *Protein & cell* **3**, 401-404
156. Sirard, C., de la Pompa, J. L., Elia, A., Itie, A., Mirtsos, C., Cheung, A., Hahn, S., Wakeham, A., Schwartz, L., Kern, S. E., Rossant, J., and Mak, T. W. (1998) The tumor suppressor gene Smad4/Dpc4 is required for gastrulation and later for anterior development of the mouse embryo. *Genes & development* **12**, 107-119
157. Dunn, N. R., Vincent, S. D., Oxburgh, L., Robertson, E. J., and Bikoff, E. K. (2004) Combinatorial activities of Smad2 and Smad3 regulate mesoderm formation and patterning in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* **131**, 1717-1728
158. James, D., Levine, A. J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development (Cambridge, England)* **132**, 1273-1282
159. Sakaki-Yumoto, M., Liu, J., Ramalho-Santos, M., Yoshida, N., and Derynck, R. (2013) Smad2 is essential for maintenance of the human and mouse primed pluripotent stem cell state. *The Journal of biological chemistry* **288**, 18546-18560
160. Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R. A. (2005) Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of cell science* **118**, 4495-4509
161. Besser, D. (2004) Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. *The Journal of biological chemistry* **279**, 45076-45084
162. Ogawa, K., Saito, A., Matsui, H., Suzuki, H., Ohtsuka, S., Shimosato, D., Morishita, Y., Watabe, T., Niwa, H., and Miyazono, K. (2007) Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *Journal of cell science* **120**, 55-65
163. Dickinson, P., Kimber, W. L., Kilanowski, F. M., Stevenson, B. J., Porteous, D. J., and Dorin, J. R. (1993) High frequency gene targeting using insertional vectors. *Human molecular genetics* **2**, 1299-1302

164. Thomson, J. M., Newman, M., Parker, J. S., Morin-Kensicki, E. M., Wright, T., and Hammond, S. M. (2006) Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes & development* **20**, 2202-2207
165. McBurney, M. W., Jones-Villeneuve, E. M., Edwards, M. K., and Anderson, P. J. (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **299**, 165-167
166. Laplante, I., Paquin, J., and Beliveau, R. (2001) RhoB expression is induced after the transient upregulation of RhoA and Cdc42 during neuronal differentiation and influenced by culture substratum and microtubule integrity. *Brain research. Developmental brain research* **129**, 157-168
167. Krawetz, R. J., Taiani, J., Greene, A., Kelly, G. M., and Rancourt, D. E. (2011) Inhibition of Rho kinase regulates specification of early differentiation events in P19 embryonal carcinoma stem cells. *PloS one* **6**, e26484
168. Laplante, I., Beliveau, R., and Paquin, J. (2004) RhoA/ROCK and Cdc42 regulate cell-cell contact and N-cadherin protein level during neurodetermination of P19 embryonal stem cells. *Journal of neurobiology* **60**, 289-307
169. Aktories, K., Mohr, C., and Koch, G. (1992) Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Current topics in microbiology and immunology* **175**, 115-131
170. Palmqvist, L., Glover, C. H., Hsu, L., Lu, M., Bossen, B., Piret, J. M., Humphries, R. K., and Helgason, C. D. (2005) Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **23**, 663-680
171. Mullen, A. C., Orlando, D. A., Newman, J. J., Loven, J., Kumar, R. M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M. G., DeKoter, R. P., and Young, R. A. (2011) Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. *Cell* **147**, 565-576
172. Chen, S., Crawford, M., Day, R. M., Briones, V. R., Leader, J. E., Jose, P. A., and Lechleider, R. J. (2006) RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 1765-1770
173. Yeo, J. C., Jiang, J., Tan, Z. Y., Yim, G. R., Ng, J. H., Goke, J., Kraus, P., Liang, H., Gonzales, K. A., Chong, H. C., Tan, C. P., Lim, Y. S., Tan, N. S., Lufkin, T., and Ng, H. H. (2014) Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell stem cell* **14**, 864-872
174. Pan, Y., Bi, F., Liu, N., Xue, Y., Yao, X., Zheng, Y., and Fan, D. (2004) Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* **315**, 686-691
175. Abraham, M. T., Kuriakose, M. A., Sacks, P. G., Yee, H., Chiriboga, L., Bearer, E. L., and Delacure, M. D. (2001) Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. *The Laryngoscope* **111**, 1285-1289
176. Kamai, T., Arai, K., Tsujii, T., Honda, M., and Yoshida, K. (2001) Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour. *BJU international* **87**, 227-231
177. Clark, A. T. (2007) The stem cell identity of testicular cancer. *Stem cell reviews* **3**, 49-59
178. Debidda, M., Wang, L., Zang, H., Poli, V., and Zheng, Y. (2005) A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 17275-17285
179. Bustelo, X. R. (2010) A transcriptional cross-talk between RhoA and c-Myc inhibits the RhoA/Rock-dependent cytoskeleton. *Small GTPases* **1**, 69-74
180. Ridley, A. J. (2004) Rho proteins and cancer. *Breast cancer research and treatment* **84**, 13-19

181. Dolfini, D., Minuzzo, M., Pavesi, G., and Mantovani, R. (2012) The short isoform of NF-YA belongs to the embryonic stem cell transcription factor circuitry. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **30**, 2450-2459
182. Vega, F. M., Fruhwirth, G., Ng, T., and Ridley, A. J. (2011) RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *The Journal of cell biology* **193**, 655-665
183. Hall, A., and Nobes, C. D. (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **355**, 965-970
184. Nusrat, A., Giry, M., Turner, J. R., Colgan, S. P., Parkos, C. A., Carnes, D., Lemichez, E., Boquet, P., and Madara, J. L. (1995) Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 10629-10633
185. Nobes, C. D., and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of cell biology* **144**, 1235-1244
186. Ho, T. T., Merajver, S. D., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V., and Deroanne, C. F. (2008) RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *The Journal of biological chemistry* **283**, 21588-21598
187. Wu, M. Y., and Hill, C. S. (2009) Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Developmental cell* **16**, 329-343
188. Hadjimichael, C., Nikolaou, C., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A. (2016) MicroRNAs for Fine-Tuning of Mouse Embryonic Stem Cell Fate Decision through Regulation of TGF-beta Signaling. *Stem cell reports* **6**, 292-301
189. Redshaw, N., Camps, C., Sharma, V., Motallebipour, M., Guzman-Ayala, M., Oikonomopoulos, S., Thymiakou, E., Ragoussis, J., and Episkopou, V. (2013) TGF-beta/Smad2/3 signaling directly regulates several miRNAs in mouse ES cells and early embryos. *PLoS one* **8**, e55186
190. Iwamoto, T., Oshima, K., Seng, T., Feng, X., Oo, M. L., Hamaguchi, M., and Matsuda, S. (2002) STAT and SMAD signaling in cancer. *Histology and histopathology* **17**, 887-895
191. Guzman-Ayala, M., Lee, K. L., Mavrakis, K. J., Goggolidou, P., Norris, D. P., and Episkopou, V. (2009) Graded Smad2/3 activation is converted directly into levels of target gene expression in embryonic stem cells. *PLoS one* **4**, e4268
192. Viotti, M., Foley, A. C., and Hadjantonakis, A. K. (2014) Gutsy moves in mice: cellular and molecular dynamics of endoderm morphogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **369**
193. Fehling, H. J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G., and Kouskoff, V. (2003) Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development (Cambridge, England)* **130**, 4217-4227
194. Ichida, J. K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E. Y., Chung, J. E., Egli, D., Loh, K. M., Carter, A. C., Di Giorgio, F. P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D. R., Rubin, L. L., and Eggan, K. (2009) A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell stem cell* **5**, 491-503



Functional analysis of the promoters of the small GTPases RhoA and RhoB in embryonic stem cells



Eirini Nomikou^a, Christos Stournaras^a, Dimitris Kardassis^{a, b, *}

^a Laboratory of Biochemistry, Division of Basic Medical Sciences, University of Crete Medical School, Heraklion 71003, Greece

^b Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology of Hellas, Heraklion 71003, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2017

Accepted 20 July 2017

Available online 21 July 2017

Keywords:

Rho GTPases

Embryonic stem cells

Promoter

CCAAT box

Autoregulation

ABSTRACT

Small GTPases of the Rho subfamily have been implicated in many physiological and pathological processes in various cell types including embryonic stem cells (ESCs). In the present study we performed a functional analysis of the promoters of the RhoA and the RhoB genes in order to identify regulatory elements that are important for their transcriptional control in ESCs. We show that RhoA mRNA levels were significantly higher compared with the RhoB mRNA levels in ESCs as well in various cancer cell lines and this difference could be accounted for by differences in the activities of the corresponding promoters. Deletion analysis of the RhoA and RhoB promoters in ESCs revealed that the proximal regions contain regulatory elements that are critical for their activity. Both proximal promoters contain CCAAT boxes and mutagenesis of these elements decreased significantly the activity of both promoters suggesting a coordinated regulation of the two genes by CCAAT box binding factors. Finally, we show that both genes are subjects to autoregulation in ESCs and in the case of RhoB, this autoregulation requires the GTPase activity of the Rho proteins. Understanding the mechanisms that control the transcription of Rho GTPases in ESCs may shed new light into the still unknown roles of these proteins in stem cell functions.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Approximately 1% of the human genome encodes for proteins that regulate or are regulated from small GTPases [1]. Small GTPases of the Rho family regulate a variety of cellular processes including apoptosis, cell cycle progression, cell adhesion, transcriptional regulation and migration [1–3]. RhoA, B and C exhibit significant amino acid sequence identity (~85%) but they have different functional properties [4]. In contrast to other small GTPases which are relatively stable, RhoB is turned over quickly and its synthesis is rapidly upregulated by a variety of stimuli such as cytokines or growth factors [5,6]. RhoB is post-translationally modified by the addition of lipid moieties which enable RhoB to bind to cell membranes [7]. RhoB is often down-regulated in tumors and its expression inversely correlates with tumor aggressiveness whereas RhoA promotes the formation of stress fibers and focal adhesions through actin-myosin contractility control thereby regulating cell shape, attachment and motility [8]. Modulation of

Rho protein activity can promote metastasis by disrupting epithelial-sheet organization, increasing cell motility and promoting the degradation of the extracellular matrix [9]. There is evidence showing that RhoA and RhoC are upregulated in a high number of human tumors [10].

One transcription factor shown to regulate the RhoA gene is c-Myc. Myc binds to two proximal E-boxes of the RhoA promoter whereas c-Myc knockdown decreased RhoA mRNA expression [11]. Two other transcription factors controlling RhoA expression are STAT6 and NF- κ B which bind to the proximal region of the RhoA promoter [12,13]. Transforming growth factor- β (TGF β) signaling upregulates RhoB transcription via activation of Smad3/4 and MEK/ERK pathways in human HaCaT keratinocytes. Activation of the MEK/ERK pathway is required for recruitment of Smad3 to a nonclassical binding site in the proximal RhoB promoter which is overlapping with a CCAAT box that binds nuclear factor Y (NFY) [14].

In the present study, we aimed to investigate the transcriptional regulation of RhoA and RhoB genes in mouse embryonic stem cells (ESCs).

* Corresponding author. Laboratory of Biochemistry, Division of Basic Sciences, University of Crete Medical School, Heraklion 71003, Greece.

E-mail address: kardasis@imbb.forth.gr (D. Kardassis).

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

Mouse CGR8 ES cell line (provided by Dr A. Kretsovali, IMBB-FORTH, Heraklion) was cultured in KnockOut DMEM supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% NEAA, 2 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin, 0.1 mM β -mercaptoethanol and Leukemia inhibitory factor (LIF, 2 μ l/ml our own production) on gelatinized dishes. The mouse P-19 embryonal carcinoma cell line (provided by Dr P. Papazafiri, Faculty of Biology, NKUA, Athens) was maintained in α -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% NEAA, 2 mM L-glutamine, penicillin/streptomycin. All cell lines were maintained at 37 °C in a 5% CO₂ humidified environment.

2.2. Transient transfections and reporter assays

Transient transfections were performed using the attractene method. Luciferase assays were performed using the luciferase assay kit from Promega Co. Normalization for transfection efficiency was performed by β -galactosidase assays.

2.3. RNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR (qPCR)

Total RNA was prepared using RNAiso Plus reagent according to the manufacturer's instructions. One μ g RNA was reverse transcribed by M-MLV Reverse Transcriptase using random primers.

The cDNAs were used for quantitative PCR (qPCR) on a Step-OnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix. The expression of the RhoA or RhoB genes was normalized to the expression of the housekeeping genes tubulin or beta actin and the normalized Ct (threshold cycle) values were calibrated against the control condition for each sample. The relative gene expression levels were determined using the comparative $\Delta\Delta$ Ct method as described in Applied Biosystems Guide. All oligonucleotide sequences used as primers in qPCR experiments are shown in Table S1.

2.4. Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.D. Statistical significance was determined using two-tailed Student's t-test. Differences with $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Analysis was performed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

3. Results

3.1. Relative expression of RhoA and RhoB genes in stem and cancer cell lines

We measured the relative RhoA and RhoB mRNA levels in two cell lines: the mouse embryonic stem cell line CGR8 [15] and the mouse embryonic teratocarcinoma stem cell line P-19 [16]. As shown in Fig. S1A-C the mRNA levels of RhoA were significantly

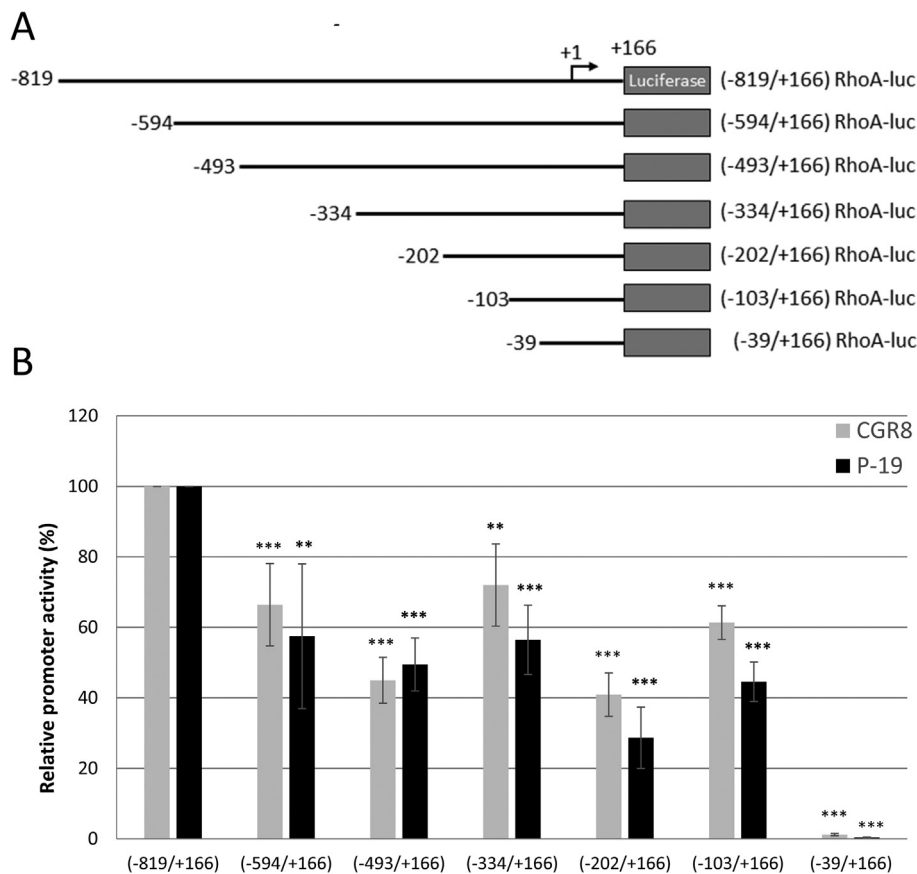


Fig. 1. The short proximal region between nucleotides -103 and -39 is essential for RhoA promoter activity in stem cells. (A) Schematic representation of the 5'-deletion fragments of the (-819/+166) human RhoA promoter that were used in the transactivation experiments of panel B. (B) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoA-luc reporter plasmids (0.1 μ g). The normalized relative luciferase activity is presented with histograms. Each value of luciferase activity represents the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

higher compared with the mRNA levels of RhoB in both cell lines (RhoA/RhoB mRNA ratio 38 and 172 in CGR8 and P-19 cells respectively). For comparison, we measured the relative mRNA levels of RhoA and RhoB genes in various cancer cell lines and found that the levels of RhoA were significantly higher than the levels of RhoB in all cell lines tested (Fig. S1C). We also measured the relative activities of the promoters of the two genes in stem cells. This analysis showed that the (–819/+166) RhoA promoter is stronger than the (–726/+86) RhoB promoter in both CGR8 and P-19 cells (Fig. S2). The combined data of Fig. S1 and S2 indicate that RhoA is expressed at very high levels compared to RhoB in stem cells and in cancer cell lines at least in part due to differences in the activities of their corresponding promoters.

3.2. The RhoA promoter is regulated in stem cells by a combination of negative and positive regulatory elements

We mapped the regions of the RhoA promoter that could contribute to its transcriptional activity in stem cells. For this purpose, we generated the truncated RhoA promoter/luciferase fusion plasmids shown in Fig. 1A and used them for transient transfections. We found that deletion of the RhoA promoter to positions –594 and –493 caused a step-wise decrease in its activity to 65% and 45% respectively relative to the –819/+166 promoter in CGR8 cells suggesting the presence of positive regulatory elements inside the distal –819/–493 region (Fig. 1B). Further deletion to

nucleotide position –334 increased RhoA promoter activity suggesting that this deletion removed regulatory elements with an inhibitory role in RhoA gene regulation. A significant drop in RhoA promoter activity was observed when the –103 to –39 region was deleted suggesting the presence of strong positive regulatory elements inside this region. (Fig. 1B). Very similar results were obtained in P-19 cells (Fig. 1B).

The proximal RhoA promoter contains binding sites for the transcription factors NF- κ B, STAT6 and c-Myc (Fig. 2A) [11,12]. These sites are well conserved between humans and mice (Fig. S3). The same region also contains an inverted CCAAT box at position –68/–64 which could serve as a binding site for CCAAT box binding factors. We had shown previously that this CCAAT box binds with low affinity transcription factor NFYA [14]. Binding of NFYA, NFYB, CEBPB and CEBPD to the RhoA promoter is supported by ChIP-seq data (Fig. S4). As shown in Fig. 2B, deletion of the RhoA promoter region containing the NF- κ B, STAT6 and c-Myc sites was associated with a reduction in RhoA promoter activity by 60% whereas the deletion of the CCAAT box reduced further RhoA promoter activity to 75%. A very similar pattern was observed in P-19 cells (Fig. 2B).

3.3. Mutations in the CCAAT box reduced basal RhoA promoter activity

The inverted CCAAT box present in the proximal region of the

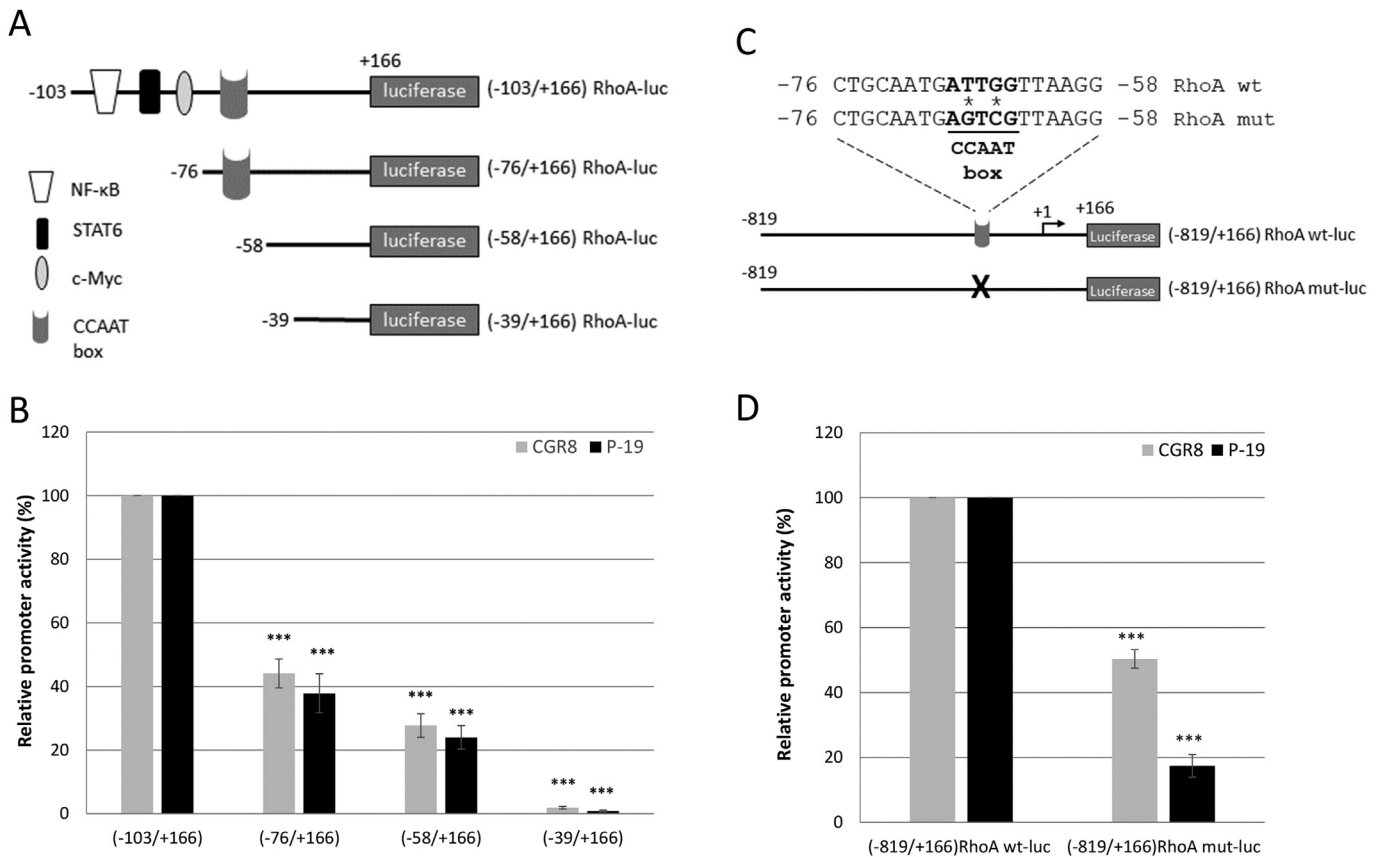


Fig. 2. The binding sites for NF- κ B, STAT6, c-Myc and the CCAAT box contribute to RhoA promoter activation in stem cells. (A) Schematic representation of the 5'-deletion fragments of the RhoA promoter that were used in the transactivation experiments of panel B. (B) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoA-luc reporter plasmids (0.1 μ g). Normalized relative luciferase activity values are shown as the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. (C) Schematic representation of the wild type –819/+166 human RhoA promoter construct and the corresponding construct bearing mutations in the CCAAT box. Two nucleotide substitutions are indicated with the asterisks. (D) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoA-luc reporter plasmids (0.05 μ g). Normalized relative luciferase activity values are shown as the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. ***, $p < 0.001$.

RhoA promoter at position $-68/-64$ is fully conserved in mammals (Fig. S5A). In order to examine the contribution of this CCAAT element in RhoA gene regulation in stem cells, we introduced two nucleotide substitutions (Fig. 2C). The mutations in the CCAAT box reduced basal RhoA promoter activity by 55% and 82% respectively in the two cell lines (Fig. 2D). These data suggested that factors that bind to this CCAAT element may play a positive role in RhoA gene regulation in ESCs.

3.4. The $-85/-53$ region of the RhoB promoter is crucial for its activity in stem cells

A 5' deletion analysis was performed to identify regions that are important for the activity of the RhoB promoter in stem cells. The RhoB promoter fragments shown in Fig. 3A were transfected into CGR8 and P-19 cells and their activity was measured. As shown in Fig. 3B, deletion of the RhoB promoter region between -1605 and -227 had no effect on the activity of this promoter. In contrast, deletion to nucleotides -85 and -53 reduced significantly and abolished RhoB promoter activity respectively suggesting that the region between nucleotides -227 and -53 is essential for the transcription of the RhoB gene in stem cells. Similar results were obtained in P-19 cells (Fig. 3B).

The RhoB promoter contains two CCAAT box elements at positions $-109/-105$ and $-60/56$ which are fully conserved in mammals (Fig. S5B and S6). We had shown that mutagenesis of the more proximal CCAAT box of the RhoB promoter reduced significantly basal promoter activity in HepG2 cells [14]. Binding of NFYB and CEBPB to the RhoB promoter is supported by previous ChIP-seq data (Fig. S7). To examine the contribution of this CCAAT box in RhoB promoter regulation in stem cells, luciferase reporter plasmids bearing the wild type $-726/+86$ RhoB promoter or the corresponding promoter bearing point mutations in the CCAAT

sequence (Fig. 3C) were transfected in CGR8 and P-19 cells. The data (Fig. 3D) showed that in both cell lines, the CCAAT box mutations reduced significantly the basal activity of the RhoB promoter (by 85% and 91% in CGR8 and P-19 cells respectively). The combined data of Figs. 1–3 suggested that the expression of the RhoA and RhoB genes may be coordinated by common transcription factors that bind to the CCAAT box elements present in both promoters.

3.5. Rho genes are subject to autoregulation in stem cells

To investigate potential autoregulation of Rho genes in ESCs, we transfected CGR8 and P-19 cells with the $(-726/+86)$ RhoB-luc reporter plasmid in the presence and in the absence of expression vectors for wt RhoA and the dominant negative form RhoAN19. As shown in Fig. 4A, overexpression of wt RhoA inhibited whereas overexpression of dominant negative RhoA stimulated the activity of the RhoB promoter in CGR8 and P-19 cells. The RhoA promoter is also subject to negative autoregulation. As shown in Fig. 4B, overexpression of wt RhoB had no effect on the activity of the $(-819/+166)$ RhoA promoter in CGR8 cells. In sharp contrast, overexpression of wt RhoB in P-19 cells inhibited the activity of the $(-819/+166)$ RhoA promoter.

We investigated the contribution of the proximal CCAAT boxes in the transcriptional autoregulation of the RhoA and RhoB genes. Overexpression of RhoB inhibited the activity of the RhoB promoter in both CGR8 and P-19 cells in a dose-dependent manner (Fig. 4C) whereas mutagenesis of the RhoB CCAAT box had no effect on autoinhibition in CGR8 cells but abolished autoinhibition in P-19 cells (Fig. 4C). Similarly, RhoA inhibited the activity of the $(-819/+166)$ RhoA promoter in CGR8 cells in a dose-dependent manner and this inhibition was more pronounced in P-19 cells (Fig. 4D). Mutagenesis of the CCAAT box in the RhoA promoter had no effect on RhoA autoinhibition in either CGR8 cells or P-19 cells.

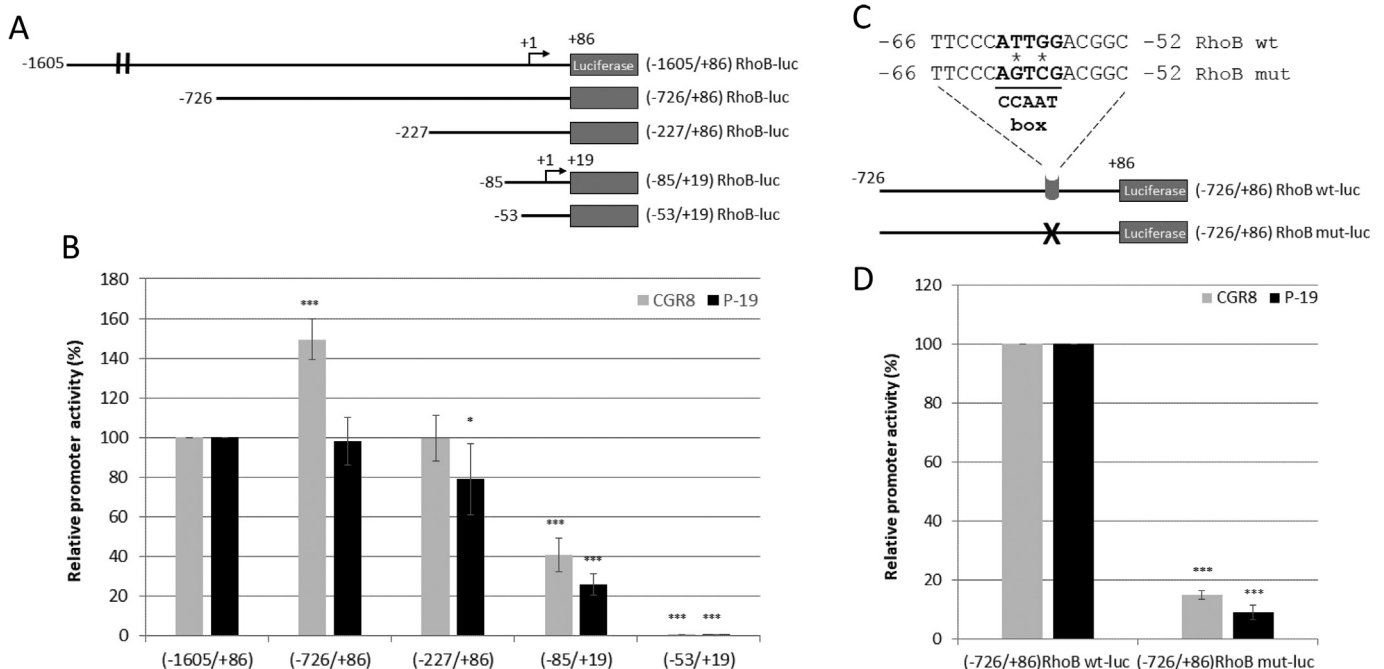


Fig. 3. The crucial region for RhoB promoter activity in stem cells is the short proximal region between nucleotides -85 and -53 . (A) Schematic representation of the 5' deletion fragments of the $(-1605/+86)$ human RhoB promoter that were used in the transactivation experiments of panel B. (B) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoB-luc reporter plasmids (0.1 μ g). The normalized, relative luciferase activity (\pm SD) calculated from three independent experiments performed in duplicate is presented. (C) Schematic representation of the wild type $-726/+86$ human RhoB promoter construct and the corresponding construct bearing mutations in the CCAAT box. Two nucleotide substitutions are indicated with the asterisks. (D) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoB-luc reporter plasmids (0.05 μ g). Normalized relative luciferase activity values are shown as the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

To investigate whether RhoA and RhoB autoregulation requires the GTPase activity of the Rho proteins, we used the pan-Rho inhibitor C3 transferase [17]. As shown in Fig. 4E, the C3 inhibitor increased the mRNA levels of the RhoB but not of the RhoA gene in a time-dependent manner. A more pronounced upregulation of the RhoB gene by the C3 inhibitor was observed in P-19 cells whereas the expression of RhoA was unchanged (Fig. 4F). These data are in line with the transactivation data of Fig. 4A–D supporting a mechanism of autoregulation in RhoB gene expression in both normal and cancer stem cells.

4. Discussion

In the present study we have undertaken a functional analysis of the promoters of the RhoA and the RhoB genes to identify regulatory elements that are important for their transcriptional control in ESCs. Our objective was to identify potential similarities and differences in the regulation of RhoA and RhoB genes in normal (CGR8) versus cancer (P-19) embryonic stem cells as well as to validate the physiological role of regulatory elements that had been identified previously in other cell systems.

We found that the mRNA levels of RhoA were significantly high in both stem cells lines used whereas the mRNA levels of RhoB were almost undetectable. However, this drastic difference in the relative levels of expression between the two genes does not appear to be specific for stem cells since it was observed in all cancer cell lines

tested. The data are in line with previous studies showing that RhoA is highly expressed whereas RhoB is downregulated in tumors [18–20]. The reason for the observed RhoA upregulation in stem cells is not yet known. We could hypothesize that elevated RhoA provides stem cells the ability to form stress fibers and migrate very quickly upon the appropriate signaling cues.

Using a large panel of RhoA and RhoB promoter constructs, we established that the proximal regions of both promoters contain regulatory elements which are essential for their activity in stem cells. Both proximal promoters contain inverted CCAAT boxes which serve as binding sites for CCAAT box binding factors such as NFY and CEBP family members (ChIP-Seq experiments of Fig. S4 and S7). Point mutations in these regulatory elements decreased the activity of both promoters in normal embryonic and cancer stem cells. Our findings are in agreement with previous data from our lab in which the same mutations abolished both the basal as well as the Smad-mediated transactivation of the RhoB promoter in human hepatoblastoma HepG2 cells [14]. Other studies had also provided strong evidence in favor of the significance of the CCAAT box for RhoB gene regulation [21–24]. In contrast to the RhoB CCAAT box, the RhoA CCAAT box has not been studied previously. We report here for the first time that the RhoA CCAAT box plays an important role in RhoA regulation in stem cells. We had shown in a previous study [14] that the CCAAT sequence itself is not sufficient for high affinity binding of NFYA and that additional flanking sequences are required. This was concluded by comparing the nucleotide sequences of the proximal

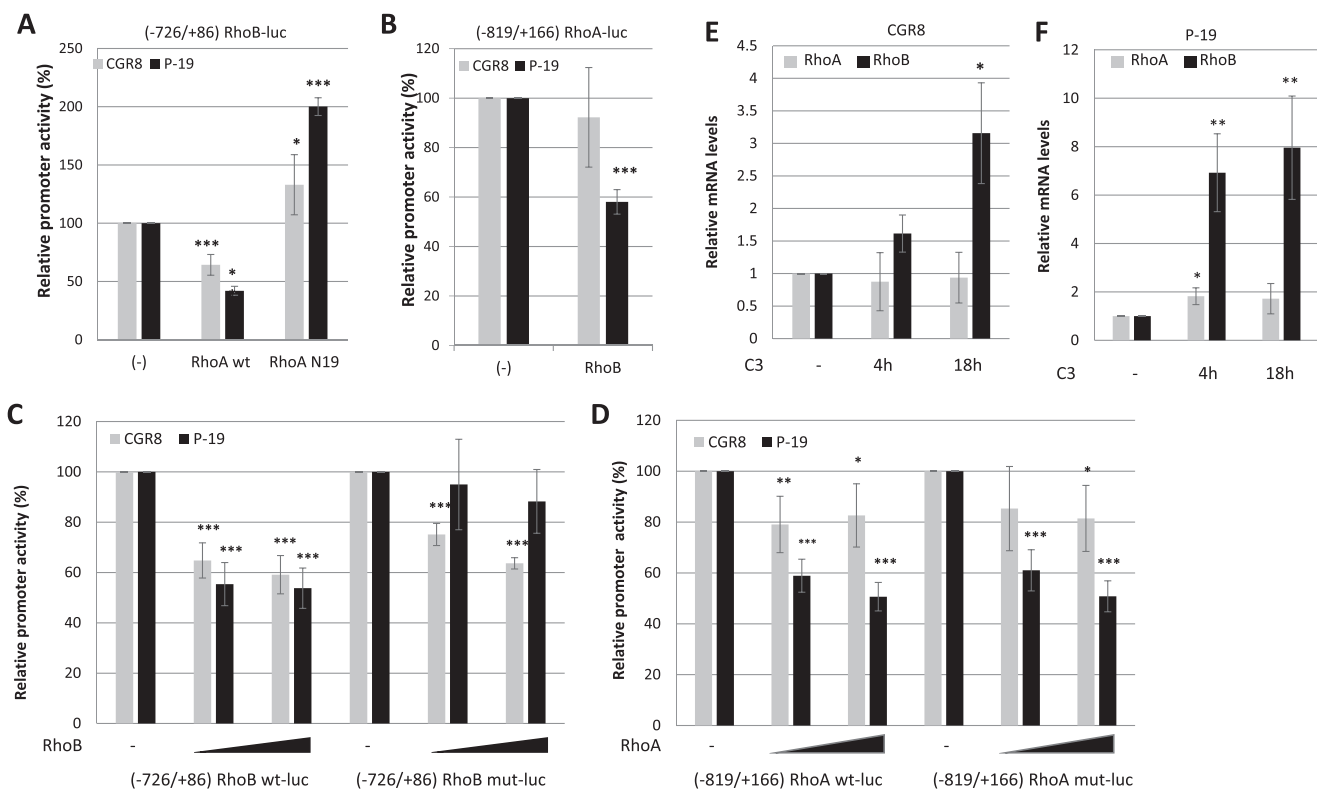


Fig. 4. RhoA and RhoB genes are subject to autoregulation in stem cells. (A) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the (-726/+86) RhoB-luc reporter plasmid (0.05 μ g) along with expression vectors for RhoA and RhoA dominant negative mutant N19 (0.75 μ g). (B) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the (-819/+166) RhoA-luc reporter plasmid (0.05 μ g) in the presence or in the absence of the RhoB expression vector (0.75 μ g). The normalized relative luciferase activity is presented with histograms. Each value of luciferase activity represents the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. (C) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoB-luc reporter plasmids (0.05 μ g) along with increasing amounts of an expression vector for wild type RhoB (0.35 μ g and 0.75 μ g). The normalized relative luciferase activity is presented with histograms. Each value of luciferase activity represents the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. (D) CGR8 and P-19 cells were transiently transfected with the indicated RhoA-luc reporter plasmids (0.05 μ g) along with increasing amounts of an expression vector for wild type RhoA (0.35 μ g and 0.75 μ g). The normalized relative luciferase activity is presented with histograms. Each value of luciferase activity represents the average (\pm SD) from at least three independent experiments performed in duplicate. (E) CGR8 or (F) P19 cells were treated with C3 (0.1 μ g/ μ l) for 4 h or 18 h. Total RNA was extracted and RhoA and RhoB mRNA levels were determined by reverse transcription qPCR. RhoA and RhoB mRNA levels were normalized relative to the tubulin mRNA levels. Results are expressed as mean (\pm SD) from at least three independent experiments and shown as a histogram. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

CCAAT boxes of the human RhoB and RhoA promoters and finding that the affinity of NFYA for the RhoB CCAAT box is much higher than its affinity for the RhoA CCAAT box [14]. This suggested that different stem cell factors may bind to the CCAAT box elements in the RhoA and RhoB promoters and regulate their activities in response to different external or internal cues.

In the present study we showed that the activity of the RhoA and RhoB promoters is subject to auto-regulation. Specifically, we showed that a) overexpression of RhoA inhibits the activity of the RhoB promoter and of the RhoA promoter and this inhibition was more pronounced in P-19 cells; b) overexpression of RhoB inhibits the activity of the RhoA promoter only in P-19 cells as well as of the RhoB promoter equally well in both cell lines; c) the CCAAT box of the RhoB promoter is essential for the autoregulation only in P-19 cells whereas the CCAAT box of the RhoA promoter does not appear to play a critical role in autoregulation. The combined data indicate that the cellular and the promoter context are very critical factors that determine the strength and the specificity of RhoA and RhoB autoregulation at the transcriptional level. We showed that the C3 inhibitor increased the mRNA levels of the RhoB gene in a time-dependent manner but not of the RhoA gene. A more pronounced upregulation of the RhoB gene by the C3 inhibitor was observed in P-19 cells whereas the expression of RhoA was unchanged. These data could also explain, at least in part, the low levels of expression of RhoB gene in cells that express high levels of RhoA such as CGR8 and P-19.

Our findings are in line with a previous study [25] which reported that overexpression of constitutively activated RhoA or wild-type RhoB strongly inhibited RhoB promoter activity in mouse fibroblasts. Furthermore, cotransfection of Rho-GDI, which is an inhibitory molecule for Rho proteins, caused a 6.4-fold increase in the RhoB promoter activity [25]. Ho et al. [26] reported that silencing of RhoA in human breast adenocarcinoma cells induced a strong up-regulation of both total and active RhoB protein levels that was mediated by the GDP-bound form of RhoA. Finally, Vega et al. [27] reported that reduced RhoA increased RhoB protein levels in PC3 prostate cancer cells and MDA-MB-231 breast cancer cells.

In summary, in the present study we show that despite the difference in the levels of expression of the RhoA and RhoB genes in mouse embryonic stem cells, their promoters are regulated by common mechanisms and similar regulatory elements. However, certain aspects of RhoA and RhoB regulation, especially their autoregulation, differ among normal and cancer stem cells. Understanding the mechanisms that control the transcription of Rho GTPases in stem cells may shed new light into the still unknown roles of these proteins in stem cell functions as well as in cancer cells that share many features with stem cells.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Hellenic Ministry for Education, Research and Religious Affairs (THALIS MIS 380334) to DK and CS. EN was supported by a fellowship from the “Research Projects for Excellence-IKY/Siemens” program. We would like to thank Dimitris Theofilatos for assistance in the bioinformatical analysis of the RhoA and RhoB promoters. We would like to thank all members of the Kardassis and Stournaras labs for assistance with protocols and useful suggestions.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.114>.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.114>.

References

- [1] A.B. Jaffe, A. Hall, Rho GTPases: biochemistry and biology, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21 (2005) 247–269.
- [2] D.R. Croft, M.F. Olson, Transcriptional regulation of Rho GTPase signaling, *Transcription* 2 (2011) 211–215.
- [3] F.M. Vega, A.J. Ridley, Rho GTPases in cancer cell biology, *FEBS Lett.* 582 (2008) 2093–2101.
- [4] A.J. Ridley, Rho proteins and cancer, *Breast Cancer Res. Treat.* 84 (2004) 13–19.
- [5] A.P. Wheeler, A.J. Ridley, Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility, *Exp. Cell Res.* 301 (2004) 43–49.
- [6] D. Kardassis, C. Murphy, T. Fotsis, A. Moustakas, C. Stournaras, Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases, *FEBS J.* 276 (2009) 2947–2965.
- [7] G.C. Prendergast, Actin' up: RhoB in cancer and apoptosis, *Nat. Rev. Cancer* 1 (2001) 162–168.
- [8] K. Wennerberg, C.J. Der, Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it), *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1301–1312.
- [9] E. Sahai, C.J. Marshall, RHO-GTPases and cancer, *Nat. Rev. Cancer* 2 (2002) 133–142.
- [10] S.A. Benitah, P.F. Valeron, L. van Aelst, C.J. Marshall, J.C. Lacal, Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1705 (2004) 121–132.
- [11] C.H. Chan, S.W. Lee, C.F. Li, J. Wang, W.L. Yang, C.Y. Wu, J. Wu, K.I. Nakayama, H.Y. Kang, H.Y. Huang, M.C. Hung, P.P. Pandolfi, H.K. Lin, Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 457–467.
- [12] K. Goto, Y. Chiba, K. Matsusue, Y. Hattori, Y. Maitani, H. Sakai, S. Kimura, M. Misawa, The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells, *Pharmacol. Res.* 61 (2010) 466–472.
- [13] Y. Chiba, K. Goto, K. Matsusue, S. Kimura, M. Misawa, Identification and characterization of rat RhoA gene promoter, *J. Pharmacol. Sci.* 112 (2010) 467–472.
- [14] E. Vasilaki, E. Papadimitriou, V. Tajadura, A.J. Ridley, C. Stournaras, D. Kardassis, Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF[beta]-induced signaling pathways, *Faseb J.* 24 (2010) 891–905.
- [15] C. Gissel, C. Voolstra, M.X. Doss, C.I. Koehler, J. Winkler, J. Hescheler, A. Sachinidis, An optimized embryonic stem cell model for consistent gene expression and developmental studies: a fundamental study, *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 719–727.
- [16] J. Rossant, M.W. McBurney, The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection, *J. Embryol. Exp. Morphol.* 70 (1982) 99–112.
- [17] K. Aktories, C. Mohr, G. Koch, Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 175 (1992) 115–131.
- [18] G. Fritz, I. Just, B. Kaina, Rho GTPases are over-expressed in human tumors, *Int. J. Cancer* 81 (1999) 682–687.
- [19] Y. Pan, F. Bi, N. Liu, Y. Xue, X. Yao, Y. Zheng, D. Fan, Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315 (2004) 686–691.
- [20] M.T. Abraham, M.A. Kuriakose, P.G. Sacks, H. Yee, L. Chiriboga, E.L. Bearer, M.D. Delacure, Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer, *Laryngoscope* 111 (2001) 1285–1289.
- [21] G. Fritz, B. Kaina, Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 792–798.
- [22] S. Wang, Y. Yan-Neale, D. Fischer, M. Zeremski, R. Cai, J. Zhu, F. Asselbergs, G. Hampton, D. Cohen, Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line, *Oncogene* 22 (2003) 6204–6213.
- [23] J. Ahn, J.H. Choi, M. Won, C.M. Kang, M.R. Gyun, H.M. Park, C.H. Kim, K.S. Chung, The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409 (2011) 211–216.
- [24] K.S. Chung, G. Han, B.K. Kim, H.M. Kim, J.S. Yang, J. Ahn, K. Lee, K.B. Song, M. Won, A novel antitumor piperazine alkyl compound causes apoptosis by inducing RhoB expression via ROS-mediated cAbl/p38 MAPK signaling, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 72 (2013) 1315–1324.
- [25] G. Fritz, B. Kaina, RhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30637–30644.
- [26] T.T. Ho, S.D. Merajver, C.M. Lapierre, B.V. Nusgens, C.F. Deroanne, RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 21588–21598.
- [27] F.M. Vega, G. Fruhwirth, T. Ng, A.J. Ridley, RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets, *J. Cell Biol.* 193 (2011) 655–665.



Transcriptional and post-transcriptional regulation of the genes encoding the small GTPases RhoA, RhoB, and RhoC: implications for the pathogenesis of human diseases

Eirini Nomikou¹ · Melina Livitsanou¹ · Christos Stournaras¹ · Dimitris Kardassis^{1,2} 

Received: 6 November 2017 / Revised: 25 January 2018 / Accepted: 26 February 2018
© Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018

Abstract

Rho GTPases are highly conserved proteins that play critical roles in many cellular processes including actin dynamics, vesicular trafficking, gene transcription, cell-cycle progression, and cell adhesion. The main mode of regulation of Rho GTPases is through guanine nucleotide binding (cycling between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form), but transcriptional, post-transcriptional, and post-translational modes of Rho regulation have also been described. In the present review, we summarize recent progress on the mechanisms that control the expression of the three members of the Rho-like subfamily (RhoA, RhoB, and RhoC) at the level of gene transcription as well as their post-transcriptional regulation by microRNAs. We also discuss the progress made in deciphering the mechanisms of cross-talk between Rho proteins and the transforming growth factor β signaling pathway and their implications for the pathogenesis of human diseases such as cancer metastasis and fibrosis.

Keywords Rho GTPases · RhoA · RhoB · RhoC · Transcriptional regulation · miRNAs · TGF β · Signaling cross talks

Abbreviations

ATF-1	Activating transcription factor 1
BSMs	Bronchial smooth muscles
PKG	cGMP-dependent protein kinase
EC	Endometrial carcinoma
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FTIs	Farnesyltransferase inhibitors
GGTIs	Geranylgeranyltransferase I inhibitors
GAPs	GTPase-activating proteins
GDI	Guanosine nucleotide dissociation inhibitors
GEFs	Guanosine nucleotide exchange factors
HCC	Hepatocellular carcinoma
HDAC1	Histone deacetylase 1
HOXD10	Homeobox D10
HIF	Hypoxia inducible factor

IL-13	Interleukin 13
miRNAs	MicroRNAs
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
Miz1	Myc-interacting zinc finger protein 1
NO	Nitric oxide
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NF-Y	Nuclear factor Y
PARP-1	Poly(ADP-ribose) polymerase-1
PMA	Phorbol-12-myristyl-13-acetate
ROS	Reactive oxygen species
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
siRNAs	Small interfering RNAs
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
TGF β	Transforming growth factor β
TNF α	Tumor necrosis factor α

✉ Dimitris Kardassis
kardassis@imbb.forth.gr

¹ Laboratory of Biochemistry, Department of Medicine, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece

² Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Foundation for Research and Technology-Hellas, 71110 Heraklion, Greece

Introduction

Rho proteins are members of the Ras superfamily of small GTPases that play critical roles in many cellular processes including actin dynamics, vesicular trafficking, gene transcription, cell-cycle progression, and cell

adhesion [1]. Rho GTPases are highly conserved from lower eukaryotes to plants and mammals. In mammals, the family includes 22 members, divided into eight different subfamilies [2]. The Rho-like subfamily consists of three highly homologous isoforms: RhoA, RhoB, and RhoC. Rho GTPases are molecular switches cycling between an active GTP-bound form and an inactive GDP-bound form. This cycling is regulated by numerous cellular proteins, namely guanine nucleotide exchange factors (GEFs) that facilitate the exchange of GDP for GTP, GTPase-activating proteins (GAPs) which regulate the GTP hydrolysis of Rho GTPases, and the guanine nucleotide dissociation inhibitors (GDIs) that bind to the C-terminal prenyl group, preventing the association of Rho to the membrane and sequestering them in the cytoplasm, inhibiting their access to downstream targets. The topic of Rho regulation by effector proteins has been the subject of numerous excellent and very thorough reviews [3–7]. Due to the high amino acid sequence homology among the three Rho-like isoforms especially in the insert region which has been shown to be critical for interaction with GEFs and other effector proteins [7], Rho GEFs and GAPs that show isoform specificity are very few. One example is XPLN, a GEF that belongs to the Dbl-Rho GEF family which shows activity toward RhoA and RhoB but not RhoC due to an amino acid difference at position 43 at the N-terminus of Rho isoforms (Ile vs Val) [8, 9]. Importantly, a RhoC-I43V mutant had increased ovarian cancer cell invasion potential compared to wild type RhoC [9]. Another example of an isoform-specific RhoGEF is SmgGDS which specifically activates RhoA and RhoC but not RhoB or a large panel of other GTPases [10]. Rho GAPs that are able to differentiate among the three Rho-like isoforms have not been identified yet, but specificity of GAPs for Rho versus other members of the Ras family has been reported [11, 12].

In humans, rats and mice Rho-like genes are mapped on different chromosomes and differ in size [13]. The RhoA gene is longer and contains more exons and introns than the other Rho genes, whereas the RhoB gene contains only one exon, possibly derived from reverse transcription [14]. The primary sequences of Rho-like proteins are around 85% identical, with most divergence close to the C-terminus [1].

In addition to their important roles in cell physiology [15], Rho-like proteins also contribute to pathological processes such as cancer cell migration, invasion, metastasis, fibrosis, inflammation, and wound repair [2].

In previous studies, we have revealed the critical role of RhoA and RhoB as well as the downstream effectors (ROCK, LIMK, Cofilin) in TGF β signaling leading to actin cytoskeleton reorganization [16–21]. We have also shown that RhoB, in contrast to RhoA, is a direct transcriptional target of TGF β that mediates the long-term effect of TGF β in actin cytoskeleton [21].

In the present review, we summarize recent progress made on the mechanisms that control the expression of Rho-like proteins (RhoA, RhoB, and RhoC) at the level of gene transcription as well as post-transcriptionally by micro-RNAs. We also review progress made in deciphering the mechanisms of cross-talk between Rho proteins and TGF β and their implications in the pathogenesis of human diseases such as cancer and fibrosis.

Transcriptional regulation of the RhoA gene

The role of Rho proteins in cancer and metastasis has been the subject of intense investigation during the past decades [22]. Constitutively active tumorigenic mutations in RhoA are much less common than mutations in the Ras gene, but few of them were identified recently in gastric cancers. In one study, Wang et al. [23] performed whole-genome sequencing and a comprehensive molecular profiling in 100 tumor and non-tumor paired samples from intestinal-type gastric tumors (IGC) and diffuse-type gastric tumors (DGC) followed by resequencing in a larger DGC cohort. RhoA mutations were identified in 14.3% of DGC tumors but not in IGC tumors. Similarly, Kakiuchi et al. [24] performed whole-exome sequencing within 30 DGCs followed by resequencing in another 57 cases and identified RhoA mutations in 25.3% of the cases. These findings were in agreement with the data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) project evaluating 295 primary gastric adenocarcinomas [25]. The consortium identified mutations in the RhoA gene in 16 cases which were clustered in two adjacent amino-terminal regions that are predicted to modulate signaling downstream of RhoA [25]. Mutations in RhoA were also identified in a genome-wide association screen of patients with pediatric Burkitt lymphoma [26] and in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL), a common type of mature T-cell lymphoma of poor prognosis [27].

Upregulation of RhoA mRNA and protein levels has been well documented in various types of human malignancies [28–30]. Furthermore, the activity of RhoA can be compromised in tumor cells via different mechanisms including its phosphorylation by protein kinase A (PKA) that causes its dissociation from the plasma membrane [31], the proteasomal degradation by E3 ubiquitin ligases [32], inhibition of RhoA GEFs and stimulation of GAPs [33, 34], or the interaction of RhoA with cell-cycle inhibitors that prevent binding of effectors [35].

The functions of RhoA in cancer cells can also be modulated at the transcriptional level. The mechanisms that control RhoA gene expression during metastasis have been explored by Chan et al. [36]. They focused on the oncogenic Myc protein, a transcription factor that binds to E-box motives present in target gene promoters and regulates

transcription by cooperating with auxiliary factors such as the Myc-interacting zinc finger protein 1 (Miz1) and various coactivator complexes/histone acetyltransferases [37]. The authors showed that Myc cooperates with the E3 ubiquitin ligase S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) to induce RhoA transcription by recruiting Miz1 and p300 to the RhoA promoter independently of Skp1-Cullin-F-box protein containing complex (SCF)–Skp2 E3 ligase activity (Fig. 1a). Myc knockdown decreased RhoA mRNA levels in Rat1 fibroblasts, whereas Myc overexpression induced RhoA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. Importantly, increased levels of the Myc–Skp2–Miz1 complex can be found in metastatic human cancers, whereas deficiency of these proteins not only results in impaired RhoA expression but also inhibits cell migration, invasion, and breast cancer metastasis [36]. In summary, this study revealed, for the first time, the role of the ubiquitin ligase Skp2 in RhoA gene transcription and in cancer metastasis.

RhoA has been implicated in the pathogenesis of allergic bronchial asthma because its upregulation causes Ca²⁺ sensitization of bronchial smooth muscles (BSMs). However, the mechanisms and the transcription factors that mediate this RhoA upregulation were poorly understood. Goto et al. showed that RhoA gene expression and the activity of the RhoA promoter were induced by treatment of BSMs with the pro-inflammatory cytokines Tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin 13 (IL-13) [38]. A promoter deletion analysis showed that the proximal RhoA promoter between nucleotide position -112 and the transcription start site contains binding sites for the transcription factors signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) at position - 78/- 70 bp and nuclear factor kappa B (NF- κ B) at position - 84/- 74 bp. Mutations in these sites abolished the upregulation of the RhoA promoter by the two cytokines suggesting a critical role of the two pro-inflammatory transcription factors in RhoA gene regulation during asthma. Similar results were found by Chiba et al. who showed that the rat RhoA gene promoter contains an STAT6-binding region and that RhoA expression may be regulated by the IL-13–JAK1–STAT6 signaling pathway in BSMs of asthmatic rats (Fig. 1a) [39].

It was reported previously that cells that were resistant to the chemotherapeutic drug cisplatin had decreased levels of RhoA, disorganized cytoskeleton, and as a consequence, displayed with reduced uptake of drugs from cell-surface transporters [40]. However, the mechanism that could account for RhoA gene downregulation in cisplatin-resistant cells remained unknown. In a follow-up study, the same group showed that the transcription factor GCF2 (GC-binding factor 2) is a transcriptional repressor of the RhoA gene [41]. Specifically, they showed that overexpression of GCF2 abolished RhoA expression and disrupted the actin–filamin network; and as a result, membrane transporter MRP1 was

translocated from the cell membrane to the cytoplasm rendering cells resistant to cisplatin. In contrast, siRNA-mediated silencing of GCF2 restored RhoA expression and actin microfilament organization [41].

Nitric oxide (NO) plays an important role in vessel wall homeostasis via many functions including the transcriptional activation of target gene in endothelial or smooth muscle cells [42]. Sauzeau et al. [43] showed that in arterial smooth muscle cells, RhoA mRNA and protein levels were increased by treatment with agents that serve as precursors for NO (sodium nitroprusside) or raise the intracellular cGMP [8-(2-chlorophenylthio)-cGMP] and this upregulation was inhibited by the cGMP-dependent protein kinase (PKG) inhibitor (Rp)-8-bromo-phenyl-1,N2-ethenoguanosine 3:5-phosphorothioate. Promoter analysis revealed that the NO/PKG pathway triggered the phosphorylation of activating transcription factor 1 (ATF-1) and its binding to a cAMP-response element present on the RhoA promoter (Fig. 1a). In agreement with these findings, they showed that chronic inhibition of NO synthesis decreased RhoA mRNA and protein expression in the aorta and the pulmonary artery of rats and this was associated with inhibition of RhoA-mediated Ca²⁺ sensitization. These data suggested a critical role of a NO/PKG/ATF-1/RhoA signaling pathway in vascular smooth muscle cells [43].

Transcriptional regulation of the RhoB gene

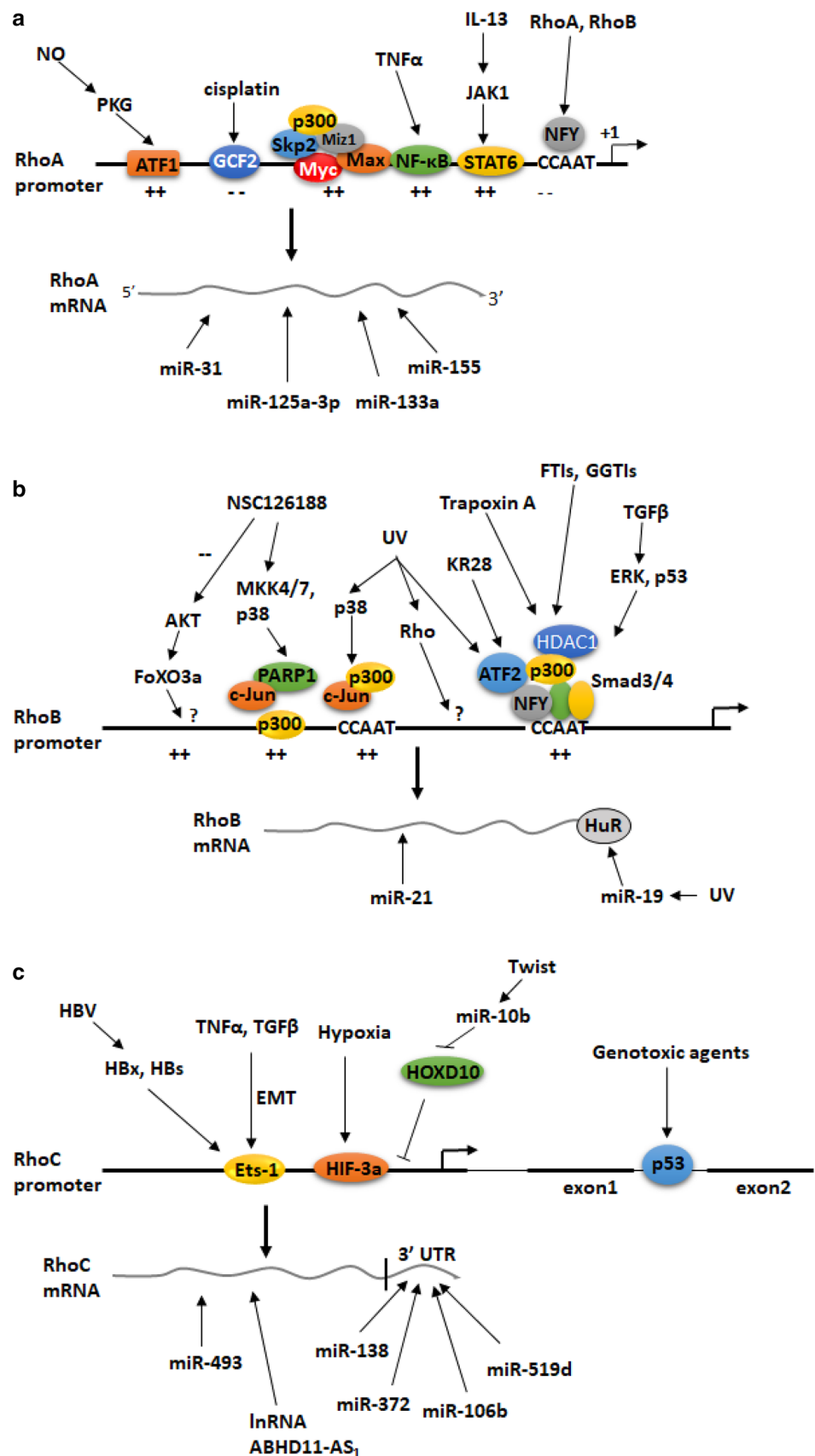
RhoA and RhoC proteins are often upregulated in human tumors and their expression correlates with tumor aggressiveness whereas the levels and functions of RhoB in human cancers are context-dependent. Although expression of RhoB inversely correlates with disease progression in several epithelial cancers, recent data suggest that RhoB may support malignant phenotypes in certain cancer types including T-acute lymphoblastic leukemia [44], lung adenocarcinoma [45], and glioblastoma [46, 47].

It has been proposed that RhoB can work as a tumor suppressor as it is activated in response to several stress stimuli including DNA damage or hypoxia; and it has been reported to inhibit tumor growth, cell migration, and invasion, and have proapoptotic functions in cells [48, 49]. In addition, we have shown previously that RhoB, similar to RhoA, is a major membrane androgen receptor effector regulating actin cytoskeleton and apoptosis in various tumor cells [50–53].

RhoB expression is further regulated by extracellular stimuli such as UV irradiation [54–56], growth factors (epidermal growth factor and platelet-derived growth factor in Rat-2 fibroblasts) [57], cytokines, and oncogenes [54–58].

The two CCAAT boxes (proximal and distal) that are present in the RhoB promoter mediate RhoB gene regulation

Fig. 1 Summary of the mechanisms that control the expression of the small GTPases RhoA (a), RhoB (b) and RhoC (c) genes at the transcriptional and the post-transcriptional level. Symbols + and – indicate positive and negative effects on gene expression, respectively



by genotoxic stress (Fig. 1b). It was shown that NFY that binds to the proximal CCAAT box of the RhoB promoter mediates RhoB gene induction by the binding of activating transcription factor 2 (ATF-2) and inhibition of histone deacetylase 1 (HDAC1) [49, 56]. More recently, it was shown that the p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulates the recruitment of the proto-oncogene c-Jun and the histone acetyltransferase p300 to the more distal CCAAT box of the RhoB promoter leading to upregulation of RhoB gene expression and induction of apoptosis of UV-irradiated human T lymphocyte (Jurkat) cells [59].

The p38 MAPK/ATF-2 complex is also responsible for the upregulation of the RhoB gene by the piperazine alkyl anticancer compound KR28 in human prostate carcinoma PC-3 cells and this upregulation was shown to require p300 and the CCAAT box of the RhoB promoter (Fig. 1b) [60]. HDAC1 is also involved in the upregulation of the RhoB gene by farnesyltransferase inhibitors (FTIs) and geranylgeranyltransferase I inhibitors (GGTIs). Specifically, treatment of cancer cells with FTIs and GGTIs resulted in HDAC1 dissociation, HAT association, and histone acetylation of the RhoB promoter, which led to increased RhoB expression [61].

Several studies focused on the mechanism by which the piperazine alkyl derivative NSC126188 induces apoptosis in several cancer cell types (Fig. 1b). In one study, it was shown that in stomach carcinoma NUGC-3 cells, NSC126188 induced the activity of the RhoB promoter by increasing the expression of p300 and c-Jun in a poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)-dependent manner [62]. The signaling pathway that was activated by this drug involved the MAP kinases MKK4/7 and p38 and the transcription factor c-Jun [63]. In another study, it was found that NSC126188 induced apoptosis in prostate cancer PC-3 cells by interfering with membrane recruitment of AKT, resulting in dephosphorylation of AKT and of the forkhead box transcription factor FoxO3a, which increased the transcription of the RhoB gene [64]. NSC126188 also induced apoptosis of the cervical carcinoma HeLa cells by inducing the transcriptional activation of RhoB [65].

Pharmaceutical agents including the alkylating agent *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU), the cytostatic drug cisplatin, hydroxyurea, and dexamethasone elicited RhoB gene induction in NIH3T3 cells [55]. Gallic acid was shown to inhibit gastric cancer cell metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB through suppressing the PI3K/AKT pathway [66]. Aloe emodin (AE), a natural anthraquinone compound, was reported to have antiproliferative activity in various cancer cell lines. AE suppressed the phorbol-12-myristyl-13-acetate (PMA)-induced migration and invasion of tumor cells and downregulated RhoB gene expression indicating the involvement of RhoB in the anti-migratory property of AE in colon cancer cells [67].

RhoB transcription is also negatively regulated by oncogenes including H-Ras N-Ras, K-Ras, EGFR, and ErbB2 in NIH 3T3 cells and human cancer cell lines derived from lung, pancreatic, and cervical tumors [58, 68].

The transcription of the RhoB gene is regulated in a tissue- and age-specific manner. Yoon et al. [69] measured the RhoB mRNA levels in 4-week-old mice and observed high transcriptional levels in liver, skeletal muscle, kidney, and lung with the highest levels of expression in the brain. Furthermore, the RhoB mRNA levels gradually decreased with age in lung and skeletal muscles but not in the other tissues. These changes in RhoB expression were not due to alterations in DNA methylation but rather due to the differential binding of HDAC1 to the CCAAT boxes of RhoB promoter. Specifically, histone H3 and histone H4 acetylation levels of the RhoB CCAAT boxes decreased; histone H3 lysine 9 trimethylation levels and recruitment of HP1b (heterochromatin protein 1b) increased, whereas histone H3 lysine 4 demethylation levels gradually decreased with aging [69]. It was concluded that the chromatin structure of the RhoB promoter gradually changes during aging in a tissue-specific manner [69].

Transcriptional regulation of the RhoC gene

Similar to RhoA, RhoC was found to be upregulated in many types of tumors and it was proposed that inhibition of RhoC could be a promising antitumor strategy [70–72]. RhoC is an essential factor for invasion and metastasis [73]. Overexpression of RhoC in breast cancer cells indicates poor prognosis. In a very recent study Xu et al. investigated the possible anticancer potential of small-interfering RNA (siRNA) targeting RhoC in breast cancer cells [74]. The authors showed that the RhoC-specific siRNA inhibited cancer cell proliferation and invasion, increased cell apoptosis, and induced cell-cycle arrest. Furthermore, intra-tumoral injection of the RhoC siRNA inhibited tumor growth and increased survival rate in BALB/c-nu mice [74].

At the transcriptional level, there are very few studies addressing the mechanisms that control the regulation of the expression of the RhoC gene. In one study, it was shown that the RhoC gene is induced by various genotoxic agents in cancer cell lines and that activated p53 binds to a consensus p53-binding element present in the second intron of the RhoC gene (Fig. 1c) [75]. Thus, RhoC is a direct p53 target gene that is induced during genotoxic stress to mediate the pro-survival functions of p53.

RhoC is also involved in epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). It was shown that the levels of RhoC expression and activity are induced during EMT in colon cancer cells and that its expression can be regulated by the Ets-1

transcription factor which binds to multiple sites on the RhoC promoter (Fig. 1c) [76].

The expression of RhoC is significantly increased in hepatocellular carcinoma (HCC). Hepatitis B virus (HBV) was shown to upregulate RhoC expression through enhancing the activity of its promoter [77]. It was subsequently shown that the HBV proteins, HBx and HBs, induced the expression levels of Ets-1 which activated the RhoC promoter (Fig. 1c) [78]. These findings provide a novel insight into HBV-induced HCC metastasis.

In a very recent study, Luo et al. [79] found that the mRNA levels of RhoC are increased in Jurkat acute lymphoblastic leukemia cells by stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling which is important for the maintenance and progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia. In addition to inducing RhoC expression, SDF-1 activated RhoC signaling towards reactive oxygen species (ROS) production and the subsequent cytoskeleton redistribution and assembly which are important for cell migration [79].

Hypoxia and hypoxia-inducible factors (HIF) play critical roles in pancreatic cancer metastasis. In a recent study, Zhou et al. [80] investigated the mechanism by which HIF-3a controls invasion and metastasis in pancreatic cells. They found that HIF-3a overexpression increased RhoC mRNA levels and promoted tumor cell invasion in transwell and wound healing assays which was compromised by siRNAs targeting RhoC. Using chromatin immunoprecipitation and luciferase reporter assays, they found that endogenous HIF-3a binds to various regions on the promoter of the RhoC gene under hypoxic but not under normoxic conditions (Fig. 1c). It was proposed that targeting the HIF-3a/RhoC signaling pathway may be a novel therapeutic approach for the treatment of pancreatic cancer invasion and metastasis [80].

Phagocytosis via phagosome formation of macrophages plays an essential role in the host defense mechanism and in tissue remodeling. Very recently, using live-cell imaging combined with RNAi-based knockdown and CRISPR/Cas-mediated knockout (KO), Egami et al. [81] showed that RhoC is implicated in the regulation of phagosome formation in macrophages by modifying actin cytoskeletal remodeling via mDial.

Regulation of Rho genes by the transforming growth factor β (TGF β) and TGF β /Rho signaling cross talks

In a previous study, we showed that the transforming growth factor β (TGF β) upregulates RhoB transcription via activation of cytoplasmic Smad3/4 and MEK/ERK pathways in human HaCaT keratinocytes [21]. Activation of the MEK/ERK pathway by TGF β as well as functional p53 was required for the binding of Smad3 to a non-classical

binding site in the proximal RhoB promoter which overlaps a CCAAT box that constitutively binds nuclear factor Y (Fig. 1b) [21]. Importantly, we showed that TGF β /Smad signaling had no effect on the RhoA gene despite the fact that both RhoA and RhoB are critical for the rapid non-genomic cell responses to TGF β toward actin cytoskeleton reorganization [21].

In a follow-up study, we showed that short-term TGF β treatment of HaCaT keratinocytes induced the RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor Net1 isoform2 (Net1A) [18] and this induction was essential for the activation of RhoA GTPase activity by TGF β . The signaling pathways that were found to facilitate Net1A upregulation by TGF β were the Smads and the MAPK/ERK kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. Furthermore, we showed that miR-24 was a post-transcriptional regulator of Net1A expression. miR-24 was found to be implicated in the regulation of the EMT program in response to TGF β and was shown to be directly involved in the TGF β -induced breast cancer cell invasiveness through Net1A regulation. It was concluded that Net1 isoform 2 plays a critical role in the short- and long-term TGF β -mediated regulation of EMT [18].

Recent work has extended our understanding of how TGF β /Rho signaling operates in multiple cell models. In one study, the role of Rho/Rock in TGF β 1-induced lung fibroblasts differentiation was examined [82]. They showed that Rho/Rock and TGF β /Smad inhibitors suppressed TGF β 1-induced lung fibroblast differentiation. RhoA, RhoC, ROCK1, Smad2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 were upregulated by TGF β 1 stimulation. The Rho/Rock inhibitor downregulated Smad2 expression and the TGF β /Smad inhibitor downregulated RhoA, RhoC, and ROCK1 expression. Therefore, the Rho/Rock pathway and Smad signaling were involved in the process of lung fibroblasts transformation, induced by TGF β 1 to myofibroblasts [82].

In another study, the role of small GTPases Rac1 and RhoA in the NADPH oxidase 4 (Nox4)-dependent generation of ROS during TGF β 1-induced kidney myofibroblast activation was investigated [83]. It was shown that TGF β induced the expression and the activity of Nox4 as well as the expression of α -smooth muscle actin (SMA) and the fibronectin variant Fn-EIIIA in kidney myofibroblasts in an RhoA-dependent manner. Downregulation of RhoA using siRNAs or inhibition of ROCK compromised the effect of TGF β 1 on the expression of the above genes, whereas inhibition of Nox4 inhibited TGF β 1-induced α -SMA and Fn-EIIIA expression, indicating that RhoA is upstream of ROS generation. RhoA/ROCK also regulated polymerase (DNA-directed) δ -interacting protein 2 (Poldip2), a newly discovered Nox4 enhancer protein, suggesting that induction of redox signaling in kidney myofibroblast activation is mediated by RhoA/ROCK upstream of Poldip2-dependent

Nox4 oxidase. The findings may have broad implications in the pathophysiology of renal fibrosis [83].

Very recently, the involvement of Nox4 in epithelial-to-amoeboid transition in the highly metastatic hepatocellular carcinoma was investigated [84]. Crosas-Molist et al. showed that Nox4 gene deletions are frequently found in HCC patients correlating with higher tumor grade. They found an inverse association between Nox4 expression and the levels of RhoC and Cdc42 in HCC, and the low Nox4/high RhoC phenotype was associated with worse cancer prognosis. Importantly, overexpression of Nox4 caused a downregulation in RhoC and Cdc42, it maintained parenchymal structures, increased cell–substrate adhesion and suppressed actomyosin contractility. [84].

Bravo-Nuevo et al. [85] examined the potential involvement of RhoB in thymocyte development using RhoB-deficient mice. The showed that mice lacking RhoB were characterized by thymic atrophy, i.e. small thymus weight and cellularity, beginning as early as 5 weeks of age. These mice also had enhanced expression of TGF β receptor type II (TGF β RII) in thymic medullary epithelium as well as enhanced fibronectin. These data support a role of RhoB in the regulation of thymus development through inhibition of TGF β signaling in thymic medullary epithelium [85].

Epithelial–mesenchymal transition (EMT) is one of the critical steps in cancer metastasis and is regulated by multiple factors including TGF β and the small Rho GTPases [16, 86]. The molecular mechanisms that control this cellular transformation are not yet clear. Toward this goal, Meneses et al. [87] showed that silencing of MDA-9/syntenin (SDCBP) in mesenchymal metastatic breast cancer cells triggered a transition to a more epithelial-like morphology which was confirmed by changes in EMT markers. In contrast, overexpression of MDA-9 in epithelial cells induced EMT, cytoskeleton reorganization and invasion. Importantly, they found that MDA-9 upregulated both RhoA and Cdc42 via TGF β 1, and they showed that MDA-9 binds to TGF β 1 via its PDZ1 domain. Finally, they showed that silencing the expression of MDA-9 resulted in decreased lung metastasis. These findings support the importance of MDA-9 in EMT in breast cancer and suggest that MDA-9 could be explored as a potential therapeutic target against metastatic diseases [87].

Mechanisms of autoregulation of RhoA and RhoB genes

In a recent study, we showed that the activity of the RhoA and RhoB promoters is subject to autoregulation [88]. Specifically, we showed that overexpression of RhoA inhibits the activity of the RhoB and RhoA promoters and that the CCAAT box of the RhoB promoter is essential for this autoregulation (Fig. 1a). We also showed that the pan-Rho

inhibitor C3 increased the mRNA levels of the RhoB gene in a time-dependent manner but not of the RhoA gene. These data could also explain, at least in part, the low levels of expression of RhoB gene in cells that express high levels of RhoA such as the stem cell lines CGR8 and P-19 [88]. Similar type of Rho autoregulation has been observed in mouse fibroblasts [54], in adenocarcinoma cells [89] as well as in PC3 prostate cancer cells and MDA-MB-231 breast cancer cells [90].

Post-transcriptional regulation of RhoA, RhoB, and RhoC genes by miRNAs

MicroRNAs (miRNAs) function as modulators of gene expression at the post-transcriptional level and play a wide range of physiological and pathological roles [91, 92]. They are small non-coding RNA molecules that bind to complementary mRNAs expressed from target genes and inhibit their translation by the ribosomes or enhance their degradation. Several microRNAs were shown to regulate the expression of small Rho GTPases including RhoA, RhoB, and RhoC, and to affect the functions of different cell types. These miRNAs are discussed below.

MiR-31 was identified as one of the highly upregulated miRNAs during osteoclast development and controls cytoskeleton organization in osteoclasts for optimal bone resorption activity by targeting RhoA [93]. miR-125a-3p functions as a tumor suppressor that inhibits the migration and invasion of lung cancer cells [94]. miR-125a-3p decreased the RhoA protein levels, while the levels of RhoA mRNA remain unchanged. Negative regulation of RhoA protein expression has also been demonstrated by miR-133a in cardiomyocytes [95] and human bronchial smooth muscle cells [96]. The microRNA miR-151 suppresses expression of RhoGDI A, resulting in increased basal activation of RhoA, Rac1, and Cdc42 [97] in hepatocellular carcinoma, while RhoA protein expression is negatively regulated by miR-155 in breast cancer cells [98] (Fig. 1a).

Sabatel et al. [99] showed that miR-21 acts as a negative modulator of angiogenesis. miR-21 overexpression reduced endothelial cell proliferation, migration, and the organization of actin into stress fibers. They showed that RhoB gene expression and activity is decreased in miR-21 overexpressing cells and that RhoB silencing impaired endothelial cell migration and tubulogenesis, thus providing a possible mechanism for miR-21-mediated inhibition of angiogenesis [99]. In another study, Connolly et al. [100] showed miR-21 targets the 3' untranslated region of the RhoB gene and that loss of miR-21 is associated with an elevation of RhoB in hepatocellular carcinoma cell lines Huh-7 and HepG2 and in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. Using in vitro models of distinct stages of metastasis, they

showed that loss of miR-21 also causes a reduction in migration, invasion, and cell elongation which could be mimicked by overexpression of RhoB [100]. Finally, Liu et al. [101] showed that the expression of miR-21 in HEK293 and several colorectal cancer cells was inversely correlated with the levels of RhoB expression. miR-21 overexpression mimicked the effect of RhoB knockdown in promoting proliferation and invasion and inhibiting apoptosis (Fig. 1b).

Glorian et al. [102] showed that miR-19 regulates the expression of RhoB in keratinocytes upon exposure to UV radiation. miR-19-mediated regulation requires the binding of human antigen R (HuR), an AU-rich element binding protein, to the 3'-untranslated region of the RhoB mRNA. It was suggested that downregulation of RhoB by miR-19 potentiates UV-induced apoptosis (Fig. 1b) [102].

Two papers demonstrated the role of miR-138 in cancer migration and metastasis via RhoC downregulation. In one paper, Jiang et al. [103] showed that miR-138 suppressed migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma (TSCC) cells by directly targeting the 3' untranslated region of RhoC mRNA. Reduced expression of RhoC was associated with morphological changes including reorganization of the stress fibers to a round bleb-like shape as well as the suppression of cell migration and invasion whereas knockdown of miR-138 in TSCC cells enhanced the expression of RhoC and accelerated cell migration and invasion. In the second study, Islam et al. [104] showed similar roles of miR-138 and RhoC in head and neck squamous cell carcinoma (HNCCC) cells. They also showed that inhibition of RhoC by miR-138 caused the downregulation of FAK, Src and Erk1/2 signaling molecules (Fig. 1c).

Liu et al. [105] examined the role of miR-372 in the pathogenesis of endometrial adenocarcinoma (EC). They showed that miR-372 levels are lower in EC than normal endometrial specimens and that miR-372 overexpression reduced the expression of RhoC via its 3' untranslated region and suppressed cell proliferation, migration, and invasion suggesting that miR-372 could be a novel therapeutic target in EC (Fig. 1c).

Another miR that regulates RhoC gene in various cancer cells is miR-10b. Recent studies showed that miR-10b was highly expressed in metastatic breast cancer cells and enhanced cell migration and invasion via a mechanism that involves activation of miR-10b expression by the transcription factor Twist and the subsequent repression of the translation of the messenger RNA encoding homeobox D10 (HOXD10) which is an inhibitor of RhoC [106] resulting in increased expression of RhoC [107, 108]. RhoC regulation by miR-10b via HOXD10 was reported in the case of colorectal cancer cells [109] and in malignant glioma cells [110].

The role of RhoC in the pathogenesis of ovarian cancer was studied by Wu et al. [111]. They found that the levels of RhoC in ovarian cancer cells were increased by the

overexpression of the long-coding RNA ABHD11-AS₁ and the two molecules were co-immunoprecipitated suggesting a direct interaction. They also showed that silencing of RhoC compromises the cancer-promoting effects of ABHD11-AS₁. The findings suggested a potential role of this long-coding RNA in anticancer therapies. In the same cancer type (ovarian cancer) Sang et al. [112] showed that miR-519d binds directly to the 3' UTR of the RhoC mRNA and inhibits its expression suggesting that the RhoC mRNA is a direct target of miR-519d. A negative correlation between the levels of miR519d and RhoC was also found *in vivo* using the nude mouse xenograft model [112] (Fig. 1c).

Zhou et al. [113] showed that levels of miR-493 were strongly downregulated in gastric cancer and were associated with clinical stage and the presence of lymph node metastases. They found that upregulation of miR-493 inhibited the proliferation and metastasis of gastric cancer cells, *in vitro* and *in vivo* and that miR-493 directly targeted RhoC, which resulted in a marked reduction of the expression of mRNA and protein. This effect, in turn, led to a decreased ability of growth, invasion and metastasis in gastric cancer cells (Fig. 1c).

Yau et al. [114] established an orthotopic hepatocellular carcinoma (HCC) metastasis animal model to identify miRNAs that could be associated with the development of metastasis *in vivo*. They found 15 miRNAs, including miR-106b, which were differentially expressed in 2 metastatic cell lines compared with the primary tumor cell lines. They showed that miR-106b enhanced cell migration and stress fiber formation by inducing the expression of the small GTPases RhoA and RhoC and these effects were associated with activation of epithelial–mesenchymal transition (EMT). A role of miR-106b in RhoC regulation was also found in epithelial ovarian cancer (Fig. 1c) [115]. Table 1 summarizes the transcriptional and post-transcriptional Rho modulators the mechanisms involved, the associated diseases and the relevant cell types in which these mechanisms were studied.

Conclusions

In conclusion, investigation of the mechanisms that control the expression of RhoA and RhoB small GTPases in various cell types and conditions during the past decade revealed the existence of a core group of transcription factors and coactivators that are involved in different cellular responses such as genotoxic stress, cytokines, and drugs. These factors are the nuclear factor Y, the leucine bZip proteins c-Jun and ATF2, and the coactivators p300 and HDACs. Formation of protein complexes on specific regulatory elements of the RhoA and RhoB promoters, including the CCAAT boxes, appears to coordinate the regulation of their activity and to increase (in the majority of the cases) the mRNA levels of

Table 1 Modulators and mechanisms of transcriptional and post-transcriptional regulation of the RhoA, RhoB and RhoC genes

Gene	Modulator	Mechanism	Associated disease	Cell type	Refs.
RhoA	Skp2	Activation of RhoA gene expression by the Myc-Skp2-Miz1 complex in metastatic human cancers is correlated with RhoA expression	Cancer metastasis	293T, Rat1, MDA-MB-231	[36]
RhoA	TNF α , IL-13	Binding of STAT6 and NF- κ B to the proximal RhoA promoter	Bronchial asthma	Bronchial smooth muscle cells	[38, 39]
RhoA	Cisplatin	Inhibition of RhoA gene transcription by the repressor GCF2	Resistance to anticancer drugs	Human cisplatin-resistant cancer cell lines	[41]
RhoA	NO	Phosphorylation of ATF-1 by PKG and ATF-1 binding to the RhoA promoter	Cardiovascular diseases	Arterial smooth muscle cells, Swiss 3T3 fibroblasts	[43]
RhoA	miR-31	Decreases RhoA	Cytoskeleton organization	Osteoclasts	[93]
RhoA	miR-125a-3p	Decreases RhoA	Cancer	Lung cancer cells	[94]
RhoA	miR-133a	Decreases RhoA	Cardiovascular disease	Cardiomyocytes, hBSM cells	[95]
RhoA	miR-151	Suppresses Rho GDI, increases RhoA, Rac, cdc42	Cancer	Hepatocellular carcinoma	[97]
RhoA	miR-155	Decreases RhoA	Cancer	Breast cancer cells	[98]
RhoB	Histone deacetylase inhibitors	Repression of HDAC1 activity via a CCAAT box element	Cancer	Human nonsmall lung carcinoma cell line	[49]
RhoB	UV	Formation of NFY/ATF-2 complexes on the CCAAT box of the RhoB promoter	Genotoxic stress	NIH3T3 cells, Jurkat cells	[56]
RhoB	FTIs, GGTIs	HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter lead to RhoB upregulation	Cancer	Various human cancer cell lines	[61]
RhoB	UV	p38 MAPK upregulation of RhoB (c-Jun and p300 recruitment)	Cancer	Jurkat cells/prostate cancer PC-3 cells	[59]
RhoB	KR28	p38/ATF2/p300 complex formation on the CCAAT box	Cancer	Human prostate cancer PC-3 cells	[60]
RhoB	TGF β	TGF β 1 upregulates RhoB transcription via Smad3/4 (p53-dependent) and MEK/ERK	Cancer	HaCaT	[21]
RhoB	Rho GTPases and effectors	Induction/inhibition of RhoB promoter activity, autoregulation	Genotoxic stress	Fibroblasts	[54]
RhoB	Ras, EGFR, ErbB2	Suppression of RhoB	Cancer	NIH 3T3 cells/lung, pancreatic and cervical cancer cell lines	[58, 68]
RhoB	NSC126188	RhoB induction via p300, c-Jun, JNK, MKK4/7, AKT dephosphorylation and FoxO3a activation	Cancer	Stomach carcinoma NUGC-3 cells/prostate cancer PC-3 cells/HeLa	[62–65]
RhoB	TSA	RhoB gene induction	Cancer	Ovarian cancer	[116]
RhoB	MNU, cisplatin, hydroxyurea, dexamethasone	RhoB gene induction	Cancer	NIH3T3 cells	[55]

Table 1 (continued)

Gene	Modulator	Mechanism	Associated disease	Cell type	Refs.
RhoB	Gallic acid	RhoB gene induction through PI3 K/AKT suppression	Metastasis	Gastric cancer cells	[66]
RhoB	Aloe emodin	Downregulation of RhoB, suppression of PMA	Cancer	Cancer cell lines	[67]
RhoB	miR-21	RhoB suppression	Angiogenesis, cancer	Endothelial cells, hepatic, breast, colorectal cancer cells	[99–101]
RhoB	miR-19	RhoB suppression	Genotoxic stress	Keratinocytes	[102]
RhoC	Genotoxic stress	Binding of p53 to the 2nd intron of the RhoC gene	Cancer	Cancer cell lines	[75]
RhoC	EMT induced by TGF β and TNF α	Binding of Ets-1 to various sites on the RhoC promoter	Cancer	LJM 1863 colon cancer cell line	[76]
RhoC	Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)	Induction of RhoC	T-cell acute lymphoblastic leukemia	Jurkat cells	[79]
RhoC	Hypoxia	Binding of HIF-3 α to the RhoC promoter	Pancreatic cancer	Pancreatic cancer cell lines	[80]
RhoC	Hepatitis B virus	Binding of Ets-1 to the RhoC promoter	Hepatocellular carcinoma	HepG2 cells	[77, 78]
RhoC	miR-138	RhoC suppression	Tongue squamous cell carcinoma (TSCC) and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)	TSCC and HNSCC cell lines	[103, 104]
RhoC	miR-372	RhoC suppression	Endometrial adenocarcinoma (EC)	EC cells	[105]
RhoC	miR-10b	RhoC induction via suppression of homeobox D10 (HOXD10)	Breast cancer, colorectal cancer, malignant glioma	Breast cancer cell lines, colorectal cancer cell lines, glioblastoma cell lines	[107–110]
RhoC	lncRNA ABHD11-AS ₁	RhoC upregulation	Ovarian cancer	Ovarian carcinoma cell lines	[111]
RhoC	miR-519d	RhoC suppression	Ovarian cancer	Ovarian carcinoma cell lines	[112]
RhoC	miR-493	RhoC suppression	Gastric cancer	Gastric cancer cell lines	[113]
RhoC	miR-106b	RhoC upregulation	Hepatocellular carcinoma, ovarian cancer	HCC cell lines, ovarian cancer cell lines	[114, 115]

the two genes. Dysregulation of RhoA, RhoB and RhoC gene expression or inhibition of their expression by a variety of microRNAs can be causal to pathological conditions such as cancer and asthma. Positive or negative cross talks between Rho GTPases and TGF β have been shown to regulate cell responses to TGF β such as EMT, migration, myofibroblast activation and thymus development. Understanding in depth the mechanisms that fine tune the expression of Rho GTPases and their cross talks with other signaling pathways combined with the critical roles that these proteins play in disease pathogenesis will lead to the development of novel, optimized therapies for the treatment of devastating disease such as cancer, asthma or fibrosis.

Acknowledgements This work was supported by a Grant from the Hellenic Ministry for Education, Research and Religious Affairs (THALIS MIS 380334) to DK and CS. EN and ML were supported by a doctoral fellowship from IKY-Siemens Research Grants.

References

- Bishop AL, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348(Pt 2):241–255
- Vega FM, Ridley AJ (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582:2093–2101
- Hall A, Nobes CD (2000) Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355:965–970
- Haga RB, Ridley AJ (2016) Rho GTPases: regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* 7:207–221
- Hodge RG, Ridley AJ (2016) Regulating Rho GTPases and their regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17:496–510
- Lawson CD, Ridley AJ (2018) Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *J Cell Biol* 217: 447–457
- Schaefer A, Reinhard NR, Hordijk PL (2014) Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation. *Small GTPases* 5:6
- Arthur WT, Ellerbroek SM, Der CJ, Burridge K, Wennerberg K (2002) XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J Biol Chem* 277:42964–42972
- Sloan CM, Quinn CV, Peters JP, Farley J, Goetzinger C, Wernli M, DeMali KA, Ellerbroek SM (2012) Divergence of Rho residue 43 impacts GEF activity. *Small GTPases* 3:15–22
- Hamel B, Monaghan-Benson E, Rojas RJ, Temple BR, Marston DJ, Burridge K, Sondek J (2011) SmgGDS is a guanine nucleotide exchange factor that specifically activates RhoA and RhoC. *J Biol Chem* 286:12141–12148
- Ridley AJ, Self AJ, Kasmi F, Paterson HF, Hall A, Marshall CJ, Ellis C (1993) rho family GTPase activating proteins p190, ber and rhoGAP show distinct specificities in vitro and in vivo. *EMBO J* 12:5151–5160
- Lazarini M et al (2013) ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1832:365–374
- Cannizzaro LA, Madaule P, Hecht F, Axel R, Croce CM, Huebner K (1990) Chromosome localization of human ARH genes, a ras-related gene family. *Genomics* 6:197–203
- Karnoub AE, Symons M, Campbell SL, Der CJ (2004) Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat* 84:61–71
- Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118:843–846
- Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A, Stournaras C (2009) Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J* 276:2947–2965
- Papadimitriou E, Kardassis D, Moustakas A, Stournaras C (2011) TGFbeta-induced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3-independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* 28:229–238
- Papadimitriou E, Vasilaki E, Vorvis C, Iliopoulos D, Moustakas A, Kardassis D, Stournaras C (2012) Differential regulation of the two RhoA-specific GEF isoforms Net1/Net1A by TGF-beta and miR-24: role in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* 31:2862–2875
- Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C (2005) LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 280:11448–11457
- Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C (2008) A novel mechanism of TGFbeta-induced actin reorganization mediated by Smad proteins and Rho GTPases. *FEBS J* 275:4074–4087
- Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D (2010) Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF β -induced signaling pathways. *FASEB J* 24:891–905
- Jansen S, Gosens R, Wieland T, Schmidt M (2018) Paving the Rho in cancer metastasis: Rho GTPases and beyond. *Pharmacol Ther* 183:1–21
- Wang K et al (2014) Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* 46:573–582
- Kakiuchi M et al (2014) Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet* 46:583–587
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014) Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513:202–209
- Richter J et al (2012) Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44:1316–1320
- Yoo HY et al (2014) A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 46:371–375
- Bellizzi A et al (2008) RhoA protein expression in primary breast cancers and matched lymphocytes is associated with progression of the disease. *Int J Mol Med* 22:25–31
- Faried A, Faried LS, Usman N, Kato H, Kuwano H (2007) Clinical and prognostic significance of RhoA and RhoC gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 14:3593–3601
- Horiuchi A, Imai T, Wang C, Ohira S, Feng Y, Nikaido T, Konishi I (2003) Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest* 83:861–870
- Lang P, Gesbert F, Delespine-Carmagnat M, Stancou R, Pouchet M, Bertoglio J (1996) Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* 15:510–519
- Chen Y et al (2009) Cullin mediates degradation of RhoA through evolutionarily conserved BTB adaptors to control actin cytoskeleton structure and cell movement. *Mol Cell* 35:841–855
- Alberts AS, Qin H, Carr HS, Frost JA (2005) PAK1 negatively regulates the activity of the Rho exchange factor NET1. *J Biol Chem* 280:12152–12161

34. Callow MG, Zozulya S, Gishizky ML, Jallal B, Smeal T (2005) PAK4 mediates morphological changes through the regulation of GEF-H1. *J Cell Sci* 118:1861–1872
35. Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM (2004) p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* 18:862–876
36. Chan CH et al (2010) Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nat Cell Biol* 12:457–467
37. Adhikary S, Eilers M (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:635–645
38. Goto K, Chiba Y, Matsusue K, Hattori Y, Maitani Y, Sakai H, Kimura S, Misawa M (2010) The proximal STAT6 and NF-kappaB sites are responsible for IL-13- and TNF-alpha-induced RhoA transcriptions in human bronchial smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 61:466–472
39. Chiba Y, Goto K, Matsusue K, Kimura S, Misawa M (2010) Identification and characterization of rat RhoA gene promoter. *J Pharmacol Sci* 112:467–472
40. Shen DW, Su A, Liang XJ, Pai-Panandiker A, Gottesman MM (2004) Reduced expression of small GTPases and hypermethylation of the folate binding protein gene in cisplatin-resistant cells. *Br J Cancer* 91:270–276
41. Shen DW, Pouliot LM, Gillet JP, Ma W, Johnson AC, Hall MD, Gottesman MM (2012) The transcription factor GCF2 is an upstream repressor of the small GTPase RhoA, regulating membrane protein trafficking, sensitivity to doxorubicin, and resistance to cisplatin. *Mol Pharm* 9:1822–1833
42. Somlyo AP, Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522(Pt 2):177–185
43. Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Marionneau C, Loirand G, Pacaud P (2003) RhoA expression is controlled by nitric oxide through cGMP-dependent protein kinase activation. *J Biol Chem* 278:9472–9480
44. Bhavsar PJ, Infante E, Khwaja A, Ridley AJ (2013) Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene* 32:198–208
45. Luis-Ravelo D et al (2014) RHOB influences lung adenocarcinoma metastasis and resistance in a host-sensitive manner. *Mol Oncol* 8:196–206
46. Forget MA, Desrosiers RR, Del M, Moumdjian R, Shedid D, Berthelet F, Beliveau R (2002) The expression of rho proteins decreases with human brain tumor progression: potential tumor markers. *Clin Exp Metastasis* 19:9–15
47. Ma Y, Gong Y, Cheng Z, Loganathan S, Kao C, Sarkaria JN, Abel TW, Wang J (2015) Critical functions of RhoB in support of glioblastoma tumorigenesis. *Neuro Oncol* 17:516–525
48. Huang M, Prendergast GC (2006) RhoB in cancer suppression. *Histol Histopathol* 21:213–218
49. Wang S et al (2003) Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene* 22:6204–6213
50. Papadopoulou N, Charalampopoulos I, Alevizopoulos K, Gravanis A, Stournaras C (2008) Rho/ROCK/actin signaling regulates membrane androgen receptor induced apoptosis in prostate cancer cells. *Exp Cell Res* 314:3162–3174
51. Papadopoulou N, Papakonstanti EA, Kallergi G, Alevizopoulos K, Stournaras C (2009) Membrane androgen receptor activation in prostate and breast tumor cells: molecular signaling and clinical impact. *IUBMB Life* 61:56–61
52. Lang F, Alevizopoulos K, Stournaras C (2013) Targeting membrane androgen receptors in tumors. *Expert Opin Ther Targets* 17:951–963
53. Stournaras C, Gravanis A, Margioris AN, Lang F (2014) The actin cytoskeleton in rapid steroid hormone actions. *Cytoskeleton (Hoboken)* 71:285–293
54. Fritz G, Kaina B (1997) rhoB encoding a UV-inducible Ras-related small GTP-binding protein is regulated by GTPases of the Rho family and independent of JNK, ERK, and p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 272:30637–30644
55. Fritz G, Kaina B, Aktories K (1995) The ras-related small GTP-binding protein RhoB is immediate-early inducible by DNA damaging treatments. *J Biol Chem* 270:25172–25177
56. Fritz G, Kaina B (2001) Transcriptional activation of the small GTPase gene rhoB by genotoxic stress is regulated via a CCAAT element. *Nucleic Acids Res* 29:792–798
57. Jahner D, Hunter T (1991) The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11:3682–3690
58. Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S, Sebt S (2004) Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis. *Mol Cell Biol* 24:5565–5576
59. Ahn J, Choi JH, Won M, Kang CM, Gyun MR, Park HM, Kim CH, Chung KS (2011) The activation of p38 MAPK primarily contributes to UV-induced RhoB expression by recruiting the c-Jun and p300 to the distal CCAAT box of the RhoB promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 409:211–216
60. Chung KS et al (2013) A novel antitumor piperazine alkyl compound causes apoptosis by inducing RhoB expression via ROS-mediated cAbl/p38 MAPK signaling. *Cancer Chemother Pharmacol* 72:1315–1324
61. Delarue FL et al (2007) Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors upregulate RhoB expression by HDAC1 dissociation, HAT association and histone acetylation of the RhoB promoter. *Oncogene* 26:633–640
62. Kim BK et al (2014) p300 cooperates with c-Jun and PARP-1 at the p300 binding site to activate RhoB transcription in NSC126188-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1839:364–373
63. Kim BK et al (2011) Upregulation of RhoB via c-Jun N-terminal kinase signaling induces apoptosis of the human gastric carcinoma NUGC-3 cells treated with NSC12618. *Carcinogenesis* 32:254–261
64. Won KJ et al (2014) NSC126188 induces apoptosis of prostate cancer PC-3 cells through inhibition of Akt membrane translocation, FoxO3a activation, and RhoB transcription. *Apoptosis* 19:179–190
65. Kim BK et al (2011) NSC126188, a piperazine alkyl derivative, induces apoptosis via upregulation of RhoB in HeLa cells. *Invest New Drugs* 29:853–860
66. Ho HH, Chang CS, Ho WC, Liao SY, Lin WL, Wang CJ (2013) Gallic acid inhibits gastric cancer cells metastasis and invasive growth via increased expression of RhoB, downregulation of AKT/small GTPase signals and inhibition of NF-kappaB activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 266:76–85
67. Suboj P, Babykutty S, Gopi DRV, Nair RS, Srinivas P, Gopala S (2012) Aloe emodin inhibits colon cancer cell migration/angiogenesis by downregulating MMP-2/9, RhoB and VEGF via reduced DNA binding activity of NF-kappaB. *Eur J Pharm Sci* 45:581–591
68. Jiang K, Delarue FL, Sebt SM (2004) EGFR, ErbB2 and Ras but not Src suppress RhoB expression while ectopic expression of RhoB antagonizes oncogene-mediated transformation. *Oncogene* 23:1136–1145
69. Yoon YS, Choo JH, Yoo T, Kang K, Chung JH (2007) RhoB is epigenetically regulated in an age- and tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* 362:164–169

70. Mokady D, Meiri D (2015) RhoGTPases—a novel link between cytoskeleton organization and cisplatin resistance. *Drug Resist Updat* 19:22–32
71. Guan X, Chen S, Zhao Y (2018) The role of RhoC in malignant tumor invasion, metastasis and targeted therapy. *Histol Histopathol* 33(3):255–260
72. Ridley AJ (2013) RhoA, RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration. *J Microsc* 251:242–249
73. Lang S, Busch H, Boerries M, Brummer T, Timme S, Lassmann S, Aktories K, Schmidt G (2017) Specific role of RhoC in tumor invasion and metastasis. *Oncotarget* 8:87364–87378
74. Xu XD, Shen HB, Zhu L, Lu JQ, Zhang L, Luo ZY, Wu YQ (2017) Anti-RhoC siRNAs inhibit the proliferation and invasiveness of breast cancer cells via modulating the KAI1, MMP9, and CXCR4 expression. *Onco Targets Ther* 10:1827–1834
75. Croft DR et al (2011) p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res* 21:666–682
76. Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oettgen P, Mercurio AM (2006) Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene* 25:6959–6967
77. Tian Y, Liu Y, Qu J, Li K, Qin D, Huang A, Tang H (2013) HBV regulated RhoC expression in HepG2.2.15 cells by enhancing its promoter activity. *J Basic Microbiol* 53:461–468
78. Qin D, Li K, Qu J, Wang S, Zou C, Sheng Y, Huang A, Tang H (2013) HBx and HBs regulate RhoC expression by upregulating transcription factor Ets-1. *Arch Virol* 158:1773–1781
79. Luo J, Li D, Wei D, Wang X, Wang L, Zeng X (2017) RhoA and RhoC are involved in stromal cell-derived factor-1-induced cell migration by regulating F-actin redistribution and assembly. *Mol Cell Biochem* 436:13–21
80. Zhou X, Guo X, Chen M, Xie C, Jiang J (2018) HIF-3 α promotes metastatic phenotypes in pancreatic cancer by transcriptional regulation of the RhoC-ROCK1 signaling pathway. *Mol Cancer Res* 16:124–134
81. Egami Y, Kawai K, Araki N (2017) RhoC regulates the actin remodeling required for phagosome formation during Fc γ maR-mediated phagocytosis. *J Cell Sci* 130:4168–4179
82. Ji H, Tang H, Lin H, Mao J, Gao L, Liu J, Wu T (2014) Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor-beta/Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomed Rep* 2:787–792
83. Manickam N, Patel M, Griendling KK, Gorin Y, Barnes JL (2014) RhoA/Rho kinase mediates TGF- β 1-induced kidney myofibroblast activation through Poldip2/Nox4-derived reactive oxygen species. *Am J Physiol Renal Physiol* 307:F159–F171
84. Crosas-Molist E, Bertran E, Rodriguez-Hernandez I, Herraiz C, Cantelli G, Fabra A, Sanz-Moreno V, Fabregat I (2017) The NADPH oxidase NOX4 represses epithelial to amoeboid transition and efficient tumour dissemination. *Oncogene* 36:3002–3014
85. Bravo-Nuevo A, O'Donnell R, Rosendahl A, Chung JH, Benjamin LE, Odaka C (2011) RhoB deficiency in thymic medullary epithelium leads to early thymic atrophy. *Int Immunol* 23:593–600
86. Ungefroren H, Witte D, Lehnert H (2018) The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF- β -induced EMT and cell motility in cancer. *Dev Dyn* 247:451–461
87. Menezes ME, Shen XN, Das SK, Emdad L, Sarkar D, Fisher PB (2016) MDA-9/Syntenin (SDCBP) modulates small GTPases RhoA and Cdc42 via transforming growth factor beta1 to enhance epithelial–mesenchymal transition in breast cancer. *Oncotarget* 7:80175–80189
88. Nomikou E, Stournaras C, Kardassis D (2017) Functional analysis of the promoters of the small GTPases RhoA and RhoB in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 491:754–759
89. Ho TT, Merajver SD, Lapiere CM, Nusgens BV, Deroanne CF (2008) RhoA-GDP regulates RhoB protein stability potential involvement of RhoGDI α . *J Biol Chem* 283:21588–21598
90. Vega FM, Fruhwirth G, Ng T, Ridley AJ (2011) RhoA and RhoC have distinct roles in migration and invasion by acting through different targets. *J Cell Biol* 193:655–665
91. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–233
92. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297
93. Mizoguchi F, Murakami Y, Saito T, Miyasaka N, Kohsaka H (2013) miR-31 controls osteoclast formation and bone resorption by targeting RhoA. *Arthritis Res Ther* 15:R102
94. Huang B, Luo W, Sun L, Zhang Q, Jiang L, Chang J, Qiu X, Wang E (2013) MiRNA-125a-3p is a negative regulator of the RhoA-actomyosin pathway in A549 cells. *Int J Oncol* 42:1734–1742
95. Care A et al (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med* 13:613–618
96. Chiba Y, Tanabe M, Goto K, Sakai H, Misawa M (2009) Down-regulation of miR-133a contributes to up-regulation of RhoA in bronchial smooth muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 180:713–719
97. Ding J et al (2010) Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through down-regulating RhoGDI α . *Nat Cell Biol* 12:390–399
98. Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ (2008) MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 28:6773–6784
99. Sabatel C et al (2011) MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. *PLoS One* 6:e16979
100. Connolly EC, Van Doorslaer K, Rogler LE, Rogler CE (2010) Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol Cancer Res* 8:691–700
101. Liu M, Tang Q, Qiu M, Lang N, Li M, Zheng Y, Bi F (2011) miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett* 585:2998–3005
102. Glorian V, Maillot G, Poles S, Iacovoni JS, Favre G, Vagner S (2011) HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 18:1692–1701
103. Jiang L, Liu X, Kolokythas A, Yu J, Wang A, Heidbreder CE, Shi F, Zhou X (2010) Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 127:505–512
104. Islam M, Datta J, Lang JC, Teknos TN (2014) Down regulation of RhoC by microRNA-138 results in de-activation of FAK, Src and Erk1/2 signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 50:448–456
105. Liu BL, Sun KX, Zong ZH, Chen S, Zhao Y (2016) MicroRNA-372 inhibits endometrial carcinoma development by targeting the expression of the Ras homolog gene family member C (RhoC). *Oncotarget* 7:6649–6664
106. Myers C, Charboneau A, Cheung I, Hanks D, Boudreau N (2002) Sustained expression of homeobox D10 inhibits angiogenesis. *Am J Pathol* 161:2099–2109

107. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA (2007) Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 449:682–688
108. Knirsh R, Ben-Dror I, Modai S, Shomron N, Vardimon L (2016) MicroRNA 10b promotes abnormal expression of the proto-oncogene c-Jun in metastatic breast cancer cells. *Oncotarget* 7:59932–59944
109. Wang YF, Li Z, Zhao XH, Zuo XM, Zhang Y, Xiao YH, Li J, Peng ZH (2015) MicroRNA-10b is upregulated and has an invasive role in colorectal cancer through enhanced RhoC expression. *Oncol Rep* 33:1275–1283
110. Sasayama T, Nishihara M, Kondoh T, Hosoda K, Kohmura E (2009) MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int J Cancer* 125:1407–1413
111. Wu DD, Chen X, Sun KX, Wang LL, Chen S, Zhao Y (2017) Role of the lncRNA ABHD11-AS1 in the tumorigenesis and progression of epithelial ovarian cancer through targeted regulation of RhoC. *Mol Cancer* 16:138
112. Sang XB, Zong ZH, Wang LL, Wu DD, Chen S, Liu BL, Zhao Y (2017) E2F-1 targets miR-519d to regulate the expression of the ras homolog gene family member C. *Oncotarget* 8:14777–14793
113. Zhou W, Zhang C, Jiang H, Zhang Z, Xie L, He X (2015) MiR-493 suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer cells by targeting RhoC. *Iran J Basic Med Sci* 18:1027–1033
114. Yau WL et al (2013) Over-expression of miR-106b promotes cell migration and metastasis in hepatocellular carcinoma by activating epithelial–mesenchymal transition process. *PLoS One* 8:e57882
115. Chen S, Chen X, Xiu YL, Sun KX, Zhao Y (2015) Inhibition of ovarian epithelial carcinoma tumorigenesis and progression by microRNA 106b mediated through the RhoC pathway. *PLoS One* 10:e0125714
116. Liu Y, Song N, Ren K, Meng S, Xie Y, Long Q, Chen X, Zhao X (2013) Expression loss and revivification of RhoB gene in ovary carcinoma carcinogenesis and development. *PLoS One* 8:e78417