



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ**

**ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΚΤΙΒΙΝΗ Α ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΧΗΡΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΛΑΡΗΣ**

**ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΑΚΤΙΒΙΝΗ Α ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ
ΚΥΤΤΑΡΑ: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΜΗΧΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΣΥΝΔΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ
ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ**

**ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ ΧΗΡΑ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».



Ημερομηνία αίτησης της κ. Χήρα Παναγιώτας: 23-9-2003

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 512^ο/23-9-2003

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας
Μέλη

Murphy Carol, Ερευνήτρια Β', ΙΒΕ-ΙΤΕ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Πολίτου Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-9-2003

«Μεταγωγή του Σήματος από Ακτιβίνη Α στα Ενδοθηλιακά Κύτταρα: Διερεύνηση των Μηχανισμών και Διασύνδεση με την Ενδοκυτταρική Μεταφορά Μεμβρανών»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 648^ο/18-11-2008

1. Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Γεωργάτος Σπυρίδωνας Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Παπαμαρκάκη Θωμαή Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Πολίτου Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Murphy Carol, Ερευνήτρια Β', ΙΒΕ-ΙΤΕ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
7. Χριστοφορίδης Σάββας Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 30-3-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Γουδέβενος Ιωάννης

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ.Θεόδωρου Φώτη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου παρείχε καθώς και για τις πολύτιμες ιδέες και συμβουλές του κατά την εκπόνηση και τη συγγραφή της διατριβής αυτής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Carol Murphy για το αμείωτο ενδιαφέρον της καθώς και για την μετάδοση των πολύτιμων γνώσεων που μου προσέφερε κατά την διάρκεια αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης, την επίκουρη καθηγήτρια κ. Αναστασία Πολίτου, μέλος της τριμελούς επιτροπής για την αξιολόγηση της πορείας της παρούσης εργασίας, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές της σε θέματα δομικής βιολογίας. Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθηγητές κ. Δημήτριο Γαλάρη και κ. Σπυρίδωνα Γεωργάτο, την αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Θωμαή Παπαμαρκάκη και τον επίκουρο καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη στην κρίση των οποίων υποβάλλεται αυτή η διατριβή, ευχαριστώ θερμά για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους. Ιδιαίτερα τον επίκουρο καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, τον ευχαριστώ θερμά για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τις χρήσιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια των ενδο-εργαστηριακών σεμιναρίων, καθώς και για το ενθαρρυντικό περιβάλλον που δημιουργεί στις μεταξύ μας συζητήσεις.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου Γιώργο Σφλώμο, Αθηνά Κύρκου, Εύη Καραλή, Σοφία Μπέλλου, Λευτέρη Κωσταρά, Κατερίνα Πανοπούλου, Νίκο Πατπά, Μαρία Μαργαρίτη, Λαμπρινή Κύρκου καθώς και το καινούργιο μέλος του εργαστηρίου μας Νικολέτα Κωστοπούλου για τη συνεργασία μας και τις όμορφες στιγμές που περάσαμε κατά τη διάρκεια της κοινής παραμονής μας στο εργαστήριο.

Η διατριβή αυτή είναι αφιερωμένη στους αγαπημένους μου γονείς Σοφία και Περικλή για την αγάπη και την στήριξη που μου προσέφεραν τα χρόνια της εναγωνίας προσπάθειάς μου για την κατάκτηση της γνώσης.



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και την Ακτιβίνη A.....	1
1.1.1 Η υπεροικογένεια του TGFβ.....	1
1.1.2 Δομικά χαρακτηριστικά του TGFβ.....	2
1.1.3 Δομικά χαρακτηριστικά της Ακτιβίνης A.....	3
1.1.4 Οι μεμβρανικοί υποδοχείς της υπεροικογένειας του TGFβ.....	3
1.1.4.1 Βασικά χαρακτηριστικά.....	3
1.1.4.2 Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων στη σηματοδοτική απόκριση.....	5
1.1.5 Τα SMAD-ανεξάρτητα μονοπάτια.....	7
1.1.6 Οι SMAD πρωτεΐνες.....	10
1.1.6.1 Δομικά χαρακτηριστικά των SMAD Διαμεσολαβητών.....	11
1.1.6.2 Φωσφορυλίωση των R-SMAD από την κινάση του υποδοχέα τύπου I.....	12
1.1.6.3 Φωσφορυλίωση των SMADs από άλλες κινάσες.....	15
1.1.6.4 Ολιγομερισμός των SMADs.....	17
1.1.6.5 Είσοδος και έξοδος των SMAD στον πυρήνα του κυττάρου.....	18
1.1.6.6 Πρόσδεση των SMAD πρωτεϊνών στο DNA.....	19
1.1.6.7 Συνεργασία των SMAD με μεταγραφικούς παράγοντες.....	20
1.1.6.8 Αλληλεπίδραση των SMAD με συνενεργοποιητές και αποσιωποητές.....	22
1.1.7 Τροποποίηση και τερματισμός του σήματος.....	26
1.1.8 Μεταγωγή του σήματος από την υπεροικογένεια του TGFβ και ασθένειες του ανθρώπου.....	29
1.1.8.1 TGFβ οικογένεια και αγγειακές διαταραχές.....	33
1.2 Η ARF6 GTPάση.....	35
1.2.1 Η οικογένεια των παραγόντων ADP-Ριβοζυλίωσης (ADP-Ribozylation Factors, ARF).....	35
1.2.2 Παράγοντες ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) των ARF6 GTPασών.....	37
1.2.3 Ενεργοποιητικές της δραστικότητας GTPάσης πρωτεΐνες (GTPase activating proteins, GAPs) της ARF6.....	38
1.2.4 Ο ρόλος της PI3K στη ρύθμιση του κύκλου των ARF.....	41
1.2.5 Λειτουργίες της ARF6.....	42
1.2.5.1 Η ARF6 συμμετέχει στη ρύθμιση της κλαθρίνο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης.....	42

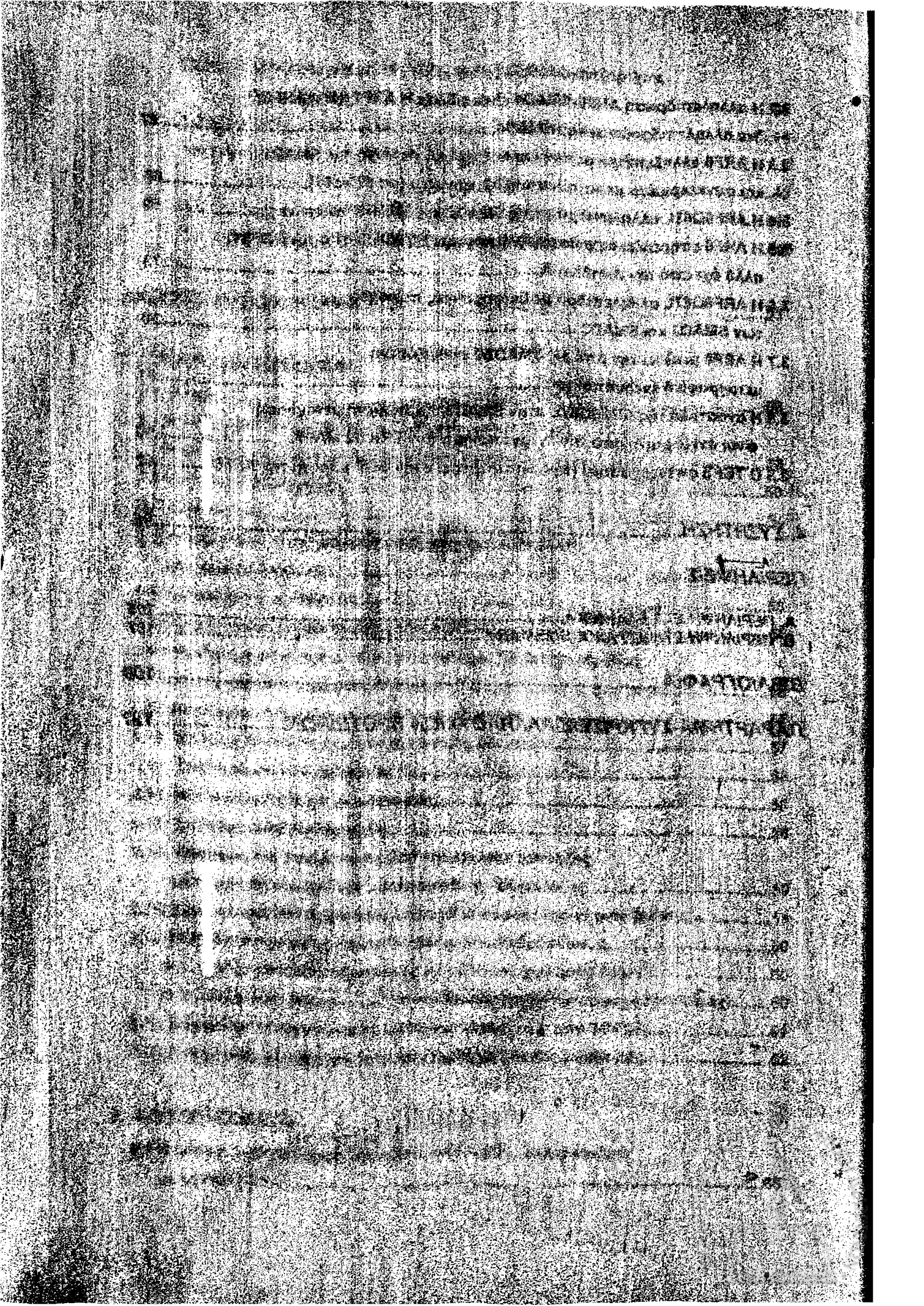


1.2.5.2 Η ARF6 συμμετέχει στη ρύθμιση της κλαθρίνο-ανεξάρτητης ενδοκυττάρωσης.....	43
1.2.5.3 Η ARF6 απαιτείται για την ενδοσωματική ανακύκλωση.....	44
1.2.5.4 Η ARF6 ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση υποδοχέων συζευμένων με G-πρωτεΐνες.....	45
1.2.5.5 Ο ρόλος της ARF6 στην αναδιοργάνωση της ακτίνης.....	47
1.2.5.6 ARF6 και αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης.....	48
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	51
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1. Υλικά.....	53
2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενων από φλέβα ομφάλιου λώρου.....	53
2.3. Κυτταροκαλλιέργειες.....	53
2.4. Κατασκευές.....	54
2.5. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από E.coli σε μικρή και μεσαία κλίμακα.....	55
2.6. Διαμόλυνση κυττάρων.....	55
2.7. Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών.....	56
2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά western.....	56
2.9. Αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών.....	57
2.10. Μεσαίας κλίμακας πολλαπλασιασμός αδενοϊών.....	57
2.11. Τιτλοποίηση των αδενοϊών.....	58
2.12. Μόλυνση κυττάρων με αδενοϊούς.....	58
2.13. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	58
2.14. Έκφραση και απομόνωση GST-πρωτεϊνών σύντηξης με τη χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης- σεφαρόζης.....	59
2.15. Χρωματογραφία αγκιστείας (σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης).....	59
2.16. Μέθοδοι ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων.....	60
2.16.1. In vitro δοκιμασία πρωτεϊνικής καταβύθισης (pull down assay).....	60
2.16.2. In vivo δοκιμασία συν-ανοκατακρήμισης (co-immunoprecipitation assay).....	60
2.17. Δοκιμασία ενεργοποίησης GTPάσης επαγόμενη από TGFβ1.....	61
2.18. Δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς.....	62
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1 Η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6, ARF6Q67L, αλληλεπιδρά με την SMAD4.....	65



3.2 Η αλληλεπίδραση ARF6-SMAD4 είναι ειδική: Η ARF1 και η ARF5 δεν αλληλεπιδρούν με την SMAD4.....	67
3.3 Η ARF6 αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή της SMAD4 και συγκεκριμένα με τα τελευταία 32 αμινοξέα (αα 520-552).....	68
3.4 Η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με τις SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες.....	69
3.5 Η ARF6 επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ1, αλλά όχι από την Ακτιβίνη Α.....	73
3.6 Η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με διαφορετικές περιοχές των SMAD2 και SMAD3.....	80
3.7 Η ARF6 μειώνει την από τις SMAD2/3 ρυθμιζόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση.....	81
3.8 Η αναστολή της ARF6Q67L στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK.....	90
3.9 Ο TGFβ απενεργοποιεί (την μετατατρέπει στην GDP μορφή) την ARF6.....	92
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	95
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ.....	105
B. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY.....	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ-ΣΥΓΚΡΙΣΕΙΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	127





ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

TGF-β (Transforming Growth Factor-β): αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β
LAP Latency-Associated Peptide
FKBP12 12-kDa FK506 (tacrolimus)-binding protein
EMT (Epithelial-mesenchymal transition): επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίηση
PI(3)P (Phosphatidyl Inositol 3-Phosphate): 3-φωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας
Smad: πρόκειται για σύμπτυξη των φράσεων **Mad (Mothers against decapentaplegic)** και **C.elegans Sma (Derynck et al., 1996)**
MH domain (Mad Homology domain): περιοχή ομολογίας των Mad
SBD (Smad Binding Domain): περιοχή σύνδεσης των Smad πρωτεϊνών.
GST (Glutathione-S-Transferase): τρανσφεράση της γλουταθειόνης.
SBE (Smad Binding Element): στοιχείο ανταπόκρισης στις πρωτεΐνες Smad.
SARA (Smad Anchor for Receptor Activation): πρωτεΐνη αγκυροβόλησης των Smad στη μεμβράνη για ενεργοποίηση από τους υποδοχείς
PAI (Plasminogen Activator Inhibitor): αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου
GFP (Green Fluorescent Protein): πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.
FLAG: οκταπεπτιδίο που αποτελείται από τα αμινοξέα N-Asp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys-C.
BBCE (Bovine Brain Capillary Endothelial cells): ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου βοός.
HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells): Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από φλέβα ομφαλίου λώρου
HEK-293 (Human Embryonic Kidney): Ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα-293
MEEC (Mouse Embryonic Endothelial cells): Εμβρυικά ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού
EPS15 (Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15)
GTP (Guanosine triphosphate): τριφωσφορική γουανοσίνη
GAP (GTPase activating protein): πρωτεΐνη ενεργοποίησης δραστηριότητας GTPάσης
GEF (Guanine exchange factor): παράγοντας ανταλλαγής της γουανίνης
ROCK Rho associated coiled-coil kinase
HECT (Homologous to E6-AP C-terminus), ανήκει στις E3-λιγάσες ουβικιτίνωσης
SCF (Skp1 Cullin F-box protein)
APC (Anaphase-promoting complex)
FYVE (Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1, EEA1): δομική περιοχή αγκυροβόλησης σε PI(3)P
AMSH (Associated molecule with the SH3 domain of STAM)
PP1 (Protein Phosphatase 1)
GADD34 (Growth arrest and DNA damage protein)
ARNO (Arf nucleotide-binding site opener)
MDCK (Madin-Darby canine kidney)
ARAP (Arf GAP with Rho GAP, ankyrin repeat, and pleckstrin homology domains)
ASAP (Arf GAP with Src homology 3, ankyrin repeat, and pleckstrin homology domains)
GIT (G-protein-coupled receptor kinase interacting protein)
EEA1 (Early endosomal antigen 1)
GPI-AP (Glycosylphosphatidyl inositol anchored proteins): πρωτεΐνες που αγκυροβολούν στη μεμβράνη μέσω σύνδεσής τους με γλυκοσυλφωσφατιδύλο ινοσιτόλες
GPCR (G protein-coupled receptor): υποδοχέας συζευγμένος με G-πρωτεΐνες



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

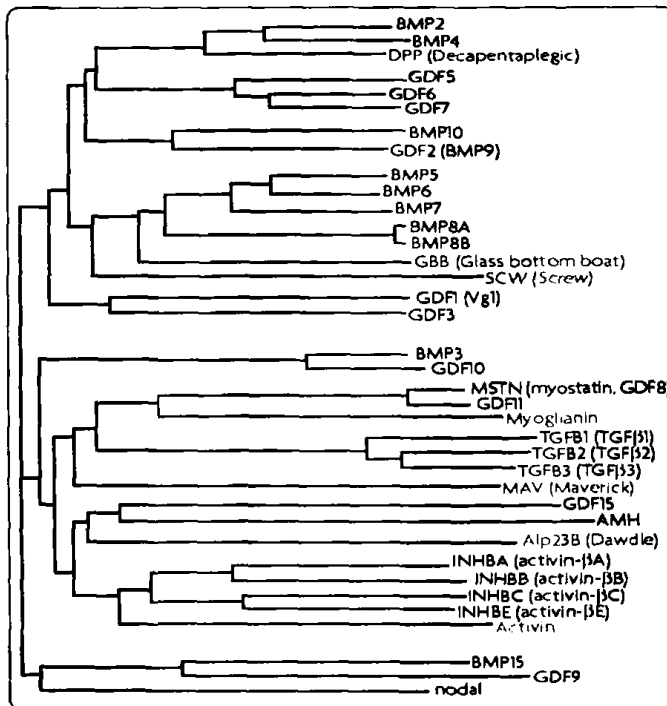
1.1 Μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και την Ακτιβίνη Α

1.1.1 Η υπεροικογένεια του TGFβ

Η υπεροικογένεια του μετασχηματίζοντα αυξητικού παράγοντα β (*transforming growth factor β*, *TGFβ*) αριθμεί ένα πλήθος 42 πρωτεϊνών στον άνθρωπο, 9 πρωτεϊνών στη φρουτόμυγα *Drosophila* και 6 πρωτεϊνών στο σκώληκα *Caenorhabditis Elegans* (Lander et al., 2001).

Στα θηλαστικά, τα προσδέματα της υπεροικογένειας αυτής κωδικοποιούνται από τουλάχιστο 30 γονίδια, στα οποία περιλαμβάνονται 3 για τις ισομορφές του TGFβ, 4 για τις β-αλυσίδες της ακτιβίνης, 1 για την nodal, 10 για τις πρωτεΐνες οστικής μορφογένεσης (*Bone Morphogenetic Proteins*, *BMPs*) και 11 για τους παράγοντες αύξησης και διαφοροποίησης (*Growth and Differentiation Factors*, *GDFs*) (Εικόνα 1.1, φυλογενετικό δέντρο προσδεμάτων), (Schmierer and Hill, 2007).

Οι ανωτέρω πρωτεΐνες-προσδέματα διακρίνονται σε δύο υπο-οικογένειες: την υπο-οικογένεια των *TGFβ/activin/Nodal* και την υπο-οικογένεια των *BMP/GDF/MIS (Muellerian Inhibiting Substance)*, οι οποίες καθορίζονται με βάση τις ομοιότητες στη δομή και την αμινοξική τους αλληλουχία, αλλά και την εξειδίκευση που παρουσιάζουν ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν (Shi and Massague, 2003). Τα μέλη αυτής της υπεροικογένειας επηρεάζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών και αποκρίσεων, όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση (Lutz and Knaus, 2002).

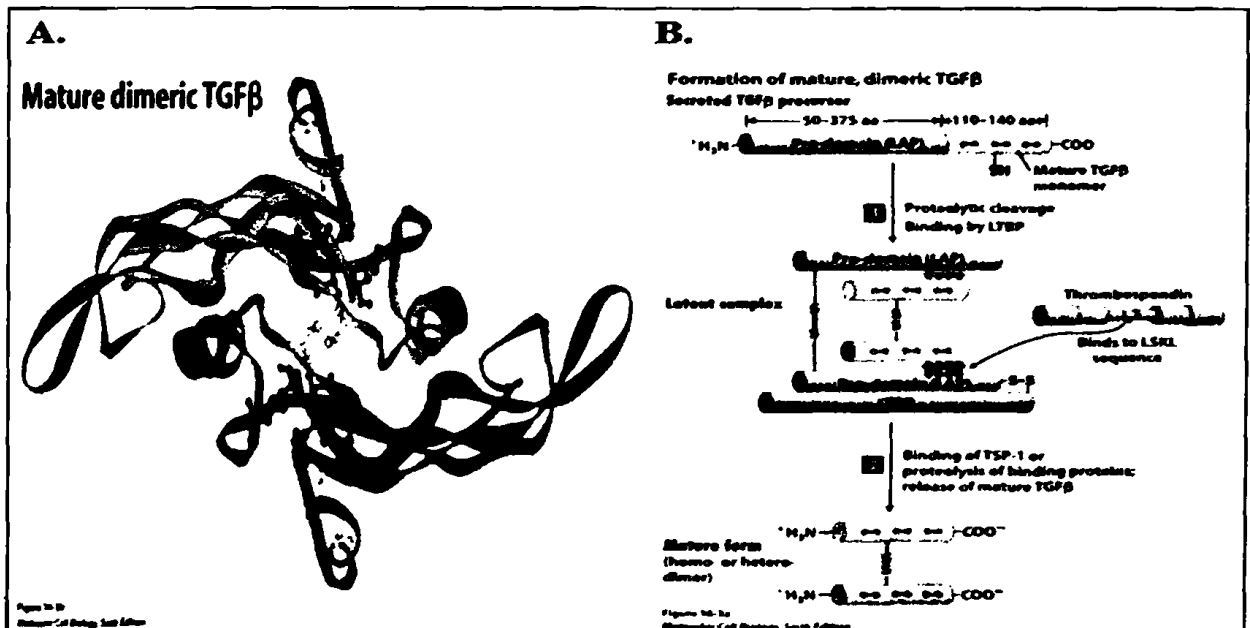


Εικόνα 1.1. Φυλογενετικό δέντρο των προσδεμάτων της TGFβ υπεροικογένειας. Κατασκευάστηκε με βάση την ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας των προσδεμάτων τόσο στον άνθρωπο όσο και στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*. Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα ενώ οι πρωτεΐνες της *D.melanogaster* με γκρι χρώμα. Τα εναλλακτικά πρωτεϊνικά ονόματα δίνονται σε παρένθεση. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου, χρησιμοποιήθηκαν οι ώριμες, πλήρως επεξεργασμένες μορφές των προσδεμάτων. *BMP*, bone morphogenetic protein; *GDF*, growth and differentiation factor; *TGF*, transforming growth factor (Schmierer and Hill, 2007).

1.1.2 Δομικά χαρακτηριστικά του TGFβ

Ο ώριμος TGFβ, συγκροτεί ομοδιμερή που συγκρατούνται από έναν δισουλφιδικό δεσμό και πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Κάθε μονομερές έχει 110-140 αμινοξέα, 4 αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα, μία α-έλικα και 3 ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζουν μια διακριτή περιοχή αποκαλούμενη *περιοχή κόμβου κυστεΐνης (cysteine-knot domain)* (de Caestecker, 2004; Shi and Massague, 2003; Sun and Davies, 1995) (Εικόνα 1.2A). Στα θηλαστικά έχουν προσδιοριστεί τρία διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες ισομορφές του TGFβ: TGFβ1, TGFβ2 και TGFβ3. Αν και οι τρεις αυτές ισομορφές παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, εν τούτοις έχουν διαφορές κυρίως στο άμινο-τελικό άκρο, την α-έλικα και τις θηλιές μεταξύ των β-πτυχωτών φύλλων.

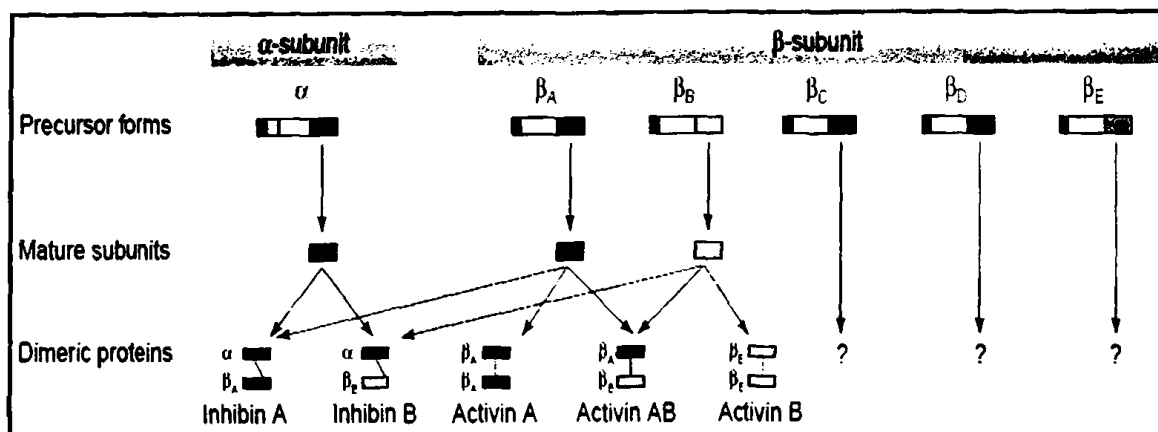
Ο TGFβ εκκρίνεται από τα κύτταρα ως ένα βιολογικά ανενεργό σύμπλεγμα μορίων, που ονομάζεται *μεγάλο λανθάνον σύμπλεγμα (large latent complex, LLC)* και διατηρείται στην *εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (extracellular matrix, ECM)* μέχρι να ενεργοποιηθεί. Αυτό αποτελείται από την *λανθάνουσα συνδετική πρωτεΐνη του TGFβ (latent TGFβ-binding protein, LTBP, μεγέθους ~125-240 kDa)*, την πρωτεΐνη LAP (μεγέθους ~75 kDa) και το ώριμο διμερές του TGFβ (μεγέθους ~25 kDa) (Εικόνα 1.2B). Ενώ η σύνδεση της LTBP με τη LAP γίνεται μέσω δισουλφιδικού δεσμού, η σύνδεση της LAP με τον ώριμο TGFβ γίνεται μη-ομοιοπολικά (LSKL και RKPK αμινοξέα). Σε αυτή την μορφή ο TGFβ είναι ανενεργός. Η απελευθέρωση του ώριμου βιοενεργού TGFβ από το σύμπλεγμα αυτό μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Πρώτον, με την πρωτεόλυση της LAP από πρωτεάσες, όπως η πλασμίνη, η θρομβίνη, η πλασματική τρανσγλουταμινάση και ενδογλυκοσιδάσες (Schultz-Cherry et al., 1994). Δεύτερον, με τη σύνδεση πρωτεϊνών της ECM, όπως η θρομβοσπονδίνη-1, στην LSKL αλληλουχία της LAP (Crawford et al., 1998), οπότε και τελικά απελευθερώνεται το ώριμο βιοενεργό μόριο του TGFβ, λόγω κατάρτησης του μη-ομοιοπολικού δεσμού του με τη LAP (Εικόνα 1.2B).



Εικόνα 1.2. Έκκριση και δομή του TGFβ. Α) Στην απεικόνιση με μορφή «ταινίας» του ώριμου διμερούς TGFβ, οι δύο υπομονάδες φαίνονται με πράσινο και μπλέ. Κατάλοιπα κυστεΐνης συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό (κίτρινο και κόκκινο χρώμα), απεικονίζονται με μορφή «σφαιριδίων και ράβδων». Οι τρεις ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί (κόκκινο) σε κάθε μονομερές, σχηματίζουν την αποκαλούμενη περιοχή «κόμβου κυστεΐνης», Β) Σχηματισμός του ώριμου διμερούς TGFβ (περιγράφεται στο κείμενο) (Lodish et al., 2008, *Molecular Cell Biology*, 6th Edition).

1.1.3 Δομικά χαρακτηριστικά της Ακτιβίνης Α

Η ακτιβίνη Α είναι ένα διμερές πολυπεπτιδίο, το οποίο έχει γενική δομή παρόμοια με τον TGFβ (Κεφάλαιο 1.1.2), όπως άλλωστε και τα περισσότερα μέλη της υπερικογένειας αυτής. Η ακτιβίνη Α ανήκει στην οικογένεια των ινχιμπινών/ακτιβινών, τα μέλη της οποίας προέρχονται από το διμερισμό δύο ανόμοιων υπομονάδων: της υπομονάδας α και της υπομονάδας β (Ling et al., 1986).



Εικόνα 1.3. Οι πρώιμες μορφές των υπομονάδων και τα τελικά διαμορφωμένα διμερή της οικογένειας των ακτιβινών (Activin A, AB, B και Inhibin A, B). Οι υπομονάδες βC, βD και βE δεν έχουν χαρακτηριστεί ακόμα εκτενώς. Παρατηρούμε ότι τα ώριμα μόρια προέρχονται από πρόδρομες μορφές (precursor forms) κατόπιν πρωτεόλυσης. Όμο ή έτεροδιμερισμός των τελευταίων έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό λειτουργικών ώριμων διμερών μορίων (Ethier and Findlay, 2001).

Η υπομονάδα β έχει πολλές ισομορφές (βA, βB, βC, βD και βE). Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν καθεμία από αυτές εντοπίζονται σε διαφορετικό χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα η σύνθεσή τους να είναι ανεξάρτητη (Ying, 1988). Οι ακτιβίνες A, B, AB είναι διμερή (βA-βA, βB-βB, και βA-βB) των πολυπεπτιδικών αλυσίδων βA και βB. Παράλληλα, οι αλυσίδες βA και βB μπορούν να ετεροδιμεριστούν με την αλυσίδα α παράγοντας έτσι τον ανταγωνιστή της Ακτιβίνης, την ινχιμπίνη Α (α-βA) και την ινχιμπίνη Β (α-βB) (inhibin A και B, Εικόνα 1.3) (Petraglia et al., 1989).

Όπως και τα άλλα μέλη της υπερικογένειας του TGFβ, η βιολογικά ενεργή ακτιβίνη Α είναι προϊόν μιας ανενεργού πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης. Η πρόδρομη μορφή της ακτιβίνης είναι ένα διμερές των 110 kDa, που περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτιδίο, μια γλυκοσυλιωμένη περιοχή και την ώριμη ενεργή περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο (Ying, 1988). Η ώριμη μορφή της ακτιβίνης δεν είναι γλυκοσυλιωμένη και ενδοκυτταρικές πρωτεολυτικές επεξεργασίες είναι απαραίτητες για την πλήρη βιολογική δράση της.

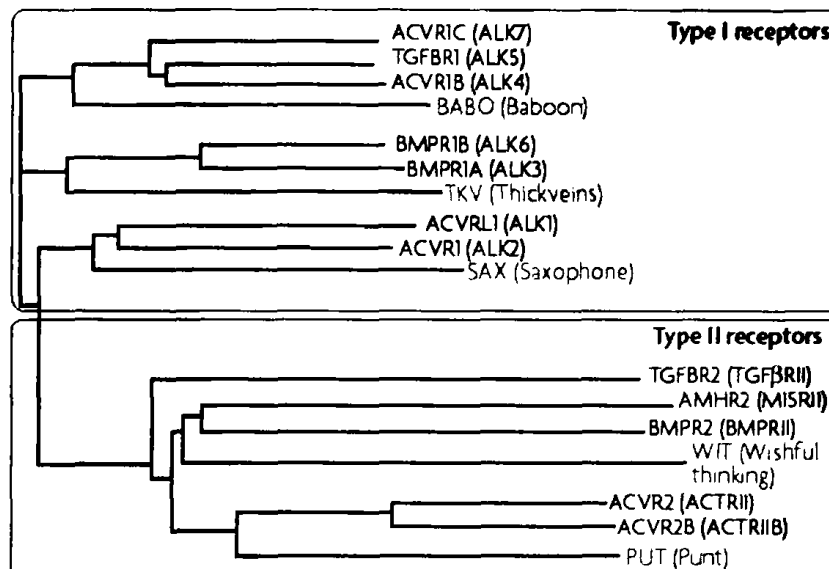
1.1.4 Οι μεμβρανικοί υποδοχείς της υπερικογένειας του TGFβ

1.1.4.1 Βασικά χαρακτηριστικά

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, η οικογένεια των υποδοχέων της υπερικογένειας του TGFβ αριθμεί 12 μέλη – 7 για τους τύπου I υποδοχείς και 5 για τους τύπου II υποδοχείς (Manning et al., 2002) (Εικόνα 1.4). Και οι δύο τύποι υποδοχέων αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα περίπου 500 αμινοξέων, η οποία αποτελείται από την N-τελική εξωκυττάρια περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνες και γλυκοσυλιωμένη (Denpler et al., 2002), τη διαμεμβρανική περιοχή, και το C-τελικό άκρο με τη δραστικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Shi and Massague, 2003). Οι

χαρακτηριστικοί υποδοχείς για τον παράγοντα TGFβ είναι ο τύπου II υποδοχέας, TGFBR2 (TGFβRII), και ο τύπου I υποδοχέας TGFBR1 (ALK-5). Για τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας οι χαρακτηριστικοί τύπου I υποδοχείς είναι ο ACVR1B (ALK-4) για την Ακτιβίνη και οι BMPR1A (ALK-3) και BMPR1B (ALK-6) για τους BMPs. Οι χαρακτηριστικοί τύπου II υποδοχείς είναι οι ACVR2 (ACTRII) και ACVR2B (ACTRIIB) για την Ακτιβίνη και ο BMPR2 (BMPRII) για τους BMPs (Schmierer and Hill, 2007).

Σε γενικές γραμμές, οι τύπου II υποδοχείς είναι συνεχώς ενεργές κινάσες, ενώ οι τύπου I υποδοχείς πρέπει να φωσφορυλιωθούν για να ενεργοποιηθούν. Φυσικά, οι περισσότερες πληροφορίες προέρχονται από τα πολύ γνωστά μέλη της υπερικογένειας, όπως ο TGFβ, η ακτιβίνη A και οι BMP πρωτεΐνες. Στην περίπτωση του TGFβ, απουσία προσδέματος, οι υποδοχείς υφίστανται ως ομοδιμερή. Η δέσμευση του TGFβ στην εξωκυτάρια περιοχή του τύπου II υποδοχέα σηματοδοτεί τη στρατολόγηση του τύπου I υποδοχέα και το σχηματισμό ενός ετερο-τετραμερούς συμπλόκου. Τότε ο TGFβRII φωσφορυλιώνει τον TGFβR1 σε μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη/σερίνη και τον ενεργοποιεί. Η περιοχή αυτή περιέχει το χαρακτηριστικό μοτίβο TTSGSGSG και εντοπίζεται μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής και της περιοχής με δράση κινάσης του τύπου I υποδοχέα (Massague, 1998).



Εικόνα 1.4. Φυλογενετικό δέντρο υποδοχέων της υπερικογένειας του TGFβ (τύπου I και τύπου II). Κατασκευάστηκε με βάση την ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών τόσο του ανθρώπου όσο και στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster*. Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα ενώ οι πρωτεΐνες της *D.melanogaster* με γκρι χρώμα. Τα εναλλακτικά ονόματα των υποδοχέων δίνονται σε παρένθεση. **ACVR**, activin receptor; **ALK**, activin receptor-like kinase; **AMHR2**, AMH (anti-Muellerian hormone) receptor-2; **BMPR**, BMP receptor; **TGFBR**, TGFβ receptor (Schmierer and Hill, 2007).

Η πρωτεΐνη FKBP12 ελέγχει την ενεργοποίηση του συμπλόκου των υποδοχέων απουσία εξωτερικού ερεθίσματος. Οι υποδοχείς TGFβR1 και TGFβRII έχουν την τάση να σχηματίζουν σύμπλοκο ακόμα και απουσία προσδέματος. Πρόσδεση της FKBP12 στη μη φωσφορυλιωμένη αλληλουχία γλυκίνης / σερίνης (GS box) (Huse et al., 1999; Okadome et al., 1996), σταθεροποιεί τη διαμόρφωση του TGFβR1 ώστε να μην γίνεται δυνατή η φωσφορυλίωσή του από τον τύπου II υποδοχέα (Εικόνα 1.10) (Chen et al., 1997; Wang et al., 1996). Επιπλέον, η δέσμευση του τύπου I υποδοχέα από την πρωτεΐνη FKBP12 προστατεύει τον υποδοχέα από την αναγνώρισή του από το



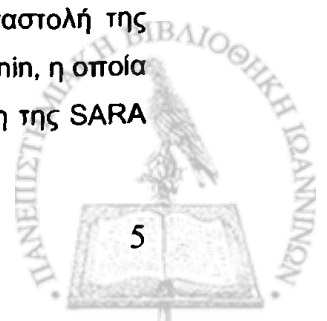
μηχανισμό ενδοκυττάρωσης και την εσωτερίκευση του στο κυτταρόπλασμα (Yao et al., 2000). Η φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα αλλάζει την τριτοταγή του διαμόρφωση με τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι προσβάσιμη η περιοχή πρόσδεσης των SMAD πρωτεϊνών (Denkler et al., 2002; Huse et al., 2001).

1.1.4.2 Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων στη σηματοδοτική απόκριση

Για πολλά χρόνια κυριαρχούσε η αντίληψη ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων ήταν βασικά μια απενεργοποιητική διαδικασία για τη σηματοδότηση επειδή οδηγούσε τους υποδοχείς για αποικοδόμηση στα λυσοσώματα. Ωστόσο, πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ενδοκυττάρωση παίζει ευοδωτικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος (Cavalli et al., 2001; Seto et al., 2002), γεγονός που φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση μερικών μελών της οικογένειας του TGFβ, όπως θα δούμε παρακάτω.

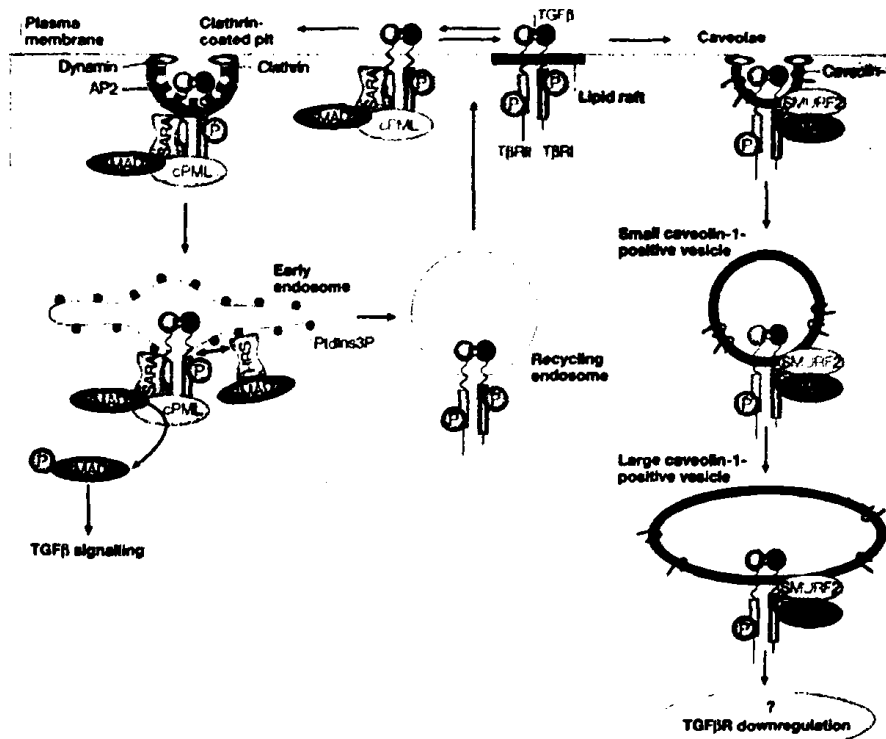
Απουσία προσδέματος, οι υποδοχείς του TGFβ υφίστανται συνεχή εσωτερικοποίηση και επαναφέρονται ξανά στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς του TGFβ από την κυτταρική μεμβράνη εισέρχονται (Garamszegi et al., 2001; Zwaagstra et al., 1999) στο εσωτερικό του κυτάρου με δυο ξεχωριστά μονοπάτια, α) το μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης (Zwaagstra et al., 1999) και β) το μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από καβεοσώματα (caveolae) ενδοκυττάρωσης (Di Guglielmo et al., 2003). Ο τύπου II υποδοχέας του TGFβ (TGFβRII) (αλλά όχι όμως και της Ακτιβίνης A (ACTRII)), φέρει σήματα εσωτερικοποίησης του τύπου της δι-λευκίνης (Ehrlich et al., 2001), εντοπίζεται στα κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη (Di Guglielmo et al., 2003) και προσδέεται στη β2 υπομονάδα της AP2 (Adaptor Protein-2), συστατικού των κυστιδίων (Yao et al., 2002). Η εσωτερικοποίηση του TGFβRII υποβοηθείται μέσω της σύνδεσής του με τον τύπου III TGFβ υποδοχέα β-γλυκάνη (betaglycan), ο οποίος προσδέεται άμεσα στη β-arrestin-2 (Chen et al., 2003). Μετά την εσωτερικοποίηση στα καλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια, οι υποδοχείς εντοπίζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα, που είναι πλούσια σε PtdIns3P λιπίδια, όπου αλληλεπιδρούν με τις δυο πρωτεΐνες SARA και HRS ενώ επίσης έχουν βρεθεί και σε ενδοσώματα ανακύκλωσης (Di Guglielmo et al., 2003). Οι πρωτεΐνες SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) και HRS (Hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine-kinase substrate) περιέχουν τη δομική περιοχή FYVE (Fab1, YOTB, Vac1, EEA1) (Tsukazaki et al., 1998). Ο ρόλος τους στην TGFβ επαγόμενη σηματοδότηση είναι να στρατολογήσουν τις SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες, ώστε να φωσφορυλιωθούν από το σύμπλοκο των ενεργοποιημένων υποδοχέων με επακόλουθο την αποσύνδεσή τους από τη SARA καθώς και από το σύμπλοκο των υποδοχέων, ώστε να πραγματοποιηθεί η μετάδοση του σήματος (Εικόνα 1.5). Στη συνέχεια, οι υποδοχείς επαναφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης. Επιπλέον, μια άλλη πρωτεΐνη, cPML (cytoplasmic promyelotic leukaemia protein) αλληλεπιδρά με τους TGFβRs, SARA, R-SMADS και απαιτείται για την ενδοσωματική εντόπισή τους (Lin et al., 2004).

Αναστολή της διαμεσολαβούμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης, είτε με κυρίαρχα αρνητικές μορφές της δυναμίνης (dynamin) ή της EPS15 είτε με μείωση του K⁺, οδηγούν σε αναστολή της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ (Hayes et al., 2002b). Επιπλέον, η ουσία wortmannin, η οποία αναστέλλει την PI3K και μειώνει τον σχηματισμό των PtdIns3P, όπως και η υπερέκφραση της SARA



στην οποία έχει αφαιρεθεί η FYVE περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τις μεμβράνες των πρώιμων ενδοσωμάτων, έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της σηματοδότησης από τον TGFβ (Panopoulou et al., 2002b). Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν περί ενός θετικού ρόλου της ενδοκυττάρωσης με κυστιδία κλαθρίνης και των πρώιμων ενδοσωμάτων στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ. Παραταύτα, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η ενεργοποίηση της SMAD2 δεν προϋποθέτει απαραίτητα την ενδοκυττάρωση των υποδοχέων (Lu et al., 2002; Zhou et al., 2004). Επιπροσθέτως, μια μεταλλαγμένη μορφή της SMAD3 που δεν μπορεί να προσδεθεί στην SARA, διατηρεί την ικανότητά της να φωσφορυλιώνεται από τον υποδοχέα και να ρυθμίζει τη μεταγραφή (Goto et al., 2001).

Αντίθετα, η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων του TGFβ μέσω των καβεοσωμάτων (caveolae) έχει αρνητική επίδραση στη μεταγωγή του σήματος. Τα καβεοσώματα είναι εγκολπώσεις της κυτταρικής μεμβράνης (Goto et al., 2001) πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη και χαρακτηρίζονται από την παρουσία της πρωτεΐνης caveolin-1 (Rothberg et al., 1992). Στα καβεοσώματα, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη SMAD7 (ανασταλτική SMAD) και τη λιγάση Smurf2. Τα καβεοσώματα συντήκονται και σχηματίζουν μεγαλύτερα καβεοσώματα, όπου η Smurf2 επάγει την ουβικιτινύλωση του υποδοχέα και την αποικοδόμηση του από το πρωτεάσωμα, με αποτέλεσμα τη μείωση του σήματος του TGFβ (Di Guglielmo et al., 2003; Kavsak et al., 2000; Razani et al., 2001) (Εικόνα 1.5). Έτσι, ο τρόπος εσωτερικοποίησης του ενεργοποιημένου υποδοχέα παίζει σημαντικό ρόλο αναφορικά με την ένταση και διάρκεια της καθοδικής σηματοδότησης.

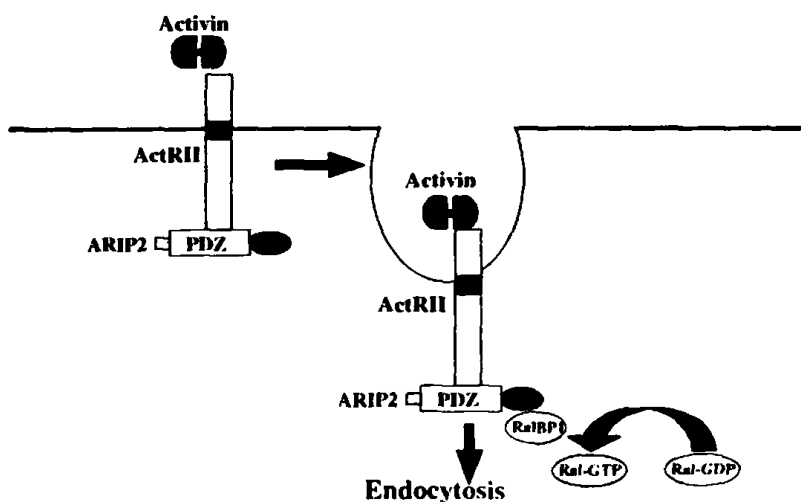


Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Εικόνα 1.5. Εσωτερικοποίηση των Υποδοχέων του TGFβ διαμέσου κυστιδίων κλαθρίνης και καβεοσωμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι πρωτεΐνες SARA, SMAD2, cPML μπορούν να αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς TGFβRs και στην κυτταρική μεμβράνη (Le Roy and Wrana, 2005).



Βέβαια, όλοι οι υποδοχείς της υπερκοινογένειας του TGFβ δεν ενδοκυτταρώνονται με τον ίδιο τρόπο. Συγκεκριμένα, οι υποδοχείς τύπου II της Ακτιβίνης A (ACTRII) φέρουν αλληλουχίες σύνδεσης με PDZ πρωτεΐνες στο καρβοξυτελικό άκρο τους (ESSL για τον ACTRIIA και ESSI για τον ACTRIIB), (Εικόνα 1.6) (Matsuzaki et al., 2002; Shoji et al., 2000). Οι υποδοχείς τύπου II του TGFβ δεν φέρουν τις αλληλουχίες αυτές. Αυτές οι αλληλουχίες διαμεσολαβούν την σύνδεση των ACTRII υποδοχέων σε δυο καινούργιες PDZ πρωτεΐνες ονομαζόμενες ARIPs (Activin Receptor-Interacting Proteins). Η ARIP1 συνδέεται με τον ACTRIIA υποδοχέα (Shoji et al., 2000), ενώ η ARIP2 συνδέεται με αμφότερους τους ACTRIIA και ACTRIIB υποδοχείς (Matsuzaki et al., 2002). Η υπερέκφραση της ARIP2 αυξάνει την ενδοκυττάρωση των ACTRII υποδοχέων μέσω της αλληλεπίδρασής της με μια πρωτεΐνη (Ral-binding protein-1, RalBP1) που προσδένεται στη Ral GTPάση (Εικόνα 1.6). Αν και ο ακριβής μηχανισμός και εντόπιση δεν μελετήθηκαν λεπτομερώς, εν τούτοις, το αποτέλεσμα ήταν να επηρεαστεί αρνητικά η καθοδική σηματοδότηση από την ακτιβίνη A και να μειωθεί η επαγωγή της μεταγραφής σε K1 κύτταρα ωοθηκών από Κινέζικα χοιρίδια (Matsuzaki et al., 2002).



Εικόνα 1.6. Σχηματική απεικόνιση της ενδοκυττάρωσης του ACTRII υποδοχέα. Απαιτείται πρόσδεση της πρωτεΐνης ARIP2 στο καρβοξυτελικό τμήμα του υποδοχέα, διαμέσου της PDZ δομικής περιοχής της και η επακόλουθη ενεργοποίηση της Ral GTPάσης (Tsuchida et al., 2004).

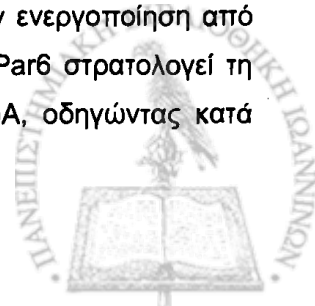
1.1.5 Τα SMAD-ανεξάρτητα μονοπάτια

Το πιο συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται από το σύμπλοκο των TGFβ υποδοχέων περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση των **SMAD** πρωτεϊνών (βλέπε παρακάτω) και την μετάβασή τους στον πυρήνα όπου ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι κυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται από το ίδιο ενεργοποιημένο σύμπλοκο των TGFβ υποδοχέων, μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το πλαίσιο της ενεργοποίησης (context stimulation). Συγκεκριμένα, ο TGFβ αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και επάγει την απόπτωση, ενώ αντιθέτως, έχει μιτογόνο δράση σε ινοβλάστες και επάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίησή τους (EMT) (Rahimi and Leaf, 2007; Siegel and Massague, 2003). Το παραπάνω «παράδοξο», βρήκε την εξήγησή του με την ταυτοποίηση άλλων πρωτεϊνών που δρουν καθοδικά από τους υποδοχείς του TGFβ, σηματοδοτώντας πλήθος κυτταρικών αποκρίσεων όπως η απόπτωση, η επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT), η μετανάστευση,

ο πολλαπλασιασμός, η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και η διαφοροποίηση. Οι μηχανισμοί δράσης αυτών των μονοπατιών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής: (α) σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των SMAD πρωτεϊνών που τροποποιούν τη δράση των SMAD, (β) σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται πρωτεΐνες των οποίων η δράση τροποποιείται από τις SMAD και στη συνέχεια μεταδίδουν το μήνυμά τους σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια και (γ) σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν απευθείας με το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF- β και δεν τροποποιούν απαραίτητα τη δράση των SMAD (Moustakas and Heldin, 2005). Πειράματα ανάλυσης μικροσυστοιχιών που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα όσο και σε καρκινικά κύτταρα παγκρέατος, στα οποία μειώθηκαν τα επίπεδα έκφρασης της SMAD4 μέσω παρεμβαλλόμενου RNA, έδειξαν ότι η SMAD4 απαιτείται μόνο για την από τον TGF- β διαμεσολαβούμενη αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης καθώς και για την κυτταρική μετανάστευση και όχι για την επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίηση των κυττάρων (EMT) (Levy and Hill, 2005). Ωστόσο, μελέτες σε άλλους κυτταρικούς τύπους υπέδειξαν ότι η συμμετοχή της SMAD4 είναι απαραίτητη στην EMT (Medici et al., 2006; Valcourt et al., 2005).

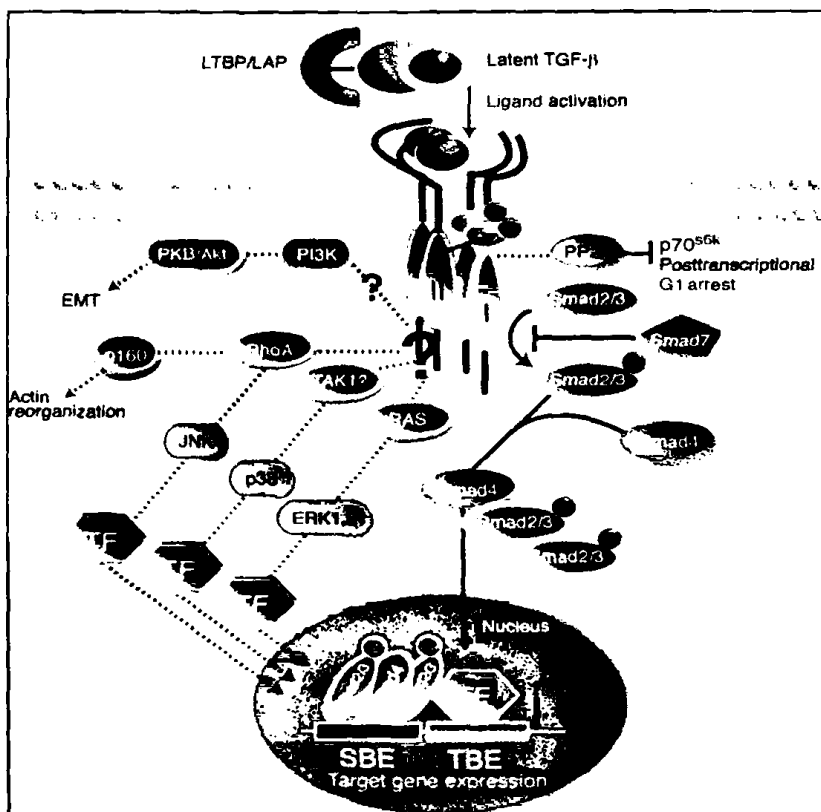
Ο παράγοντας TGF- β ενεργοποιεί μέσω ενεργοποίησης των SMAD πρωτεϊνών, την έκφραση διαφόρων προ-αποπτωτικών γονιδίων όπως αυτά που κωδικοποιούν για την φωσφατάση των φωσφολιπιδίων SHIP, την πρωτεϊνική κινάση που συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο DAPK (death-associated protein kinase) και την πρωτεΐνη TIEG1 (TGF- β -inducible early response gene 1) (Siegel and Massague, 2003; Ten Dijke et al., 2002). Επιπλέον, η SMAD3 επάγει την έκφραση και ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης - 8 και την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του γαστρικού συστήματος (Kim et al., 2004). Ο TGF- β προκαλεί την έξοδο των μιτοχονδριακών septin πρωτεϊνών ARTS (apoptosis-related proteins in the TGF- β signaling pathway), εμποδίζοντας τις πρωτεΐνες XIAPs, γνωστούς αναστολείς των κασπασών, οδηγώντας έτσι το κύτταρο στην απόπτωση (Moustakas and Heldin, 2005). Επιπροσθέτως, το μονοπάτι της πρωτεΐνης TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) οδηγεί στην απόπτωση. Ο τύπου I υποδοχέας του TGF- β προσδένει την SMAD7 που με τη σειρά της προσδένει την TAK1 και ο τύπου II υποδοχέας προσδένει την προ-αποπτωτική πρωτεΐνη Daxx, ενώ οι BMP υποδοχείς προσδένουν την XIAP και τις αλληλεπιδρώσες με αυτήν πρωτεΐνες, TAB και TAK1. Επομένως, και οι δυο υποδοχείς των TGF- β και BMP ενεργοποιούν την TAK1, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των κινασών MKK3, MKK4 ή MKK7. Οι κινάσες αυτές πάλι ενεργοποιούν τις κινάσες JNK ή p38, οι οποίες οδηγούν στην απόπτωση μια ποικιλία κυτταρικών τύπων. Στο μονοπάτι της Daxx, η HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase 2) φωσφορυλιώνει την Daxx, η οποία ενεργοποιεί τις MKK4 και MKK7 (Moustakas and Heldin, 2005).

Ο παράγοντας TGF- β επίσης ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και την επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT). Οι ενεργοποιημένες SMAD ρυθμίζουν γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Snail, ένα καταστολέα της μεταγραφής του γονιδίου της E-Καντχερίνης, οδηγώντας έτσι στη διάλυση των συνδέσμων προσκόλλησης. Εναλλακτικά, οι υποδοχείς συνδέουν ιδιοστατικά την πρωτεΐνη occludin και την πρωτεΐνη πολικότητας Par6. Κατά την ενεργοποίηση από πρόσδεμα, ο τύπου II υποδοχέας φωσφορυλιώνει άμεσα την Par6. Έπειτα, η Par6 στρατολογεί τη λιγάνη ουβικιτινυλίωσης Smurf1, η οποία ουβικιτινώνει και αποδομεί την RhoA, οδηγώντας κατά



συνέπεια στη διάλυση των στεγανών συνδέσμων. Η συνδυασμένη δράση των δύο μονοπατιών προάγει την EMT. Ακόμη, ο TGFβ μπορεί να ενεργοποιήσει την κινάση της 3-φωσφατιδύλο-ινοσιτόλης (PI3K) με επακόλουθα τη φωσφορυλίωση της AKT και πρόκληση επιθηλιακής-μεσεγχυματικής διαφοροποίησης (epithelial-mesenchymal transission, EMT) (Εικόνα 1.7). Σε ένα δεύτερο μοντέλο, ο TGF-β ενεργοποιεί τις Rho GTPases, οι οποίες ενεργοποιούν τη ROCK, που με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την Limk2 κινάση η οποία ακολούθως φωσφορυλιώνει και αναστέλλει την πρωτεΐνη κοφιλίνη (cofilin). Η κοφιλίνη είναι μια ακτίνο-δεσμευτική πρωτεΐνη που οδηγεί στον αποπολυμερισμό της ακτίνης. Οι BMP υποδοχείς δεσμεύουν άμεσα τη Limk1 κινάση και την ενεργοποιούν, γεγονός που οδηγεί στην παρεμπόδιση της κοφιλίνης. Η συνδυαστική δράση των δύο μονοπατιών συμβάλλει στον πολυμερισμό της ακτίνης (Moustakas and Heldin, 2005).

Όπως προαναφέρθηκε, ο παράγοντας TGF-β αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μη μετασχηματισμένων επιθηλιακών, ενδοθηλιακών ή αιματοποιητικών κυττάρων (Ten Dijke et al., 2002). Αντιθέτως, έχει μιτογόνο δράση σε μετασχηματισμένα κύτταρα και αθανατοποιημένους ινοβλάστες (Alexandrow and Moses, 1995).



Εικόνα 1.7. Ορισμένα από τα SMAD ανεξάρτητα σηματοδοτικά μονοπάτια επαγόμενα από τον TGFβ υποδοχέα. Τα ερωτηματικά δηλώνουν πως ο ακριβής μηχανισμός ενεργοποίησης και ο τρόπος σύνδεσης με το σύμπλοκο των υποδοχέων δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως (Roberts and Derynck, 2001).

Ο TGF-β αναστέλλει την κυτταρική αύξηση, ρυθμίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών που εμπλέκονται στον κυτταρικό κύκλο. Οι υποδοχείς του TGF-β ενεργοποιούν τις SMADs οι οποίες επάγουν την έκφραση του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21 σε συνεργασία με τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxO, p53 και Sp1. Ωστόσο, το γονίδιο της p21 επάγεται από τον TGF-β και μέσω άλλων μηχανισμών που περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη Ras, και τις MEKK1 και ERK (Hu et

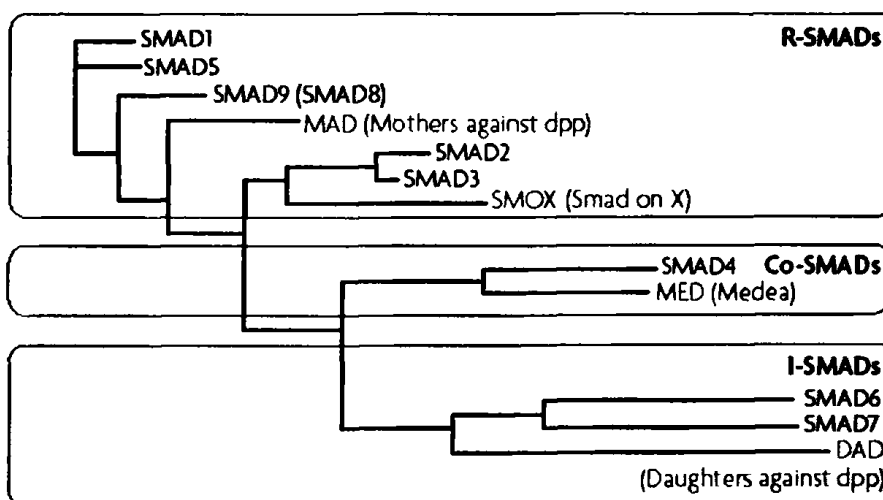
al., 1999; Kivinen and Laiho, 1999). Οι SMADs μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η οποία οδηγεί στη φωσφορυλίωση του Sp1 και την επαγωγή της έκφρασης της p21. Επιπροσθέτως, το SMAD μονοπάτι, επάγει την μεταγραφή των p15 ή p57 και καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων *Myc* και *Id* (*Id1, Id2, Id3, inhibitors of differentiation*). Ακόμη, οι υποδοχείς του TGFβ μπορούν να προσδέσουν την ρυθμιστική υπομονάδα Βα της φωσφατάσης PP2A, οδηγώντας στην αποφωσφορυλίωση και επακόλουθη απενεργοποίηση της κινάσης p70 S6K αναστέλλοντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Petritsch et al., 2000). Επιπλέον, ο TGF-β μέσω του μονοπατιού RhoA/ROCK1 οδηγεί σε φωσφορυλίωση και αναστολή της φωσφατάσης Cdc25A σε επιθηλιακά κύτταρα (Bhowmick et al., 2003). Η πρωτεΐνη Cdc25A αποφωσφορυλιώνει τις εξαρτώμενες από κυκλίνες κινάσες (cyclin dependent kinases) επάγοντας έτσι εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Απενεργοποίηση της Cdc25A σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση.

Αντίθετα η μιτογόνος απόκριση των AKR-2B ινοβλαστών στον TGF-β περιλαμβάνει ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής κινάσης PAK2 (Wilkes et al., 2003). Οι μικρές GTPάσες Rac1 και Cdc42 μεσολαβούν για αυτήν την απόκριση, ενώ το μονοπάτι φαίνεται να λειτουργεί σε ινοβλάστες αλλά όχι και σε επιθηλιακά κύτταρα (Moustakas and Heldin, 2005).

Ο TGFβ επάγει την ενεργοποίηση των MAP κινασών ERK1/2 (Yue and Mulder, 2000), JNK (Engel et al., 1999) και p38 (Bakin et al., 2002), οι οποίες επιδρούν στη φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών όπως θα αναφέρουμε παρακάτω. Η ενεργοποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ανοδικών διαμεσολαβητών, όπως η Ras, η RhoA GTPάση και η TAK1 (Κινάση ενεργοποιούμενη από TGF-β, TGF-β-activated kinase), αντίστοιχα (Εικόνα 1.7).

1.1.6 Οι SMAD πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες SMAD είναι τα μόνα γνωστά υποστρώματα της δράσης κινάσης των τύπου I υποδοχέων της οικογένειας του TGFβ. Ταυτοποιήθηκαν αρχικά στη Δροσόφιλα, σαν προϊόντα των γονιδίων *Mad*, και στο *C. elegans* σαν προϊόντα των γονιδίων *sma* (Moustakas et al., 2001). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 8 μέλη της οικογένειας των SMAD (Εικόνα 1.8).

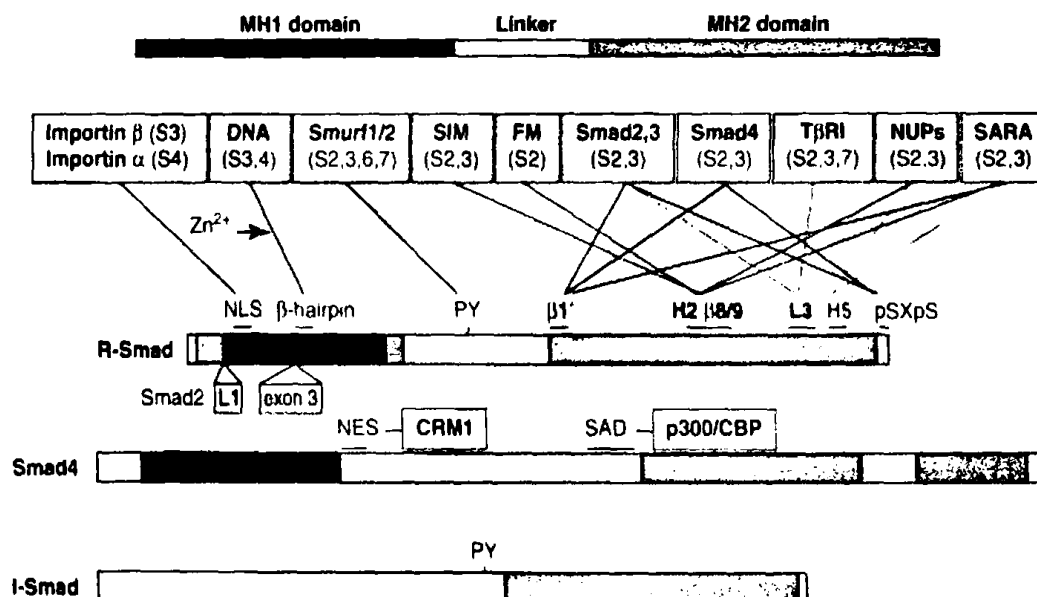


Εικόνα 1.8. Φυλογενετικό δέντρο των SMAD πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη σηματοδότηση, επαγόμενη από τα προσδέματα της υπερικογένειας του TGFβ. Κατασκευάστηκε με βάση την ομοιότητα αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών τόσο του ανθρώπου όσο και της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster*. Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα ενώ οι πρωτεΐνες της *D.melanogaster* με γκρι χρώμα. Τα αναλυτικά ονόματα των SMAD δίνονται σε παρένθεση. R-SMAD, receptor-regulated SMAD; Co-SMAD, common mediator SMAD; I-SMAD, inhibitory SMAD (Schmierer and Hill, 2007).

Οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε τρεις υπο-οικογένειες: (α) τις SMAD που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (Receptor-activated SMADs, R-SMADs), οι οποίες είναι οι SMAD2 και SMAD3 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους TGFβ, Ακτιβίνη και Nodal, και οι SMAD1, SMAD5 και SMAD8 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους BMP παράγοντες. (β) Η συν-διαμεσολαβούσα SMAD4 (Co-mediator SMAD4, Co-SMAD4), η οποία είναι κοινή για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ, και η οποία δημιουργεί ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-SMADs οπότε και μεταφέρονται στον πυρήνα για να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή, και (γ) οι ανασταλτικές SMAD (Inhibitory SMADs, I-SMADs) SMAD6 και SMAD7 που αναστέλλουν τη δράση των R-SMADs κυρίως παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα (Lutz and Knaus, 2002; Moustakas et al., 2001; Shi and Massague, 2003).

1.1.6.1 Δομικά χαρακτηριστικά των SMAD Διαμεσολαβητών

Οι R-SMADs και η Co-SMAD μοιάζουν δομικά και αποτελούνται από την N-τελική MH1 περιοχή (Mad homology domain 1) και την C-τελική MH2 (Mad homology 2) περιοχή. Μεταξύ τους συνδέονται από την περιοχή σύνδεσης (linker domain) η οποία είναι πλούσια σε προλίνες και διαφέρει αρκετά ως προς την αμινοξική της αλληλουχία μεταξύ των διαφόρων SMAD (Εικόνα 1.9).



TiBS

Εικόνα 1.9. Δομή των R-SMAD, SMAD4 και I-SMAD. Η MH1 (σκούρο ρόζ τμήμα) και η MH2 (κυανό) δομικές περιοχές είναι συντηρημένες ανάμεσα στις SMAD πρωτεΐνες. Δύο περιοχές που είναι συντηρημένες μεταξύ των R-SMAD, αλλά δεν απαντώνται σε άλλες SMAD επισημαίνονται με αχνό ρόζ. Μη συντηρημένες περιοχές (συμπεριλαμβανομένης της συνδετικής-linker) φαίνονται με κίτρινο. Η SMAD2 περιέχει δύο παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες (inserts) (L1 και εξόνιο 3) οι οποίες δεν συναντώνται σε άλλες R-SMAD. Επισημαίνονται ακόμη πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με ειδικά δομικά μοτίβα πάνω στις SMAD2 και SMAD3. Τα μοτίβα αυτά είναι η β1'-πτυχωτή επιφάνεια (β1', σκούρο μπλέ), η έλικα 2 (H2, κόκκινο), οι β-πτυχωτές επιφάνειες 8 και 9 (β8/9, κόκκινο), η L3 δομή θηλιάς (L3, πράσινο), η έλικα 5 (H5, καφέ), και το καρβόξυ-τελικό pSXpS μοτίβο φωσφορυλίωσης των R-SMAD (μαύρο). Η MH1 περιοχή των SMAD3 και SMAD4 προσδέεται στο DNA, μια αλληλεπίδραση που απαιτεί ιόντα ψευδαργύρου. Τα SIM (SMAD interaction motif) και FM (Fast or FoxH1 motif) είναι μοτίβα αλληλεπίδρασης με ορισμένους από τους πιο γνωστούς μεταγραφικούς παράγοντες.

NUPs, nucleoporins; PY, το PPxY μοτίβο που διαμεσολαβεί την πρόσδεση με Smurf1 και Smurf2; NES, (nuclear export signal) σήμα εξόδου από τον πυρήνα; NLS, (nuclear localization signal) σήμα εισόδου στον πυρήνα; SAD, SMAD activation domain (ten Dijke and Hill, 2004).



Η περιοχή MH1 χαρακτηρίστηκε αρχικά για την ικανότητά της να αναστέλλει τη δράση των R-SMAD μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή MH2 (Hata et al., 1997). Είναι ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή σε όλες τις R-SMADs και στην SMAD4, όχι όμως στις I-SMADS. Επιπλέον, η περιοχή MH1 είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των R-SMAD στο DNA, (μόνο η SMAD3 έχει την ικανότητα να προσδένεται άμεσα στο DNA (Kim et al., 1997) μέσω μιας δομής β-φουρκέτας (β-hairpin)), καθώς και για την αλληλεπίδρασή τους με μεταγραφικούς παράγοντες. Τέλος, στην περιοχή αυτή περιέχονται θέσεις φωσφορυλίωσης καθώς και η αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα, NLS (Lutz and Knaus, 2002).

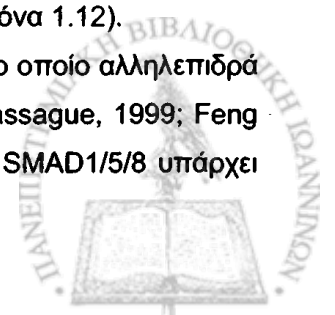
Η περιοχή MH2 είναι υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στις SMAD πρωτεΐνες και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, τη δημιουργία ομο-διμερών ή ετερο-τριμερών μεταξύ των R-SMAD-SMAD4 (Lagna et al., 1996), αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες, με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA μέσω της α-έλικας αH-2 (Chen et al., 1997) και με συνενεργοποιητές και αποσιωποποιητές (Janknecht et al., 1998; Wotton and Massague, 2001). Επιπλέον, περιέχει το καρβόξυ-τελικό μοτίβο Ser-X-Ser στο οποίο φωσφορυλιώνονται οι R-SMADS από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I. Ακόμη, εδώ απαντάται και η περιοχή πρόσδεσης με την πρωτεΐνη SARA (Wu et al., 2000). Τέλος, στην περιοχή MH2 εμπεριέχεται μια αλληλουχία-σήμα εξόδου από τον πυρήνα (NES, Nuclear Export Signal), ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό των πρωτεϊνών (Lutz and Knaus, 2002; Moustakas et al., 2001).

Η περιοχή που συνδέει τις MH1 και MH2 (Linker domain), εμπεριέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις πρωτεϊνικές κινάσες MAPK (Kretzschmar et al., 1999). Όταν οι SMAD φωσφορυλιωθούν σε αυτήν την περιοχή, παρεμποδίζεται η είσοδος τους στον πυρήνα (αναλύεται διεξοδικότερα παρακάτω). Επιπλέον, μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνη και τυροσίνη (PY motif), η οποία απαντάται στις R-SMADs και στις I-SMADS, διευκολύνει την αναγνώριση τους από τις λιγάσες ουβικιτινυλίωσης Smurf (Ebisawa et al., 2001; Kavsak et al., 2000). Ειδικά για την SMAD4 στη συνδετική περιοχή βρίσκεται η αλληλουχία NES και η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της μεταγραφικής ικανότητας των SMAD (SAD: SMAD Activation Domain) (de Caestecker et al., 2000).

1.1.6.2 Φωσφορυλίωση των R-SMAD από την κινάση του υποδοχέα τύπου I

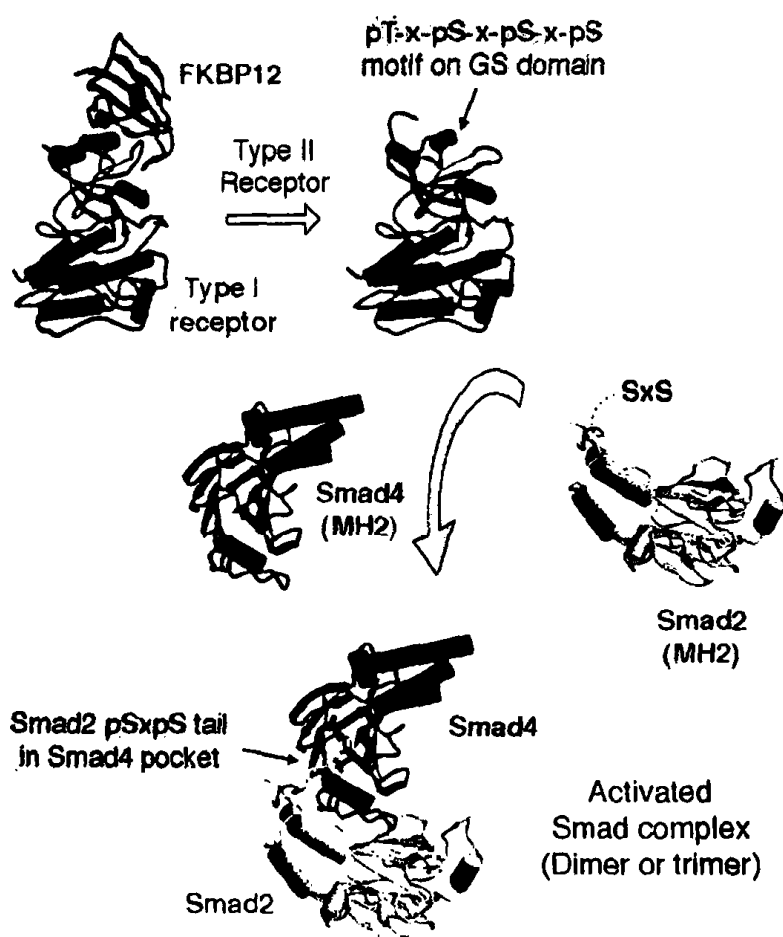
Μια αλληλουχία μέσα στην περιοχή με δραστικότητα κινάσης του TβR-I, η θηλιά-L45 (L45 loop) είναι αποφασιστικής σημασίας για την πρόσδεση και ενεργοποίηση των SMAD. Στην θηλιά L45, αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στους τύπου I υποδοχείς του TGFβ και των BMPs προσδίδουν την εξειδίκευση ως προς το ποιες SMAD θα προσδεθούν και θα ενεργοποιηθούν από τον υποδοχέα, διαχωρίζοντας έτσι τα σηματοδοτικά μονοπάτια ανάμεσα στα μέλη της υπεροικογένειας των TGFβ κυτοκινών (Chen et al., 1998; Feng and Derynck, 1997; Persson et al., 1998) (Εικόνα 1.12).

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας αναγνωρίζει την R-SMAD με το τμήμα του L45, το οποίο αλληλεπιδρά με το τμήμα L3 και με την α-έλικα αH-1 της αντίστοιχης R-SMAD (Chen and Massague, 1999; Feng and Derynck, 1997; Lo et al., 1998) (Εικόνα 1.11). Ανάμεσα στις SMAD2/3 και SMAD1/5/8 υπάρχει



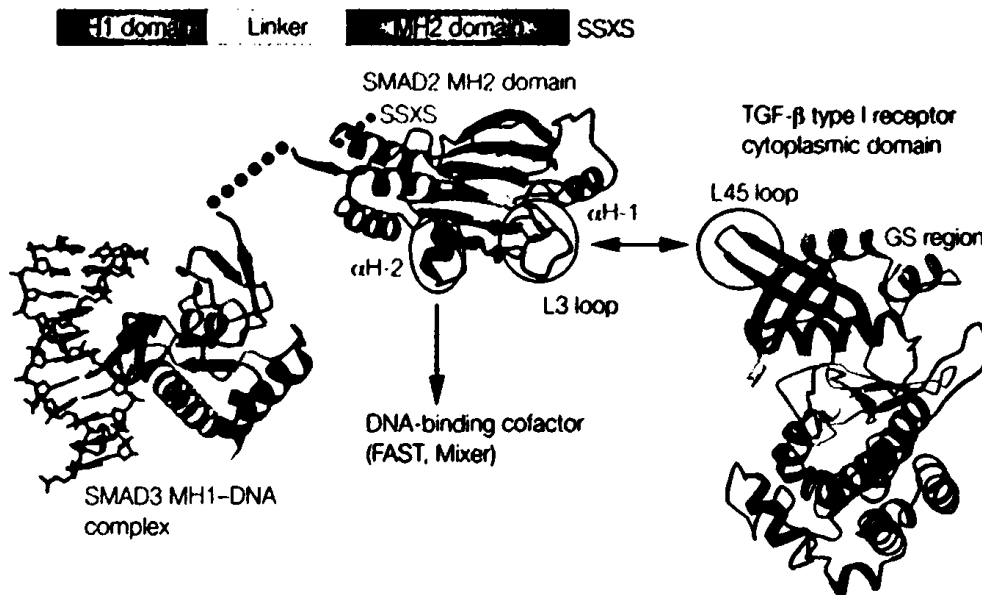
διαφορά δύο αμινοξέων στο τμήμα L3, που είναι αρκετή για να καθορίσει την εξειδίκευση του υποδοχέα (Chen et al., 1998) (Εικόνα 1.12). Οι R-SMADs φωσφορυλιώνονται στις δύο τελευταίες σερίνες του C-τελικού τους άκρου και συγκεκριμένα στην αλληλουχία SSXS (Abdollah et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1997). Φωσφορυλίωση των SMAD2/3 συνεπάγεται την αποδέσμευσή τους από τις πρωτεΐνες κατακράτησής τους στο κυτταρόπλασμα, όπως, από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I, τη SARA, τους μικροσωληνίσκους (Dong et al., 2000), την πρωτεΐνη διασύνδεσης με την ακτίνη, φιλαμίνη (Sasaki et al., 2001), με τις οποίες συνδέονται στην ανενεργή μορφή τους. Η αποδέσμευση αυτή επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους με την SMAD4 και τη μεταφορά του συμπλόκου στον πυρήνα (Xu et al., 2000) (Εικόνα 1.10).

Η αλληλεπίδραση μεταξύ των R-SMADs/SMAD4 για τη δημιουργία του συμπλόκου γίνεται μέσω της C-τελικής αλληλουχίας pSer-X-pSer των R-SMAD και μιας βασικής επιφάνειας στην MH2 περιοχή της SMAD4 (Wu et al., 2001).

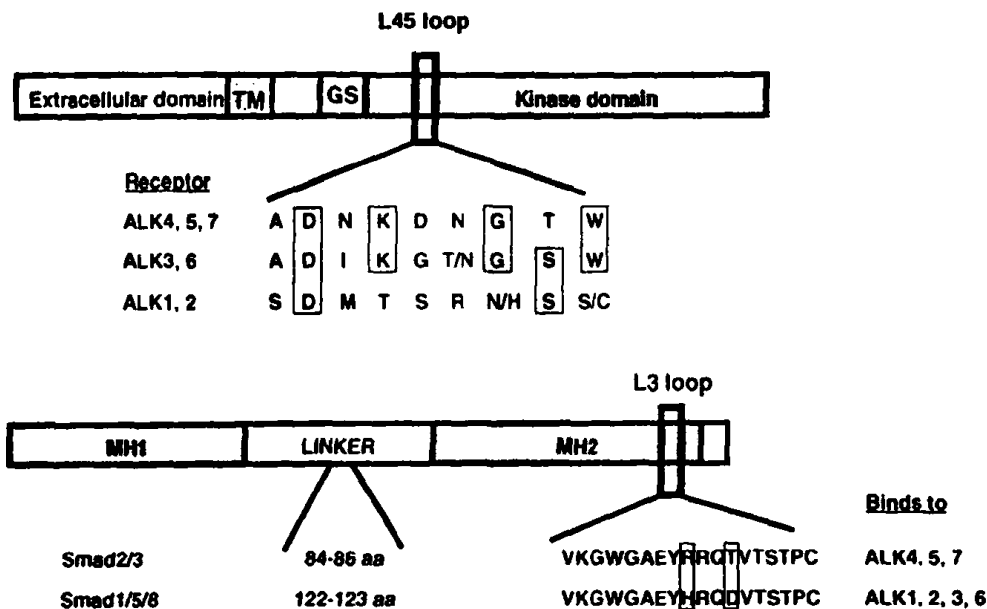


Εικόνα 1.10. Ενεργοποίηση του υποδοχέα τύπου I και σχηματισμός ενεργοποιημένου συμπλόκου SMAD πρωτεϊνών. Η φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα στην περιοχή GS από τον τύπου II οδηγεί στην αποδέσμευσή του από την ανασταλτική πρωτεΐνη FKBP12 και στο σχηματισμό επαναλαμβανόμενου μοτίβου pSer-x-pSer το οποίο προσελκύει τις R-SMADS και φωσφορυλιώνει δύο κατάλοιπα σερίνης στο καρβοξυτελικό άκρο τους σε αλληλουχία Ser-Val-Ser (Ser-Met-Ser για SMAD2). Οι φωσφορυλιωμένες σερίνες αποτελούν μια αρνητικά φορτισμένη ουρά η οποία αλληλεπιδρά με μια βασική επιφάνεια στην MH2 περιοχή της SMAD4. Έτσι, σχηματίζονται ολιγομερή ενεργοποιημένα σύμπλοκα R-SMAD-SMAD4 τα οποία μετακινούνται στον πυρήνα και ρυθμίζουν την μεταγραφή σε συνεργασία με άλλους παράγοντες (Massague et al., 2005).

Εκτός από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη φωσφορυλίωση της καρβοξυτελικής SSXS αλληλουχίας των R-SMADS από άλλες πρωτεΐνες. Ενεργοποίηση κυτάρων R1B, Mn1Lu, HepG2 με τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (Hepatocyte Growth Factor, HGF) οδήγησε σε αύξηση της SSXS φωσφορυλίωσης της SMAD2, η οποία είναι ανεξάρτητη από τον τύπου I υποδοχέα του TGFβ (de Caestecker et al., 1998). Διάσπαση του δικτύου των μικροσωληνίσκων με νοκοδαζόλη ενεργοποιεί την κινάση Mps1, η οποία έχει ως υποστρώματα τις SMAD2 και SMAD3 και τις φωσφορυλιώνει στην SSXS αλληλουχία, επάγοντας TGFβ-ανεξάρτητη ενεργοποίηση των SMAD (Zhu et al., 2007).



Εικόνα 1.11. Απεικόνιση τρισδιάστατων δομών όπου φαίνονται οι περιοχές αλληλεπίδρασης, της SMAD2 με το κυτταροπλασματικό τμήμα του TGF-β υποδοχέα τύπου I και της SMAD3 με το DNA. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας μέσω της L45 περιοχής δομής θηλιάς αλληλεπιδρά εξειδικευμένα με συγκεκριμένη ομάδα SMAD πρωτεϊνών (εδώ φαίνεται η SMAD2) μέσω της L3 περιοχής δομής θηλιάς εντός της MH2 περιοχής. Η αναγνώριση της SMAD1 από τον υποδοχέα ALK1 απαιτεί επίσης την α-έλικα 1 (αH-1). Η α-έλικα 2 (αH-2) διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση με παράγοντες που προσδένουν DNA (όπως FAST, Mixer). Η δομή β-φουρκέτας στην MH1 περιοχή της SMAD3 αλληλεπιδρά με αλληλουχίες του DNA (Massague and Chen, 2000).



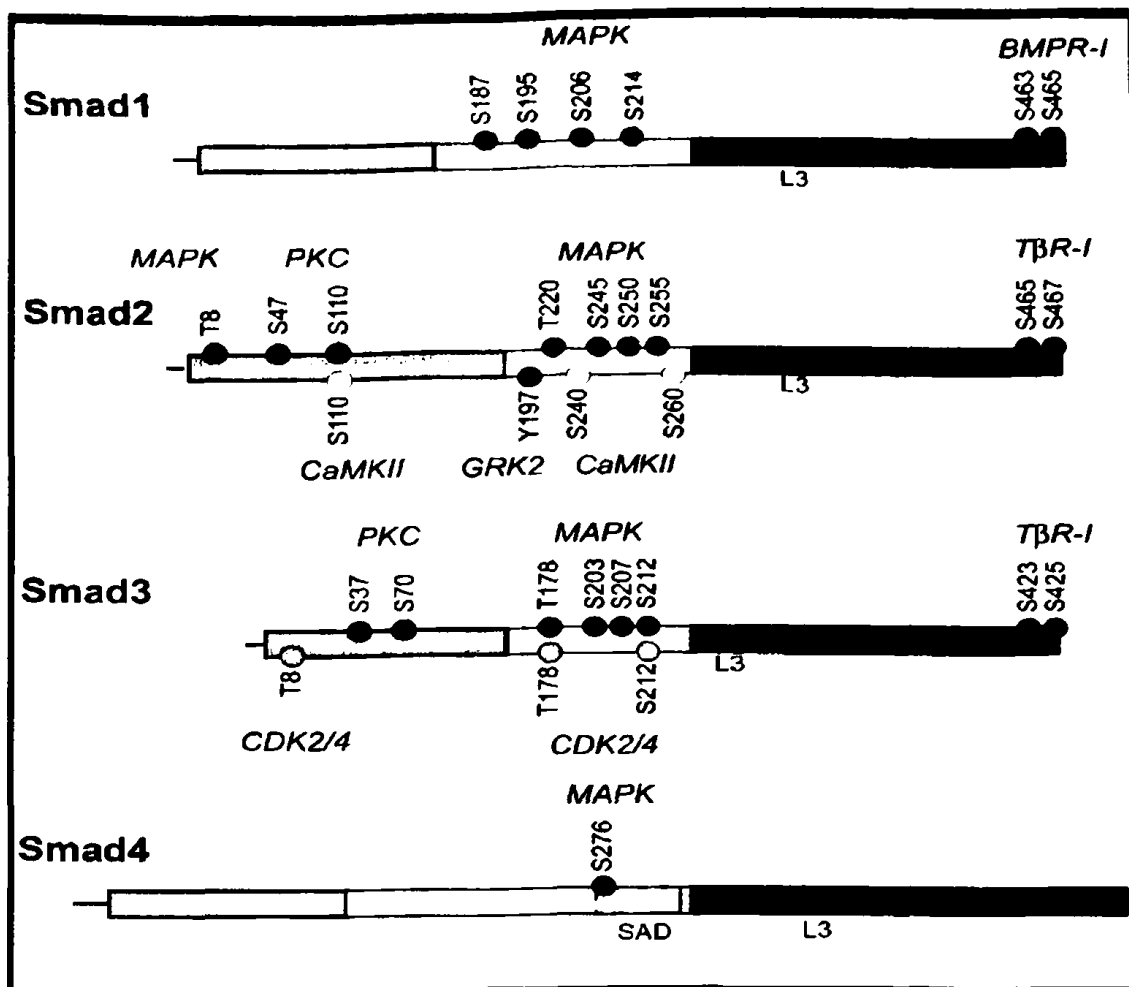
Εικόνα 1.12. Παράγοντες που καθορίζουν την εξειδικευμένη αναγνώριση υποδοχέα-SMAD πρωτεϊνών. Α) Διαφορές αλληλουχίας στην περιοχή δομής θηλιάς L45 εντός της περιοχής κινάσης του υποδοχέα τύπου I, Β) Η αλληλουχία της περιοχής L3 δομής θηλιάς καθορίζει την πρόσδεση συγκεκριμένης ομάδας των R-SMADS στον υποδοχέα (Valdimarsdottir and Mummery, 2005).

1.1.6.3 Φωσφορυλίωση των SMADs από άλλες κινάσες

Εκτός από την αλληλουχία SSXS, στις R-SMADs υπάρχουν και άλλες θέσεις φωσφορυλίωσης. Έτσι, διάφορες κινάσες όπως η ERK1/2, η CamKII (Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II), η πρωτεϊνική κινάση PKC, οι CDK2/4 (G1 cyclin-dependent kinases), η GRK2 (G-coupled receptor kinase-2) φωσφορυλιώνουν μέλη των R-SMAD (SMAD1, SMAD2 και SMAD3) και επηρεάζουν τη δραστηριότητά τους και την κυτταρική εντόπισή τους.

Ως γνωστόν, ο TGFβ επάγει την ενεργοποίηση των MAPK κινασών (Kamaraju and Roberts, 2005; Mulder, 2000; Nohe et al., 2004; Yamaguchi et al., 1995). Οι ERK1/2, p38 και JNK, με τη σειρά τους, φωσφορυλιώνουν τις R-SMAD και SMAD4 σε κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης (Javelaud and Mauviel, 2005). Αυτές οι θέσεις φωσφορυλίωσης βρίσκονται κυρίως στο συνδετικό τμήμα των SMAD, αλλά έχουν αναφερθεί και στην MH1 περιοχή της SMAD2. Το αποτέλεσμα αυτών των φωσφορυλίωσεων μπορεί να είναι ενισχυτικό ή κατασταλτικό για την σηματοδότηση από τον TGFβ, σε κάθε περίπτωση όμως είναι ειδικό για κάθε τύπο κυττάρου (Ross and Hill, 2008).

Οι ERK1/2 φωσφορυλιώνουν συγκεκριμένα κατάλοιπα στο συνδετικό τμήμα που για την SMAD2 είναι τα: Thr8, Thr220, Ser 245, Ser250, Ser255 (Funaba et al., 2002; Kretzschmar et al., 1999), ενώ για την SMAD3 είναι τα: Thr178, Ser203, Ser207, Ser212 (Kretzschmar et al., 1999; Matsuura et al., 2005) (Εικόνα 1.13).



Εικόνα 1.13. Φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών στο συνδετικό τμήμα.

Αυτές οι φωσφορυλιώσεις επάγονται από μιτογόνα όπως ο EGF και ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας, HGF. Ενεργοποίηση του JNK μονοπατιού από την συνχρήγηση HGF και TGFβ σε φυσιολογικά κύτταρα γαστρικού βλεννογόνου επίμυος προκάλεσε την αύξηση της διεισδυτικής τους ικανότητας, η οποία προκλήθηκε εν μέρει από την επαγωγή του ενεργοποιητή του αναστολέα του πλασμινογόνου τύπου I (plasminogen activator inhibitor type I, PAI-1), διαμέσου της φωσφορυλίωσης της SMAD3 στο συνδετικό τμήμα (Mori et al., 2004). Επίσης τα κατάλοιπα Ser203 και Ser207 στην SMAD3 αποτελούν στόχους για την ρ38 MAPK και τα Rho/ROCK μονοπάτια (Kamaraju and Roberts, 2005). Πειραματικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι αυτές οι φωσφορυλιώσεις έχουν ενεργοποιητικό ρόλο στην από τον TGFβ επαγόμενη ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς με μηχανισμό που εξασφαλίζει την σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων στον πυρήνα μεταξύ R-SMAD και SMAD4 ή και με συνενεργοποιητές όπως το ρ300 (Brown et al., 1999; de Caestecker et al., 1998; Engel et al., 1999; Funaba et al., 2002). Ενισχυτική επίσης είναι η συνεισφορά της φωσφορυλίωσης του καταλοίπου της θρεονίνης 276 εντός του συνδετικού τμήματος της SMAD4 από την ERK (Roelen et al., 2003). Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να ερμηνεύσουν τη συνεργιστική δράση των TGFβ και MAPK σηματοδοτικών μονοπατιών κατά τη διάρκεια αναπτυξιακών διαδικασιών (LaBonne and Whitman, 1994).



Αντίθετα, ενεργοποίηση των ERK1/2 από την ογκογόνο RAS προκάλεσε αναστολή της από τον TGFβ επαγόμενης αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Σε αυτή την περίπτωση, η φωσφορυλίωση του συνδετικού τμήματος των SMAD2/3 ανέστειλε την μετακίνηση των SMAD στον πυρήνα και κατ' επέκταση τη μεταγραφική ενεργοποίηση (Kretzschmar et al., 1999). Επιπλέον, μετάλλαξη των ERK1/2 επαγόμενων θέσεων φωσφορυλίωσης της SMAD3 προκάλεσε αύξηση της SMAD3-εξαρτώμενης μεταγραφής μετά από χορήγηση EGF σε Mv1Lu (mink lung) επιθηλιακά κύτταρα, αποδίδοντας ανασταλτικό ρόλο στις από τις ERK1/2 επαγόμενες φωσφορυλίώσεις (Matsuura et al., 2005). Πρόσφατα, η GRK2 (G-coupled receptor kinase-2) κινάση, η οποία ως γνωστόν εμπλέκεται στην απευαισθητοποίηση των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G πρωτεΐνες (Jurado-Pueyo et al., 2008), βρέθηκε ότι ρυθμίζει αρνητικά την από TGFβ/Ακτιβίνη επαγόμενη σηματοδότηση, τόσο στα φυσιολογικά όσο και σε καρκινικά ηπατοκύτταρα. Συγκεκριμένα, η GRK2 αλληλεπιδρά με τις SMAD2/SMAD3 και φωσφορυλιώνει το συνδετικό τμήμα τους, παρεμποδίζοντας έτσι τη φωσφορυλίωσή (στο καρβοξυτελικό τμήμα) τους από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I (Ho et al., 2005).

1.1.6.4 Ολιγομερισμός των SMADs

Η ακριβής στοιχειομετρική αναλογία των SMADs στο σχηματισμό των ομο- ή ετερομερών SMAD συμπλόκων αποτελεί αντικείμενο επιστημονικής διαφωνίας. Απουσία προσδέματος, οι SMADs υφίστανται ως μονομερή στη βασική τους κατάσταση (Kawabata et al., 1998). Κάτι τέτοιο φαίνεται να ισχύει στην περίπτωση της SMAD2 λόγω του εξονίου 3 που παρεμβάλλεται στην αλληλουχία της και το οποίο αποκλείει τον ομο-ολιγομερισμό της (Jayaraman and Massague, 2000; Wu et al., 2001). Αλλά και για την SMAD1 φαίνεται να ευνοείται η μονομερής κατάσταση (Qin et al., 2001). Αντίθετα, η SMAD3 συναντάται σε μια ποικιλία καταστάσεων ολιγομερισμού (Chacko et al., 2001; Jayaraman and Massague, 2000). Σε ότι αφορά την SMAD4 οι απόψεις δίστανται. Σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της MH2 περιοχής της SMAD4 (Shi et al., 1997) προτάθηκε ότι η SMAD4 υφίσταται ως ομοτριμερές απουσία προσδέματος. Ωστόσο, πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η SMAD4 πρέπει να είναι μονομερές λόγω της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας στην MH2 περιοχή (μια επέκταση της δομής της που αναφέρεται ως "ΠΥΡΓΟΣ", TOWER) που εμποδίζει τον ομο-ολιγομερισμό της (Correia et al., 2001; Tada et al., 1999).

Κατά την ενεργοποίηση με Ακτιβίνη ή TGFβ σχηματίζονται ετερομερή σύμπλοκα R-SMAD/SMAD4 τα οποία ποικίλουν σε μέγεθος (έχουν περιγραφεί τόσο διμερή, όσο και τριμερή) όπως τα SMAD2/SMAD4 ή όπως τα SMAD3/SMAD4, αντίστοιχα, ενώ έχουν βρεθεί και σχηματισμοί που ξεπερνούν τα 650KDa (Jayaraman and Massague, 2000). Κυριαρχεί επίσης, το μοντέλο της διμερούς SARA που λειτουργεί ως «φύλακας» εμποδίζοντας τον ανεξέλεγκτο σχηματισμό SMAD ολιγομερών (Moustakas and Heldin, 2002), τα οποία σταθεροποιούνται με συνδέσεις μεταξύ της φωσφορυλιωμένης ουράς και της δομής L3 αγκύλης (L3 loop) ενός γειτονικού μονομερούς (Chacko et al., 2001; Wrana, 2002). Οι ενδογενείς ενεργοποιημένες SMADS μπορούν να υφίστανται στα μεταγραφικά σύμπλοκα σε διάφορες αναλογίες (ως ομοδιμερή ή ετεροτριμερή) (Chacko et al., 2001; Inman and Hill, 2002; Wu et al., 2001) και αυτό εξαρτάται από τον μεταγραφικό παράγοντα με τον

οποίο αλληλεπιδρούν. Για παράδειγμα, όταν πρόκειται για τους μεταγραφικούς παράγοντες FAST-1 ή FAST-3 η αναλογία SMAD2/SMAD4 είναι 2:1 (Inman and Hill, 2002; Randall et al., 2004).

1.1.6.5 Είσοδος και έξοδος των SMAD στον πυρήνα του κυττάρου

Ο ακριβής μηχανισμός μετακίνησης των SMAD πρωτεϊνών διαμέσου του πυρηνικού πόρου είναι αμφιλεγόμενος. Σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται η συμμετοχή πρωτεϊνών που ονομάζονται *καρυοφερίνες* (*karyopherins*, ιμπορτίνες και εξπορτίνες) ενώ σε άλλες πάλι όχι.

Χωρίς την παρουσία προσδέματος οι R-SMADs εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα η SMAD4 μετακινείται συνεχώς μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (Nicolas et al., 2004). Η συνεχής μετακίνηση της SMAD4 οφείλεται στη συνδυασμένη δράση ενός μόνιμα ενεργού σήματος πυρηνικής εντόπισης (NLS), που βρίσκεται στην MH1 περιοχή, και ενός μόνιμα ενεργού σήματος πυρηνικής εξόδου (NES) πλούσιου σε λευκίνη, που εντοπίζεται στην αμινο-τελική περιοχή του συνδετικού τμήματος (Pierreux et al., 2000; Watanabe et al., 2000). Η SMAD4 μπορεί να εισέρχεται στον πυρήνα διαμέσου της αλληλεπίδρασης του σήματος πυρηνικής εντόπισης (NLS) με την ιμπορτίνη-α1 (Xiao et al., 2003). Η δραστικότητα του NES εξαρτάται από την πρόσδεση με τον υποδοχέα πυρηνικής μεταφοράς, εξπορτίνη-1 (XPO1, γνωστό και ως CRM1; Chromosome Region Maintenance 1). Κατά το σχηματισμό των ενεργοποιημένων συμπλόκων R-SMAD-SMAD4, το NES επικαλύπτεται. Με αυτό τον τρόπο ο TGFβ επιβάλλει στα σύμπλοκα να παραμένουν εγκλωβισμένα στον πυρήνα (Chen et al., 2005). Μια εναλλακτική μορφή της SMAD4, η XSMAD4β (υπάρχει μόνο στον *Xenopus laevis*) η οποία στερείται NES εντοπίζεται μόνιμα στον πυρήνα (Masuyama et al., 1999), υποδηλώνοντας ότι αυτό το μοτίβο είναι απαραίτητο για την έξοδο της SMAD4 από τον πυρήνα.

Ανάλυση της κινητικότητας των SMADs μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα σε ζώντα κύτταρα απέδειξε ότι δεν πρόκειται για στατικές πρωτεΐνες, αλλά ότι μετακινούνται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα τόσο απουσία όσο και παρουσία επαγωγέα (Nicolas et al., 2004). Οι φωσφορυλιωμένες SMAD2 και SMAD3 αλληλεπιδρούν άμεσα με συστατικά του πυρηνικού πόρου, τις νουκλεοπορίνες CAN/Nup214 και Nup153 διαμέσου ενός υδρόφοβου τμήματος στην MH2 περιοχή (Brown et al., 2007; Xu et al., 2003; Xu et al., 2002). Επιπλέον, η φωσφορυλιωμένη SMAD3 μπορεί να μεταφέρεται στον πυρήνα διαμέσου του NLS της (αλληλουχία πλούσια σε λυσίνες, Lys-Lys-Leu-Lys), που βρίσκεται στην MH1 περιοχή και το οποίο αλληλεπιδρά άμεσα με την ιμπορτίνη-β1, μια διαδικασία η οποία απαιτεί τη RAN-GTPάση (Kurisaki et al., 2001; Xiao et al., 2000a; Xiao et al., 2000b). Αντίθετα, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση της SMAD2 με την ιμπορτίνη-β, λόγω της ένθεσης 30 αμινοξέων στην περιοχή MH1 που εμποδίζουν αυτή την αλληλεπίδραση (Kurisaki et al., 2001). Ανάλογο μοτίβο πυρηνικής εισόδου απαιτείται για την SMAD1 (Xiao et al., 2001) αλλά άμεση πρόσδεση σε υποδοχέα εισόδου δεν έχει αποδειχθεί. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι ο υποδοχέας εισόδου Moleskin (MSK) στη *Drosophila melanogaster* καθώς και τα ομόλογά του στα θηλαστικά, ιμπορτίνη-7 και ιμπορτίνη-8 είναι απαραίτητα για την πυρηνική εντόπιση των ενεργοποιημένων MAD και SMAD1, SMAD2, SMAD3 *in vivo* μετά από επαγωγή με πρόσδεμα (Xu et al., 2007). Και οι δύο αυτοί μεταφορείς αλληλεπιδρούν άμεσα με την MH1 περιοχή και το συνδετικό τμήμα των R-SMADs, ανεξάρτητα από την κατάσταση ενεργοποίησης τους ή όχι. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητοι για την είσοδο στον πυρήνα των ανενεργών SMADs. Τα ενεργοποιημένα από TGFβ σύμπλοκα



SMAD3/SMAD4 μεταφέρονται στον πυρήνα με μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος της ιμφορτίνης. Σε αυτή την περίπτωση η SMAD3 είναι αυτή που ρυθμίζει την είσοδο του συμπλόκου στον πυρήνα ενώ η μονομερής SMAD4 φαίνεται πως χρησιμοποιεί άλλες νουκλεοπορίνες προκειμένου να εισέλθει στον πυρήνα (Chen et al., 2005). Το ίδιο πρέπει να ισχύει και για τα σύμπλοκα SMAD2/SMAD4 αφού η περιοχή που μελετήθηκε για την SMAD3 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την αντίστοιχη της SMAD2 (Chen et al., 2005).

Παρατεταμένη ενεργοποίηση επιθηλιακών κυττάρων με TGFβ οδηγεί τις R-SMADs σε συνεχή είσοδο προς τον πυρήνα και έξοδο προς το κυτταρόπλασμα. Οι R-SMADs που εξέρχονται προς το κυτταρόπλασμα είναι αποφωσφορυλιωμένες και αποδεσμευμένες από την SMAD4 (Inman et al., 2002; Pierreux et al., 2000). Η έξοδος των R-SMADs από τον πυρήνα είναι CRM1-ανεξάρτητη και διαμεσολαβείται από τις νουκλεοπορίνες CAN/Nup214 και Nup153 που είναι υπεύθυνες και για την είσοδο στον πυρήνα (Xu et al., 2002). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η έξοδος της SMAD3 από τον πυρήνα μπορεί να διαμεσολαβείται από την εξαπορτίνη-4 (Kurisaki et al., 2006). Αναφορικά με την SMAD2 είναι γνωστό ότι η έξοδος της από τον πυρήνα δεν διαμεσολαβείται από καρυοφερίνες (Xu et al., 2002). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε η φωσφατάση που είναι υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση των R-SMADs. Πρόκειται για την PPM1A/PP2Ca, πρωτεϊνική φωσφατάση 1A, μαγνήσιο εξαρτώμενη/ πρωτεϊνική φωσφατάση 2Ca (Lin et al., 2006). Αν οι υποδοχείς εξακολουθούν να είναι ενεργοποιημένοι, οι αποφωσφορυλιωμένες R-SMADs επαναφωσφορυλιώνονται και επιστρέφουν στο πυρήνα. Αν οι υποδοχείς δεν είναι πλέον ενεργοί οι R-SMADs κατακρατούνται στο κυτταρόπλασμα. Με αυτό τον μηχανισμό τα επίπεδα των ενεργοποιημένων SMADs που βρίσκονται στο πυρήνα αντανακλούν άμεσα τα επίπεδα των ενεργοποιημένων υποδοχέων του κυτταροπλάσματος (Inman et al., 2002).

1.1.6.6 Πρόσδεση των SMAD πρωτεϊνών στο DNA

Η SMAD4 και όλες οι R-SMADs, εκτός από την SMAD2, έχουν την ικανότητα της άμεσης πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA. Αρχικά, ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία 5'-GTCTAGAC-3' του DNA στην οποία μπορεί να προσδένονται η SMAD3 και η SMAD4 (Zawel et al., 1998). Αργότερα αποδείχθηκε ότι η ελάχιστη αλληλουχία για την πρόσδεση της SMAD4 και SMAD3 στο DNA (SBE, SMAD Binding Element) περιέχει μόνο τέσσερα ζεύγη βάσεων 5'-AGAC-3' ή τη συμπληρωματική τους 3'-GTCT-5' (Dennler et al., 1998; Yingling et al., 1997; Zawel et al., 1998), αν και οι περισσότερες φυσιολογικές ακολουθίες DNA που υπάρχουν περιέχουν μία επιπλέον βάση C στο άκρο 5'. Η κρυσταλλική δομή της SMAD3 συνδεδεμένης με την ακολουθία SBE έδειξε ότι η υψηλά διατηρημένη δομή β-φουρκέτας (β-hairpin) συνδέεται ειδικά με τρεις βάσεις της ακολουθίας SBE (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998). Η υψηλά συντηρημένη δομή β-φουρκέτας υποδεικνύει ότι όλες οι R-SMAD μπορούν να συνδέονται ειδικά στην ακολουθία SBE (Shi et al., 1998). Συγκρινόμενη με τις άλλες R-SMAD, η SMAD2 περιέχει μια ένθεση 30 καταλοίπων μεταξύ της β-φουρκέτας και της έλικας H2 που δεν επιτρέπει την άμεση πρόσδεση της στο DNA, πιθανότατα λόγω της μετατόπισης της διαμόρφωσης β-φουρκέτας (Shi et al., 1998). Η αλληλουχία AGAC εκτός από τον υποκινητή του γονιδίου *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) όπου ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά εμφανίζεται και σε άλλους υποκινητές γονιδίων στόχων του TGFβ, όπως του *JunB* (Jonk et al., 1998) *COL7A1*

οποίο αλληλεπιδρούν. Για παράδειγμα, όταν πρόκειται για τους μεταγραφικούς παράγοντες FAST-1 ή FAST-3 η αναλογία SMAD2/SMAD4 είναι 2:1 (Inman and Hill, 2002; Randall et al., 2004).

1.1.6.5 Είσοδος και έξοδος των SMAD στον πυρήνα του κυττάρου

Ο ακριβής μηχανισμός μετακίνησης των SMAD πρωτεϊνών διαμέσου του πυρηνικού πόρου είναι αμφιλεγόμενος. Σε ορισμένες περιπτώσεις αναφέρεται η συμμετοχή πρωτεϊνών που ονομάζονται *καρυοφερίνες* (*karyopherins*, ιμφορτίνες και εξπορτίνες) ενώ σε άλλες πάλι όχι.

Χωρίς την παρουσία προσδέματος οι R-SMADs εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα η SMAD4 μετακινείται συνεχώς μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα (Nicolas et al., 2004). Η συνεχής μετακίνηση της SMAD4 οφείλεται στη συνδυασμένη δράση ενός μόνιμα ενεργού σήματος πυρηνικής εντόπισης (NLS), που βρίσκεται στην MH1 περιοχή, και ενός μόνιμα ενεργού σήματος πυρηνικής εξόδου (NES) πλούσιου σε λευκίνη, που εντοπίζεται στην αμινο-τελική περιοχή του συνδετικού τμήματος (Pierreux et al., 2000; Watanabe et al., 2000). Η SMAD4 μπορεί να εισέρχεται στον πυρήνα διαμέσου της αλληλεπίδρασης του σήματος πυρηνικής εντόπισης (NLS) με την ιμφορτίνη-α1 (Xiao et al., 2003). Η δραστηριότητα του NES εξαρτάται από την πρόσδεση με τον υποδοχέα πυρηνικής μεταφοράς, εξπορτίνη-1 (XPO1, γνωστό και ως CRM1; Chromosome Region Maintenance 1). Κατά το σχηματισμό των ενεργοποιημένων συμπλόκων R-SMAD-SMAD4, το NES επικαλύπτεται. Με αυτό τον τρόπο ο TGFβ επιβάλλει στα σύμπλοκα να παραμένουν εγκλωβισμένα στον πυρήνα (Chen et al., 2005). Μια εναλλακτική μορφή της SMAD4, η XSMAD4β (υπάρχει μόνο στον *Xenopus laevis*) η οποία στερείται NES εντοπίζεται μόνιμα στον πυρήνα (Masuyama et al., 1999), υποδηλώνοντας ότι αυτό το μοτίβο είναι απαραίτητο για την έξοδο της SMAD4 από τον πυρήνα.

Ανάλυση της κινητικότητας των SMADs μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα σε ζώντα κύτταρα απέδειξε ότι δεν πρόκειται για στατικές πρωτεΐνες, αλλά ότι μετακινούνται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα τόσο απουσία όσο και παρουσία επαγωγέα (Nicolas et al., 2004). Οι φωσφορυλιωμένες SMAD2 και SMAD3 αλληλεπιδρούν άμεσα με συστατικά του πυρηνικού πόρου, τις νουκλεοπορίνες CAN/Nup214 και Nup153 διαμέσου ενός υδρόφοβου τμήματος στην MH2 περιοχή (Brown et al., 2007; Xu et al., 2003; Xu et al., 2002). Επιπλέον, η φωσφορυλιωμένη SMAD3 μπορεί να μεταφέρεται στον πυρήνα διαμέσου του NLS της (αλληλουχία πλούσια σε λυσίνες, Lys-Lys-Leu-Lys), που βρίσκεται στην MH1 περιοχή και το οποίο αλληλεπιδρά άμεσα με την ιμφορτίνη-β1, μια διαδικασία η οποία απαιτεί τη RAN-GTPάση (Kurisaki et al., 2001; Xiao et al., 2000a; Xiao et al., 2000b). Αντίθετα, δεν υπάρχει αλληλεπίδραση της SMAD2 με την ιμφορτίνη-β, λόγω της ένθεσης 30 αμινοξέων στην περιοχή MH1 που εμποδίζουν αυτή την αλληλεπίδραση (Kurisaki et al., 2001). Ανάλογο μοτίβο πυρηνικής εισόδου απαιτείται για την SMAD1 (Xiao et al., 2001) αλλά άμεση πρόσδεση σε υποδοχέα εισόδου δεν έχει αποδειχθεί. Πρόσφατα, δείχθηκε ότι ο υποδοχέας εισόδου Moleskin (MSK) στη *Drosophila melanogaster* καθώς και τα ομόλογά του στα θηλαστικά, ιμφορτίνη-7 και ιμφορτίνη-8 είναι απαραίτητα για την πυρηνική εντόπιση των ενεργοποιημένων MAD και SMAD1, SMAD2, SMAD3 in vivo μετά από επαγωγή με πρόσδεμα (Xu et al., 2007). Και οι δύο αυτοί μεταφορείς αλληλεπιδρούν άμεσα με την MH1 περιοχή και το συνδετικό τμήμα των R-SMADs, ανεξάρτητα από την κατάσταση ενεργοποίησης τους ή όχι. Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητοι για την είσοδο στον πυρήνα των ανενεργών SMADs. Τα ενεργοποιημένα από TGFβ σύμπλοκα



SMAD3/SMAD4 μεταφέρονται στον πυρήνα με μηχανισμό που είναι ανεξάρτητος της ιμφορτίνης. Σε αυτή την περίπτωση η SMAD3 είναι αυτή που ρυθμίζει την είσοδο του συμπλόκου στον πυρήνα ενώ η μονομερής SMAD4 φαίνεται πως χρησιμοποιεί άλλες νουκλεοτινικές προκειμένου να εισέλθει στον πυρήνα (Chen et al., 2005). Το ίδιο πρέπει να ισχύει και για τα σύμπλοκα SMAD2/SMAD4 αφού η περιοχή που μελετήθηκε για την SMAD3 παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με την αντίστοιχη της SMAD2 (Chen et al., 2005).

Παρατεταμένη ενεργοποίηση επιθηλιακών κυττάρων με TGFβ οδηγεί τις R-SMADs σε συνεχή είσοδο προς τον πυρήνα και έξοδο προς το κυτταρόπλασμα. Οι R-SMADs που εξέρχονται προς το κυτταρόπλασμα είναι αποφωσφορυλιωμένες και αποδεσμευμένες από την SMAD4 (Inman et al., 2002; Pierreux et al., 2000). Η έξοδος των R-SMADs από τον πυρήνα είναι CRM1-ανεξάρτητη και διαμεσολαβείται από τις νουκλεοτινικές CAN/Nup214 και Nup153 που είναι υπεύθυνες και για την είσοδο στον πυρήνα (Xu et al., 2002). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η έξοδος της SMAD3 από τον πυρήνα μπορεί να διαμεσολαβείται από την εξαπορτίνη-4 (Kurisaki et al., 2006). Αναφορικά με την SMAD2 είναι γνωστό ότι η έξοδος της από τον πυρήνα δεν διαμεσολαβείται από καρυοφερίνες (Xu et al., 2002). Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε η φωσφατάση που είναι υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση των R-SMADs. Πρόκειται για την PPM1A/PP2Ca, πρωτεϊνική φωσφατάση 1A, μαγνήσιο εξαρτώμενη/πρωτεϊνική φωσφατάση 2Ca (Lin et al., 2006). Αν οι υποδοχείς εξακολουθούν να είναι ενεργοποιημένοι, οι αποφωσφορυλιωμένες R-SMADs επαναφωσφορυλιώνονται και επιστρέφουν στο πυρήνα. Αν οι υποδοχείς δεν είναι πλέον ενεργοί οι R-SMADs κατακρατούνται στο κυτταρόπλασμα. Με αυτό τον μηχανισμό τα επίπεδα των ενεργοποιημένων SMADs που βρίσκονται στο πυρήνα αντανακλούν άμεσα τα επίπεδα των ενεργοποιημένων υποδοχέων του κυτταροπλάσματος (Inman et al., 2002).

1.1.6.6 Πρόσδεση των SMAD πρωτεϊνών στο DNA

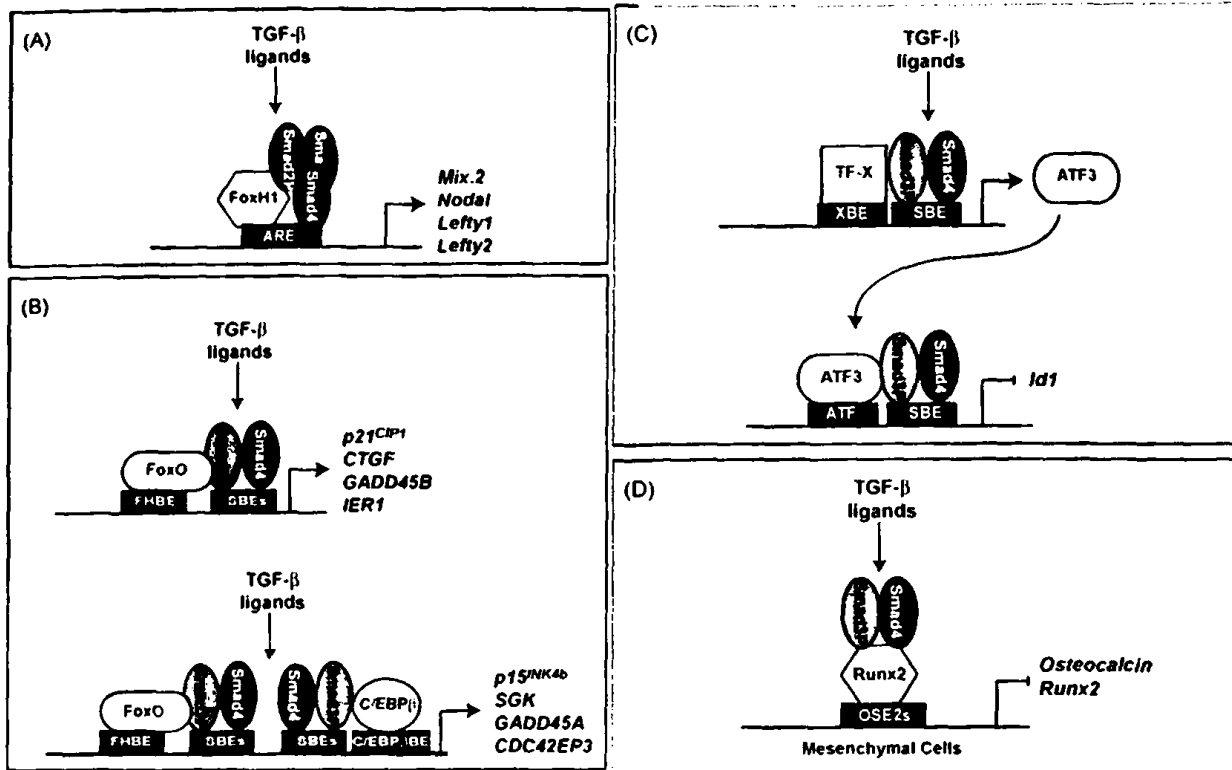
Η SMAD4 και όλες οι R-SMADs, εκτός από την SMAD2, έχουν την ικανότητα της άμεσης πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA. Αρχικά, ταυτοποιήθηκε η αλληλουχία 5'-GTCTAGAC-3' του DNA στην οποία μπορεί να προσδένονται η SMAD3 και η SMAD4 (Zawel et al., 1998). Αργότερα αποδείχθηκε ότι η ελάχιστη αλληλουχία για την πρόσδεση της SMAD4 και SMAD3 στο DNA (SBE, SMAD Binding Element) περιέχει μόνο τέσσερα ζεύγη βάσεων 5'-AGAC-3' ή τη συμπληρωματική τους 3'-GTCT-5' (Dennler et al., 1998; Yingling et al., 1997; Zawel et al., 1998), αν και οι περισσότερες φυσιολογικές ακολουθίες DNA που υπάρχουν περιέχουν μία επιπλέον βάση C στο άκρο 5'. Η κρυσταλλική δομή της SMAD3 συνδεδεμένης με την ακολουθία SBE έδειξε ότι η υψηλά διατηρημένη δομή β-φουρκέτας (β-hairpin) συνδέεται ειδικά με τρεις βάσεις της ακολουθίας SBE (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998). Η υψηλά συντηρημένη δομή β-φουρκέτας υποδεικνύει ότι όλες οι R-SMAD μπορούν να συνδέονται ειδικά στην ακολουθία SBE (Shi et al., 1998). Συγκρινόμενη με τις άλλες R-SMAD, η SMAD2 περιέχει μια ένθεση 30 καταλοίπων μεταξύ της β-φουρκέτας και της έλικας H2 που δεν επιτρέπει την άμεση πρόσδεση της στο DNA, πιθανότατα λόγω της μετατόπισης της διαμόρφωσης β-φουρκέτας (Shi et al., 1998). Η αλληλουχία AGAC εκτός από τον υποκινητή του γονιδίου *PAI-1* (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) όπου ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά εμφανίζεται και σε άλλους υποκινητές γονιδίων στόχων του TGFβ, όπως του *JunB* (Jonk et al., 1998) *COL7A1*

(*human type VII collagen gene*) (Vindevooghel et al., 1998) και *Smad7* (Nagarajan et al., 1999). Επιπλέον, οι SMAD3 και SMAD4 μπορούν επίσης να προσδένονται σε αλληλουχίες πλούσιες στις βάσεις γουανίνη και κυτοσίνη (GC-rich sequences) (Kim et al., 1997; Kusanagi et al., 2000; Labbe et al., 1998; Qing et al., 2000). Επιπροσθέτως, η BMP επαγόμενη SMAD1 προσδένεται σε αλληλουχίες πλούσιες σε GC, GCCGNC ή GRCGNC οι οποίες απαντώνται σε υποκινητές BMP ρυθμιζόμενων γονιδίων όπως *SMAD6*, *Id1*, *Msx2* και το γονίδιο της *Drosophila vestigal* (Brugger et al., 2004; Ishida et al., 2000; Kim et al., 1997; Lopez-Rovira et al., 2002). Συμπερασματικά, η πρόσδεση των SMAD στο DNA είναι σχετικά χαμηλής ειδικότητας και συγγένειας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι SMAD θα πρέπει να συνεργάζονται και με άλλους παράγοντες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA για να προκαλέσουν συγκεκριμένες μεταγραφικές αποκρίσεις (Massague and Wotton, 2000; Shi et al., 1998).

1.1.6.7 Συνεργασία των SMAD με μεταγραφικούς παράγοντες

Μελέτες σε *Xenopus* έμβρυα οδήγησαν στην ταυτοποίηση δυο κατηγοριών μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι μπορούν να στρατολογούν φωσφορυλιωμένα SMAD2-SMAD4 σύμπλοκα στους υποκινητές TGF- β ρυθμιζόμενων γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι εξελικτικά συντηρημένοι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας των Forkhead, FoxH1a (προηγουμένως αποκαλούμενο Fast1) και FoxH1b (προηγουμένως αποκαλούμενα Fast3) στρατολογούν τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα SMAD2-SMAD4 στα στοιχεία απόκρισης σε Ακτιβίνη (ARE; Activin Response Elements) εντός των υποκινητών γονιδίων όπως του Mix.2 (Chen et al., 1996; Chen et al., 1997; Howell et al., 2002) (Εικόνα 1.14A). Επιπλέον, στον *Xenopus* τα μέλη της οικογένειας Mix των μεταγραφικών παραγόντων, Mixer, Milk (Bix2) και Bix3 μπορούν επίσης να στρατολογήσουν τα φωσφορυλιωμένα SMAD2-SMAD4 σύμπλοκα στο ακραίο στοιχείο (DE; distal element) εντός του υποκινητή του γονιδίου *gooseoid* που επάγεται από Ακτιβίνη (Germain et al., 2000; Randall et al., 2002). Κατά ενδιαφέροντα τρόπο, αυτοί οι ανεξάρτητοι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται στην MH2 περιοχή της SMAD2 μέσω ενός κοινού μοτίβου πλούσιου σε προλίνες ονομαζόμενο ως μοτίβο αλληλεπίδρασης με SMAD (SIM; Smad Interacting Motif), το οποίο εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με την περιοχή δέσμευσης των SMAD από το μόριο της SARA (Germain et al., 2000; Randall et al., 2002). Οι παράγοντες FoxH1 περιέχουν επιπρόσθετα ένα Fast/FoxH1 μοτίβο (FM) που αλληλεπιδρά ειδικά με την φωσφορυλιωμένη SMAD2 (Randall et al., 2004). Εάν αυτά τα μοτίβα είναι συντηρημένα σε άλλα SMAD2-αλληλεπιδρώντα μόρια δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί.





Εικόνα 1.14. Στρατολόγηση των συμπλόκων SMAD στους υποκινητές. Παραδείγματα για το πώς οι SMADs στρατολογούνται στους διάφορους υποκινητές γονιδίων στόχων μέσω της διασύνδεσής τους με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες. (Α) Τα ενεργοποιημένα SMAD2-SMAD4 σύμπλοκα στρατολογούνται στο ARE διαμέσω των FoxH1 μεταγραφικών παραγόντων για να επάγουν γονίδια στόχους που αποκρίνονται σε Ακτιβίνη. (Β) Τα ενεργοποιημένα σύμπλοκα SMAD3-SMAD4 μπορούν να συνδεθούν με τους μεταγραφικούς παράγοντες FoxO και C/EBPβ για να ρυθμίσουν TGF-β επαγόμενα γονίδια στόχους που περιέχουν forkhead (FHBE), SMAD3/SMAD4 (SBE) και c/EBPβ-δεσμευτικά στοιχεία. (Γ) Σε απόκριση προς TGF-β προσδέματα, τα ενεργοποιημένα SMAD3-SMAD4 σύμπλοκα σε συνδυασμό με τον άγνωστο παράγοντα μεταγραφής (TF-X) προκαλούν την έκφραση ATF3. Ο ATF3 έπειτα διαμορφώνει ένα μεγαλύτερο σύμπλοκο με αυτό των SMAD3-SMAD4, στον Id1 υποκινητή για να καταστείλει τη μεταγραφή του. (Δ) Τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα SMAD3-SMAD4 στρατολογούνται στα Runx2-δεσμευτικά στοιχεία (OSE2's) εντός γονιδίων όπως της osteocalcin από τον μεταγραφικό παράγοντα Runx2 για να καταστείλουν τη μεταγραφή κατά κύτταρο-ειδικό τρόπο (Ross and Hill, 2008).

Εκτός από την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων FoxH1 και Mix, οι ρυθμιζόμενες από τον TGF-β R-SMADs, θεωρείται ότι συνεργάζονται με μια πλειάδα άλλων μεταγραφικών παραγόντων επί των TGF-β εξαρτώμενων υποκινητών. Ένα καλό παράδειγμα αφορά μια άλλη κατηγορία Forkhead μεταγραφικών παραγόντων, την οικογένεια FoxO, μέλη της οποίας συνεργάζονται με τις SMAD3 και SMAD4 για να ρυθμίσουν την TGF-β επαγόμενη έκφραση του γονιδίου του αναστολέα κυκλίνου-εξαρτώμενων κινασών, p21 (Seoane et al., 2004). Οι FoxO3, SMAD3 και SMAD4 αλληλεπιδρούν παρουσία TGF-β και στρατολογούνται στην ακραία περιοχή του p21 υποκινητή η οποία περιέχει συντηρημένο forkhead-δεσμευτικό στοιχείο (FHBE; Forkhead-Binding Element), που ακολουθείται από τέσσερα SBEs, τα οποία δεσμεύουν τα σύμπλοκα SMAD3-SMAD4 (Εικόνα 1.14B). Το FHBE και τα SBEs, καθώς επίσης και οι πρωτεΐνες FoxO, δείχθηκε ότι απαιτούνται για την ενεργοποίηση του p21. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, το FoxO-SMAD σύμπλοκο μπορεί επίσης να σχηματίσει ένα κατασταλτικό σύμπλοκο με τον forkhead μεταγραφικό καταστολέα FoxG1, το οποίο είναι ουσιαστικό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του πρόσθιου εγκεφάλου ώστε να διατηρηθεί ο πληθυσμός των νευροεπιθηλιακών προγονικών κύτταρων (Seoane et al., 2004). Επομένως, η κυτταροστατική

απόκριση στον TGF-β εξαρτάται εν μέρει από την κυτταρική έκφραση του FoxG1. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το FoxO-SMAD μεταγραφικό σύμπλοκο απαιτείται για να ρυθμίσει τουλάχιστον 10 άλλα TGF-β αποκρινόμενα γονίδια συμπεριλαμβανομένου ενός άλλου αναστολέα των κυκλίνω-εξαρτώμενων κινάσεων, p15 (Gomis et al., 2006). Ένα υποσύνολο των γονιδίων που ενεργοποιούνται από FoxO-SMAD σύμπλοκα κατόπιν επαγωγής με TGF-β περιέχει επίσης DNA-δεσμευτικά στοιχεία για C/EBP, τα οποία απαιτούνται για την ρύθμισή τους (Gomis et al., 2006) (Εικόνα 1.14B). Ο C/EBP είναι ένας leucine zipper μεταγραφικός παράγοντας και είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με τις SMADS (Choy and Derynck, 2003). Πράγματι, ο C/EBP μπορεί να συνεργαστεί με τις SMADs για να ενεργοποιήσουν ή να καταστείλουν διάφορα TGF-β ρυθμιζόμενα γονίδια (Choy and Derynck, 2003; Gomis et al., 2006).

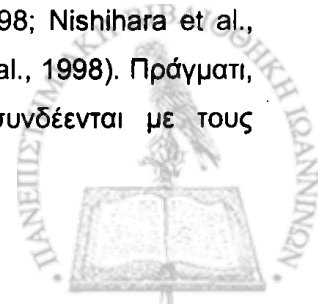
Η SMAD3 επίσης διαμορφώνει ένα μεταγραφικό κατασταλτικό σύμπλοκο με τον βασικό leucine zipper παράγοντα ATF3, ένα σύμπλοκο που εμφανίζεται να εμποδίζει την έκφραση των *Id* γονιδίων σε απόκριση προς τον TGF-β (Kang et al., 2003) (Εικόνα 1.14C). Τα γονίδια *Id1* ρυθμίζονται με αντίθετο τρόπο από τα TGF-β και BMP προσδέματα και ανάλυση του *Id1* υποκινητή οδήγησε σε ταυτοποίηση της ATF-δεσμευτικής θέσης ως στοιχείου που απαιτείται συγκεκριμένα για την TGF-β προκληθείσα καταστολή. Επιπλέον, η έκφραση του ATF3 προκαλείται σε απόκριση προς τον TGF-β, αλλά όχι προς τον BMP και μπορεί να αλληλεπιδρά ειδικά με SMAD3, αλλά όχι με SMAD1. Αυτό αποτελεί παράδειγμα όπου ο ίδιος ο TGF-β διευκολύνει την απόκρισή του, καθώς ένας μεταγραφικός ρυθμιστής του συντίθεται ως απάντηση προς το TGF-β επαγόμενο σήμα (Kang et al., 2003).

Ένα άλλο παράδειγμα τέτοιου φαινομένου προέρχεται από *Xenopus* έμβρυα, όπου ο μεταγραφικός παράγοντας Mixer συντίθεται σε απόκριση προς τη Nodal σηματοδότηση και έπειτα συνεργάζεται με τις ενεργοποιημένες SMADs για να ρυθμίσει την έκφραση του *Gooseoid* (Germain et al., 2000).

Άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες που έχουν αναφερθεί να συνεργάζονται με τις R-SMADs, είναι: μέλη της οικογένειας της ενεργοποιούσας πρωτεΐνης-1 (AP-1; Activating protein-1) των μεταγραφικών παραγόντων (Verrecchia et al., 2001; Wong et al., 1999; Zhang et al., 1998b), ο πυρηνικός παράγοντας-kappaB (NF-B; Nuclear Factor kappaB) (Lopez-Rovira et al., 2000), ο runt-related μεταγραφικός παράγοντας-2 (Runx2) (Εικόνα 1.14D) (Hanai et al., 1999; Selvamurugan et al., 2004), ο signal protein-1 (Sp1) (Feng et al., 2000; Moustakas and Kardassis, 1998) και άλλοι (Attisano et al., 2001; Massague et al., 2005). Εντούτοις, ο λειτουργικός ρόλος πολλών από τους μεταγραφικούς παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τις SMAD παραμένει αδιευκρίνιστος.

1.1.6.8 Αλληλεπίδραση των SMAD με συνενεργοποιητές και αποσιωπητές

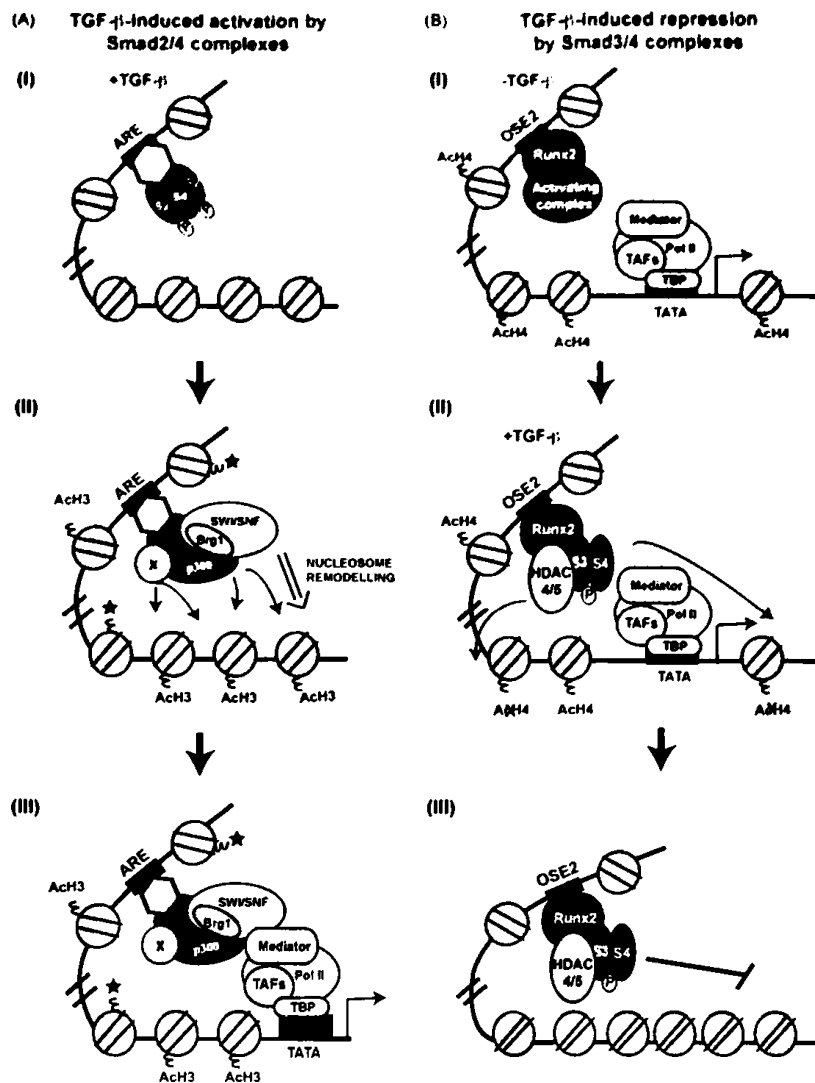
Η περιοχή MH2 των SMAD πρωτεϊνών επιδεικνύει μεταγραφική ενεργότητα σαν συντηγμένη πρωτεΐνη με την περιοχή σύνδεσης DNA της GAL4 υποδεικνύοντας ότι οι SMAD μπορούν να συνδέονται άμεσα με τη βασική μεταγραφική μηχανή. Πολλές μελέτες έδειξαν ότι οι μεταγραφικοί συνενεργοποιητές, p300 και CBP, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση τόσο της TGF-β όσο και της BMP επαγόμενης μεταγραφής (Feng et al., 1998; Janknecht et al., 1998; Nishihara et al., 1998; Pearson et al., 1999; Rouponnot et al., 1998; Shen et al., 1998; Topper et al., 1998). Πράγματι, η περιοχή MH2 των SMAD1, SMAD2, SMAD3 αλλά και της SMAD4 συνδέονται με τους



μεταγραφικούς συνενεργοποιητές p300 και CBP (CREB Binding Protein). Οι p300/CBP γεφυρώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες με την βασική μεταγραφική μηχανή μέσω της ενδογενούς ενεργότητας ακετυλοτρανσφεράσης (HAT, Histone acetyltransferase) που διευκολύνει την μεταγραφή μειώνοντας την συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών (Εικόνα 1.15Α). Οι p300/CBP που βρίσκονται σε μικρά ποσά μέσα στο κύτταρο δρουν ως συνενεργοποιητές για πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες ενσωματώνοντας έτσι πολλαπλά σήματα. Πολλοί άλλοι μεταγραφικοί συμπαράγοντες ρυθμίζουν την TGF-β εξαρτώμενη γονιδιακή έκφραση μέσω των p300/CBP. Για παράδειγμα, ο πυρηνικός παράγοντας MSG1 και ο SRC1 (Steroid receptor co-activator 1) ενισχύουν τη μεταγραφική ενεργότητα συγκεκριμένων TGF-β ρυθμιζόμενων υποκινητών, γεγονός που απαιτεί την παρουσία των p300/CBP (Denmler et al., 2005; Shioda et al., 1998; Yahata et al., 2000). Ο μοριακός μηχανισμός δράσης των MSG1 και SRC1 δεν είναι γνωστός, όμως υποτίθεται ότι διευκολύνουν την λειτουργική σύνδεση μεταξύ των SMADs και των p300/CBP.

Έκτος από το να επάγουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων οι SMADs μπορούν να δράσουν και ως αποσιωπητές της μεταγραφής. Έτσι, για παράδειγμα, στον υποκινητή *gooseoid*, η SMAD2 ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου σε συνεργασία με τον παράγοντα FAST2, ενώ η SMAD3 δεν έχει την ίδια δράση και φαίνεται να αναστέλλει την SMAD2-εξαρτώμενη ενεργοποίηση (Labbe et al., 1998). Η διαφορά αυτή οφείλεται στην περιοχή MH1 της SMAD3 που συνδέεται στο DNA και συναγωνίζεται με την SMAD4 για την περιοχή SMAD που βρίσκεται δίπλα στην περιοχή FAST. Σε αντίθεση με τον υποκινητή *gooseoid*, η περιοχή ARE στο γονίδιο *Mix.2* στον *Xenopus* ενεργοποιείται από την SMAD2 και SMAD3 (Yagi et al., 1999). Έτσι η SMAD3 μπορεί να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή αποσιωπητής ανάλογα με τον υποκινητή. Η ικανότητα των R-SMADs να συνδέονται στο DNA μπορεί να καθορίζει την αρνητική ή θετική δράση τους στην μεταγραφή αν και ο μηχανισμός για αυτή την διαφορετική δράση δεν είναι ακόμα γνωστός.

Οι SMADs στρατολογούν συν-αποσιωπητές για να καταστείλουν τη μεταγραφή γονιδίων στόχων που αποκρίνονται σε επαγωγή με TGF-β. Παράλληλα, στρατολογούνται επίσης από τις SMADs ή από συν-αποσιωπητές αποακετυλάσες ιστονών (HDACs), οι οποίες αφαιρούν τις ομάδες ακετυλίωσης από τις ουρές των ιστονών ώστε να επιτρέπουν ισχυρές ιοντικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιστονών και του DNA. Αυτό οδηγεί σε ένα πιο περιοριστικό περιβάλλον συμπυκνωμένης χρωματίνης που αποτρέπει τη μεταγραφική μηχανή να δεσμευτεί στο DNA υποκινητών.



Εικόνα 1.15. Ρύθμιση της SMAD διαμεσολαβούμενης μεταγραφής από τη δομή της χρωματίνης. (A) Μοντέλο για την ενεργοποίηση της μεταγραφής στη χρωματίνη από τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα SMAD2/SMAD4. (I) Παρουσία TGF- β , τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα SMAD2-SMAD4 στρατολογούνται στους ενισχυτές όπως το στοιχείο απόκρισης στην Ακτιβίνη (ARE) σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες μεταγραφής. (II) Τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα SMAD2-SMAD4 έπειτα στρατολογούν τροποποιητές και αναδιοργανωτές της χρωματίνης συμπεριλαμβανομένου του p300 και του συμπλόκου SWI/SNF για να ακετυλιώσουν και να αναδιοργανώσουν τη χρωματίνη. Άλλοι άγνωστοι παράγοντες (X) μπορούν επίσης να στρατολογηθούν για να τροποποιήσουν τη χρωματίνη (αστέρια). (III) Η τροποποιημένη και αναδιοργανωμένη χρωματίνη μαζί με τις SMADS μπορεί έπειτα να στρατολογήσει τη μεταγραφική μηχανή της RNA πολυμεράσης II για να ενεργοποιήσει την έκφραση γονιδίων. (B) Μοντέλο καταστολής της μεταγραφής από τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα Smad3/Smad4. (I) Απουσία TGF- β , μεταγράφονται γονίδια οστεοβλαστών όπως αυτό της osteocalcin. (II) Αποκρινόμενα στον TGF- β , τα φωσφορυλιωμένα σύμπλοκα SMAD3/SMAD4 στρατολογούν αποακετυλάσες ιστονών (HDACs) στους υποκινητές γονιδίων των οστεοβλαστών μέσω της αλληλεπίδρασης με τον μεταγραφικό παράγοντα Runx2. Αυτό προκαλεί αποακετυλίωση ιστονών εντός των υποκινητών των γονιδίων οστεοβλαστών. (III) Οι αποακετυλιωμένες ιστόνες σχηματίζουν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με το DNA συσπειρώνοντας τη δομή χρωματίνης και καταστέλλοντας τη μεταγραφή γονιδίων (Ross and Hill, 2008).

Η TGF- β διαμεσολαβούμενη καταστολή της διαφοροποίησης οστεοβλαστών είναι ο καλύτερα χαρακτηρισμένος μεταγραφικός μηχανισμός καταστολής από SMAD. Ο TGF- β εμποδίζει τη διαφοροποίηση οστεοβλαστών παρεμποδίζοντας τη δράση του μεταγραφικού παράγοντα Runx2, και επομένως καταστέλλοντας την έκφραση πρωτεϊνών που απαιτούνται για το σχηματισμό οστών όπως της osteocalcin (Alliston et al., 2001). Η TGF- β -διαμεσολαβούμενη καταστολή των Runx2-

ρυθμιζόμενων υποκινητών εξαρτάται από την SMAD3, και η SMAD3 αλληλεπιδρά άμεσα με την Runx2 κατά TGF-β επαγόμενο τρόπο (Alliston et al., 2001) (Εικόνα 1.15B). Επεξεργασία των κυττάρων με τον αναστολέα των παραγόντων HDAC, trichostatin A (TSA) μείωσε την TGF-β διαμεσολαβούμενη καταστολή ενός Runx2-εξαρτώμενου γονιδίου αναφοράς και του ενδογενούς γονιδίου osteocalcin, υποστηρίζοντας την άποψη ότι οι HDACs εμπλέκονται στην αναστολή της δράσης της Runx2 από τον TGF-β (Εικόνα 1.15B). Πιθανολογείται ότι υπεύθυνες για τη δράση αποακετυλίωσης *in vivo* είναι οι HDACs της κατηγορίας II, HDAC4 και 5, που όπως δείχθηκε σχηματίζουν σύμπλοκο με τις SMAD3 και Runx2 σε απόκριση προς τον TGF-β και στρατολογούνται στον ενδογενή υποκινητή της osteocalcin (Kang et al., 2005).

Διάφοροι άλλοι αποσιωπητές που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τις SMADs έχουν προσδιοριστεί, αν και εμφανίζονται περισσότερο να διαμορφώνουν τις ενεργοποιητικές δυνατότητες του TGF-β. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν τα πρωτο-ογκογονίδια Ski και SnoN που ρυθμίζουν αρνητικά ορισμένα TGF-β-εξαρτώμενα γονίδια, και ανταγωνίζονται την TGF-β επαγόμενη αναστολή της αύξησης των επιθηλιακών κυττάρων (Liu et al., 2001). Τα Ski/SnoN αλληλεπιδρούν άμεσα με τις SMAD2, SMAD3 και SMAD4, αλλά μόνο το Ski αλληλεπιδρά με την BMP-ρυθμιζόμενη SMAD1 (Akiyoshi et al., 1999; Luo et al., 1999; Sun et al., 1999a). Είναι σημαντικό ότι, η DNA-δεσμευτική περιοχή που αναγνωρίζεται από τα Ski και SnoN είναι η ίδια με το συναινετικό στοιχείο πρόσδεσης των SMAD3-SMAD4 (Cohen et al., 1998; Nicol and Stavnezer, 1998) και ο SnoN πιθανώς να καταστέλλει τη μεταγραφή από αυτά τα στοιχεία με το σχηματισμό συμπλόκου με την SMAD4 (Stroschein et al., 1999). Σε απόκριση από επαγωγή με TGF-β, η SnoN, και μέχρι ενός βαθμού και η Ski, υφίστανται γρήγορη αποικοδόμηση, επιτρέποντας την έκφραση γονιδίων στόχων. Ωστόσο, ο TGF-β μπορεί να επάγει την έκφραση του γονιδίου της SnoN, δημιουργώντας έτσι έναν μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης εμποδίζοντας την ανεξέλεγκτη έκφραση των γονιδίων του (Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999b). Οι Ski και SnoN καταστέλλουν την TGF-β επαγόμενη μεταγραφή μέσω διάφορων μηχανισμών πιθανότατα με το να μειώνουν την ακετυλίωση των ιστονών δημιουργώντας έτσι ένα περιοριστικό περιβάλλον χρωματίνης που αποτρέπει την προσέλευση της μεταγραφικής μηχανής. Για παράδειγμα, τα Ski και SnoN καταστρέφουν την αλληλεπίδραση των SMADs με την p300 και το πιο σημαντικό στρατολογούν ένα σύμπλοκο κατασταλτικών πρωτεϊνών που αποτελείται από τις N-CoR, mSin3A και HDAC1 (Akiyoshi et al., 1999; Luo et al., 1999).

Έχουν αναφερθεί και άλλοι καταστολείς που μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις SMAD και να εμποδίζουν την SMAD-διαμεσολαβούμενη μεταγραφή, ενδεχομένως αποτρέποντας τις SMAD να στρατολογήσουν HDACs, συμπεριλαμβανομένου της SMAD-αλληλεπιδρώσας πρωτεΐνης 1 (SIP1; Smad interacting protein 1), της TGIF και μιας πρωτεΐνης που είναι ομόλογη με την Evi-1 (Ecotropic virus integration site 1 protein homolog). Συγκριμένα, η homeodomain πρωτεΐνη TGIF αλληλεπιδρά εκλεκτικά με SMAD2 και SMAD3, αλλά ασθενέστερα με την SMAD1 (Wotton et al., 1999). Η TGIF καταστέλλει την TGF-β επαγόμενη έκφραση γονιδίων αναφοράς πιθανώς μέσω της στρατολόγησης ενός συμπλόκου mSin3A και HDAC (Wotton et al., 2001; Wotton et al., 1999). Η Evi-1, είναι ένας καταστολέας zinc finger, που μπορεί να καταστείλει τόσο την BMP όσο και την TGF-β ρυθμιζόμενη μεταγραφή μέσω των αλληλεπιδράσεων του με SMAD1, SMAD2 και SMAD3. Η Evi-1 μπορεί να στρατολογεί τον καταστολέα CtBP (C-terminal-binding protein 1) και τις HDACs, μειώνοντας έτσι την

TGF- β -επαγόμενη ακετυλίωση του υποκινητή της SMAD7 (Alliston et al., 2005; Izutsu et al., 2001; Kurokawa et al., 1998).

Επιπλέον, οι SMADs έχουν την ικανότητα να στρατολογούν σύμπλοκα αναδιοργάνωσης της χρωματίνης. Έχει δειχθεί ότι συστατικά του συμπλόκου SWI/SNF (Switching of mating type/sucrose non fermenting) συμπεριλαμβανομένου του βασικού συστατικού ATPάσης Brg1 και των παραγόντων που συνδέονται με Brg1 (BAFs; Brg1-associated factors) BAF155 και BAF170 μπορούν να αλληλεπιδρούν με τις R-SMADs (He et al., 2006; Ross et al., 2006) υποδηλώνοντας έτσι τη συμμετοχή του SWI/SNF συμπλόκου στην TGF- β επαγόμενη μεταγραφή (Εικόνα 1.15A). In vitro πειράματα έδειξαν ότι η Brg1 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της μεταγραφής από τα φωσφορυλιωμένα SMAD2 σύμπλοκα (Ross et al., 2006). Επιπροσθέτως, η Brg1 απαιτείται για την από την Ακτιβίνη επαγόμενη έκφραση του SMAD2-εξαρτώμενου γονιδίου Lefty1 και στρατολογείται στον υποκινητή του Lefty1 in vivo (Ross et al., 2006).

1.1.7 Τροποποίηση και τερματισμός του σήματος

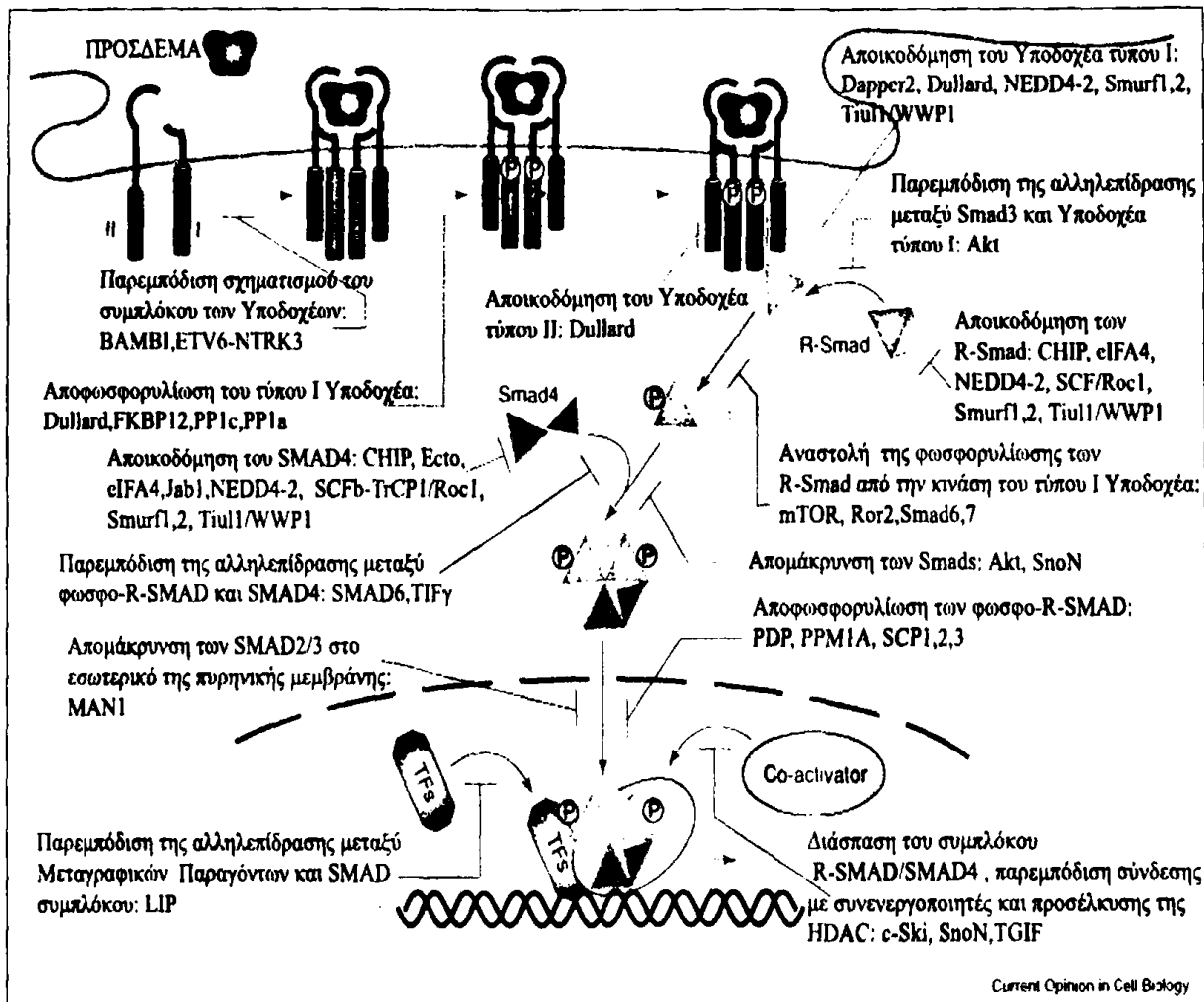
Η μετάδοση του σήματος που επάγεται από τα μέλη της οικογένειας του TGF β δεν αποτελεί απλά και μόνο μια γραμμική διαδικασία που ξεκινάει από τους υποδοχείς της μεμβράνης και καταλήγει στον πυρήνα. Αντίθετα, όπως αποδεικνύουν πρόσφατα πειραματικά δεδομένα, κάθε επίπεδο της σηματοδοτικής διαδικασίας χαρακτηρίζεται από έντονη πολυπλοκότητα η οποία συνίσταται στο πλήθος των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που ρυθμίζουν την έκφραση, την ενεργοποίηση ή/και απενεργοποίηση, την υποκυτταρική εντόπιση καθώς και την σταθερότητα των συστατικών που συμμετέχουν στο TGF β σηματοδοτικό μονοπάτι.

Η αποικοδόμηση των υποδοχέων του TGF β μέσω των ανασταλτικών SMADs που προσελκύουν τις SMURFs λιγάσες ουβικιτινυλίωσης, αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 1.1.4.2 περί ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων (Kavsak et al., 2000; Ogunjimi et al., 2005). Όπως οι SMURFs έτσι και οι λιγάσες ουβικιτινυλίωσης (Tiu1)/WWP1 και NEDD4-2 συνδέονται με την SMAD7 και προάγουν την αποικοδόμηση του υποδοχέα τύπου I του TGF β (Komuro et al., 2004; Kuratomi et al., 2005; Seo et al., 2004). Η Dapper, προάγει την λυσοσωμική αποικοδόμηση των nodal υποδοχέων στο ψάρι zebrafish και των υποδοχέων του TGF β στα θηλαστικά (Su et al., 2007).

Η πρωτεΐνη SARA δεν παίζει μόνο ενεργοποιητικό ρόλο στην TGF β επαγόμενη σηματοδότηση. Αντίθετα, όπως πρωτοπαρατηρήθηκε στη *Drosophila* και επιβεβαιώθηκε και στα θηλαστικά, η SARA συμβάλλει στην συγκρότηση ενός συμπλόκου που αποτελείται από τις SMAD7-GADD34 (ρυθμιστική περιοχή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης, PP1)-PP1c (καταλυτική περιοχή της PP1) που έχει στόχο την αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I του TGF β (Bennett and Alphey, 2002; Shi et al., 2004). Η πρωτεΐνη Dullard καταστέλλει την φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα του BMP και προάγει την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του τύπου II υποδοχέα του BMP.

Ο σχηματισμός του συμπλόκου των υποδοχέων του τύπου I και τύπου II μπορεί να παρεμποδιστεί από άλλους υποδοχείς όπως οι BAMB1 (Onichtchouk et al., 1999) και ο χιμαιρικός υποδοχέας ETV6-NTRK3 (TrkC) (Jin et al., 2005).





Εικόνα 1.16. Απεικόνιση των ρυθμιστικών μηχανισμών και των μορίων που τους διαμεσολαβούν κατά την μετάδοση του από τον TGFβ επαγόμενου σήματος, από την μεμβράνη ως τον πυρήνα (Itoh and ten Dijke, 2007).

Όπως προαναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1.1.6.5, ο τερματισμός της SMAD σηματοδότησης πραγματοποιείται στον πυρήνα με πρωτεοσωμική αποικοδόμησή τους ή με αποφωσφορυλίωσή τους, με τη δεύτερη διαδικασία να υπερισχύει (Howell et al., 2002; Inman et al., 2002; Lo and Massague, 1999; Xu et al., 2002). Καθοριστικό ρόλο έπαιξε η ταυτοποίηση της φωσφατάσης PPM1A που αποφωσφορυλιώνει το καρβοξυ-τελικό άκρο των SMAD1,2 και 3 (Duan et al., 2006; Lin et al., 2006) ενώ μια άλλη φωσφατάση της δεϋδρογονάσης του πυροβικού οξέος (pyruvate dehydrogenase phosphatase, PDP) που εκτός από τα μιτοχόνδρια, βρέθηκε επίσης στον πυρήνα, αποφωσφορυλιώνει μόνο την SMAD1 και όχι τις SMAD2 και 3. Όσον αφορά την πρωτεοσωμική αποικοδόμησή τους πάλι, η SMURF1 είναι ειδική για τις SMAD1/5 ενώ αντίθετα η SMURF2 είναι δραστική σε ένα ευρύτερο φάσμα των SMAD πρωτεϊνών. Μολονότι, η SMURF2 προσδένει την SMAD2 και την SMAD3, δεν αποδομεί την SMAD3 (Lin et al., 2000). Αντ' αυτού, επάγει την αποικοδόμηση πρωτεϊνών όπως της SnoN που αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο των SMAD3-SMURF2 (Bonni et al., 2001). Άλλα μόρια που ομοιάζουν τις SMURFs εμπλέκονται στην πολυ-ουβικιτινυλίωση των SMAD2 και SMAD3. Συγκεκριμένα, για την SMAD2 έχουν αναφερθεί οι Tiul1/WWP1 (όπου απαιτείται η αλληλεπίδρασή τους με τον TGIF) (Komuro et al., 2004; Seo et al., 2004), οι NEDD4-2 (Kuratomi et al., 2005) και Itch (όπου επάγει την TGFβ/SMAD2 σηματοδότηση) (Bai et al., 2004). Επιπλέον, για την SMAD3 έχουν αναφερθεί οι CHIP (C-terminus of Hsc70 interacting protein) (Xin et al., 2005) και SCF/Roc1 λιγάσες

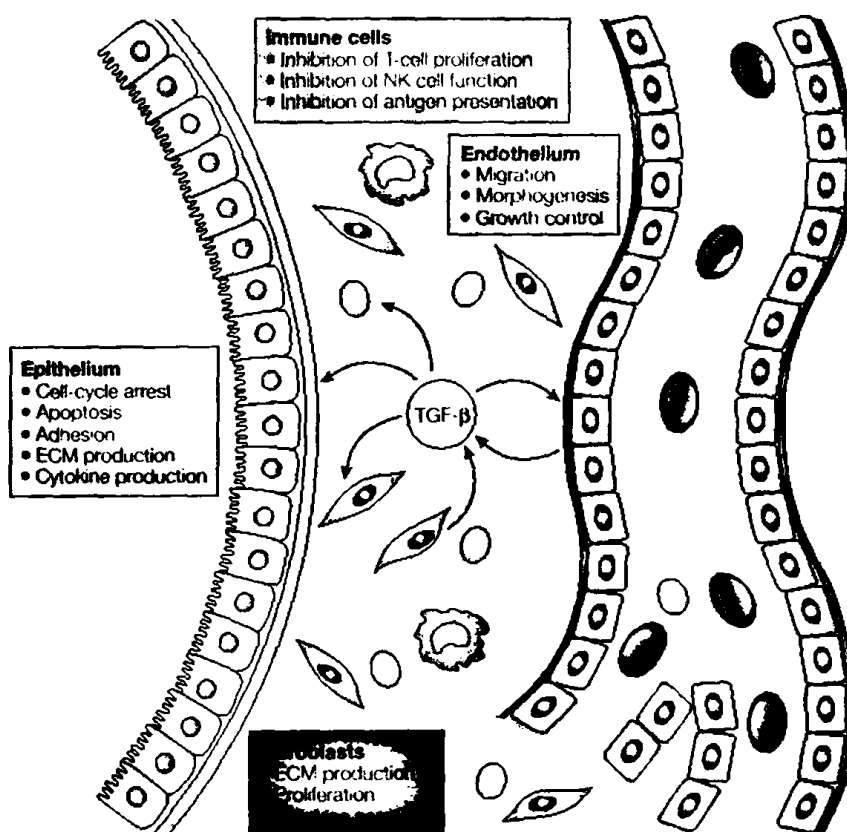
ουβικιτινυλίωσης (Izzi and Attisano, 2004; ten Dijke and Hill, 2004). Οι παραπάνω λιγάσες ουβικιτινυλίωσης έχει δείχθει ότι συμβάλλουν στην αποικοδόμηση και της SMAD4 (Dupont et al., 2005; Izzi and Attisano, 2004; Li and Li, 2006; Li et al., 2004a; ten Dijke and Hill, 2004; Wan et al., 2004) (Εικόνα 1.16).

Έχουν αναφερθεί επίσης μόρια τα οποία απομακρύνουν τις R-SMADs πριν την ενεργοποίηση της μεταγραφής. Τέτοια είναι η κυτταροπλασματική SnoN (μεταγραφικός αποσιωποποιητής) (Krakowski et al., 2005), η πυρηνική MAN1 που αλληλεπιδρά με τις R-SMADs και αναστέλλει την επαγόμενη από τον TGFβ σηματοδότηση (Lin et al., 2005; Pan et al., 2005) και η Akt που ως ενεργοποιητής της κυτταρικής επιβίωσης αναστέλλει την TGFβ/SMAD3 επαγόμενη απόπτωση αλληλεπιδρώντας με την μη φωσφορυλιωμένη SMAD3 (Conery et al., 2004; Remy et al., 2004) ενώ άλλοι εμπλέκουν το υπόστρωμα της Akt, mTOR σε ότι αφορά την αναστολή της SMAD3 φωσφορυλίωσης (Song et al., 2006). Σημαντική επίσης ήταν η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης TIFγ η οποία ανταγωνίζεται την SMAD4 για την αλληλεπίδραση με τις R-SMADs. Ενώ τα σύμπλοκα R-SMAD-TIFγ επάγουν τη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων, τα σύμπλοκα R-SMAD-SMAD4 αναστέλουν τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων. Η ισορροπία στο σχηματισμό αυτών των συμπλόκων είναι καθοριστική για την τύχη των παραπάνω κυττάρων (He et al., 2006). Ο LIP ένα προϊόν εναλλακτικού ματίσματος του C/EBPβ (συζητήθηκε στο κεφάλαιο 1.1.6.7) από το οποίο λείπει η περιοχή ρύθμισης της μεταγραφής, εμποδίζει την TGFβ επαγόμενη έκφραση του p15INK4b (αναστολέα της έκφρασης των κυκλίνου-εξαρτώμενων κινασών, cdk4/6) (Gomis et al., 2006). Τέλος, η Arkadia μια E3 λιγάση ουβικιτινυλίωσης, ενισχύει την από τον TGFβ επαγόμενη μεταγραφή προάγοντας την ουβικιτινυλίωση και την επακόλουθη αποικοδόμηση τριών σημαντικών αναστολέων του TGFβ σηματοδοτικού μονοπατιού των SMAD7-SnoN-c-Ski (Koinuma et al., 2003; Levy et al., 2007; Nagano et al., 2007). Επίσης, εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι η Arkadia στα εμβρυϊκά κύτταρα, από την μια μεριά, ενισχύει την TGFβ/Nodal επαγόμενη μεταγραφή, ενώ, από την άλλη, αλληλεπιδρά με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2/3, τις ουβικιτινώνει και προάγει την αποικοδόμισή τους, μια δράση που διαμεσολαβείται μέσω των ίδιων δομικών περιοχών που συμβάλλουν στην ενίσχυση της μεταγραφικής τους ενεργότητας (Mavrakis et al., 2007).



1.1.8 Μεταγωγή του σήματος από την υπεροικογένεια του TGFβ και ασθένειες του ανθρώπου

Τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ είναι πολυλειτουργικά και επηρεάζουν σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η απόπτωση, η μετανάστευση, η προσκόλληση, και η σύσταση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, σε πλειάδα κυτταρικών τύπων (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17. Οι στόχοι του TGFβ και οι επιδράσεις του στους ώριμους ιστούς. Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού (TGFβ) συμβάλλει στην διατήρηση της ομοιοστασίας των ιστών ελέγχοντας τον πολλαπλασιασμό μιας ποικιλίας κυτταρικών τύπων – συμπεριλαμβανομένων των επιθηλιακών, ενδοθηλιακών, ινοβλαστών στρώματος και ανοσοκυττάρων-καθώς επίσης και επηρεάζοντας την αλληλεπίδραση αυτών των κυττάρων με το μικροπεριβάλλον του ιστού. ECM, extracellular matrix; NK, natural killer (Siegel and Massague, 2003).

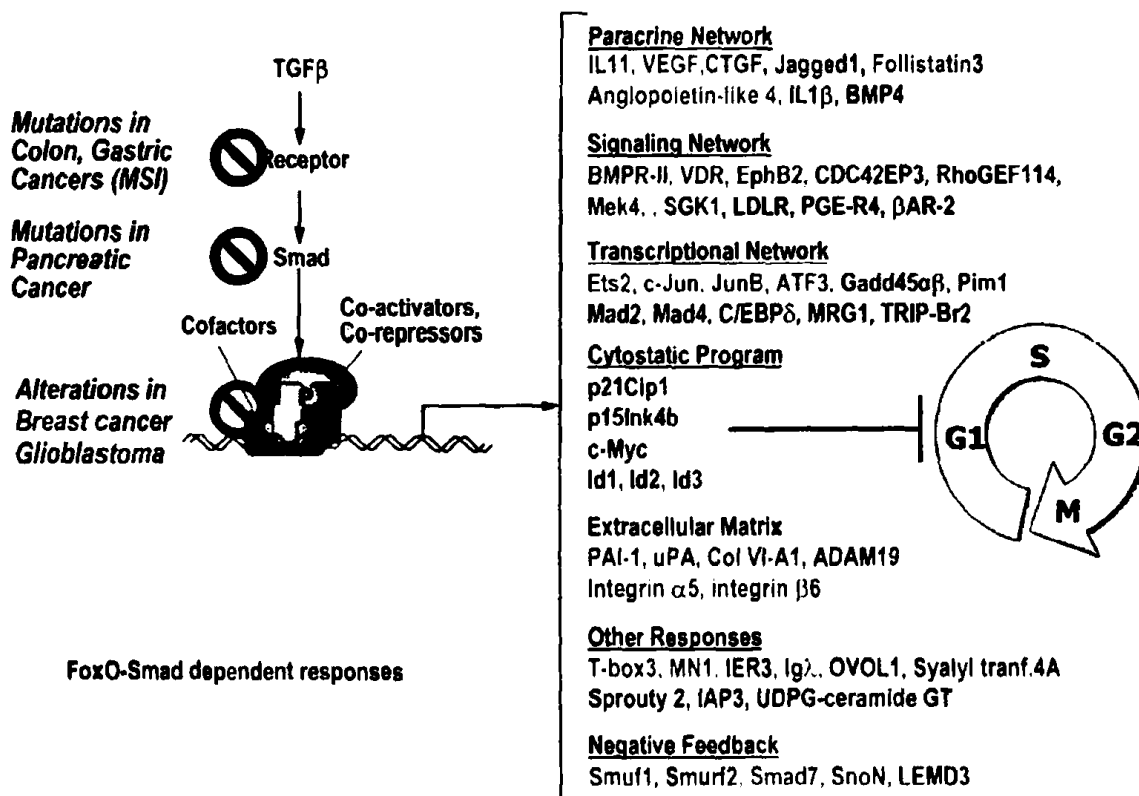
Σαν αποτέλεσμα απενεργοποίηση ή ελαττωματική έκφραση συστατικών της μεταγωγής του σήματος του TGF-β παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών του ανθρώπου (Gordon and Blobel, 2008) (Πίνακας 1). Η επίδραση των μελών της οικογένειας του TGFβ στην ανάπτυξη των οργανισμών αντικατοπτρίζεται στο πλήθος των κληρονομικών ασθενειών στις οποίες συμμετέχουν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των μελών της οικογένειας του TGFβ (Πίνακας 1). Τα διάφορα μέλη της οικογένειας του TGFβ παίζουν σημαντικό ρόλο και χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην αυτοανανέωση και διαφοροποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Puceat, 2007).

Πίνακας 1. Κατάλογος ασθενειών με ελαττωματική μεταγωγή του σήματος μελών της οικογένειας TGFβ

Ασθένεια	Σηματοδοτικό συστατικό
Καρδιαγγειακά νοσήματα	
Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία	<i>ENG, ACVRL1, SMAD4</i>
Νοσήματα της αορτής (Loeys-Dietz syndrome, familial thoracic aortic aneurysm syndrome, arterial tortuosity syndrome)	<i>TGFBR1, TGFBR2</i>
Πρωτοπαθής πνευμονική υπέρταση	<i>BMPR2, ACVRL1</i>
Προ-εκλαμψία	sEnd
Αρτηριοσκλήρυνση	↑ TGFβ1
Επαναστένωση μετά από αγγειοπλαστική	↑ TGFβ1
Υπέρταση	<i>TGFB1 (↑ TGFβ1)</i>
Υπερτροφική καρδιομυοπάθεια/καρδιακή ανεπάρκεια	<i>BMP10 (↑ BMP10)</i>
Νοσήματα του συνδετικού ιστού	
Σύνδρομο Marfan και συναφή σύνδρομα	<i>FBN1, TGFBR1, TGFBR2</i>
Ινωτικά νοσήματα (fibrotic diseases)	
Σκελετικές και μυϊκές διαταραχές	
Ασθένεια Camurati-Engelman	<i>TGFB1</i>
Προοδευτική Οστεοποιητική Ινωδυσπλασία	<i>ACVR1</i>
Χονδροδυσπλασίες Hunter-Thompson και Grebe-type	<i>GDF5</i>
Οστεοπόρωση	<i>TGFB1 (↑ TGFβ1)</i>
Σκληροστέωση και νόσος Van Buchem	<i>SOST</i>
Βραχυδακτυλία	<i>GDF5, BMPR1B</i>
Συμφαλαγγισμός	<i>NOGGIN, GDF5</i>
Μυϊκή δυστροφία Duchenne	
Διαταραχές του αναπαραγωγικού συστήματος	
Πρώιμη ανεπάρκεια των ωοθηκών	<i>BMP15, INHA</i>
Σύνδρομο παραμένοντα Μυλλεριανού πόρου	<i>MIS, AMHR2</i>
Κληρονομικός καρκίνος	
Σύνδρομο νεανικής πολυποδίασης	<i>BMPR1A, ENG, SMAD4</i>
Κληρονομικός μη πολυποδικός καρκίνος του παχέος εντέρου	<i>TGFBR1</i>
Σύνδρομο Bannayan-Riley-Ruvalcaba και Cowden	<i>BMPR1A</i>
Σποραδικός καρκίνος	
Μαστού	<i>TGFB1, TGFB2, TGFBR1, ALK6, BMP-4, BMP-7</i>
παχέος εντέρου	<i>BMP, TGFB1, TGFBR2, SMAD2, SMAD4</i>
πνεύμονα	<i>TGFBR2, SMAD2, SMAD3</i>
παγκρέατος	↑ TGFβ1, ↑ TGFβ2, <i>TGFBR2, SMAD4</i>
προστάτη	<i>TGFB1, GDF-5, TβRIII, SMAD3</i>
Διαταραχές της ανάπτυξης	
Λαγόστομα	<i>TGFB2, TGFB3</i>
Situs Inversus and Situs Ambiguus	<i>LEFTY1, NODAL</i>



Προεξάρχουσα θέση στον κατάλογο των νοσημάτων αυτών κατέχουν ο καρκίνος και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Αναφορικά με τα καρδιαγγειακά νοσήματα, το αγγειακό στοιχείο συμμετέχει έντονα στην παθολογία την οποία προκαλούν τα μέλη του TGFβ και δη η παράμετρος της δημιουργίας ακέραιων, λειτουργικών αγγείων. Σε αυτό θα αναφερθούμε ξεχωριστά παρακάτω στο κεφάλαιο 1.1.8.1. Αναφορικά με τον καρκίνο, είναι γνωστό ότι ο TGFβ, μέσω των SMAD, ρυθμίζει πολλά γονίδια με σημαντικότερα αυτά τα οποία ρυθμίζουν ανασταλτικά τον κυτταρικό κύκλο (Siegel and Massague, 2003). Επειδή ο TGF-β μεταφέρει ανασταλτικά του πολλαπλασιασμού σήματα και θεωρείται σαν το πρότυπο ανασταλτικό πολυπεπίδιο, μεταλλάξεις αρκετών από τα συστατικά της μεταγωγής του σήματος του TGF-β, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων και των SMAD πρωτεϊνών, καθιστούν τα κύτταρα μη ανταποκρίσιμα στον TGF-β με αποτέλεσμα τη δημιουργία καρκίνων (Massague et al. 2000; ten Dijke et al. 2002) (Εικόνα 1.18).

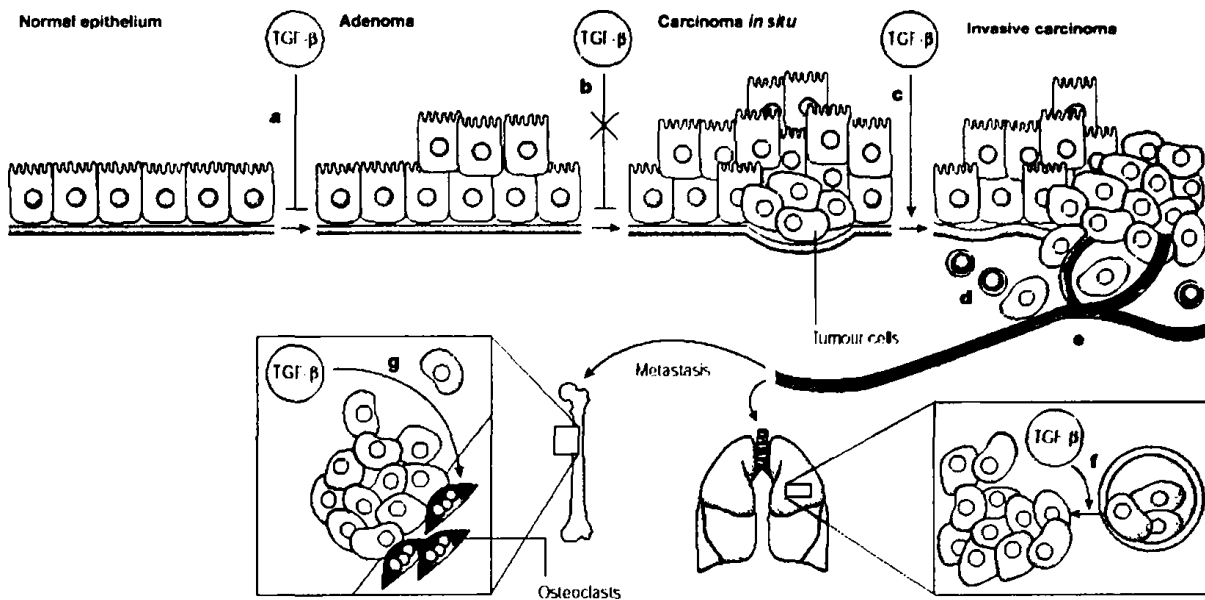


Εικόνα 1.18. Το μεταγραφικό πρόγραμμα του TGFβ και οι αλλαγές του στον καρκίνο. Η σχηματική απεικόνιση που παρουσιάζεται στο αριστερό μέρος απεικονίζει τις μεταλλάξεις ή τις αλλαγές που εμφανίζονται σε κάθε επίπεδο του μονοπατιού της TGFβ σηματοδότησης στους διάφορους τύπους ανθρώπινων καρκίνων. Στο δεξί μέρος, παρατίθενται τα γονίδια στόχοι του TGFβ στα επιθηλιακά κύτταρα σύμφωνα με τις βιολογικές αποκρίσεις που διαμεσολαβούν. Με κίτρινο επισημαίνονται οι TGFβ μεταγραφικές αποκρίσεις γονιδίων που εξαρτώνται από τα σύμπλοκα FoxO-Smad. Με κόκκινο επισημαίνονται οι αποκρίσεις γονιδίων που καταστέλλονται από TGFβ ενώ με πράσινο αποκρίσεις γονιδίων που επάγονται από TGFβ (Massague and Gomis, 2006).

Μεταξύ των βασικών συστατικών της μηχανής σήματος, οι τύπου II υποδοχείς για τον TGF-β και η Co-SMAD, SMAD4, απενεργοποιούνται συχνότερα στους επιθηλιακούς ανθρώπινους καρκίνους κυρίως στο έντερο και στο πάγκρεας (ten Dijke et al. 2002). Πράγματι, η SMAD4 αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο σε καρκίνους του παγκρέατος, αφού το γονίδιο SMAD4 στο χρωμόσωμα 18q21 είχε χαθεί στο 50% αυτών των όγκων (Hahn et al., 1996). Μεταλλάξεις στην SMAD2 που βρίσκεται στο ίδιο χρωμόσωμα 18q21, έχουν επίσης βρεθεί σε κάποιους καρκίνους του

εντέρου. Οι μεταλλάξεις στην SMAD4 και στην SMAD2 στους καρκίνους προκαλούνται είτε από πλήρη διαγραφή του χρωμοσωμικού locus, μικρές διαγραφές, μεταλλάξεις μετατόπισης, παρανοηματικές μεταλλάξεις ή μη νοηματικές μεταλλάξεις (Harradine and Akhurst, 2006; Massague, 1998, 2008; Pardali and Moustakas, 2007; Qiu et al., 2007).

Οι μεταλλάξεις οι οποίες καταργούν την ογκοκατασταλτική δράση (αναστολή του κυτταρικού κύκλου) του TGFβ παίζουν σημαντικό ρόλο στα αρχικά στάδια της κακοήθους εξαλλαγής επιτρέποντας την έναρξη ενός καρκινικού κλώνου (Εικόνα 1.19). Σε αργότερα στάδια, όμως, ο TGFβ υπερκεφράζεται (Derynck et al., 2001) και συνεισφέρει στον κακοήθη φαινότυπο με άλλους μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, ενεργοποιεί την επιθηλιακή-μεσεγγυματική μεταδιαφοροποίηση αυξάνοντας το διεισδυτικό δυναμικό των όγκων, δημιουργεί ένα ανοσοκατασταλτικό περιβάλλον καταστέλλοντας την λειτουργία των T κυττάρων και επάγει την αγγειογένεση (Εικόνα 1.19).



Εικόνα 1.19. Σημεία επίδρασης του TGFβ κατά την εξέλιξη του καρκίνου (Siegel and Massague, 2003).

Επίσης, ο TGFβ αυξάνει την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως του πνεύμονα, με αποτέλεσμα αυξημένη εξαγγείωση καρκινικών κυττάρων και δημιουργία μεταστάσεων στους ιστούς αυτούς (Siegel and Massague, 2003). Ειδικά στον καρκίνο του μαστού, ο υπερεκφραζόμενος TGFβ επάγει την μεταγραφή γονιδίων, όπως της ιντερλευκίνης-11 και του αυξητικού παράγοντα του συνδετικού ιστού (connective tissue growth factor, CTGF), οι οποίοι προκαλούν διαφοροποίηση των οστεοκλαστών και αγγειογένεση, αντίστοιχα, προκαλώντας εκλεκτικά μεταστάσεις στα οστά (Siegel and Massague, 2003) (Εικόνα 1.19). Φαίνεται, λοιπόν, ότι τα καρκινικά κύτταρα των όγκων αυτών, ενώ έχουν απωλέσει την ανασταλτική του πολλαπλασιασμού δράση του TGFβ, εντούτοις, έχουν τη δυνατότητα να ανταποκρίνονται σε άλλα μεταγωγικά μονοπάτια του TGFβ. Φυσικά, παρακρινική δραστηριότητα διαμέσου αλληλεπίδρασης με ινοβλάστες, ενδοθηλιακά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος συμμετέχει στις διαδικασίες αυτές.



1.1.8.1 TGFβ οικογένεια και αγγειακές διαταραχές

Η **αγγειακή διαφοροποίηση (vasculogenesis)** αποτελεί το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη νέων αγγείων και περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση αρχέγονων βλαστικών κυττάρων (αγγειοβλαστών) σε ενδοθηλιακά κύτταρα και τη συναρμολόγηση τους σε ένα πρωτογενές αγγειακό δίκτυο. **Αγγειογένεση** είναι η διαδικασία με την οποία νέα αγγεία αναπτύσσονται από προϋπάρχοντα τριχοειδή με εκβλάστηση (sprouting), σμίλευση (pruning) και διαχωρισμό (εγκολεασμό) [splitting (intrussusception)]. Αυτές οι διαδικασίες κατευθύνονται από μια σύνθετη αλληλεπίδραση αυξητικών παραγόντων (όπως VEGF, FGF και TGFβ) και των υποδοχέων τους. Η κατευθύνση των νέων αγγείων καθορίζεται από την επίδραση καθοδηγητικών μορίων (guidance molecules) στα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στην κορυφή του νεοσχηματιζόμενου αγγείου, ενώ τα ακολουθούντα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν τον αυλό με σύντηξη ενδοθηλιακών κενотоπίων (vacuoles). Κατά την ωρίμανση των αγγείων, περικύτταρα ή λεία μυϊκά κύτταρα προσελκύνονται στα τριχοειδή ή τα αρτηρίδια, αντίστοιχα (**αγγειακή μυογένεση**). Ο PDGF και η μεταγωγή του σήματός του είναι σημαντικός για την προσέλκυση μεσεγγυματικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια διαφοροποιούνται σε περικύτταρα ή λεία μυϊκά κύτταρα με τη δράση του TGFβ. Καθώς ο οργανισμός αναπτύσσεται, το αγγειακό δίκτυο συνεχώς αναδομείται με σμίλευση και διακλάδωση ανταποκρινόμενο σε συνδυαστική δράση αυξητικών παραγόντων, υποξίας και αιματικής ροής για να δημιουργηθεί μια σύνθετη δενδροειδής δομή αρτηριών, φλεβών και τριχοειδών.

Πρόσφατες, αλλά και παλαιότερες, μελέτες έδειξαν ότι η μεταγωγή του σήματος από τον TGF-β είναι σημαντική για τη ρύθμιση της αγγειακής διαφοροποίησης και της αγγειογένεσης. Ο TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες, ενώ διεγείρει την νεοαγγείωση στον κερατοειδή των κουνελιών και την χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη της όρνιθας. Πράγματι, στοχευμένη απενεργοποίηση των γονιδίων του TGF-β1 ή του TβRII (Oshima et al., 1996) οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα λόγω ελαττωματικής αγγειακής διαφοροποίησης και αγγειογένεσης. Φαινότυποι με ελαττωματική αγγειογένεση παρατηρήθηκαν επίσης σε ποντίκια με απενεργοποίηση των γονιδίων του TβRI (ALK-5) (Larsson et al., 2001), του ALK-1 (Oh et al., 2000), της SMAD5 (Chang et al., 2000; Yang et al., 1999), και της ενδογλίνης (Arthur et al., 2000; Li et al., 1999), ενός ειδικού ενδοθηλιακού υποδοχέα του TGF-β τύπου III (χαμηλής συγγένειας).

Πίνακας 2. Αγγειακές και μη αγγειακές διαταραχές παρατηρούμενες σε ετερόζυγα ή ομόζυγα στοχευμένους επίμους αναφορικά με συστατικά της TGF-β σηματοδότησης

Γονίδιο	Θνητότητα	Παρατηρούμενες αγγειακές ανωμαλίες	Άλλοι φαινότυποι που έχουν περιγραφεί	Αγγειακός φαινότυπος ενήλικου ετερόζυγου ποντικού
TGF-β1	E10.5	Διαταραχές αγγειακής διαφοροποίησης λεκιθικού ασκού, μειωμένη ακεραιότητα αγγειακών τοιχωμάτων; Ανωμαλία στην εξωεμβρυϊκή διαφοροποίηση μεσοδέρματος	Φλεγμονή, αυτοανοσία; Ελαττωματική αιμοποίηση λεκιθικού ασκού	Δεν έχει περιγραφεί
TβRII	E10.5	Διαταραχές αγγειακής διαφοροποίησης λεκιθικού ασκού, σχηματισμός διογκωμένων τριχοειδών αγγείων	Ελαττωματική αιμοποίηση λεκιθικού ασκού (δευτερεύουσα)	Δεν έχει περιγραφεί

ALK5	E10.5	Ανωμαλία στο σχηματισμό αγγείων, διαταραχή μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων; Βαριές ανωμαλίες αγγειακής ανάπτυξης λεκιθικού ασκού και πλακούντα	επίπτωση) Απουσία κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων; Φυσιολογική αιμοποίηση Δεν έχει περιγραφεί	Δεν έχει περιγραφεί
ALK1	E11.5	Ελαττωματική αγγειογένεση και διαφοροποίηση και στρατολόγηση αγγειακών λείων μυικών κυττάρων; Αρτηριοφλεβική δυσπλασία	Δεν έχει περιγραφεί	Σύνδρομο συναφές με την Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία
Endoglin	E10- E11.5	Ελαττωματική ωρίμανση του πρωτογενούς πλέγματος του λεκιθικού ασκού, ανάπτυξη και στρατολόγηση μυικών κυττάρων; Ανώμαλη οργάνωση των κυριότερων αγγείων του εμβρύου	Καρδιακές δυσπλασίες (υπετροφικές κοιλίες), μειωμένος αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων	Σύνδρομο συναφές με την Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία
Smad5	E9.5- E11.5	Ελαττωματικό αγγειακό σύστημα του λεκιθικού ασκού συντιθέμενη από μεγενθυμένα αιμοφόρα αγγεία περιβαλλόμενα από μειωμένο αριθμό αγγειακών λείων μυικών κυττάρων; ανωμαλία στην διακλάδωση αγγείων στο κύριο έμβρυο	Αριστερο-δεξιά ασυμμετρία, κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, δυσπλασίες του νευρικού σωλήνα, εντέρου και καρδιάς; αυξημένη μεσεγχυματική απόπτωση	Δεν έχει περιγραφεί

Επιπλέον, αρκετά μοντέλα υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο για τον από τους όγκους εκκρινόμενο TGF-β1 στην αγγειογένεση των όγκων. Υπερέκφραση του TGF-β1 σε διαμολυσμένα κύτταρα προστατικού καρκινώματος ή ωοθηκών Κινέζικου χοιρίδιου προκάλεσε σημαντική αύξηση της ογκικής αγγειογένεσης σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). Τοπική χορήγηση εξουδετερωτικών αντισωμάτων του TGF-β1 ελάττωσε σημαντικά την αγγειογένεση των όγκων (Ueki et al., 1992). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο TGFβ έχει αγγειογενετικό ρόλο *in vivo* και διαμέσου της ενεργοποίησης της αγγειογένεσης σε διάφορους καρκίνους μπορεί να προωθήσει τον κακοήγη φαινότυπο των καρκίνων αυτών (Wakefield and Roberts 2002 and 2003).

Σε αντίθεση με τον TGFβ, η ακτιβίνη A φαίνεται να έχει αντιαγγειογενετική δράση *in vivo*. Πράγματι, η ακτιβίνη A όχι μόνο έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, αλλά αναστέλλει επίσης την δημιουργία αγγείων στην δοκιμασία αγγειογένεσης στην χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσού όρνιθας *in vivo* (Breit et al., 2000). Αυτό την διαφοροποιεί από τον TGFβ και αποτελεί σημαντικό σημείο μελέτης. Πράγματι, δεν υπάρχουν άλλα δεδομένα στη βιβλιογραφία αναφορικά με τη δράση της ακτιβίνης A στην αγγειογένεση και το σημείο αυτό αποτελεί και ένα από τους βασικούς σκοπούς της παρούσας διατριβής.



1.2 Η ARF6 GTPάση

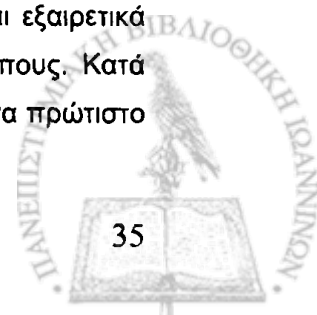
1.2.1 Η οικογένεια των παραγόντων ADP-Ριβοζυλίωσης (ADP-Ribosylation Factors, ARF)

Η οικογένεια των παραγόντων ADP-Ριβοζυλίωσης (ARF) ανήκει στην υπεροικογένεια των Ras GTPασών. Η αρχική ονομασία των ARF πρωτεϊνών οφείλεται στη δυνατότητά τους να λειτουργούν ως συμπαράγοντες για την καταλυόμενη από την τοξίνη της χολέρας ADP-ριβοζυλίωση της α-υπομονάδας των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών, Gs, (Kahn and Gilman, 1986) σε βιοχημικές δοκιμασίες άνευ κυτάρων. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της μεμβρανικής κυκλοφορίας.

Όπως όλες οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν GTP και σχετίζονται με τις Ras, έτσι και οι ARF εναλλάσσονται μεταξύ δύο διαμορφώσεων, της ενεργού μορφής που προσδένει GTP και της ανενεργού μορφής που προσδένει GDP. Πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη δραστηριότητα GTPάσης (GTPase-activating protein, GAPs) μεσολαβούν την υδρόλυση του προσδεμένου GTP, ενώ η ανταλλαγή του GDP με τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, GTP, μεσολαβείται από παράγοντες ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (guanine-nucleotide exchange factors, GEFs) (Jackson and Casanova, 2000; Randazzo and Hirsch, 2004). Όλες οι ARF πρωτεΐνες υφίστανται μυριστουλίωση στο δεύτερο κατάλοιπο γλυκίνης του αμινο-τελικού τους τμήματος, και αυτή η λιπιδιακή τροποποίηση φαίνεται να είναι σημαντική για την αγκυροβόληση των ARF πρωτεϊνών σε μεμβράνες (Amor et al., 1994). Όλα τα ομόλογα της ARF6 είναι βασικές πρωτεΐνες, με ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 8.5 και 9.5, σε αντίθεση με τις άλλες ARF των οποίων το ισοηλεκτρικό σημείο κυμαίνεται από 6.0 έως 7.0. Αυτό το χαρακτηριστικό καθώς και το διπεπτιδίο «υπογραφή» (Gln37-Ser38) (Al-Awar et al., 2000) επιτρέπουν την ταυτοποίηση ομολόγων της ARF6.

Με βάση την ομοιότητα της αμινοξικής τους αλληλουχίας (sequence identity), οι έξι ARF πρωτεΐνες που απαντώνται στα θηλαστικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες (Kahn et al., 2006). Οι ARF πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία I (ARF1, ARF2 και ARF3) εμφανίζουν ομοιότητα (similarity) περισσότερο από 96%, ρυθμίζουν τη συναρμολόγηση των διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών του καλύμματος κυστιδίων κατά μήκος της εκκριτικής οδού, και ενεργοποιούν ένζυμα τροποποίησης των λιπιδίων (Bonifacino and Glick, 2004). Οι λειτουργίες της κατηγορίας II των ARF πρωτεϊνών (ARF4 και ARF5) ακόμα παραμένουν ασαφείς, εντούτοις, μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ARF5 έχει έναν ρόλο στη μεταφορά μέσω των κυστιδίων Golgi και στη στρατολόγηση συστατικών του κυστιδιακού καλύμματος στο δίκτυο trans-Golgi (Claude et al., 1999; Takatsu et al., 2002). Η ARF6, που είναι το μοναδικό μέλος της κατηγορίας III, αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ενδοσωματικής κυκλοφορίας, καθώς και της λιπιδιακής σύστασης της κυτταρικής μεμβράνης (D'Souza-Schorey et al., 1995; Peters et al., 1995; Porat-Shliom et al., 2008). Άλλες πρωτεΐνες που δομικά μοιάζουν με τις προαναφερθείσες ανθρώπινες πρωτεΐνες ARF είναι οι ARL (ARF-Like proteins) (Burd et al., 2004), η λιγότερο σχετιζόμενη SAR1p (Secrition Associated and Ras-related protein-1) (Kuge et al., 1994) και η ARFRP1 (ARF-related Protein) (Mueller et al., 2002).

Οι ARF πρωτεΐνες εκφράζονται ευρύτατα και οι αμινοξικές τους αλληλουχίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από τη ζύμη στους ανθρώπους. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, έξι μέλη της ARF οικογένειας ταυτοποιήθηκαν στο *Giardia lamblia*, ένα πρώτιστο



ALK5	E10.5	Ανωμαλία στο σχηματισμό αγγείων, διαταραχή μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού ενδοθηλιακών κυττάρων; Βαριές ανωμαλίες αγγειακής ανάπτυξης λεκιθικού ασκού και πλακούντα	επίπτωση) Απουσία κυκλοφορούντων ερυθρών αιμοσφαιρίων; Φυσιολογική αιμοποίηση	Δεν έχει περιγραφεί
ALK1	E11.5	Ελαττωματική αγγειογένεση και διαφοροποίηση και στρατολόγηση αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων; Αρτηριοφλεβική δυσπλασία	Δεν έχει περιγραφεί	Σύνδρομο συναφές με την Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία
Endoglin	E10- E11.5	Ελαττωματική ωρίμανση του πρωτογενούς πλέγματος του λεκιθικού ασκού, ανάπτυξη και στρατολόγηση μυϊκών κυττάρων; Ανώμαλη οργάνωση των κυριότερων αγγείων του εμβρύου	Καρδιακές δυσπλασίες (υπετροφικές κοιλίες), μειωμένος αριθμός ερυθρών αιμοσφαιρίων	Σύνδρομο συναφές με την Κληρονομική Αιμορραγική Τηλεαγγειεκτασία
Smad5	E9.5- E11.5	Ελαττωματικό αγγειακό σύστημα του λεκιθικού ασκού συντιθέμενη από μεγενθυμένα αιμοφόρα αγγεία περιβαλλόμενα από μειωμένο αριθμό αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων; ανωμαλία στην διακλάδωση αγγείων στο κύριο έμβρυο	Αριστερό-δεξιά ασυμμετρία, κρανιοπροσωπικές ανωμαλίες, δυσπλασίες του νευρικού σωλήνα, εντέρου και καρδιάς; αυξημένη μεσεγχυματική απόπτωση	Δεν έχει περιγραφεί

Επιπλέον, αρκετά μοντέλα υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο για τον από τους όγκους εκκρινόμενο TGF-β1 στην αγγειογένεση των όγκων. Υπερέκφραση του TGF-β1 σε διαμολυσμένα κύτταρα προστατικού καρκινώματος ή ωοθηκών Κινέζικου χοιριδίου προκάλεσε σημαντική αύξηση της ογκικής αγγειογένεσης σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). Τοπική χορήγηση εξουδετερωτικών αντισωμάτων του TGF-β1 ελάττωσε σημαντικά την αγγειογένεση των όγκων (Ueki et al., 1992). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο TGFβ έχει αγγειογενετικό ρόλο *in vivo* και διαμέσου της ενεργοποίησης της αγγειογένεσης σε διάφορους καρκίνους μπορεί να προωθήσει τον κακοήγη φαινότυπο των καρκίνων αυτών (Wakefield and Roberts 2002 and 2003).

Σε αντίθεση με τον TGFβ, η ακτιβίνη A φαίνεται να έχει αντιαγγειογενετική δράση *in vivo*. Πράγματι, η ακτιβίνη A όχι μόνο έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, αλλά αναστέλλει επίσης την δημιουργία αγγείων στην δοκιμασία αγγειογένεσης στην χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσού όρνιθας *in vivo* (Breit et al., 2000). Αυτό την διαφοροποιεί από τον TGFβ και αποτελεί σημαντικό σημείο μελέτης. Πράγματι, δεν υπάρχουν άλλα δεδομένα στη βιβλιογραφία αναφορικά με τη δράση της ακτιβίνης A στην αγγειογένεση και το σημείο αυτό αποτελεί και ένα από τους βασικούς σκοπούς της παρούσας διατριβής.



1.2 Η ARF6 GTPάση

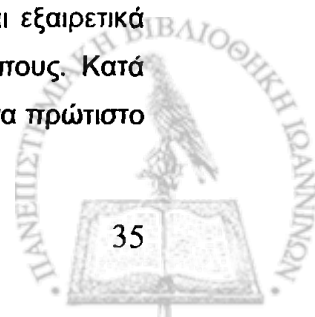
1.2.1 Η οικογένεια των παραγόντων ADP-Ριβοζυλίωσης (ADP-Ribosylation Factors, ARF)

Η οικογένεια των παραγόντων ADP-Ριβοζυλίωσης (ARF) ανήκει στην υπεροικογένεια των Ras GTPασών. Η αρχική ονομασία των ARF πρωτεϊνών οφείλεται στη δυνατότητά τους να λειτουργούν ως συμπαραγόντες για την καταλυόμενη από την τοξίνη της χολέρας ADP-ριβοζυλίωση της α-υπομονάδας των ετεροτριμερών G πρωτεϊνών, Gs, (Kahn and Gilman, 1986) σε βιοχημικές δοκιμασίες άνευ κυττάρων. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές της μεμβρανικής κυκλοφορίας.

Όπως όλες οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν GTP και σχετίζονται με τις Ras, έτσι και οι ARF εναλλάσσονται μεταξύ δύο διαμορφώσεων, της ενεργού μορφής που προσδένει GTP και της ανενεργού μορφής που προσδένει GDP. Πρωτεΐνες που ενεργοποιούν τη δραστηριότητα GTPάσης (GTPase-activating protein, GAPs) μεσολαβούν την υδρόλυση του προσδεδεμένου GTP, ενώ η ανταλλαγή του GDP με τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, GTP, μεσολαβείται από παράγοντες ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (guanine-nucleotide exchange factors, GEFs) (Jackson and Casanova, 2000; Randazzo and Hirsch, 2004). Όλες οι ARF πρωτεΐνες υφίστανται μυριστουλίωση στο δεύτερο κατάλοιπο γλυκίνης του αμινο-τελικού τους τμήματος, και αυτή η λιπιδιακή τροποποίηση φαίνεται να είναι σημαντική για την αγκυροβόληση των ARF πρωτεϊνών σε μεμβράνες (Amor et al., 1994). Όλα τα ομόλογα της ARF6 είναι βασικές πρωτεΐνες, με ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 8.5 και 9.5, σε αντίθεση με τις άλλες ARF των οποίων το ισοηλεκτρικό σημείο κυμαίνεται από 6.0 έως 7.0. Αυτό το χαρακτηριστικό καθώς και το διπεπτιδίο «υπογραφή» (Gln37-Ser38) (Al-Awar et al., 2000) επιτρέπουν την ταυτοποίηση ομολόγων της ARF6.

Με βάση την ομοιότητα της αμινοξικής τους αλληλουχίας (sequence identity), οι έξι ARF πρωτεΐνες που απαντώνται στα θηλαστικά μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις κατηγορίες (Kahn et al., 2006). Οι ARF πρωτεΐνες που ανήκουν στην κατηγορία I (ARF1, ARF2 και ARF3) εμφανίζουν ομοιότητα (similarity) περισσότερο από 96%, ρυθμίζουν τη συναρμολόγηση των διαφορετικών τύπων πρωτεϊνών του καλύμματος κυστιδίων κατά μήκος της εκκριτικής οδού, και ενεργοποιούν ένζυμα τροποποίησης των λιπιδίων (Bonifacino and Glick, 2004). Οι λειτουργίες της κατηγορίας II των ARF πρωτεϊνών (ARF4 και ARF5) ακόμα παραμένουν ασαφείς, εντούτοις, μερικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ARF5 έχει έναν ρόλο στη μεταφορά μέσω των κυστιδίων Golgi και στη στρατολόγηση συστατικών του κυστιδιακού καλύμματος στο δίκτυο trans-Golgi (Claude et al., 1999; Takatsu et al., 2002). Η ARF6, που είναι το μοναδικό μέλος της κατηγορίας III, αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ενδοσωματικής κυκλοφορίας, καθώς και της λιπιδιακής σύστασης της κυτταρικής μεμβράνης (D'Souza-Schorey et al., 1995; Peters et al., 1995; Porat-Shliom et al., 2008). Άλλες πρωτεΐνες που δομικά μοιάζουν με τις προαναφερθείσες ανθρώπινες πρωτεΐνες ARF είναι οι ARL (ARF-Like proteins) (Burd et al., 2004), η λιγότερο σχετιζόμενη SAR1p (Secritin Associated and Ras-related protein-1) (Kuge et al., 1994) και η ARFRP1 (ARF-related Protein) (Mueller et al., 2002).

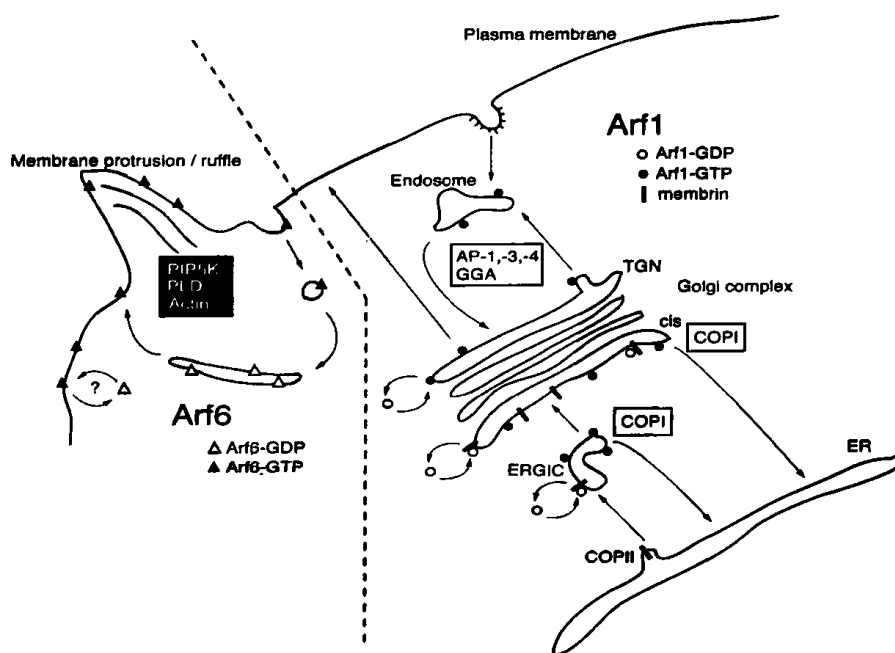
Οι ARF πρωτεΐνες εκφράζονται ευρύτατα και οι αμινοξικές τους αλληλουχίες είναι εξαιρετικά συντηρημένες σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, από τη ζύμη στους ανθρώπους. Κατά τρόπο ενδιαφέροντα, έξι μέλη της ARF οικογένειας ταυτοποιήθηκαν στο *Giardia lamblia*, ένα πρώτιστο



της πρώιμης αποκλίνουσας εξέλιξης (early diverging lineage) που στερείται αντιπροσώπων της Ras οικογένειας και των ετεροτριμερών G-πρωτεϊνών (Li et al., 2004b; Murtagh et al., 1992). Αυτή η ανακάλυψη δείχνει μια διακριτή και πρόωρα ευκαρυωτική προέλευση για τα μέλη της ARF οικογένειας σχετικά με τις άλλες GTPases. Εντύπωση προκαλεί η απουσία ομολόγων της ARF6 στο φυτό *Arabidopsis* ή σε άλλα φυτικά είδη γεγονός που υποδηλώνει ότι η ARF6 δεν απαντάται στα φυτά!

Η ιδιαίτερη κυτταρική κατανομή της καθεμιάς ARF πρωτεΐνης και τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν είναι μεγάλης σημασίας για τον προσδιορισμό της λειτουργίας των ARF πρωτεϊνών. Επίλυση της δομής των ARF1 και ARF6 πρωτεϊνών με κρυσταλλογραφικές μελέτες αποκάλυψαν ότι μολονότι οι «περιοχές Switch» των ARF1 και ARF6 υιοθετούν αρκετά διακριτές διαμορφώσεις κατά την πρόσδεση GDP, οι δομές που προσδένουν GTP, είναι αρκετά όμοιες (Pasqualato et al., 2001). Αυτό εγείρει το εύλογο ερώτημα της εξειδίκευσης αναφορικά με τις αλληλεπιδράσεις με καθοδικούς τελεστές και τις κυτταρικές λειτουργίες που αυτές επάγουν. Πράγματι, η πλειοψηφία των ARF τελεστών που έχουν ταυτοποιηθεί μπορούν να αλληλεπιδράσουν τουλάχιστον ως ένα ορισμένο βαθμό, με περισσότερες από μια πρωτεΐνες ARF σε in vitro δοκιμασίες πρόσδεσης (Balasubramanian et al., 2007; Bose et al., 2001; Brown et al., 1993; Cockcroft et al., 1994; Kawasaki et al., 2005; Shin et al., 2001; Shin and Exton, 2001).

Στο κύτταρο, εντούτοις, φαίνεται ότι οι πρωτεΐνες ARF έχουν διακριτό εντοπισμό, ώστε κάθε μέλος της ARF οικογένειας να επάγει συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες (Peters et al., 1995) (Εικόνα 1.20). Έτσι, η ARF6, λόγω της εντόπισής της στην κυτταρική μεμβράνη, επηρεάζει την ενδοκυττάρωση και διαλογή μεμβρανικών πρωτεϊνών, καθώς και τη λιπιδιακή σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ η ARF1, η οποία εντοπίζεται στις μεμβράνες του εκκριτικού συστήματος, ρυθμίζει τη συναρμολόγηση των κυστιδικών καλυμμάτων στο εκκριτικό σύστημα (Donaldson, 2005; Donaldson and Honda, 2005).

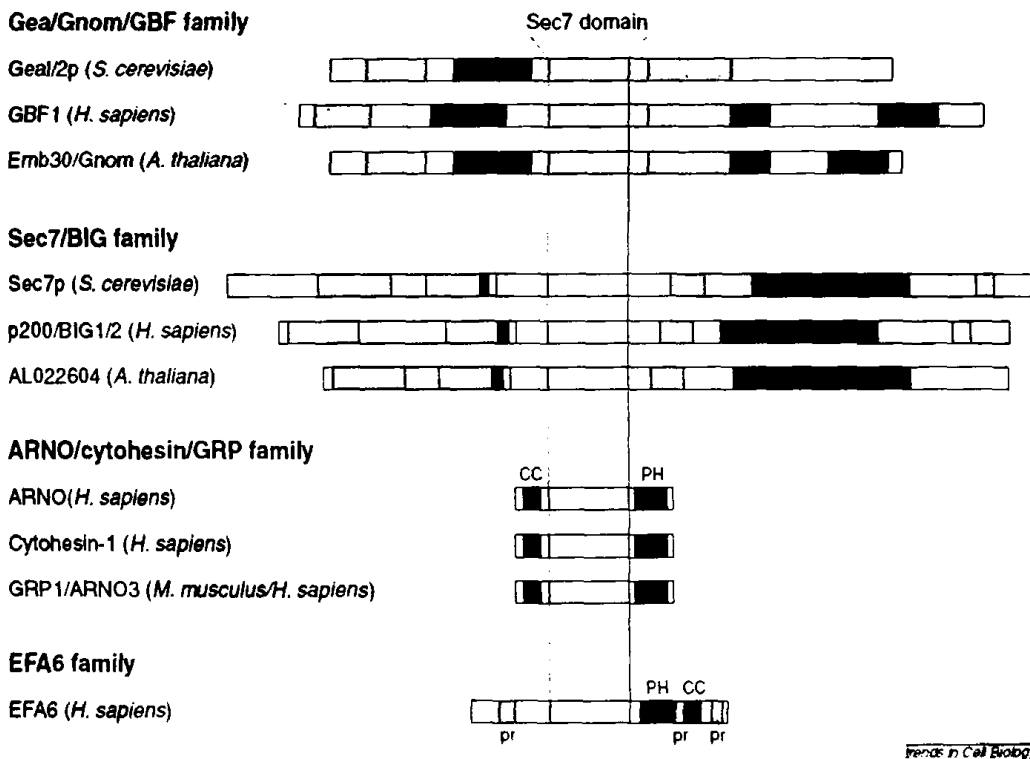


Εικόνα 1.20. Κυτταρική εντόπιση και λειτουργία των ARF1 και ARF6 πρωτεϊνών (Donaldson and Honda, 2005).



1.2.2 Παράγοντες ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (guanine nucleotide exchange factors, GEFs) των ARF6 GTPασών

Οι ARF GTPάσες απαιτούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες τις γνωστές ως παράγοντες ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου της γουανίνης (GEFs) που καταλύουν την ανταλλαγή του GDP με GTP, η οποία διαφορετικά θα είχε βραδεία κινητική υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το 1996 ταυτοποιήθηκαν οι πρώτοι ARF GEFs στο μύκητα *S. Cerevisiae* (Peyroche et al., 1996). Αν και οι ARF GEFs εμφανίζουν μεγάλη ποικιλότητα σε ό,τι αφορά την αλληλουχία τους, ωστόσο μοιράζονται μια κοινή δομική περιοχή περιοχή 200 περίπου αμινοξέων που εμφανίζει μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη Sec7p των μυκήτων γι' αυτό και ονομάστηκε Sec7 δομική περιοχή (Εικόνα 1.21). Αυτή η περιοχή από μόνη της είναι επαρκής ώστε να καταλύει την ανταλλαγή νουκλεοτιδίου. Οι περιοχές εκτός αυτής παίζουν ρόλο στο να καθορίσουν την εξειδίκευση υποστρώματος, είτε άμεσα είτε έμμεσα στοχεύοντας τις GEFs σε συγκεκριμένες μεμβρανικές τοποθεσίες. Η δραστικότητα πολλών από τους ARF GEFs κυρίως των μεγάλου μοριακού βάρους, αναστέλλεται από την τοξίνη του μύκητα brefeldin A (BFA) (Donaldson et al., 1992; Helms and Rothman, 1992). Η ευαισθησία στη BFA βρίσκεται εντός της ίδιας της Sec7 περιοχής. Συγκεκριμένα, πρόκειται για μια περιοχή 35 αμινοξέων που διαφέρει μεταξύ GEF ευαίσθητων και ανθεκτικών στη BFA.



Εικόνα 1.21. Η οικογένεια των Sec7 πρωτεϊνών. Απεικονίζονται αντιπροσωπευτικά μέλη τεσσάρων διαφορετικών υποοικογενειών των Sec7 πρωτεϊνών, με την Sec7 περιοχή να χρωματίζεται με γκρι χρώμα. Στους GEFs υψηλού μοριακού βάρους οι δομικές περιοχές όμοιας αλληλουχίας χρωματίζονται το ίδιο χρώμα, ενώ υπάρχει μόνο ένα κοινό μοτίβο (I/V/L-N-F/L/Y-D-C) ανάμεσά τους το οποίο παρουσιάζεται με μπλέ σκούρο ανοδικά της Sec7 περιοχής. Επίσης, δείχνονται οι coiled-coil (CC) και pleckstrin-homology (PH) περιοχές των ARNO-cytohesin-GRP και EFA6 υποοικογενειών. Οι περιοχές πλούσιες σε προλίνες της EFA6 οικογένειας συμβολίζονται ως 'pr' (Jackson and Casanova, 2000).

Η υποοικογένεια των ARF GEF πρωτεϊνών μικρότερου μοριακού βάρους περιέχει τις πρωτεΐνες ARNO (Chardin et al., 1996), cytohesin-1 (Kolanus et al., 1996), GRP1/ARNO3 (Franco et al., 1998;

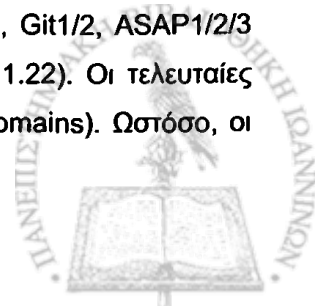
Klarlund et al., 1997) και EFA6 (Franco et al., 1999). Οι ARNO, cytohesin-1 και GRP1/ARNO3 είναι παρεμφερείς σε ότι αφορά το μέγεθος (kDa 45-50) και την ακολουθία (ταυτότητα 77%). Η αμινοτελική περιοχή των ~60 αμινοξέων σχηματίζει δομή εσπειραμένου σπειράματος (coiled-coil), η οποία στον ARNO είναι υπεύθυνη για τον ομοδιμερισμό του μορίου (Chardin et al., 1996). Η περιοχή ομολογίας με πλεκστρίνη (pleckstrin homology, PH) μεσολαβεί την σύνδεση με μεμβράνες με την πρόσδεσή της είτε σε (3,4,5) ή (4,5) φωσφατιδύλο-ινοσιτόλες (Chardin et al., 1996; Venkateswarlu et al., 1998). Αυτή η αλληλεπίδραση προκαλεί τη συγκέντρωση των αντιδρώντων μορίων στη μεμβρανική επιφάνεια ενεργοποιώντας εντυπωσιακά το ρυθμό ανταλλαγής νουκλεοτιδίου επί των ARF (Paris et al., 1997).

Με βάση τα παραπάνω, η ARF6 αποτελεί το πιο προφανές υπόστρωμα των ARNO, cytohesin-1 και GRP1/ARNO3, δεδομένου ότι εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη και σε ένα υποπληθυσμό των ενδοσωμάτων. Έτσι, τόσο ο ARNO (Frank et al., 1998a) όσο και ο GRP1/ARNO3 (Langille et al., 1999) μπορούν να καταλύσουν την ανταλλαγή νουκλεοτιδίου στην ARF6 *in vitro*. Η έκφραση της ARNO σε HeLa κύτταρα προκαλεί αλλαγές στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης παρόμοιες με εκείνες που προκαλούνται από την ενεργοποίηση της ARF6 (Frank et al., 1998b). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η ARF6 και η GRP1 προσελκύονται στις μεμβρανικές αναδιπλώσεις μετά από επεξεργασία των κυττάρων με ινσουλίνη και ότι η έκφραση της GRP1 αυξάνει τα επίπεδα της ARF6-GTP σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα (Langille et al., 1999).

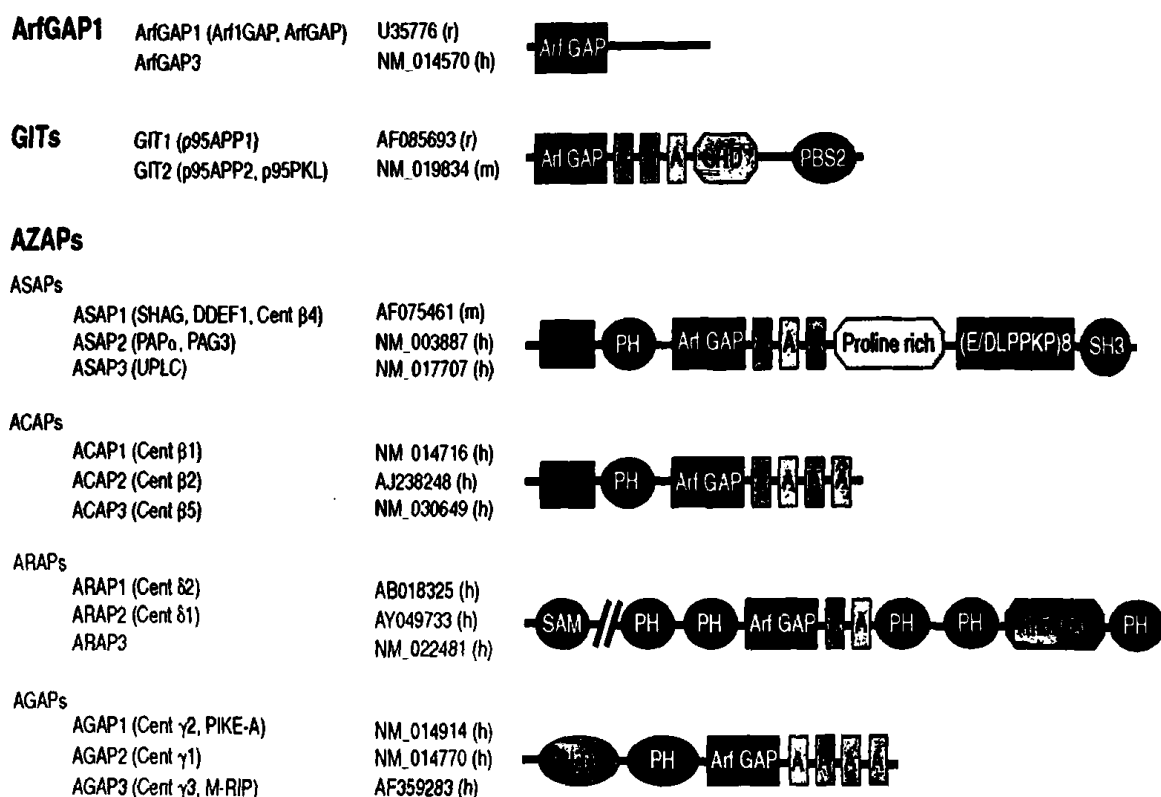
Η EFA6 είναι ένας ακόμη GEF με υπόστρωμα την ARF6 (Franco et al., 1999), η οποία περιέχει τρεις περιοχές πλούσιες σε προλίνες οι οποίες μπορούν να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες. Η Sec7 περιοχή της EFA6 είναι μόνο κατά 30% ταυτόσημη με αυτή του ARNO, έναντι της ταυτότητας αλληλουχίας 42% μεταξύ εκείνων των ARNO και Sec7p. Αν και η EFA6 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, έχει βρεθεί ότι υπάρχουν τέσσερις ισομορφές στα θηλαστικά, EFA6A, EFA6B, EFA6C, και EFA6D, εκ των οποίων η τελευταία εκφράζεται ευρύτατα (Casanova, 2007). Σύμφωνα με τη δυνατότητά της να ενεργοποιεί την ARF6 *in vitro*, η έκφραση της EFA6 προκάλεσε την αναδίπλωση της μεμβράνης σε κύτταρα CHO και επίσης εμπόδισε την πρόσληψη τρανσφερίνης (Franco et al., 1999). Αντίθετα από τους ARNO, cytohesin και GRP1, οι οποίοι στρατολογούνται παροδικά στη κυτταρική μεμβράνη αποκρινόμενοι στην παραγωγή φωσφορυλιωμένων φωσφατιδύλο-ινοσιτολών, η EFA6 εμφανίζεται να είναι συνδεδεμένη στη μεμβράνη και κατά συνέπεια συνεχώς ενεργή.

1.2.3 Ενεργοποιητικές της δραστηριότητας GTPάσης πρωτεΐνες (GTPase activating proteins, GAPs) της ARF6

Η απενεργοποίηση των ARF απαιτεί την υδρόλυση του προσδεδεμένου GTP. Επειδή τα μέλη της οικογένειας ARF έχουν εξαιρετικά χαμηλή εγγενή δραστηριότητα GTPάσης, απαιτείται μια πρόσθετη πρωτεΐνη η οποία ενεργοποιεί τη δραστηριότητα GTPάσης (GAP) για να καταλύσει την υδρόλυση του GTP. Στις GAP των ARF υπάρχει μια συντηρημένη περιοχή που περιέχει ένα μοτίβο "zinc finger" η οποία μεσολαβεί την κατάλυση (ArfGAP) (Εικόνα 1.22). Έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 24 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που φέρουν περιοχές ArfGAP. Οι πρωτεΐνες αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε έξι ομάδες βάσει των πρωτοταγών τους δομών (Arf GAP1/2/3, Git1/2, ASAP1/2/3 ACAP1/2/3, ARAP1/2/3 και AGAP1/2/3) (Randazzo and Hirsch, 2004) (Εικόνα 1.22). Οι τελευταίες τέσσερις υποομάδες καλούνται AZAP (Arf GAP with Ankyrin repeats and PH domains). Ωστόσο, οι



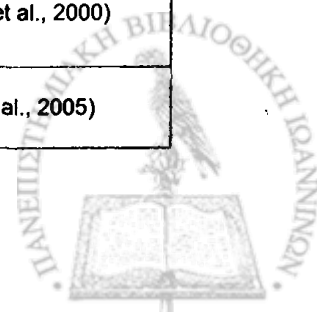
GAP των ARF δεν μεσολαβούν τις λειτουργίες τους μόνο διάμεσου των ArfGAP, αλλά φέρουν μια ποικιλία περιοχών (Εικόνα 1.22) οι οποίες διαμεσολαβούν την αλληλεπίδρασή τους με σηματοδοτικά μόρια, λιπίδια, πρωτεΐνες προσαρμογής ή μπορούν να παίζουν το ρόλο ικριώματος (Randazzo and Hirsch, 2004). Επειδή οι ARF πρωτεΐνες ρυθμίζουν την μεμβρανική κυκλοφορία και την αναδιοργάνωση της ακτίνης, οι GAP των ARF, μέσω της καταλυτικής τους δράσης επί των ARF GTPασών, επηρεάζουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, όπως την κυκλοφορία υποδοχέων, την κυτταρική μετανάστευση και διείσδυση (βλέπε, πίνακα 3 και Εικόνα 1.23).

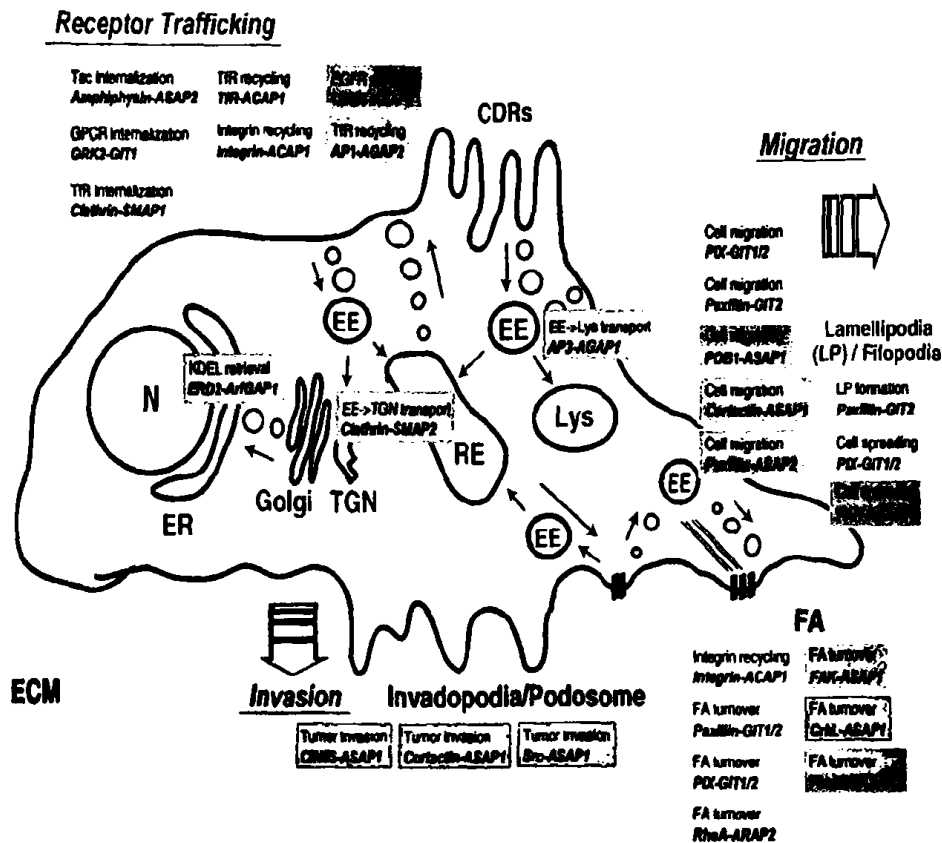


Εικόνα 1.22. Ταξινόμηση και δομικές περιοχές των ARF GAP. Σημειώνονται οι τρεις σημαντικότερες ομάδες των ARF GAP. Εναλλακτικά ονόματα για τις διαφορετικές ARF GAP αναγράφονται εντός παρενθέσεων. Επίσης, παρατίθενται οι αριθμοί πρόσβασης στην αλληλουχία για καθεμία από αυτές μαζί με τα είδη προέλευσης που υποδεικνύονται ως (h) άνθρωπος, (r) αρουραίος, και (m) ποντικός. **A**, ανκγρίνη επαναλήψεις; **BAR**, Bin, amphiphysin and Rvs 167 and Rvs 161; **GLD**, GTP-binding protein-like domain; **PBS**, αλληλουχία πρόσδεσης στην paxillin; **PH**, περιοχή ομολογίας pleckstrin; **SAM**, sterile αmotif; **SH3**, περιοχή ομολογίας src 3; **SHD**, περιοχή ομολογίας SPA (Nie and Randazzo, 2006).

Πίνακας 3. Ταξινόμηση των ARF GAPs και ιδιαίτερα αυτών που έχουν ως υπόστρωμα την ARF6. Σημειώνονται οι λειτουργίες τους καθώς και βιβλιογραφικές πηγές για καθεμία από αυτές.

ARF GAP	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ	ΑΝΑΦΟΡΑ
SMAP1	ARF6	Αλληλεπιδρά με την κλαθρίνη και ρυθμίζει την κλαθρίνο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση της τραιοφερίνης και της E-καντηχερίνης	(Kon et al., 2008; Tanabe et al., 2008; Tanabe et al., 2006; Tanabe et al., 2005)
SMAP2	ARF1	Ρύθμιση μεταφοράς από τα πρώιμα ενδοσώματα στο δίκτυο trans-Golgi	(Natsume et al., 2006; Tanabe et al., 2008)
ACAP1, ACAP2	ARF6>> ARF1,ARF5	Ανακύκλωση μεμβρανών από το εσωτερικό προς την κυτταρική μεμβράνη	(Dai et al., 2004; Jackson et al., 2000a; Ma et al., 2007)
ACAP4	ARF6	Ρύθμιση της κυτταρικής μετανάστευσης	(Fang et al., 2006)
AMAP1	ARF6	Έκφραση της AMAP1 σχετίζεται με εμφάνιση διεισδυτικού φαινότυπου σε πρωτογενείς όγκους καρκίνου του μαστού	(Hashimoto et al., 2006)
AMAP2	ARF6	Ρύθμιση της κλαθρίνο-ανεξάρτητης ενδοκυττάρωσης της Tac	(Hashimoto et al., 2004a; Hashimoto et al., 2005; Hashimoto et al., 2006)
Centaurin alpha-1	ARF6	Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης των νευρικών κυττάρων. Αναστέλλει την εσωτερική του β2-αδρενεργικού Υποδοχέα, αλληλεπιδρά με την KIF13B κινεσίνη	(Kanamarlapudi, 2005; Lawrence et al., 2005; Thacker et al., 2004; Venkateswarlu et al., 2004)
Centaurin alpha-2	ARF6	Αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης	(Venkateswarlu et al., 2007)
ARAP2	ARF6	Ρύθμιση των εστιακών προσφύσεων	(Yoon et al., 2006)
ARAP3	ARF6, RhoA	Έλεγχος σχηματισμού λαμελλοποδίων και ινιδίων του στρες	(I et al., 2004; Krugmann et al., 2002; Krugmann et al., 2006; Krugmann et al., 2004; Raaijmakers et al., 2007)
GIT1	ARF1, ARF6	Τερματίζει την ασβέστιο-ρυθμιζόμενη εξωκυττάρωση στα νευροενδοκρινικά κύτταρα, ρύθμιση του κυτταροσκελετού των εστιακών προσφύσεων και της κυτταρικής μετανάστευσης. Ενδοκυττάρωση υποδοχέων GPCR, EGFR μέσω κλαθρίνο-εξαρτώμενης οδού	(Claing et al., 2000; Meyer et al., 2006; Premont et al., 1998; Premont et al., 2004; Vitale et al., 2000)
GIT2 (επίσης PKL)	ARF1, ARF6	Καταστέλλει τη Crk και Rac1 ρυθμιζόμενη κυτταρική διασπορά και Cdc42-μεσολαβούμενη αναπλήρωση (turnover) των εστιακών προσφύσεων (focal adhesions)	(Frank et al., 2006; Lamorte et al., 2003; Vitale et al., 2000)
AGAP1	Arf1>Arf5>Arf6	Ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης	(Nie et al., 2005)

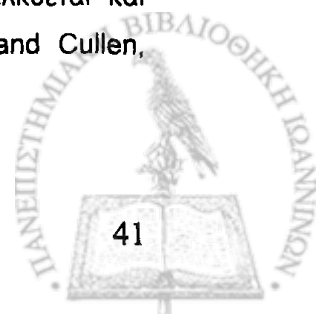




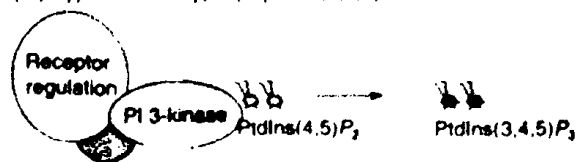
Εικόνα 1.23. Απεικόνιση των πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων που σχηματίζουν οι Arf GAPs ώστε να ρυθμίσουν σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυκλοφορία υποδοχέων (receptor trafficking), η κυτταρική μετανάστευση (cell migration) και η διείσδυση (invasion). Οι GAPs που χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα Arf1 ή Arf6 απεικονίζονται με μπλέ ή κίτρινο, αντίστοιχα. Οι GAPs των οποίων η εξειδίκευση υποστρώματος είναι αμφίβολη ή πρόκειται για την Arf5 απεικονίζονται με πράσινο (Inoue and Randazzo, 2007).

1.2.4 Ο ρόλος της PI3K στη ρύθμιση του κύκλου των ARF

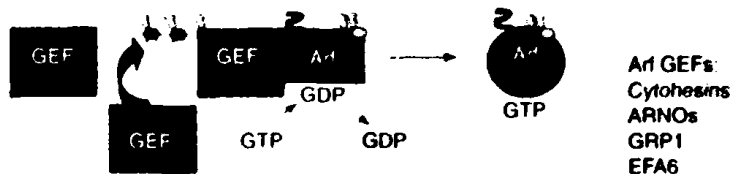
Η PI3K ενεργοποιείται από πολλούς υποδοχείς και παράγει (3,4,5)-τριφωσφορυλιωμένη φωσφατιδύλο-ινοσιτόλη φωσφορυλιώνοντας τη (4,5)-διφωσφορυλιωμένη φωσφατιδύλο-ινοσιτόλη. Το παραχθέν φωσφολιπίδιο παίζει σημαντικό ρόλο στην προσέλκυση και ενεργοποίηση άλλων κινασών, όπως της AKT, η καθοδική σηματοδότηση των οποίων ρυθμίζει σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι η (3,4,5)-τριφωσφορυλιωμένη φωσφατιδύλο-ινοσιτόλη παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη μεμβρανική προσέλκυση και ενεργοποίηση σειράς GEF και GAP (Jackson et al., 2000b), οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις ARF GTPάσες και ρυθμίζουν τον κύκλο ενεργοποίησης-απενεργοποίησης τους (Εικόνα 1.24), επηρεάζοντας κυτταρικές λειτουργίες όπως την κυστιδική κυκλοφορία και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Jackson et al., 2000b). Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι cytohesins (υποκατηγορία των ARF GEF) και οι centaurins (υποκατηγορία των ARF GAP). Ειδικότερα για την ARF6, μελέτες έδειξαν ότι η ενεργοποίηση της ARF6 λαμβάνει χώρα καθοδικά της PI 3-κινάσης και ότι αυτή πραγματοποιείται μέσω του cytohesin-1 GEF, ο οποίος προσελκύεται και προσδένεται στη (3,4,5)-τριφωσφορυλιωμένη φωσφατιδύλο-ινοσιτόλη (Venkateswarlu and Cullen, 2000).



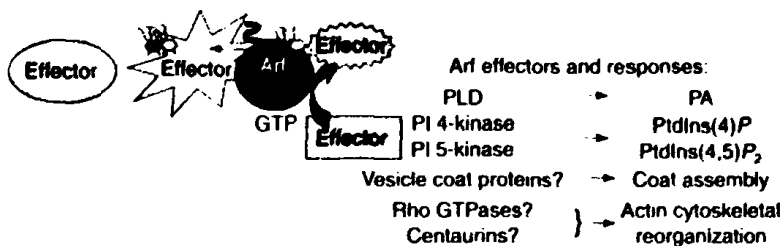
(1) Ενεργοποίηση της PI 3-κινάσης παράγει PI (3,4,5)P₃



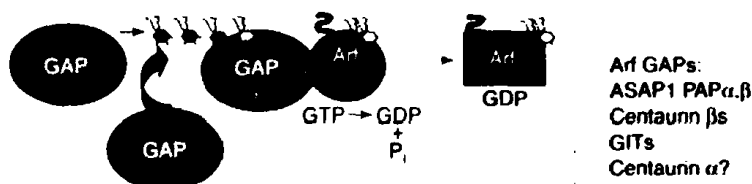
(2) Στρατολόγηση του GEF από τα PI (3,4,5)P₃ ενεργοποιεί την ARF



(3) Η ARF-GTP ενεργοποιεί καθοδικούς τελεστές και αποκρίσεις



(4) Στρατολόγηση και ενεργοποίηση της GAP από PI (3,4,5)P₃ απενεργοποιεί την ARF



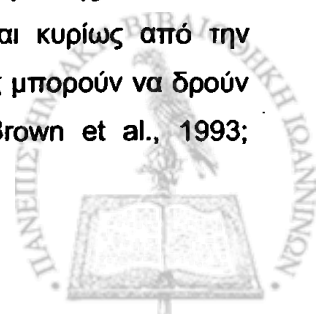
T/BS

Εικόνα 1.24. Σχηματική αναπαράσταση του ARF σηματοδοτικού καταρράκτη που ρυθμίζεται από τις PtdIns (3,4,5) P₃ φωσφατιδύλο-ινοσιτόλες. (1) Ενεργοποίηση του υποδοχέα οδηγεί σε επακόλουθη ενεργοποίηση των PI 3-κινάσων τάξης I και παραγωγή PtdIns (3,4,5) P₃. (2) Παραγωγή PtdIns (3,4,5) P₃ επάγει την προσέλκυση των GEF της υποοικογένειας των cytohesin στη μεμβράνη, ενδεχομένως συγκεντρώνοντας τους κοντά στο στόχο τους, τις ARF πρωτεΐνες. Η ενισχυμένη δραστηριότητα των GEF οδηγεί στην ανταλλαγή νουκλεοτιδίου και στην ενεργοποίηση των αγκυροβολημένων στη μεμβράνη ARF, λόγω της μυριστοϋλίωσης στο αμινοτελικό άκρο τους. (3) Οι ARF GTPάσες και οι διάφοροι φερόμενοι ως τελεστές τους αλληλεπιδρούν άμεσα με τις φωσφατιδύλο-ινοσιτόλες PtdIns (3,4,5) P₃ και PtdIns (4,5) P₂. (4) Οι φωσφατιδύλο-ινοσιτόλες PtdIns (3,4,5) P₃ επίσης προσελκύουν ARF GAP της υποοικογένειας των centaurin στη μεμβράνη, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας των GAP. Τα βήματα που περιγράφηκαν μπορεί να συμβαίνουν διαδοχικά σε ένα δεδομένο μεμβρανικό τμήμα ή να λαμβάνουν μέρος σε διαφορετικές θέσεις μεμβρανών μέσα στο κύτταρο. Συντμήσεις: ARF, ADP ribosylation factor; ARNO, Arf nucleotide-binding-site opener; ASAP1, Arf GAP with SH3, ankyrin repeat and PH domains; EFA6, exchange factor for Arf6; GIT, GRK-interacting protein; GRP, general receptor for phosphoinositides; PA, phosphatidic acid; PAP, Pyk2-associated protein; PI, phosphoinositide; PLD, phospholipase D (Jackson et al., 2000b).

1.2.5 Λειτουργίες της ARF6

1.2.5.1 Η ARF6 συμμετέχει στη ρύθμιση της κλαθρινο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης

Οι δράσεις της ARF6 στη δυναμική των ενδοσωμάτων μεσολαβούνται κυρίως από την επίδρασή της στο μεταβολισμό των φωσφολιπιδίων. Πράγματι, οι ARF πρωτεΐνες μπορούν να δράσουν ως ενεργοποιητές του ενζύμου φωσφολιπάση D (phospholipase D, PLD) (Brown et al., 1993;

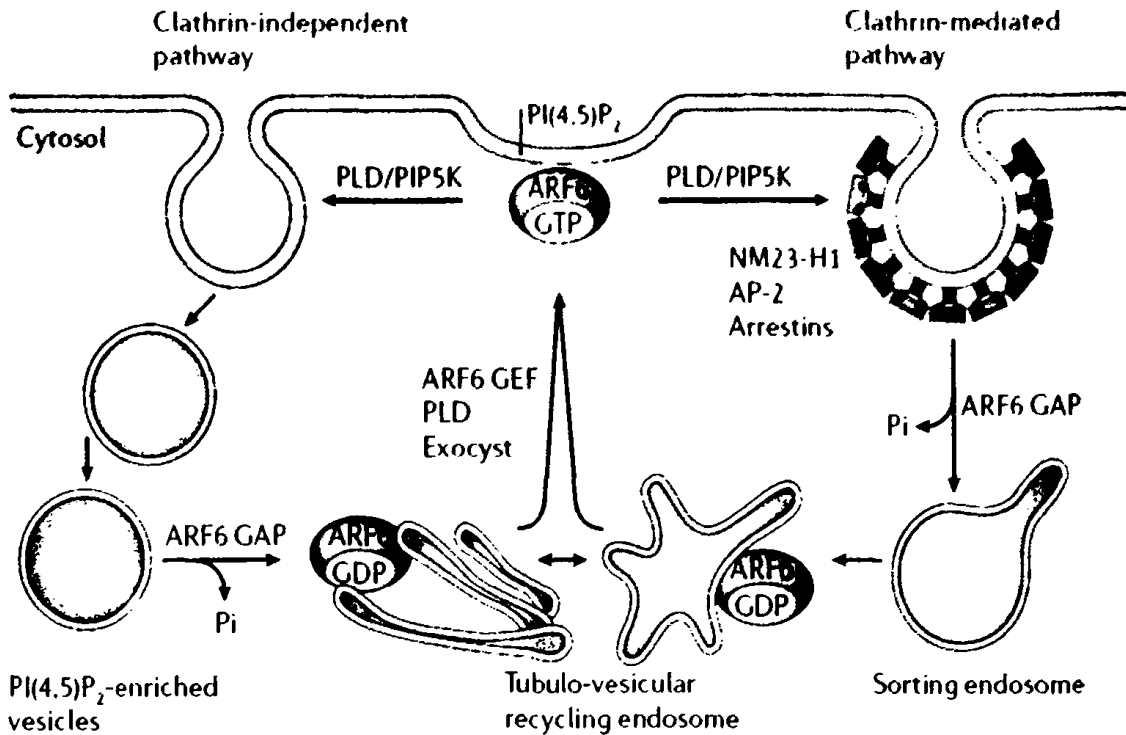


Cockcroft et al., 1994), ενός ενζύμου που υδρολύει τη φωσφατιδυλοχολίνη για να δώσει φωσφατιδικό οξύ (phosphatidic acid, PA). Πειραματικά στοιχεία υποστηρίζουν ότι η ARF6 προσδέεται άμεσα στην PLD και είναι ο βασικός ενεργοποιητής της PLD (Melendez et al., 2001; Powner and Wakelam, 2002), γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή του PA. Ένας άλλος διαμεσολαβητής της δράσης της ARF6 στη ενδοσωματική δυναμική είναι η PIP5-κινάση (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase), με την οποία συνεντοπίζεται και ενεργοποιεί. Η PIP5-κινάση με τη σειρά της παράγει PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), μια σημαντική φωσφατιδύλο-ινοσιτόλη, η οποία εμπλέκεται στη μεμβρανική κυκλοφορία και την αναδιοργάνωση της ακτίνης (Czech, 2003; Yin and Janmey, 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι το φωσφατιδικό οξύ, το οποίο προέρχεται από την ενεργοποίηση της PLD από την ARF6, ενεργοποιεί επίσης την PIP5-κινάση (Martin, 2001) δρώντας ενισχυτικά αναφορικά με την παραγωγή PIP₂ από την ARF6.

Η ενεργοποίηση της PIP5K καθώς επίσης και της PLD από την ARF6 μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση της PIP₂, η οποία ρυθμίζει θετικά την διαμεσολαβούμενη από κλαθρίνη ενδοκυττάρωση (Wenk and De Camilli, 2004). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της PIP5K1γ από την ARF6 οδηγεί στην προσέλκυση των καλυμμάτων κλαθρίνης, όπως έχει δείχθει σε συναπτικές μεμβράνες (Krauss et al., 2003). Σε τελική ανάλυση, η ARF6-GTP και η PIP₂ λειτουργούν συνεργιστικά ώστε να προσελκυστεί η AP-2, γεγονός που συμβάλλει στο σχηματισμό καλυμμένων κοιλοτήτων (coated pits) (Paleotti et al., 2005). Επιπλέον, η ARF6 συνδέεται και προσελκύει την NM23-H1 (Palacios et al., 2001; Palacios et al., 2002), μια κινάση διφωσφορικών νουκλεοσιδίων, η οποία λειτουργεί ως πηγή GTP για την εξαρτώμενη από τη δυναμίνη σχάση κυστιδίων (vesicle fission), όπως έχει δείχθει ότι συμβαίνει στην πλευρική μεμβράνη πολωμένων MDCK κυττάρων (Krishnan et al., 2001) (Εικόνα 1.25). Η υδρόλυση της ARF6-GTP συμβαίνει κατά μήκος της ενδοκυττάρωσης οδού από συγκεκριμένες ARF GAP, όπως η SMAP1, η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τη βαριά αλυσίδα της κλαθρίνης (Tanabe et al., 2005).

1.2.5.2 Η ARF6 συμμετέχει στη ρύθμιση της κλαθρίνο-ανεξάρτητης ενδοκυττάρωσης

Η ARF6 ρυθμίζει επίσης την εσωτερίκευση προσδεμάτων μέσω μιας ξεχωριστής οδού ανεξάρτητης από κλαθρίνη και καβεοσώματα (Donaldson, 2003) (Εικόνα 1.25). Προσδέματα που εσωτερικεύονται μέσω αυτής της διαδρομής περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη Τάξης I του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (MHC class I), την α-υπομονάδα του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης-2 (interleukin 2 receptor α subunit, Tac), τους M2 Μουσκαρινικούς υποδοχείς ακετυλοχολίνης, τις β1-ιντεγκρίνες και την περιφερειακή μεμβρανική πρωτεΐνη μυελίνη (PMP22) (Donaldson, 2003). Μετά την εσωτερίκευση, η ARF6 και άλλα συστατικά της μεμβράνης ανακυκλώνονται πίσω στην επιφάνεια των κυττάρων, ενώ μέρος από το μεταφερόμενο φορτίο συγχωνεύεται με εκείνο που εσωτερικεύεται μέσω της κλασικής οδού κλαθρίνο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης (Naslavsky et al., 2003). Η απενεργοποίηση της ARF6 απαιτείται για την μετακίνηση του φορτίου μέσω αυτής της οδού, καθώς έκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της ARF6 που δεν μπορεί να υδρολύσει GTP, οδηγεί στη συσσώρευση δομών που μοιάζουν με μεγάλα κενοτόπια (vacuole-like structures) τα οποία περιέχουν το PI (4,5)P₂ και F-Ακτίνη (Brown et al., 2001).



Εικόνα 1.25. Η ARF6 ρυθμίζει τόσο την κλαθρίνο-εξαρτώμενη όσο και την κλαθρίνο-ανεξάρτητη ενδοκυττάρωση. Η ARF6-GTP μέσω της επίδρασής της στην PIP5K και την PLD, συμβάλλει στην παραγωγή $PI(4,5)P_2$, διευκολύνοντας έτσι την κλαθρίνο-εξαρτώμενη καθώς επίσης και κλαθρίνο-ανεξάρτητη εσωτερικήυση των προσδεμάτων. Η ARF6 στρατολογεί την NM23-H1 ή/και την πρωτεΐνη προσαρμογής AP-2 προάγοντας την κλαθρίνο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση. Η ενεργοποίηση της ARF6 έχει συνδεθεί επίσης με την αποσύνδεση των μορίων αρρεστίνης ώστε να διευκολυνθεί η ενδοκυττάρωση υποδοχέων. Η υδρόλυση της ARF6-GTP από συγκεκριμένες GAP απαιτείται για την περαιτέρω κυκλοφορία κατά μήκος κάθε οδού, ενώ η ενεργοποίηση της ARF6 μέσω συγκεκριμένων GEF προάγει την ανακύκλωση και την επακόλουθη σύντηξη ενδοσωματικής προέλευσης μεμβρανών με την κυτταρική μεμβράνη. Από τα έως τώρα δεδομένα δεν είναι σαφές εάν οι ARF6 GEF προσελκύονται στα ενδοσώματα ή την κυτταρική μεμβράνη προκειμένου να διευκολύνουν την ενεργοποίηση της ARF6. Η ρύθμιση της μεμβρανικής ανακύκλωσης από την ARF6- μεσολαβείται εν μέρει από το σύμπλεγμα πρόσδεσης κυστιδίων ονομαζόμενο exocyst και τη φωσφολιπάση D (PLD). Κυστίδια ανακύκλωσης προερχόμενα τόσο από την κλαθρίνο-εξαρτώμενη όσο και από την κλαθρίνο-ανεξάρτητη ενδοκυττάρωση μπορεί τελικά να συγκλίνουν σε ένα κοινό διαμέρισμα ανακύκλωσης (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).

1.2.5.3 Η ARF6 απαιτείται για την ενδοσωματική ανακύκλωση

Τα διάφορα μακρομόρια τα οποία εσωτερικεύονται διαμέσου της κλαθρίνο-εξαρτώμενης ή κλαθρίνο- ανεξάρτητης ενδοκυττάρωσης φαίνεται ότι συγκλίνουν στα ενδοσώματα διαλογής (Maxfield and McGraw, 2004) και/ή στο κοινό διαμέρισμα των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης (Powelka et al., 2004). Η ανακύκλωση προς την κυτταρική μεμβράνη πραγματοποιείται από τα ενδοσώματα ανακύκλωσης, τα οποία αποτελούνται από ένα ετερογενές υποσύνολο ενδοσωματικών πληθυσμών, η πολυπλοκότητα των οποίων ποικίλει μεταξύ των διαφόρων τύπων κυττάρων (Maxfield and McGraw, 2004).

Η συμμετοχή της ARF6 στη ενδοσωματική ανακύκλωση τεκμηριώθηκε αρχικά στα κύτταρα ωθηκών των κινεζικών χάμστερ (Chinese Hamster Ovary cells, CHO), στα οποία η έκφραση μιας μόνιμα ανενεργού μορφής της ARF6 εμπόδιζε την ανακύκλωση προσδεμάτων από τα ενδοσώματα (D'Souza-Schorey et al., 1995; D'Souza-Schorey et al., 1998). Ομοίως, ο EFA6, ένας GEF ειδικός για ARF6, ρυθμίζει τη ιδιοσυστατική ενδοσωματική ανακύκλωση προς την κυτταρική επιφάνεια (Franco et al., 1999) διαμέσου μιας οδού που απαιτεί δραστηριότητα PLD2 (Padron et al., 2006). Η ARF6 αποτελεί το

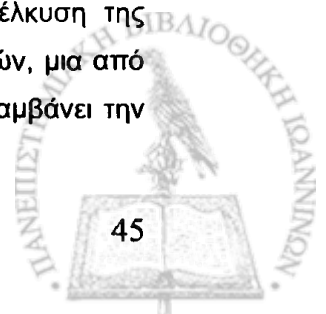


ρυθμιστικό μόριο αυτής της διαδικασίας. Σε HeLa κύτταρα, η ARF6 επηρεάζει την ανακύκλωση πρωτεϊνών που είναι ενσωματωμένες στην κυτταρική μεμβράνη και δεν διαθέτουν αλληλουχίες-μοτίβα πρόσδεσης σε AP-2 και κλαθρίνη, συμπεριλαμβανομένης της α-υπομονάδας του υποδοχέα της Ιντερλευκίνης 2 (IL-2), του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας MHC τάξης I, και των πρωτεϊνών που αγκυροβολούν στο λιπίδιο γλυκοσυλοφωσφατιδυλινοσιτόλη (glycosylphosphatidylinositol, GPI-anchored proteins) (Naslavsky et al., 2003; Radhakrishna and Donaldson, 1997). Τα διαμερίσματα ανακύκλωσης με σωληνοειδή μορφή στα οποία εντοπίζεται η ARF6 εμφανίζουν ελάχιστη επικάλυψη με τα πρώιμα ενδοσώματα και εκτείνονται από μια περιοχή γειτονική του πυρήνα μέχρι και την περιφέρεια των κυττάρων. Στην ανακύκλωση μέσω αυτού του σωληνοειδούς συστήματος εμπλέκονται επίσης η πρωτεΐνη EHD1, που περιέχει τη δομική περιοχή ομολογίας με EPS15 (Caplan et al., 2002), η Rab22 (Weigert and Donaldson, 2005), η PLD (Jovanovic et al., 2006; Padron et al., 2006), η πρωτεΐνη TRE17, που φέρει τη δομική περιοχή TBC (TRE2/BUB2/CDC16), (Martinu et al., 2004), και το σύμπλεγμα πρόσδεσης κυστιδίων, το ονομαζόμενο exocyst (Prigent et al., 2003). Η ARF6-GTP αλληλεπιδρά με την υπομονάδα Sec10 του exocyst, το οποίο εντοπίζεται στο TGN (trans-Golgi network) και στα ενδοσώματα ανακύκλωσης και το οποίο ανακατανέμεται στην κυτταρική επιφάνεια μετά από ενεργοποίηση της ARF6 (Εικόνα 1.25).

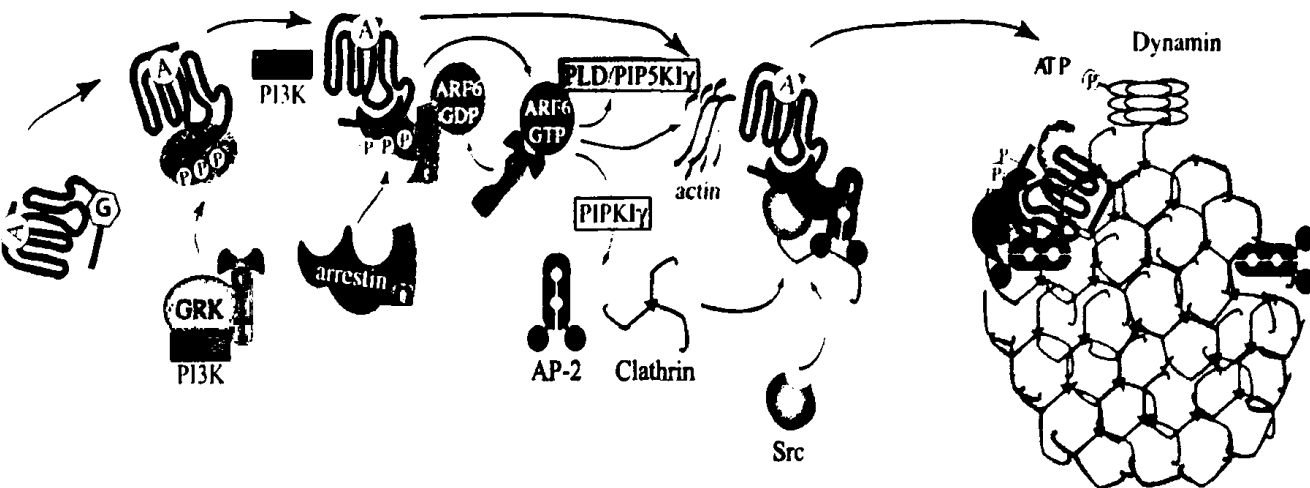
Είναι ενδιαφέρον ότι η ARF6-επαγόμενη ανακύκλωση των ενδοσωματικών μεμβρανών δεν επηρεάζεται από την επεξεργασία με BFA και ενεργοποιείται από το GTP- γ -S, το μη-υδρολύμενο ανάλογο του GTP (Burgoyne and Morgan, 2003). Το ίδιο συμβαίνει και για τη ρυθμιζόμενη έκκριση, διαδικασία στην οποία η ARF6 φαίνεται επίσης να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο (Aikawa and Martin, 2003; Bader et al., 2004; Caumont et al., 2000; Vitale et al., 2005). Η έλλειψη απαίτησης για υδρόλυση του GTP κατά τη διάρκεια της ARF6-μεσολαβούμενης ενδοσωματικής ανακύκλωσης και της ρυθμιζόμενης έκκρισης διαχωρίζει αυτές τις διαδικασίες από την συνεχή εξωκυττάρωση από το TGN προς την κυτταρική επιφάνεια, μια διαδικασία που εμποδίζεται από το GTP- γ -S.

1.2.5.4 Η ARF6 ρυθμίζει την ενδοκυττάρωση υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες

Συμφασμένη με τη δράση της ARF6 στην ενδοσωματική δυναμική είναι και η ρυθμιστική της δράση στην ενδοκυττάρωση υποδοχέων, όπως των β 2-αδρενεργικών υποδοχέων (Claing et al., 2001) και των υποδοχέων της ορμόνης LH (leutinizing hormone) (Mukherjee et al., 2000). Η θετική ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων έχει ως επακόλουθα την ενεργοποίηση της ARF6, καθώς και την προσέλκυση της αρρεστίνης, προϋποθέσεις σημαντικές για την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα μέσω της μεσολαβούμενης από κλαθρίνη οδού ενδοκυττάρωσης (Εικόνα 1.26). Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση από πρόσδεμα, επάγει την στρατολόγηση της GRK (G protein-coupled receptor kinase) και τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα (Naga Prasad et al., 2002). Οι GRKs αλληλεπιδρούν με την PI3-κινάση (Ribas et al., 2007) η οποία επίσης εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαδικασίας ενδοκυττάρωσης και την πρωτεΐνη GIT (Claing, 2004; Ribas et al., 2007), μια ARF GAP, η οποία υδρολύει αργότερα την ARF6 και έτσι αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ενδοκυττάρωσης πολλών υποδοχέων (Claing et al., 2000; Premont et al., 1998). Μόλις φωσφορυλιωθεί ο υποδοχέας, επάγεται η προσέλκυση της πρωτεΐνης αρρεστίνης στη μεμβράνη. Η αρρεστίνη αλληλεπιδρά με μια ποικιλία πρωτεϊνών, μια από τις οποίες είναι και ο ARNO GEF. Ο σχηματισμός ενός σύνθετου συμπλόκου που περιλαμβάνει την



αρρεστίνη, την ARNO και της ARF6-GDP προωθεί την μετατροπή της ARF6 στην GTP μορφή της και την συνεπακόλουθη ενεργοποίηση μορίων-τελεστών. Η ARF6-GTP εμπλέκεται στην τροποποίηση μεμβρανικών λιπιδίων μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης D και της PIP5K1γ (phosphatidylinositol phosphate kinase 5 type 1γ). Επιπλέον, η ARF6 προωθεί την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και προάγει τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών του κυστιδιακού καλύμματος, όπως η κλαθρίνη και η AP-2 στο σύμπλοκο αρρεστίνης-υποδοχέα. Σε κάποια στιγμή, η ARF6-GTP μετατρέπεται στη GDP μορφή από τη GIT, γεγονός σημαντικό στην παραπέρα πορεία της διαδικασίας. Πράγματι, η μεταλλαγμένη ανενεργή μορφή της GIT ανέστειλε την ενδοκυττάρωση των β2-αδρενεργικών υποδοχέων (Claing, 2004). Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η υπερέκφραση της GIT1 (Claing, 2004). Σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις αυτές, η έκφραση της μόνιμα ενεργού ARF6Q67L (κλειδωμένης στην GTP μορφή) και της μόνιμα ανενεργού ARFT27N (κλειδωμένης στην GDP μορφή) προκάλεσε μείωση της εσωτερικοποίησης του β2-αδρενεργικού υποδοχέα (Claing et al., 2001), όπως βέβαια και η αποσιώπηση του γονιδίου της ARF6 (Claing, 2004). Αντίθετα, η έκφραση του ARNO, ενίσχυσε την εσωτερικοποίηση του β2-αδρενεργικού υποδοχέα (Claing et al., 2001).



Εικόνα 1.26. Προτεινόμενο μοντέλο στο οποίο απεικονίζονται οι μοριακοί μηχανισμοί με τους οποίους η ARF6 ρυθμίζει τη διαδικασία εσωτερικοποίησης υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες. Η ενεργοποίηση από πρόσδεμα προκαλεί αλλαγές στην τρισδιάστατη δομή του υποδοχέα. Η συνεχής ενεργοποίηση από τον πρόσδεμα προάγει την στρατολόγηση της GRK και τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Οι GRKs αλληλεπιδρούν με τις GIT πρωτεΐνες και την PI3-κινάση που εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαδικασίας ενδοκυττάρωσης. Μόλις φωσφορυλιωθεί ο υποδοχέας, επάγεται η μετακίνηση της πρωτεΐνης arrestin στη μεμβράνη. Η arrestin αλληλεπιδρά με μια ποικιλία πρωτεϊνών, μια από τις οποίες είναι και ο ARNO GEF. Ο σχηματισμός ενός σύνθετου συμπλόκου που περιλαμβάνει τα arrestins, ARNO και του ARF6-GDP προωθεί την ενεργοποίηση της ARF6 ώστε, με τη σειρά της, να ενεργοποιήσει μόρια-τελεστές. Η ARF6 εμπλέκεται στην τροποποίηση μεμβρανικών λιπιδίων μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης D και της PIP5K1γ (phosphatidylinositol phosphate kinase 5 type 1γ). Επιπλέον, η ARF6 προωθεί την αναδιοργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και προάγει τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών του κυστιδιακού καλύμματος, όπως η κλαθρίνη και η AP-2 στο σύμπλοκο αρρεστίνης-υποδοχέα. Η ARF6 στη συνέχεια, απενεργοποιείται από τις πρωτεΐνες GIT. Τέλος, τα κυστίδια αποκόπτονται από τη μεμβράνη και μπορούν να κυκλοφορούν στα ενδοκυττάρια διαμερίσματα ώστε να μεταφέρουν το φορτίο τους (Claing, 2004).

Φαίνεται λοιπόν, ότι η ARF6 παίζει σημαντικό ρόλο στην εσωτερίκευση προσδεμάτων μέσω των πολλαπλών οδών ενδοκυττάρωσης που ρυθμίζει. Αποσιώπηση του γονιδίου της ARF6 με τη χρήση siRNAs αποκάλυψε ότι η ARF6 ρυθμίζει την εσωτερίκευση των περισσότερων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες υποδοχέων, ανεξάρτητα από την οδό ενδοκυττάρωσής τους (Houndolo et al., 2005).



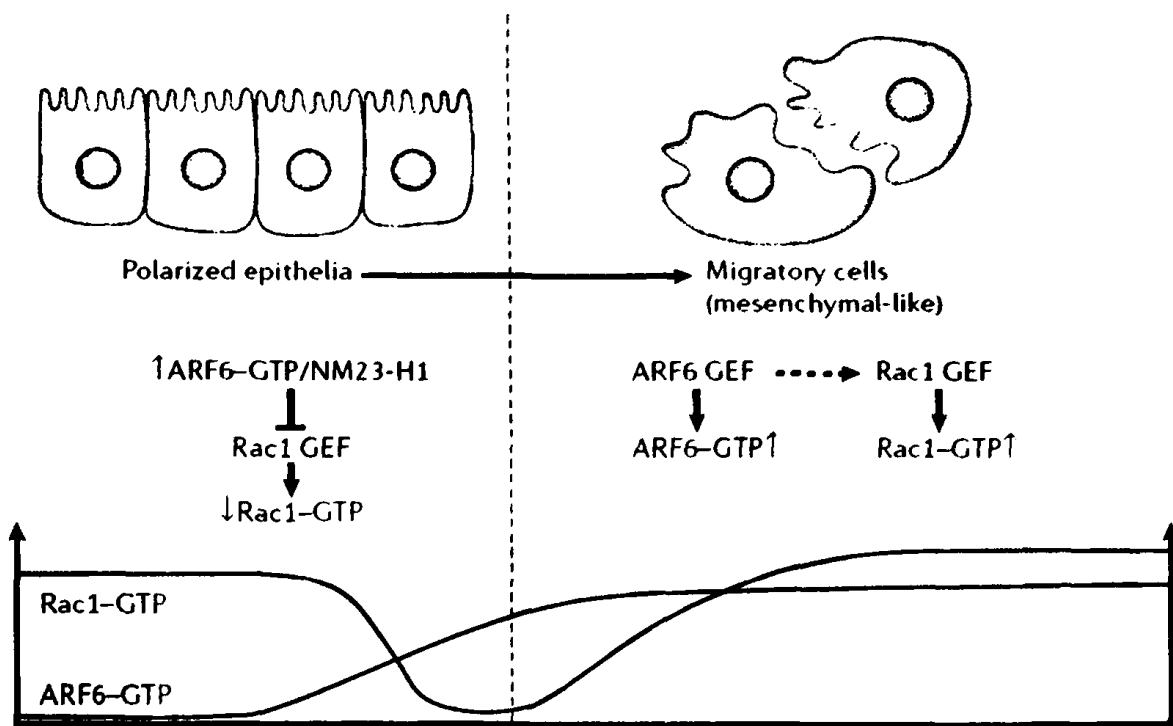
Καθώς αυτοί οι υποδοχείς εσωτερικεύονται διαμέσου κλαθρίνης, καβεοσωμάτων, και της ανεξάρτητης από κλαθρίνη και καβεοσώματα οδού, είναι προφανές ότι απαιτείται η δραστικότητα της ARF6.

1.2.5.5 Ο ρόλος της ARF6 στην αναδιοργάνωση της ακτίνης

Η ARF6 ρυθμιζόμενη αναδιαμόρφωση της ακτίνης απαιτείται για το σχηματισμό ψευδοποδίων και μεμβρανικών αναδιπλώσεων (D'Souza-Schorey et al., 1997; Radhakrishna et al., 1996) καθώς και για λειτουργίες όπως η κυτταρική εξάπλωση (Albertinazzi et al., 2003; Hernandez-Deviez et al., 2004), η κυτταρική μετανάστευση (Palacios et al., 2001; Riley et al., 2003; Santy and Casanova, 2001) και η φαγοκυττάρωση (Balana et al., 2005; Niedergang et al., 2003; Wong and Isberg, 2003; Zhang et al., 1998a). Οι δράσεις αυτές της ARF6 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης θεωρείται ότι διαμεσολαβούνται από την ενεργοποίηση της Rac1 GTPάσης ή/και του μεταβολισμού των λιπιδίων (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Donaldson et al., 2008).

Πράγματι, σε HeLa και σε CHO κύτταρα, η ARF6 διευκολύνει την ανακατανομή της Rac1 από τα ενδοσώματα, όπου εντοπίζεται, στην κυτταρική επιφάνεια (Peters et al., 2002; Radhakrishna et al., 1999). Σε επιθήλια σε φάση μετανάστευσης (migrating epithelia), ο ARF6 GEF ARNO προωθεί την ενεργοποίηση της Rac1 με την προσέλκυση ενός διμερούς GEF της Rac1, του συμπλέγματος DOCK180-ELMO (Santy et al., 2005). Η ARF6 έχει επίσης δειχθεί ότι προάγει την αναδιοργάνωση της ακτίνης μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις πρωτεΐνες POR1 (μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με την Rac1) και Arfaptin-2 (D'Souza-Schorey et al., 1997; Shin et al., 2001). Σε πολωμένα κύτταρα MDCK που επάγονται ώστε να διασπαρούν (scatter), η επίδραση της ARF6 στην ενεργοποίηση της Rac1 είναι διφασική (Palacios and D'Souza-Schorey, 2003). Αρχικά παρατηρείται μια μείωση των επιπέδων της Rac1-GTP που συσχετίζεται με την απώλεια της πολυμερισμένης ακτίνης στα σημεία επαφής κυτάρου με κύτταρο. Στη συνέχεια παρατηρείται αποκατάσταση των υψηλών επιπέδων της Rac1-GTP δραστικότητας, καθώς τα κύτταρα γίνονται μεταναστευτικά (Εικόνα 1.27). Η αρχική μείωση στην ενεργοποίηση της Rac1 φαίνεται επίσης να μεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει από την προσέλκυση της NM23-H1 στην ARF6-GTP (Palacios and D'Souza-Schorey, 2003; Palacios et al., 2002). Η NM23-H1 μειώνει τα κυτταρικά επίπεδα του Rac1-GTP, ενδεχομένως προσελκύνοντας και δεσμεύοντας την TIAM1, ένα Rac1 GEF (Otsuki et al., 2001). Επομένως, ο κύκλος της ARF6-GTPάσης ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση της Rac1 προωθεί την απόκτηση ενός μεταναστευτικού φαινότυπου.

Η ARF6 μπορεί επίσης να αναδιοργανώνει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω της επίδρασής της στο μεταβολισμό λιπιδίων. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ARF6 ενεργοποιεί τη PLD και την PIP5K, και η ενεργοποίηση των δύο αυτών ενζύμων οδηγεί στη συσσώρευση του PI (4,5) P2. Τα PI (4,5) P2 έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζουν τον σχηματισμό του καλύμματος της ακτίνης και τις δραστηριότητες αρκετών πρωτεϊνών που προσδένουν ακτίνη (Hilpela et al., 2004). Πράγματι, παρατηρείται συνεντοπισμός της Arf6-GTP με την PIP5K (Brown et al., 2001; Honda et al., 1999) στην κυτταρική επιφάνεια και ότι η ενεργοποίηση της PLD από την ARF6 σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση της Rac1 προάγει την κυτταρική μετανάστευση (Santy and Casanova, 2001).

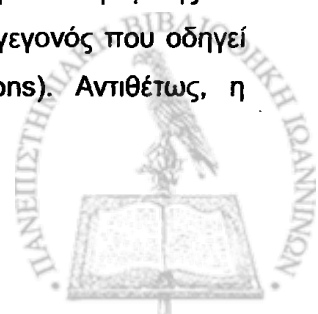


Εικόνα 1.27. Η ARF6 ρυθμίζει την ενεργοποίηση της Rac1 στα επιθηλιακά κύτταρα. Στα πολωμένα MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) που επήχθησαν ώστε να διασπαρούν, τα επίπεδα της Rac1-GTP υφίστανται μια παροδική πτώση, γεγονός που φαίνεται να διαμεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει, από την ARF6-GTP-εξαρτώμενη στρατολόγηση της NM23-H1. Αυτό ακολουθείται από την αποκατάσταση των υψηλών επιπέδων Rac1-GTP καθώς τα κύτταρα γίνονται μεταναστευτικά. Η ενεργοποίηση της Rac1 μεσολαβείται τουλάχιστον εν μέρει, από τη ARF6-ρυθμιζόμενη ενεργοποίηση συγκεκριμένων Rac1 GEF (Palacios et al., 2001).

1.2.5.6 ARF6 και αναδιαμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης

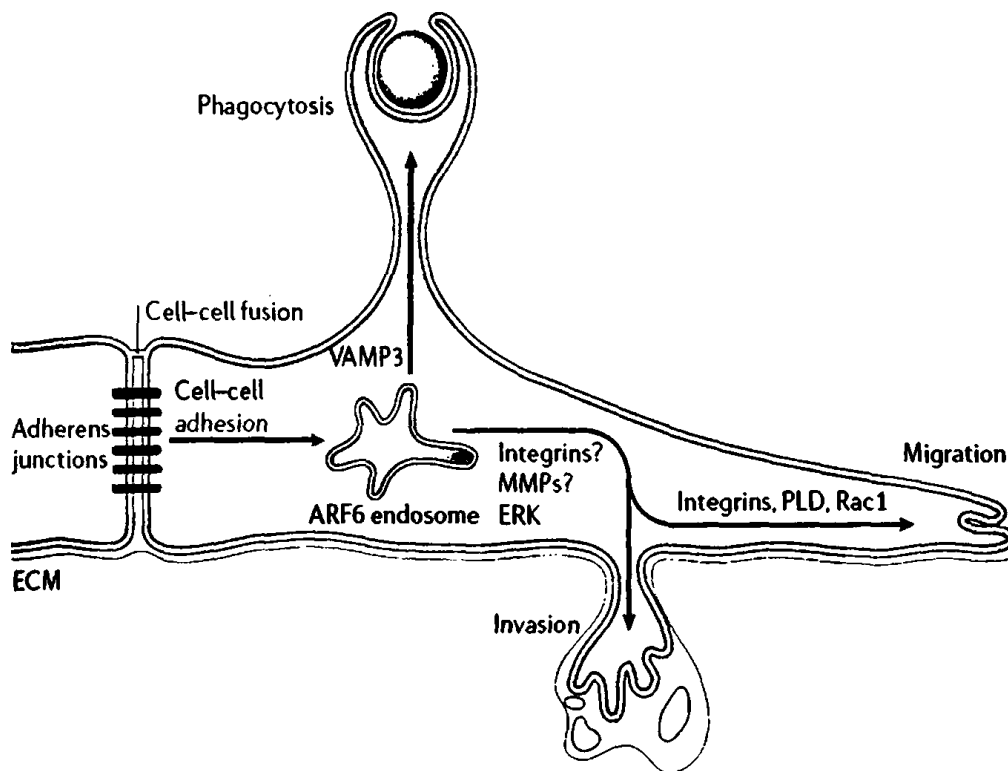
Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της ενεργοποίησης της ARF6 στη δομική οργάνωση της μεμβράνης και της ακτίνης στην περιφέρεια των κυττάρων, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι ο κύκλος της GTPάσης μπορεί να επιδρά σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες που απαιτούν γρήγορες αλλαγές στη μορφολογία της κυτταρικής επιφάνειας (Εικόνα 1.28). Κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης, μεμβράνες από εσωτερικά διαμερίσματα μεταφέρονται στην κυτταρική μεμβράνη, στις περιοχές της εσωτερικοποίησης σωματιδίων, ώστε να υποστηρίξουν την προέκταση ψευδοποδίων (Niedergang et al., 2003). Η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της ARF6 στα μακροφάγα οδηγεί σε πρόωρη παρεμπόδιση της επέκτασης των ψευδοποδίων και αποτρέπει την κατάποση σωματιδίων (Niedergang et al., 2003; Uchida et al., 2001; Zhang et al., 1998a). Στην πραγματικότητα, η ARF6 υποβάλλεται σε μια παροδική ενεργοποίηση στην αρχή της φαγοκυττάρωσης και ελέγχει την παράδοση μεμβρανών, οι οποίες φέρουν την πρωτεΐνη VAMP3 (Vesicle Associated Membrane protein-3, επίσης γνωστή ως cellubrevin), από τα ενδοσώματα ανακύκλωσης στα επεκτεινόμενα ψευδοπόδια (Niedergang et al., 2003).

Στα επιθηλιακά κύτταρα, η ARF6 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της διακυτταρικής προσκόλλησης (D'Souza-Schorey, 2005). Η ARF6-GTP προωθεί την εσωτερικοποίηση της E-Καντχερίνης από τις περιοχές διακυτταρικής επαφής στα πρώιμα ενδοσώματα, γεγονός που οδηγεί στην αποσυναρμολόγηση των συνδέσμων προσκόλλησης (adherens junctions). Αντιθέτως, η

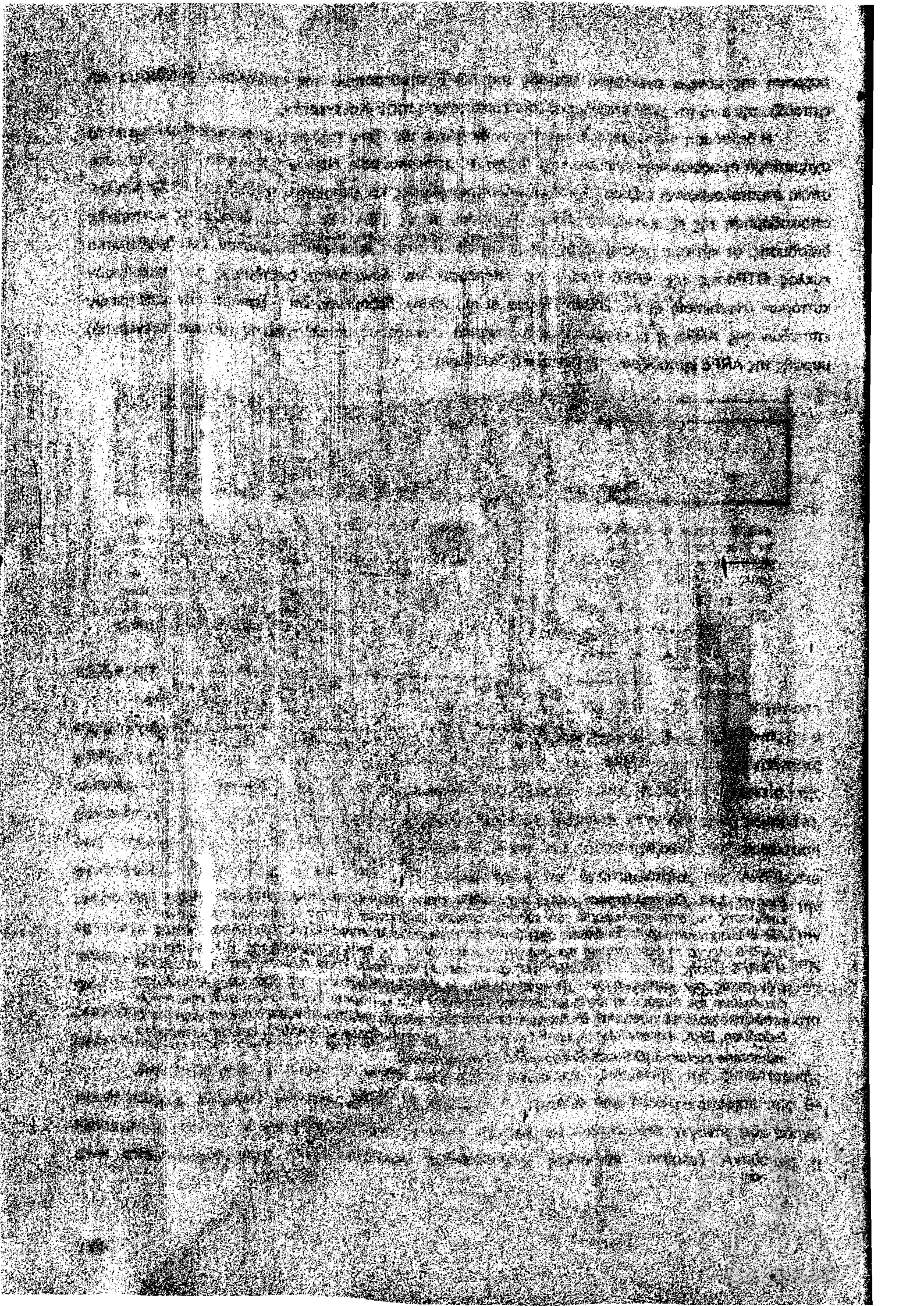


έκφραση της μόνιμα ανενεργού μορφής της ARF6 σταθεροποιεί τον επιθηλιακό φαινότυπο και εμποδίζει την από τον HGF επαγόμενη εσωτερικοποίηση της E-Καντχερίνης.

Η διείσδυση των καρκινικών κυττάρων διαμέσου της εξωκυττάριας ουσίας συνοδεύεται από το σχηματισμό προσεκβολών πλούσιων σε ακτίνη, τα αποκαλούμενα διείσδυτοπόδια (invadopodia), στα οποία στρατολογούνται ένζυμα, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες και σερινοπρωτεάσες, υπεύθυνα για την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας (Buccione et al., 2004). Σε *in vitro* δοκιμασίες κυτταρικής διείσδυσης, σε κύτταρα μελανώματος και σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού, έχει δειχθεί ότι ο κύκλος GTPάσης της ARF6 μπορεί να επηρεάσει την δυνατότητα διείσδυσης των καρκινικών κυττάρων (Hashimoto et al., 2004b; Tague et al., 2004), δεδομένου ότι η μείωση των κυτταρικών επιπέδων της ARF6 ή η έκφραση μιας αρνητικά επικρατούς μεταλλαγμένης (μόνιμα ανενεργού) μορφής της ARF6 εμποδίζουν την κυτταρική διείσδυση.



Εικόνα 1.28. Οι πολλαπλοί ρόλοι της ARF6 στην περιφέρεια του κυττάρου. Μέσω της επίδρασής της στην κυκλοφορία των ενδοσωματικών μεμβρανών και την οργάνωση της ακτίνης, η ARF6 ελέγχει λειτουργίες οι οποίες σχετίζονται με την κυτταρική επιφάνεια. Στα επιθηλιακά κύτταρα, η ARF6 ελέγχει τη διακυτταρική προσκόλληση ρυθμίζοντας της ενδοκυττάρωση της E-Καντχερίνης. Η ARF6 επίσης μπορεί να ρυθμίζει την προσκόλληση κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία (ECM) ελέγχοντας την κατανομή των β1 ιντεγκρινών. Η ARF6-ρυθμιζόμενη μεμβρανική ανακύκλωση διευκολύνει την παράδοση του φορτίου στην επιφάνεια των κυττάρων, η οποία στη συνέχεια παίζει ευοδωτικό ρόλο σε κυτταρικές διαδικασίες όπως η φαγοκυττάρωση, η μετανάστευση κυττάρων και η διείσδυση. ERK, extracellular regulated kinase, PLD, phospholipase D, VAMP3, vesicle-associated membrane protein-3 (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).



ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο TGFβ και η ακτιβίνη A είναι δύο αυξητικοί παράγοντες της υπεροικογένειας του TGFβ, η μεταγωγή του σήματος των οποίων παίζει σημαντικό ρόλο σε πλειάδα λειτουργιών σε κυτταρικό, ιστικό και οργανισμικό επίπεδο. Η καθοδική μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και την ακτιβίνη A επηρεάζεται από την πορεία ενδοκυττάρωσης και ανακύκλωσης των υποδοχέων τους, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με την γενικότερη ενδοσωματική δυναμική του κυττάρου. Η ARF6 είναι μια GTPάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοσωματική δυναμική. Τίποτα δεν είναι γνωστό αναφορικά με την αλληλεπίδρασή της με συστατικά της μεταγωγής του σήματος των παραγόντων της υπεροικογένειας του TGFβ. Προκαταρκτικά πειράματά μας σε συνεργασία με τον Δρ. Philippe Chavrier (Institut Curie, Paris, France) έδειξαν ότι η ARF6 αλληλεπιδρά με την SMAD4 στο σύστημα δύο υβριδίων σε ζυμομύκητα. Σκοπός της διατριβής αυτής είναι:

1. Να επιβεβαιώσει με βιοχημικό τρόπο την φυσική αλληλεπίδραση της ARF6 με την SMAD4.
2. Να επεκταθεί η μελέτη της αλληλεπίδρασης της ARF6 με τη SMAD2 και SMAD3, οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς του TGFβ και της Ακτιβίνης A.
3. Να διερευνηθεί η επίπτωση της αλληλεπίδρασης αυτής στη μεταγωγή του σήματος του TGFβ και της Ακτιβίνης A χρησιμοποιώντας τη μεταγραφική δραστικότητα των SMAD2 και SMAD3 σαν οδηγό.

THE SECRETARY OF THE INTERIOR
DEPARTMENT OF THE INTERIOR
WASHINGTON, D. C.

UNITED STATES OF AMERICA
DEPARTMENT OF THE INTERIOR
BUREAU OF LAND MANAGEMENT
WASHINGTON, D. C.

SECRET

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. ΥΛΙΚΑ

Ο ανθρώπινος TGFβ1 (Transforming Growth Factor β1) που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αγοράστηκε από την R&D Systems, Inc. καθώς και από την PeproTech EC Ltd. Ο ανθρώπινος ανασυνδυασμένος παράγων BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein-2) αγοράστηκε από την ImmunoTools (ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany). Το μονοκλωνικό αντίσωμα υψηλής συγγένειας αντι-HA ήταν από τη Roche (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Η αντίστοιχη ανοσοσφαιρίνη αρουραίου που χρησιμοποιήθηκε ως αντίσωμα αρνητικού ελέγχου στα πειράματα ανοσοκατακρήμνισης αποκτήθηκε από την Jackson ImmunoResearch laboratories. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-FLAG (F3165) και η ανοσοσφαιρίνη ποντικού αρνητικού ελέγχου προήλθαν από την SIGMA. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ARF6 (κλώνος 6ARF01) προήλθε από την Lab Vision Corporation (Neomarkers). Το αντίσωμα αντι-SMAD4 (B-8, sc-7966) προμηθεύτηκε από την Santa Cruz Biotechnology. Το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-MYC είναι προϊόν της Upstate. Τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών SMAD2 (Ser 465/467) και SMAD3 (pS423 pS425) αγοράστηκαν από τις Chemicon International και Rockland αντίστοιχα. Τα αντισώματα έναντι των ολικών επιπέδων των πρωτεϊνών SMAD2 και SMAD3 αγοράστηκαν από την Zymed Laboratories Inc. Όλα τα δευτερογενή αντισώματα ήταν από τη Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Όλα τα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας ήταν από την Invitrogen (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Germany). Το εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) απομονώθηκε από εγκέφαλο βοός και ήταν ελεύθερο από ενδοτοξίνες.

2.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΘΡΩΠΙΝΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΦΛΕΒΑ ΟΜΦΑΛΙΟΥ ΛΩΡΟΥ

Σε φρέσκο ανθρώπινο ομφάλιο λώρο με τη βοήθεια μιας σύριγγας εντοπίστηκε με ψηλάφηση η φλέβα του λώρου και πλύθηκε με 20 ml PBS. Στη συνέχεια κρατήθηκε κλειστό το κάτω άκρο του λώρου, με τη βοήθεια αποστειρωμένων αιμοστατών, και διαποτίστηκε η φλέβα με 0.1% κολλαγενάση διαλυμένη σε θρεπτικό μέσο M199. Ακολούθησε επώαση του λώρου με PBS σε υδατόλουτρο στους 37°C για 12 λεπτά, πλύσιμο με 10 ml θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 500g. Τέλος, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναιωρήθηκε το κυτταρικό ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό M199 (Jaffe et al., 1973).

2.3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου βοός (Bovine Brain Capillary Endothelial, BBCE) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L και 10% ορό νεογέννητου βοός (Newborn Calf Serum, NCS). Προσθήκη του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα FGF-2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) σε συγκέντρωση 2,5 ng/ml γίνονταν κάθε δεύτερη ημέρα έως ότου τα κύτταρα καλύψουν όλη την επιφάνεια των τρυβλίων. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 8-12.



Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) απομονώθηκαν (όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τα οποία είχαν πριν υποστεί επεξεργασία με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I για 30 λεπτά στους 37 °C και εκπλυθεί με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS). Η ανάπτυξη των HUVEC έγινε σε θρεπτικό υλικό M199 με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L, εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) θερμικά απενεργοποιημένο, 0,05 mg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) και 0,05/ml IU ηπαρίνης. Για τις ανάγκες των πειραμάτων της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα 3ης γενιάς.

Εμβρυονικά κύτταρα από νεφρό ανθρώπου 293 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS θερμικά απενεργοποιημένο και, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 4 ή 1 προς 5. Όλα τα θρεπτικά υλικά ήταν εμπλουτισμένα με 100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml Στρεπτομυκίνη και 2mM γλουταμίνη.

Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο στο οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO₂ εκτός των ενδοθηλιακών κυττάρων BBCE που διατηρήθηκαν σε 10% CO₂.

2.4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΕΣ

1. Όλες οι παρακάτω κατασκευές ήταν μια προσφορά του Δρ. Philippe Chavrier (Institut Curie, Paris, France):

Τα cDNA που εκφράζουν την ARF6 φυσικού τύπου και τις μεταλλαγμένες της (συνεχώς ενεργή, Q67L και συνεχώς ανενεργή, T27N μορφή) μορφές κλωνοποιημένα στον πλασμιδιακό φορέα pSRa σημασμένα με HA στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Καθώς επίσης και οι κατασκευές pCDNA3 ARNO-MYC, pSRa ARF1Q71L-HA, pCDNA3 ARF5Q71L-HA, pEGFP C3 SMAD4. Επίσης, οι κατασκευές κλωνοποιημένες στο φορέα έκφρασης πρωτεϊνών pGEX 4T1 (Amersham Biosciences): SMAD4 πλήρους μεγέθους (552 αμινοξέα), SMAD4(279-552) ελλειμματική μορφή από την οποία αφαιρέθηκαν τα 278 αμινοξέα της αμινοτελικής περιοχής της πρωτεΐνης, SMAD4(520-552) ελλειμματική μορφή η οποία φέρει μόνο τα 32 καρβοξυτελικά αμινοξέα, η πρωτεΐνη ενεργοποίησης GTPάσης που φέρει μόνο την καταλυτική περιοχή ARHGAP10 ARF6BD (885-1096).

2. Για τη δημιουργία της ελλειμματικής μορφής SMAD4ΔC43 από την οποία αφαιρέθηκαν τα 43 καρβοξυτελικά αμινοξέα κλωνοποιημένης σε φορέα pGEX 4T1(Amersham Biosciences) ακολουθήθηκε η εξής στρατηγική: έγινε πέψη του pGEX 4T1 SMAD4 με τα περιοριστικά ένζυμα Bgl II-XhoI και του pRK5 SMAD4ΔC με τα περιοριστικά ένζυμα Bgl II- XhoI (τμήμα 400bp) και συνδέθηκαν τα αντίστοιχα τμήματα DNA με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση.



2.5. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ E.COLI ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΑΙ ΜΕΣΑΙΑ ΚΛΙΜΑΚΑ (*Mini, Midi-preparation*)

Μετά τον μετασχηματισμό των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους φορείς, 5-10 αποικίες από την επιφάνεια των τρυβλίων επιλογής ενοφθαλμίστηκαν, κάθε μια ξεχωριστά, σε 5 ml LB το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (ή τετρακυκλίνη, ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση υπό ανάδευση στους 37 °C. Την επόμενη μέρα 1.5 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωληνάριο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.500 g για 5 λεπτά, σε φυγόκεντρο erppendorf, centrifuge 5415D). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 µl διαλύματος P₁ (P₁: 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A) και στο εναιώρημα προστέθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα P₂ (P₂: 200 mM NaOH, 1% SDS) και P₃ (P₃: 3M οξικό κάλιο, pH 5.5). Μετά από ήπια ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.500 g, για 5 λεπτά). Το ίζημα που αποτελείται από το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά υπολείμματα απομακρύνθηκε. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωληνάριο. Το πλασμιδιακό DNA καταβυθίστηκε με την προσθήκη στο υπερκείμενο, 1 ml παγωμένης αιθανόλης (-20 °C) και φυγοκέντρωση (13.500 g για 10 λεπτά, φυγόκεντρο erppendorf, centrifuge 5415D). Ακολούθησε πλύση του DNA με 500 µl 70% v/v αιθανόλης, φυγοκέντρωση (13.500 g, για 10 λεπτά) και επαναιώρηση του ιζήματος σε 50 µl ddH₂O. Για την παρασκευή πλασμιδιακού DNA ή ελεύθερου ενδοτοξινών πλασμιδιακού DNA (απαραίτητου για την διαμόλυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων) σε μεσαία κλίμακα έγινε χρήση του πακέτου υλικών (*Midi-preparation, QIAGEN^R Plasmid Purification Kit* ή *EndoFree Plasmid Maxi Kit*, αναλυτικές οδηγίες: www.qiagen.com/goto/plasmidinfo). Χρησιμοποιήθηκε 1 ml από την εξακριβωμένα θετική καλλιέργεια μικρής κλίμακας. Το απομονωμένο DNA επαναδιαλύθηκε σε 150 µl ddH₂O. Η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του υπολογίστηκαν φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα (OD₂₆₀= 1) αντιστοιχεί σε 50 µg δίκλωνου DNA /ml διαλύματος. Η καθαρότητα του διαλύματος του DNA προσδιορίστηκε με βάση το λόγο OD₂₆₀/OD₂₈₀ και θεωρήθηκε καθαρό για OD₂₆₀/OD₂₈₀ =1,8.

2.6. ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν 24 ώρες πριν τη διαδικασία διαμόλυνσης, σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11mm και σε συγκέντρωση 40.000 κύτταρα/φρεάτιο. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro σε αναλογία με το DNA 4:1 και σε διάλυμα M199, μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Το μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονταν σε υλικό καλλιέργειας M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS και διατήρηθηκε για 4h, πριν αντικατασταθεί με πλήρες μέσο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες μετά από 24 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂.

Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 6 φρεατίων σε συγκέντρωση 5x10⁵ κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με την χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου LipofectAMINE Plus (Life Technologies) σε υλικό OptiMEM (Invitrogen). Περιληπτικά, χρησιμοποιήθηκε 1 µg συνολικής ποσότητας DNA ανά φρεάτιο, διαλυμένο σε 100 µl

OptiMEM. Στην συνέχεια, προστέθηκε αντιδραστήριο LipofectAMINE Plus 6 μl και ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Λιπίδιο LipofectAMINE Plus 4 μl διαλυμένο σε 0.8 ml OptiMEM προστέθηκε στο διάλυμα με το DNA και ακολούθησε μια επιπλέον επώαση 15 λεπτών πριν το μίγμα προστεθεί στα κύτταρα.

Εμβρυονικά κύτταρα από νεφρό ανθρώπου 293 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας ανάλογης με αυτή που απαιτούσε η εκάστοτε δοκιμασία και για τη διαμόλυνσή τους χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο FuGene 6 Transfection Reagent (Roche Applied Science). Συνοπτικά, το αντιδραστήριο FuGene διαλύθηκε σε μέσο ανάλογου όγκου ελεύθερο ορού και αντιβιοτικών και ακολούθησε επώαση 5 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, έγινε προσθήκη του/των προς διαμόλυνση DNA στο διάλυμα του FuGene. Η αναλογία FuGene / DNA ήταν 3:1 και διατηρήθηκε πάντα η ίδια σε όλες τις διαμολύνσεις, Ακολούθησε ανάμειξη και επώαση του συμπλόκου αντιδραστήριου:DNA για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου πριν το μίγμα προστεθεί στα κύτταρα.

2.7. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

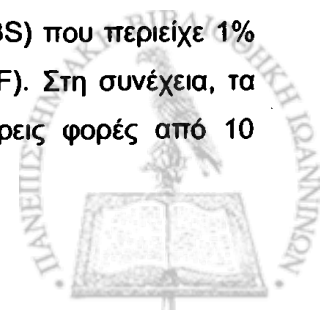
Στις περιπτώσεις όπου τα κυτταρικά εκχυλίσματα περιείχαν SDS ή TritonX-100 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (bicinchoninic acid) σύμφωνα με το αντιδραστήριο εμπορίου BCA Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce (GmbH., Bonn, Germany). Αυτή η μέθοδος συνδυάζει την αναγωγή του Cu^{+2} σε Cu^{+1} από την πρωτεΐνη σε αλκαλικό μέσο (αντίδραση διουρίας) με την ιδιαίτερα ευαίσθητη και εκλεκτική χρωματομετρική ανίχνευση του μονοσθενούς κατιόντος χαλκού (Cu^{+1}) χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήριο που περιέχει δικινχωνινικό οξύ (bicinchoninic acid). Το πορφυρά χρωματισμένο προϊόν της αντίδρασης διαμορφώνεται από το σχηματισμό χηλικού συμπλόκου μεταξύ δύο μορίων BCA με το μονοσθενές ιόν χαλκού. Η μακρομοριακή δομή της πρωτεΐνης, ο αριθμός πεπτιδικών δεσμών και η παρουσία τεσσάρων συγκεκριμένων αμινοξέων (κυστεΐνης, κυστίνης, τρυπτοφάνης και τυροσίνης) είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό χρώματος με το BCA.

Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin), 2 μg/ml, ενώ προστέθηκε ποσότητα διαλύματος λύσης με απορρυπαντικό ίση με την ποσότητα των δειγμάτων προς μέτρηση. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °C για 30 λεπτά ενώ η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562 nm.

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford (Biorad GmbH., München, Germany) που βασίζεται στην παρατήρηση ότι κατά την σύνδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες σε όξινο pH, το διάλυμά της παρουσιάζει μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης του από τα 465 nm στα 595 nm. Η πρότυπη καμπύλη έγινε όπως αναφέρεται πιο πάνω, ενώ τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά πριν την μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.

2.8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Κυτταρικά εκχυλίσματα ελήφθησαν με διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS) που περιείχε 1% SDS και 100μM αναστολέα πρωτεασών phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF). Στη συνέχεια, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπέρηχους (Branson Digital Sonifier) τρεις φορές από 10



δευτερόλεπτα και βράστηκαν για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.200g για 20 λεπτά από όπου συλλέχτηκε το υπερκείμενο.

Κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Schleicher and Schuell, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο *Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis et.al., 1989)*. Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ronceau S (0,1% σε οξικό οξύ 1%) για 1 λεπτό και ξεβάφτηκαν με νερό. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western (1 M Tris pH 7,2, 0,1% Tween 20, και 150 mM NaCl) είτε σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα είτε στους 4 °C ολονυχτίως υπό ανατάραξη για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα αρχικά αντισώματα είτε για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 4 °C ολονυχτίως σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο σύντομες πλύσεις σε διάλυμα Western, και τρεις πλύσεις των 10 λεπτών στο ίδιο διάλυμα. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως αναφέρεται παραπάνω. Η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

2.9. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ

Αναςυνδυασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν την φυσικού τύπου πρωτεΐνη ARF6 καθώς και τις μεταλλαγμένες της μορφές (μόνιμα ενεργή, Q67L και μόνιμα ανενεργή, T27N) προήλθαν από μια συνεργασία με τον Δόκτορα Yoram Altschuler (Faculty of Medicine, Hebrew University of Jerusalem, Israel). Για την αναπαραγωγή αυτών των ανασυνδυασμένων αδενοϊών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά πακεταρίσματος 293 ή 293A (packaging line) οι οποίες επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των παραγόμενων αδενοϊών προμηθεύοντας τους με τα προϊόντα των γονιδίων που τους λείπουν E1 και E3.

2.10. ΜΕΣΑΙΑΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΔΕΝΟΪΩΝ

Τόσο ο πολλαπλασιασμός, όσο και η μέτρηση του τίτλου των ιών πραγματοποιούνται στις λεγόμενες κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος (packaging lines). Έτσι για τους αδενοϊούς χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά 293 που παρέχει τα γονίδια του αδενοϊού E1 και E3. Κύτταρα 293 καλλιεργήθηκαν σε πέντε φλάσκες T-75 σε πληρότητα 80-90%. Για την μόλυνση χρησιμοποιήθηκε αδενοϊός με MOI 5 από προηγούμενο πολλαπλασιασμό του ιού σε φλάσκα T75. Όταν το 50% των κυττάρων αποκολλήθηκε, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μαζί με το θρεπτικό υλικό. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 5000g, για 5 λεπτά, στους 4°C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5 ml PBS. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με την διαδικασία της ταχείας ψύξης (σε υγρό άζωτο)-τήξης (σε πάγο) σε 4 κύκλους. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (5000g, για 5 λεπτά, στους 4°C) και το υπερκείμενο κλασματοποιήθηκε.



2.11. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ

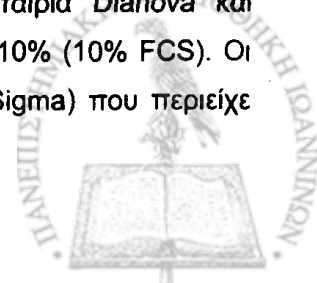
Η γνώση του τίτλου των ιών, αφού γνωρίζουμε και τον αριθμό των κυττάρων, είναι χρήσιμη στον υπολογισμό του MOI (Multiplicity Of Infection, πολλαπλότητα της μόλυνσης), που εκφράζει τον αριθμό των ιών που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο. Η τιτλοποίηση των αδενοϊών έγινε με την δοκιμασία των πλακών (plaque assay). Κύτταρα 293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 φρεατίων (5×10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο) μέχρι το 80-90% της πληρότητας τους. Την επόμενη μέρα, μολύνθηκαν με 5μl από διαφορετικές αραιώσεις του ιού (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Μετά από 4 ώρες μόλυνσης τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με 4ml άγαρ επικάλυψης που περιέχει 20mM Heps, 12,5mM $MgCl_2$, 1% αγαρόζη (Gibco BRL), σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Για την αποφυγή του στεγνώματος της αγαρόζης πριν από το σχηματισμό των πλακών, προστέθηκε PBS μεταξύ των φρεατίων και το τρυβλίο τυλίχθηκε με πάραφιλμ. Ακολούθησε επώαση σε επωαστικό κλίβανο στο οποίο η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους $37^{\circ}C$, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO_2 . Οι ιικές πλάκες αναπτύχθηκαν μετά από περίπου μία εβδομάδα, αναγνωρίστηκαν ως μεμονωμένες εστίες λύσης των κυττάρων και έγιναν συνεχείς καταμετρήσεις (στις 6,8 και 10 ημέρες) ως την πλήρη εμφάνιση των πλακών. Από τον αριθμό των ιικών πλακών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά φρεάτια, τα οποία αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές αραιώσεις του ιού, υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος (ιικά σωματίδια/μl).

2.12. ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΔΕΝΟΪΟΥΣ

Προκειμένου να μολυνθούν και να εκφράσουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, τα ΗΥVE κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επωάστηκαν με τον ανασυνδυασμένο ιό σε αναλογία ιικών σωματίων/αριθμός κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 350 για 24 ώρες ενώ τα 293 μολύνθηκαν σε αναλογία ιικών σωματίων/αριθμός κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 1 για 20 ώρες. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελεγχόταν κάθε φορά με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. παραπάνω), ενώ το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων εξεταζόταν με έμμεσο ανοσοφθορισμό (βλέπε παρακάτω).

2.13. ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες που είχαν προκαλυφθεί με κολλαγόνο τύπου 1 και στη συνέχεια επωάστηκαν στις διάφορες συνθήκες ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Με το πέρας της επώασης έγινε πλύση των κυττάρων μια φορά με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3.7% για 15 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με 50mM NH_4Cl (σε PBS) για 15 λεπτά για να μειωθεί ο αυτοφθορισμός και επώαση με Triton 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με 10% FCS (που είχε πριν υπερφυγοκεντρηθεί) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, εφόσον γινόταν πλύση των κυττάρων μία φορά με PBS, γινόταν επώαση με το διάλυμα του 2ου αντισώματος. Τα δευτερογενή αντισώματα αρουραίου συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) προήλθαν από την εταιρία Dianova και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 10% (10% FCS). Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε



100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561 και λογισμικό Leica TCS.

2.14. ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ GST ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΥΝΤΗΞΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ- ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ

Μια αποδοτική μέθοδος για την υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης και τον μετέπειτα καθαρισμό της, είναι η σύντηξη της επιθυμητής πρωτεΐνης με την (GST) τρανσφεράση-S-της γλουταθειόνης. Η γενική στρατηγική για τον καθαρισμό που ακολουθείται είναι η δέσμευση της GST πρωτεΐνης σύντηξης σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης, η απομάκρυνση με έκπλυση της στήλης του μη δεσμευμένου εκχυλίσματος, και τελικά έκλυση της πρωτεΐνης από την στήλη. Οι χιμαιρικές GST πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν στο βακτήριο *E.coli* BL21(DE) ή BL21, το οποίο ύστερα από μετασχηματισμό, έφερε ένα ανασυνδυασμένο pGEX πλασμίδιο. Η πρωτεϊνική έκφραση από αυτό το πλασμίδιο υπόκειται του ελέγχου του υποκινητή *tac* (*tac promoter*), ο οποίος επάγεται χρησιμοποιώντας το ανάλογο της λακτόζης, το IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactoside*). Οι επαγόμενες από το IPTG βακτηριακές καλλιέργειες διευκολύνουν την υπερέκφραση των GST πρωτεϊνών. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν ύστερα από κατεργασία είτε με υπερήχους, (*Branson Digital Sonifier^R 250-D, USA*), είτε με μηχανικά μέσα με την χρήση του *French pressure cell (SIM-AMINCO, 40.0000 PSI)*.

2.15. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ (ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ)

Οι πρωτεΐνες SMAD2, SMAD3 και SMAD4 πλήρους μεγέθους, καθώς και οι ελλειμματικές μορφές της SMAD4, εκφράστηκαν στα επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα BL21 (*protease free*) και BL21(DE) του βακτηρίου *E.coli*. Ακολουθήθηκε η εξής πορεία: Ύστερα από μετασχηματισμό του βακτηρίου *E.coli* με τα αντίστοιχα pGEX πλασμίδια, ακολούθησε επώαση της καλλιέργειας στους 37°C. Όταν η οπτική απορρόφηση έφτασε την τιμή 0,6 ($OD_{600nm}=0,6$), δηλαδή στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Ακολούθησε περαιτέρω επώαση στους 37 °C για ακόμη τρεις ώρες (υπερέκφραση των GST πρωτεϊνών σύντηξης). Μετά το πέρας των 3 ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση, 6.000 rpm *Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, Germany*, κεφαλή GSA, για 15 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε, στον πάγο, σε συνολικό όγκο 40 ml διαλύματος (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1mM DTT, αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με μηχανικά μέσα (*french press*). Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και αμέσως φυγοκεντρήθηκε, 14.000 rpm *Sorvall*, κεφαλή SS-34, για 30 λεπτά, στους 4 °C. Στο μεταξύ προετοιμάζεται η στήλη από όπου θα διέλθει το κυτταρικό εκχύλισμα: 700ml σφαιριδίων σεφαρόζης-γλουταθειόνης φορτώνονται στη στήλη και ακολουθεί εξισορρόπησή τους με προσθήκη 5 όγκων διαλύματος λύσης. Κατόπιν, προστίθεται επάνω στη στήλη το κυτταρικό εκχύλισμα και αφήνεται να διέλθει διαμέσου των σφαιριδίων στον ψυχρό θάλαμο ώστε να αποφευχθεί αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, η στήλη εκπλύθηκε με 10x 1ml διαλύματος αποτελούμενου από διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS), 0.5M NaCl, μίγμα αναστολέων πρωτεασών. Ακολούθησε δεύτερη έκπλυση με 10x 1ml διαλύματος σύστασης 50mM

2.11. ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΑΔΕΝΟΪΩΝ

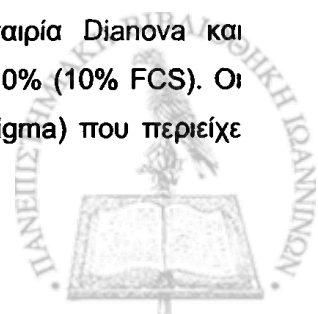
Η γνώση του τίτλου των ιών, αφού γνωρίζουμε και τον αριθμό των κυττάρων, είναι χρήσιμη στον υπολογισμό του MOI (Multiplicity Of Infection, πολλαπλότητα της μόλυνσης), που εκφράζει τον αριθμό των ιών που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο. Η τιτλοποίηση των αδενοϊών έγινε με την δοκιμασία των πλακών (plaque assay). Κύτταρα 293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 φρεατίων (5×10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο) μέχρι το 80-90% της πληρότητας τους. Την επόμενη μέρα, μολύνθηκαν με 5μl από διαφορετικές αραιώσεις του ιού (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Μετά από 4 ώρες μόλυνσης τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με 4ml άγαρ επικάλυψης που περιέχει 20mM Herpes, 12,5mm $MgCl_2$, 1% αγαρόζη (Gibco BRL), σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Για την αποφυγή του στεγνώματος της αγαρόζης πριν από το σχηματισμό των πλακών, προστέθηκε PBS μεταξύ των φρεατίων και το τρυβλίο τυλίχθηκε με πάραφιλμ. Ακολούθησε επώαση σε επωαστικό κλίβανο στο οποίο η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους $37^{\circ}C$, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO_2 . Οι ιικές πλάκες αναπτύχθηκαν μετά από περίπου μία εβδομάδα, αναγνωρίστηκαν ως μεμονωμένες εστίες λύσης των κυττάρων και έγιναν συνεχείς καταμετρήσεις (στις 6,8 και 10 ημέρες) ως την πλήρη εμφάνιση των πλακών. Από τον αριθμό των ιικών πλακών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά φρεάτια, τα οποία αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές αραιώσεις του ιού, υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος (ιικά σωματίδια/μl).

2.12. ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ ΑΔΕΝΟΪΟΥΣ

Προκειμένου να μολυνθούν και να εκφράσουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, τα ΗΥVE κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν με τον ανασυνδυασμένο ιό σε αναλογία ιικών σωματίων/αριθμός κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 350 για 24 ώρες ενώ τα 293 μολύνθηκαν σε αναλογία ιικών σωματίων/αριθμός κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 1 για 20 ώρες. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελεγχόταν κάθε φορά με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. παραπάνω), ενώ το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων εξεταζόταν με έμμεσο ανοσοφθορισμό (βλέπε παρακάτω).

2.13. ΕΜΜΕΣΟΣ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΣ

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες που είχαν προκαλυφθεί με κολλαγόνο τύπου 1 και στη συνέχεια επώαστηκαν στις διάφορες συνθήκες ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Με το πέρας της επώασης έγινε πλύση των κυττάρων μια φορά με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3.7% για 15 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με 50mM NH_4Cl (σε PBS) για 15 λεπτά για να μειωθεί ο αυτοφθορισμός και επώαση με Triton 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με 10% FCS (που είχε πριν υπερφυγοκεντρηθεί) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, εφόσον γινόταν πλύση των κυττάρων μία φορά με PBS, γινόταν επώαση με το διάλυμα του 2ου αντισώματος. Τα δευτερογενή αντισώματα αρουραίου συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) προήλθαν από την εταιρία Dianova και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 10% (10% FCS). Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιέχει



100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561 και λογισμικό Leica TCS.

2.14. ΈΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ GST ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΥΝΤΗΞΗΣ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ- ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ

Μια αποδοτική μέθοδος για την υπερέκφραση μιας πρωτεΐνης και τον μετέπειτα καθαρισμό της, είναι η σύντηξη της επιθυμητής πρωτεΐνης με την (GST) τρανσφεράση-S-της γλουταθειόνης. Η γενική στρατηγική για τον καθαρισμό που ακολουθείται είναι η δέσμευση της GST πρωτεΐνης σύντηξης σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης, η απομάκρυνση με έκπλυση της στήλης του μη δεσμευμένου εκχυλίσματος, και τελικά έκλυση της πρωτεΐνης από την στήλη. Οι χιμαιρικές GST πρωτεΐνες υπερεκφράστηκαν στο βακτήριο *E.coli* BL21(DE) ή BL21, το οποίο ύστερα από μετασχηματισμό, έφερε ένα ανασυνδυασμένο pGEX πλασμίδιο. Η πρωτεϊνική έκφραση από αυτό το πλασμίδιο υπόκειται του ελέγχου του υποκινητή *tac* (*tac promoter*), ο οποίος επάγεται χρησιμοποιώντας το ανάλογο της λακτόζης, το IPTG (*isopropyl-β-D-thiogalactoside*). Οι επαγόμενες από το IPTG βακτηριακές καλλιέργειες διευκολύνουν την υπερέκφραση των GST πρωτεϊνών. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν ύστερα από κατεργασία είτε με υπερήχους, (*Branson Digital Sonifier^R 250-D, USA*), είτε με μηχανικά μέσα με την χρήση του *French pressure cell* (*SIM-AMINCO, 40.0000 PSI*).

2.15. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΓΧΙΣΤΕΙΑΣ (ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΣΕΦΑΡΟΖΗΣ-ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ)

Οι πρωτεΐνες SMAD2, SMAD3 και SMAD4 πλήρους μεγέθους, καθώς και οι ελλειμματικές μορφές της SMAD4, εκφράστηκαν στα επιδεικτικά βακτηριακά κύτταρα BL21 (*protease free*) και BL21(DE) του βακτηρίου *E.coli*. Ακολουθήθηκε η εξής πορεία: Ύστερα από μετασχηματισμό του βακτηρίου *E.coli* με τα αντίστοιχα pGEX πλασμίδια, ακολούθησε επώαση της καλλιέργειας στους 37°C. Όταν η οπτική απορρόφηση έφτασε την τιμή 0,6 ($OD_{600nm}=0,6$), δηλαδή στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Ακολούθησε περαιτέρω επώαση στους 37 °C για ακόμη τρεις ώρες (υπερέκφραση των GST πρωτεϊνών σύντηξης). Μετά το πέρας των 3 ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση, 6.000 rpm *Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, Germany*, κεφαλή GSA, για 15 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε, στον πάγο, σε συνολικό όγκο 40 ml διαλύματος (50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1mM DTT, αναστολείς πρωτεασών). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με μηχανικά μέσα (*french press*). Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και αμέσως φυγοκεντρήθηκε, 14.000 rpm *Sorvall*, κεφαλή SS-34, για 30 λεπτά, στους 4 °C. Στο μεταξύ προετοιμάζεται η στήλη από όπου θα διέλθει το κυτταρικό εκχύλισμα: 700ml σφαιριδίων σεφαρόζης-γλουταθειόνης φορτώνονται στη στήλη και ακολουθεί εξισορρόπησή τους με προσθήκη 5 όγκων διαλύματος λύσης. Κατόπιν, προστίθεται επάνω στη στήλη το κυτταρικό εκχύλισμα και αφήνεται να διέλθει διαμέσου των σφαιριδίων στον ψυχρό θάλαμο ώστε να αποφευχθεί αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια, η στήλη εκπλύθηκε με 10x 1ml διαλύματος αποτελούμενου από διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS), 0.5M NaCl, μίγμα αναστολέων πρωτεασών. Ακολούθησε δεύτερη έκπλυση με 10x 1ml διαλύματος σύστασης 50mM

Tris pH 8.0, 200mM NaCl. Η προσδεμένη στα σφαιρίδια πρωτεΐνη εκλούστηκε με 10ml διαλύματος περιεκτικότητας 50 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 10 mM ανηγμένης γλουταθειόνης και ακολούθησε συλλογή των κλασμάτων της πρωτεΐνης. Έγινε ποσοτικοποίηση της περιεχόμενης πρωτεΐνης ανά κλάσμα με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή 12%, SDS-πολυακρυλαμιδίου και επακόλουθη χρώση του πηκτώματος με χρωστική Coomassie.

Τα κατάλληλα κλάσματα υποβλήθηκαν σε ολονύχτια διαπίδυση σε διάλυμα: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, στους 4°C. Μετά τη διαπίδυση η «καθαρή» GST πρωτεΐνη ανακτήθηκε και προσδιορίστηκε φωτομετρικά η συγκέντρωσή της με τη μέθοδο Bradford. Τέλος, η GST πρωτεΐνη αποθηκεύτηκε στους -80°C.

Αναφορικά με την έκφραση και τον καθαρισμό της ελλειμματικής μορφής της πρωτεΐνης σύντηξης GST-SMAD4ΔC42 η οποία παρουσίασε έντονη αποικοδόμηση, εφαρμόστηκαν αποδιατακτικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, έγινε προσθήκη στο διάλυμα λύσης ουρίας 8M. Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα μεγάλου όγκου (~2 LIT) και αυξημένης συγκέντρωσης NaCl στα 500 mM (στα 500 mM NaCl έγιναν και οι εκπλύσεις της στήλης). Παράλληλα, απομονώθηκε με τη χρήση 8M ουρίας και η πλήρους μεγέθους πρωτεΐνη σύντηξης GST-SMAD4 για να χρησιμοποιηθεί ως θετικός μάρτυρας επιβεβαίωσης της σωστής πρωτεϊνικής αναδίπλωσης μετά την απομάκρυνση της ουρίας.

2.16. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ

2.16.1. IN VITRO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗΣ (PULL DOWN ASSAY)

293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που κωδικοποιούν για την πρωτεΐνη φυσικού τύπου ARF6 ή τις μεταλλαγμένες της μορφές, την μόνιμα ενεργή (ARF6Q67L ή τις μόνιμα ενεργές, ARF1Q71L ή ARF5Q71L) ή την μόνιμα ανενεργή μορφή της ARF6 (ARF6T27N). Μετά την πάροδο 36 ωρών τα διαμολυσμένα κύτταρα αφού εκπλύθηκαν με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), λύθηκαν με διάλυμα λύσης που περιείχε: 50mM Tris, pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 1x μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche) και φυγοκεντρήθηκαν στα 13,000rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C. Τα υπερκείμενα επώαστηκαν με πρωτεΐνη GST (ως αρνητικός μάρτυρας) ή GST-SMAD4 πλήρους μεγέθους ή τις GST ελλειμματικές μορφές της SMAD4, παρουσία 0.1% BSA, για 30 λεπτά, στους 4°C. Στο παραπάνω μίγμα, προστέθηκαν τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (τα οποία είχαν προεπωαστεί με διάλυμα λύσης περιεκτικότητας 20mg/ml σε BSA) και η επώαση συνεχίστηκε για 1 ώρα περαιτέρω. Ακολούθησε έκπλυση των σφαιριδίων, 5 φορές με όγκο 1ml από το διάλυμα λύσης. Οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν με τη χρήση 2x SDS Laemmli διαλύματος. Η παρουσία της ARF6 στα σφαιρίδια ανιχνεύτηκε με ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-HA.

2.16.2. IN VIVO ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΥΝ-ΑΝΟΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗΣ (CO-IMMUNOPRECIPITATION ASSAY)

293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα cDNA ανάλογα με το εκάστοτε πείραμα (σύμφωνα με την ενότητα 2.6). Μετά την πάροδο 24 ωρών, (σε περιπτώσεις όπου απαιτούνται ενεργοποίηση με Ακτιβίνη Α (50ng/ml) ή TGF-β (2ng/ml), τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες



έλλειψης ορού (καθόλου παροχή ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή τους για 45 λεπτά, τα κύτταρα αφού εκπλύθηκαν με παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), λύθηκαν με διάλυμα λύσης που περιείχε: 50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 1%NP-40, 25mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 25mM β-glycerophosphate, 1x μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche) και φυγοκεντρήθηκαν στα 13,000rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C. Από τα υπερκείμενα, 5μl χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford ενώ ο υπόλοιπος όγκος επωάστηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης- πρωτεΐνης A ή G (ανάλογα με τη συγγένεια του ισότυπου του αντισώματος) στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 10000g από όπου συλλέχθηκε το υπερκείμενο (το ίζημα περιείχε τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A/G, και μόρια ή συμπλοκα μορίων των κυττάρων που δέθηκαν μη ειδικά μαζί τους). Από τα «καθαρά» πλέον υπερκείμενα των δειγμάτων κρατήθηκαν 30μg ώστε να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών των οποίων μελετάται η ενδεχόμενη συν-ανοσοκατακρήμιση ενώ το υπόλοιπο διαχωρίστηκε σε δύο δείγματα που περιείχαν ίσα ποσά (μg) πρωτεΐνης και επωάστηκαν (σε αναλογία: 1 μg αντισώματος/IgG ANA 300 μg πρωτεΐνης) το ένα με το αντίσωμα και το δεύτερο με την αντίστοιχη ανοσοσφαιρίνη (ως δείγμα αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να αποκλείσουμε μη ειδική ανοσοκατακρήμιση του αντιγόνου) στους 4°C για 5 ώρες ή ολονύχτια ανάλογα με την ισχύ της συγγένειας αντιγόνου-αντισώματος, προκειμένου να σχηματιστεί το σύμπλεγμα αντιγόνου- ειδικού αντισώματος. Κατόπιν, στο παραπάνω μίγμα αντιγόνου-αντισώματος προστέθηκαν τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A/G και ακολούθησε επώαση για 2 περαιτέρω ώρες. Ακολούθησε έκπλυση των σφαιριδίων, 5 φορές με όγκο 1ml από το διάλυμα λύσης. Οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν με τη χρήση 2x SDS Laemmli διαλύματος. Η παρουσία των συν-ανοσοκατακρημιζόμενων πρωτεϊνών στα σφαιρίδια ανιχνεύτηκε με ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας σε κάθε πείραμα το κατάλληλο αντίσωμα.

2.17. ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΤΡΑΣΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ TGFβ1

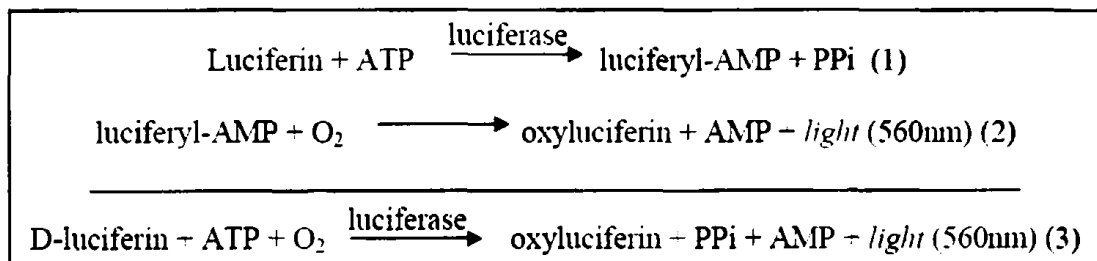
Ενδοθηλιακά κύτταρα, BBCE, υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 8 ώρες (συγκεκριμένα σε θρεπτικό μέσο DMEM που περιείχε 0.2% NCS), μη επαγόμενα ή επαγόμενα με TGF-β1 (2ng/ml) για 20 λεπτά ή 12 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα αφού εκπλύθηκαν με ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), λύθηκαν με διάλυμα λύσης που περιείχε: 50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10mM MgCl, 25mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 1x μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche) και φυγοκεντρήθηκαν στα 13,000rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C.

Τα υπερκείμενα επωάστηκαν με την πρωτεΐνη GST-GAP (πρωτεΐνη ενεργοποιούσα τη δραστικότητα GTPάσης) παρουσία 0.1% BSA, για 30 λεπτά, στους 4°C. Στο παραπάνω μίγμα, προστέθηκαν τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (τα οποία είχαν προεπωαστεί με διάλυμα λύσης περιεκτικότητας 20mg/ml σε BSA) και η επώαση συνεχίστηκε για 1 ώρα περαιτέρω. Ακολούθησε έκπλυση των σφαιριδίων, 5 φορές με όγκο 1ml από το διάλυμα λύσης. Οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν με τη χρήση 2x SDS Laemmli διαλύματος. Η παρουσία της ενδογενούς ARF6 στα σφαιρίδια ανιχνεύτηκε με ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-ARF6.

2.18. ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

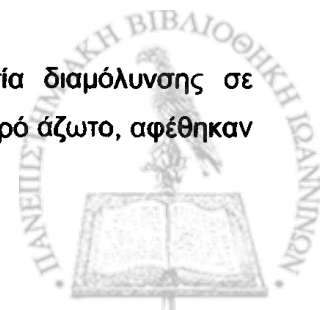
Τα εκάστοτε κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα αντίστοιχα cDNA όπως αναφέρεται στην ενότητα 2.6. Μετά την πάροδο 24 ωρών, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού, δηλαδή σε θρεπτικό μέσο που περιείχε 0,2% ορό και 1% πενικιλίνη, στρεπτομυκίνη. Κατόπιν διέλευσης 8 ωρών και ενώ τα κύτταρα βρίσκονταν σε συνθήκες στέρησης ορού, χορηγήθηκε στα κύτταρα Ακτιβίνη Α 50 ng/ml (προσφορά του Dr. Y. Eto Central Research Laboratories, Kawasaki, Japan, (Eto et al., 1987)) ή TGFβ1 2 ng/ml ή BMP-2 100 ng/ml ανάλογα με την πειραματική διαδικασία και ανάλογα με το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιείται ανά περίπτωση όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Ύστερα από συνολική επώαση 16 ωρών το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα.

Η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης έγινε με το εμπορικό προϊόν της Promega Luciferase Assay System (Promega Biosciences Inc., Mannheim, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η πρωτεΐνη λουσιφεράση κωδικοποιείται από το γονίδιο Luc. Η λουσιφεράση αποτελεί το συνήθως χρησιμοποιούμενο ένζυμο για εφαρμογές που βασίζονται στην ανίχνευση χημειοφωταύγειας. Για την δράση του ενζύμου δεν χρειάζεται καμία μεταμεταφραστική τροποποίηση. Υπάρχουν διάφορων ειδών ένζυμα λουσιφεράσης ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται. Η πλέον χρησιμοποιούμενη λουσιφεράση προέρχεται από την πυγολαμπίδα *Photinus Pyralid*. Η συνολική αντίδραση που καταλύει το ένζυμο της συγκεκριμένης λουσιφεράσης αποτελείται από δύο επιμέρους αντιδράσεις, οι οποίες φαίνονται παρακάτω:



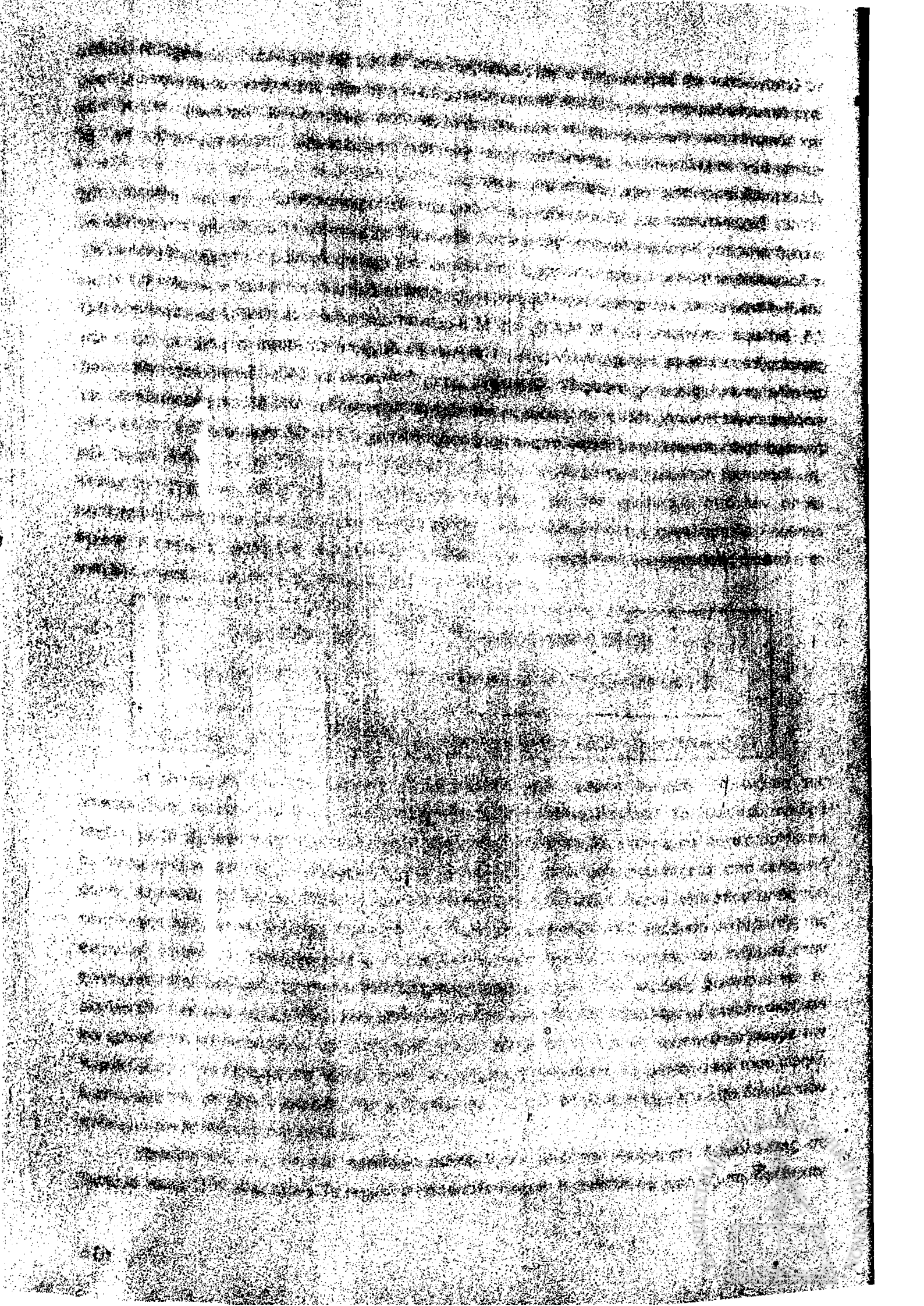
Η αντίδραση της λουσιφερίνης με το οξυγόνο έχει βραδεία κινητική. Το ένζυμο της λουσιφεράσης καταλύει την αντίδραση 1 προς παραγωγή λουσιφερύλο-AMP. Το τελευταίο αντιδρά ταχέως με το οξυγόνο προς παραγωγή οξυλουσιφερίνης (αντίδραση 2), η οποία και αρχικά βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Η μετάβασή της στη βασική της κατάσταση, συνοδεύεται από εκπομπή φωτός (Ugarova and Bronko 2002). Απαραίτητη είναι επίσης η ύπαρξη ιόντων ασβεστίου εντός του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου. Η συνολική αντίδραση 3 έχει πολύ υψηλή απόδοση μετατροπής της ενέργειας σε φως. Η εκπομπή φωτός είναι απολύτως ανάλογη της ποσότητας του ενζύμου όταν χρησιμοποιείται σταθερή ποσότητα υποστρώματος (λουσιφερίνη). Εδώ ακριβώς βρίσκεται και το μεγάλο πλεονέκτημα της μεθόδου. Χρησιμοποιώντας ένα λουμιόμετρο μπορούμε με μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία να μετρήσουμε την εκπεμπόμενη ακτινοβολία και εντέλει να ποσοτικοποιήσουμε την περιεκτικότητα του ενζύμου στο δείγμα. Είναι τόσο μεγάλη η ευαισθησία της μεθόδου και τόσο υψηλή η επαγωγή του γονιδίου αναφοράς που μπορούμε να πάρουμε μέτρηση ακόμα και από δείγμα που περιέχει μερικές εκατοντάδες κύτταρα.

Περιληπτικά, εκχυλίσματα κυττάρων συλλέχθηκαν μετά την διαδικασία διαμολύνσης σε διάλυμα λύσης (160 μl/φρεάτιο). Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν απευθείας σε υγρό άζωτο, αφέθηκαν



να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415D) σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα. Όγκος 20 μl από κάθε υπερκείμενο αναλύθηκε ως προς την ενεργότητα λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο Berthold (junior EGG, Berthold). Μέρος των κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Εκχυλίσματα των διαμολυσμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης για τον προσδιορισμό του επιπέδου διαμόλυνσης των κυττάρων. Η δοκιμασία μέτρησης ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης έχει προηγουμένα περιγραφεί (Hall et al., 1983). Μικρό μέρος κυτταρικού εκχυλίσματος αναμίχθηκε με διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,1 M pH 7,5, διάλυμα μαγνησίου (0,1 M MgCl₂, 4,5 M β-μερκαπτοαιθανόλη) και ONPG (o-nitrophenyl-β-D galactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Τα δείγματα επωάστηκαν μέχρι την εμφάνιση αχνού κίτρινου χρώματος στους 37 °C. Η αντίδραση διακόπηκε με 500μl διαλύματος ανθρακικού νατρίου, συγκέντρωσης 1M. Η απορρόφηση κάθε δείγματος μετρήθηκε στα 420nm ενώ κατώτερο και ανώτερο όριο γραμμικότητας θεωρούνται οι τιμές απορρόφησης 0,2 και 0,8 αντίστοιχα.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6, ARF6Q67L, αλληλεπιδρά με την SMAD4

Η ARF6 είναι μια GTPάση, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοσωματική δυναμική. Τίποτα δεν είναι γνωστό αναφορικά με την αλληλεπίδρασή της με συστατικά της μεταγωγής του σήματος των παραγόντων της υπεροικογένειας του TGFβ. Προκαταρκτικά πειράματα μας σε συνεργασία με τον Δρ. Philippe Chavrier (Institut Curie, Paris, France) έδειξαν ότι η ARF6 αλληλεπιδρά με την SMAD4 στο σύστημα δύο υβριδίων σε μύκητα. Για να επιβεβαιωθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών ARF6-SMAD4, πραγματοποιήθηκαν πειράματα καταβύθισης (pull-down). Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με HA σημασμένες cDNA πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν την ARF6 (φυσικού τύπου ARF6WT, τη μόνιμα ενεργή, ARF6Q67L και τη μόνιμα ανενεργή μορφή, ARF6T27N). Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης, έγινε προσπάθεια καταβύθισης της ARF6 και των μεταλλαγμένων της μορφών, HA σημασμένων, με τη SMAD4, που προστέθηκε στα κυτταρικά λύματα σημασμένα με GST (GST-SMAD4). Τα πειραματικά αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western έδειξαν ότι η μόνιμα ενεργή ARF6Q67L καταβυθίζεται αποδοτικά (Εικόνα 3.1A, διαδρομή 8) από την GST-SMAD4, ενώ το ίδιο δεν συμβαίνει με τη φυσικού τύπου ARF6WT (Εικόνα 3.1A, διαδρομή 2) ή την μόνιμα ανενεργή μορφή ARF6T27N (Εικόνα 3.1A, διαδρομή 5). Τα επίπεδα έκφρασης και των τριών ARF6 (WT, T27N, Q67L) πρωτεϊνών είναι ικανοποιητικά (Εικόνα 3.1A, διαδρομές 1, 4, 7, αντίστοιχα), ενώ δεν εμφανίζεται μη ειδική πρόσδεση στις περιπτώσεις όπου τα κυτταρικά λύματα επωάστηκαν με την πρωτεΐνη αρνητικό μάρτυρα GST (Εικόνα 3.1A, διαδρομές 3, 6, 9). Τα ποσά των καθαρών πρωτεϊνών GST-SMAD4 (Εικόνα 3.1B, διαδρομές 2, 5, 8) και GST (Εικόνα 3.1B, διαδρομές 3, 6, 9) που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα απεικονίζονται μετά από χρώση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης με τη χρωστική Ponceau.

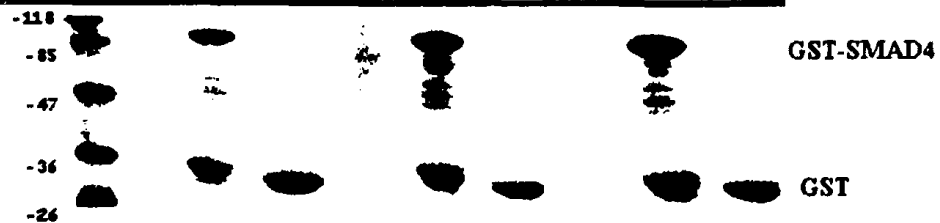
Προκειμένου να διερευνηθεί παραπέρα η αλληλεπίδραση ARF6-SMAD4 σε ζώντα κύτταρα, οι πρωτεΐνες ARF6Q67L-HA και SMAD4-GFP συνεκφράστηκαν σε 293 κύτταρα και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία συν-ανοσοκατακρήμνισης. Όταν η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με το αντίσωμα anti-HA (Εικόνα 3.2), ανοσοκατακρήμνιστηκε η πρωτεΐνη ARF6Q67L-HA (Εικόνα 3.2B, διαδρομή 2) και ανιχνεύτηκε η SMAD4-GFP, με το αντίσωμα anti-GFP, μετά από ανάλυση κατά Western (Εικόνα 3.2A, διαδρομή 2). Το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με το αντίσωμα anti-GFP (Εικόνα 3.3), όπου ανοσοκατακρήμνιστηκε η πρωτεΐνη SMAD4-GFP (Εικόνα 3.3B, διαδρομή 2) και ανιχνεύτηκε η ARF6Q67L-HA, με το αντίσωμα anti-HA (Εικόνα 3.3A, διαδρομή 2), μετά από ανάλυση κατά Western. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε συν-ανοσοκατακρήμνιση τόσο της ARF6Q67L-HA όσο και της SMAD4-GFP στα δείγματα ελέγχου όπου χρησιμοποιήθηκε ο αρνητικός μάρτυρας ανοσοσφαιρίνη IgG (Εικόνα 3.2 και 3.3, διαδρομή 3). Επομένως, επιβεβαιώθηκε και βιοχημικά η αλληλεπίδραση μεταξύ ARF6Q67L και SMAD4.

A.

Anti-HA Blot

1 2 3 4 5 6 7 8 9

ARF6WT-HA lysate	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ARF6T27N-HA lysate	-	-	-	+	+	+	-	-	-
ARF6Q67L-HA lysate	-	-	-	-	-	-	+	+	+
GST-SMAD4	-	+	-	-	+	-	-	+	-
GST	-	-	+	-	-	+	-	-	+

B.

Εικόνα 3.1. Η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6, ARF6Q67L, αλληλεπιδρά με την SMAD4. **A.** Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με cDNA κατασκευές της ARF6 σημασμένες με HA (φυσικού τύπου ARF6WT, μόνιμα ανενεργή μορφή, ARF6T27N και μόνιμα ενεργή, ARF6Q67L) και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία καταβύθισης χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη σύντηξης GST-SMAD4. Αρχικά, τα κυτταρικά λύματα επώαστηκαν με την πρωτεΐνη GST-SMAD4 για 30 λεπτά και ακολούθησε περαιτέρω επώαση του μίγματος με σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης (GST) για 1 ώρα επιπλέον, στους 4°C. Η ποσότητα της ARF6Q67L-HA που αλληλεπιδρά με την προσδεμένη στα σφαιρίδια GST-SMAD4 ανιχνεύθηκε με αποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντι-HA αντίσωμα. **B.** Χρώση Ponceau της μεμβράνης της δοκιμασίας πρωτεϊνικής καταβύθισης όπου εντοπίζονται οι καθαρές πρωτεΐνες GST-SMAD4 (~87 KD) και GST (ως αρνητικός μάρτυρας).

Input	+	-	-
HA Beads	-	+	-
IgG negative ctrl	-	-	+

A. Anti-GFP Blot

GFP-SMAD4 (~87KD)

IP: HA antibody

1

2

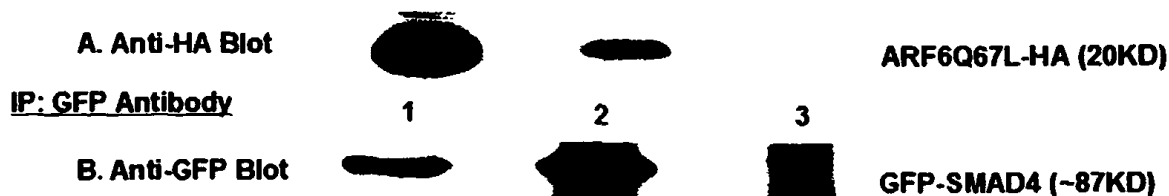
3

B. Anti-HA Blot

ARF6Q67L-HA (20KD)

Εικόνα 3.2. Η πρωτεΐνη ARF6Q67L-HA ανοκατακρημνίζει την SMAD4-GFP. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τα cDNAs των HA-ARF6Q67L και GFP-SMAD4 και κατόπιν υποβλήθηκαν σε δοκιμασία συν-ανοσοκαταβύθισης με το HA αντίσωμα ή την ανοσοσφαιρίνη αρουραίου IgG ως αρνητικό μάρτυρα. **A.** Αποτύπωση κατά Western όπου ανιχνεύεται με αντίσωμα GFP η αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη GFP-SMAD4 (διαδρομή 2), ενώ δεν ανιχνεύεται μη ειδικό σήμα στο δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG ως αρνητικό μάρτυρας (διαδρομή 3). Στην διαδρομή 1, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης της GFP-SMAD4 πρωτεΐνης. **B.** Αποτύπωση κατά Western όπου ανιχνεύεται με αντίσωμα HA η πρωτεΐνη HA-ARF6Q67L που προσδέθηκε στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G (διαδρομή 2) ενώ δεν ανιχνεύεται μη ειδικό σήμα στο δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG ως αρνητικό μάρτυρας (διαδρομή 3). Στην διαδρομή 1, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης της HA-ARF6Q67L πρωτεΐνης.

Input	+	-	-
GFP Beads	-	+	-
IgG negative ctrl	-	-	+



Εικόνα 3.3. Η πρωτεΐνη SMAD4-GFP ανοσοκατακρημνίζει την ARF6Q67L-HA. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τα cDNAs των HA-ARF6Q67L και GFP-SMAD4 και κατόπιν υποβλήθηκαν σε δοκιμασία συν-ανοσοκαταβύθισης με το GFP αντίσωμα ή την ανοσοσφαιρίνη κόνικλου IgG ως αρνητικό μάρτυρα. **A.** Αποτύπωση κατά Western όπου ανιχνεύεται με αντίσωμα HA η αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη ARF6Q67L-HA (διαδρομή 2) ενώ δεν ανιχνεύεται μη ειδικό σήμα στο δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG ως αρνητικό μάρτυρας (διαδρομή 3). Στην διαδρομή 1, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης της ARF6Q67L-HA πρωτεΐνης. **B.** Αποτύπωση κατά Western όπου ανιχνεύεται με αντίσωμα GFP η πρωτεΐνη SMAD4-GFP που προσδέθηκε στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεϊνης A (διαδρομή 2) ενώ δεν ανιχνεύεται μη ειδικό σήμα στο δείγμα όπου χρησιμοποιήθηκε ανοσοσφαιρίνη IgG ως αρνητικός μάρτυρας (διαδρομή 3). Στην διαδρομή 1, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης της SMAD4-GFP πρωτεΐνης.

3.2 Η αλληλεπίδραση ARF6-SMAD4 είναι ειδική: Η ARF1 και η ARF5 δεν αλληλεπιδρούν με την SMAD4

Προκειμένου να αποδειχθεί η ειδικότητα της αλληλεπίδρασης ARF6Q67L-SMAD4, πραγματοποιήθηκαν πειράματα καταβύθισης, όπου 293 κύτταρα, διαμολύνθηκαν με cDNA κατασκευές που εκφράζουν τις μόνιμα ενεργές μορφές των ARF1 (ARF1Q71L, Εικόνα 3.4Γ, διαδρομή 1) και ARF5 (ARF5Q71L, Εικόνα 3.4Γ, διαδρομή 3) σημασμένων με HA (που εκπροσωπούν τις GTPάσες των τάξεων I και II, αντίστοιχα). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6, ARF6Q67L- HA (Εικόνα 3.4Γ, διαδρομή 2), που αποτελεί το μοναδικό μέλος της τάξης III των ARF GTPασών, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η μόνιμα ανενεργή μορφή της ARF6 (ARF6T27N, Εικόνα 3.4Γ, διαδρομή 4). Στη συνέχεια, έγινε επώαση των κυτταρικών λυμάτων με τη SMAD4 πλήρους μήκους σημασμένη με GST (GST-SMAD4FL), τα καταβυθισθέντα ποσά της οποίας με σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης φαίνονται στη χρώση με Ponceau (Εικόνα 3.4B). Τα πειραματικά αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά από ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα υψηλής συγγένειας για τον επίτοπο HA, φαίνονται στην εικόνα 3.4A, όπου προκύπτει ότι μόνο η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6 αλληλεπιδρά με την SMAD4 (διαδρομή 2). Αξίζει να σημειωθεί ότι ανάλυση ομολογίας της πρωτοταγούς δομής των ανθρώπινων πρωτεϊνών ARF1, ARF6, ARF5 φυσικού τύπου, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>), έδειξε τα εξής ποσοστά ταυτότητας: ARF6-ARF1: 68%, ARF6-ARF5: 64%, και ARF1-ARF5: 80% (οι συγκρίσεις αμινοξικών αλληλουχιών παρατίθενται σαν παράρτημα στο τέλος αυτής της διατριβής).

HA-ARF1Q71L	+	-	-	-
HA-ARF6Q67L	-	+	-	-
HA-ARF5Q71L	-	-	+	-
HA-ARF6T27N	-	-	-	+
	1	2	3	4



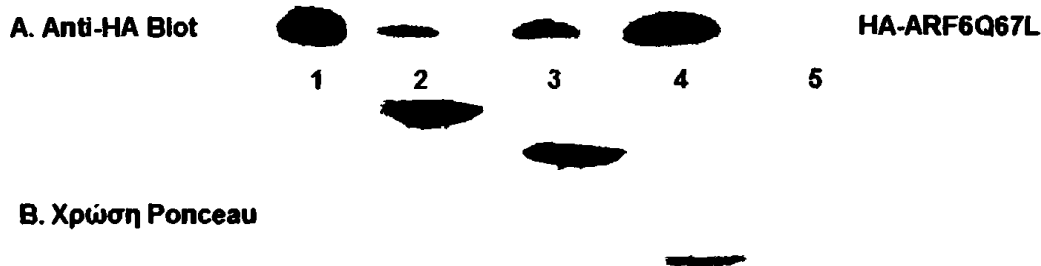
Εικόνα 3.4. Η αλληλεπίδραση ARF6-SMAD4 είναι ειδική: Η ARF1 και η ARF5 δεν αλληλεπιδρούν με την SMAD4. Α. Αποτύπωση κατά Western, με αντι-HA αντίσωμα, δοκιμασίας πρωτεϊνικής καταβύθισης. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τις HA σημασμένες, μόνιμα ενεργές cDNA κατασκευές των ARF1 (ARF1Q71L), ARF6 (ARF6Q67L), ARF5 (ARF5Q71L) καθώς και με τη μόνιμα ανενεργή μορφή της ARF6 (ARF6T27N, ως αρνητικός μάρτυρας) και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία καταβύθισης χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη σύντηξης GST-SMAD4FL. Αρχικά, τα κυτταρικά λύματα επωάστηκαν με την πρωτεΐνη GST-SMAD4FL για 30 λεπτά και ακολούθησε περαιτέρω επώαση του μίγματος με σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης (GST) για 1 ώρα επιπλέον, στους 4°C. Η ποσότητα των ARF-HA που αλληλεπιδρά με την προσδεμένη στα σφαιρίδια GST-SMAD4 ανιχνεύτηκε με αποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντι-HA αντίσωμα Β. Τα επίπεδα έκφρασης της GST-SMAD4 απεικονίζονται μετά από χρώση της μεμβράνης με Ponceau. Γ. Αποτύπωση κατά Western, με αντι-HA αντίσωμα, όπου φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης των ARF GTPασών.

3.3 Η ARF6 αλληλεπιδρά με την καρβοξυτελική περιοχή της SMAD4 και συγκεκριμένα με τα τελευταία 32 αμινοξέα (αα 520-552)

Για να εντοπιστεί η περιοχή της SMAD4 πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6 (ARF6Q67L) πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα καταβύθισης με σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης, σε κύτταρα 293. Για το σκοπό αυτό, εκτός από την πλήρους μήκους πρωτεΐνη GST-SMAD4FL (Εικόνα 3.5, διαδρομή 2), χρησιμοποιήθηκαν και μορφές της ίδιας πρωτεΐνης που φέρουν μόνο τα 274-καρβοξυτελικά αμινοξέα GST-SMAD4 (279-552) (Εικόνα 3.5, διαδρομή 3) καθώς και κατασκευή που φέρει μόνο τα 32 καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD4, GST-SMAD4 (520-552) (Εικόνα 3.5, διαδρομή 4). Κυτταρικά λύματα που εξέφραζαν την ARF6Q67L (η έκφρασή της φαίνεται στην Εικόνα 3.5A, διαδρομή 1) επωάστηκαν με κάθε μια από τις παραπάνω μορφές της SMAD4 καθώς και με την GST ως δείγμα αρνητικού ελέγχου (Εικόνα 3.5, διαδρομή 5). Προκύπτει σαφώς ότι τα 32 καρβοξυ-τελικά αμινοξέα της SMAD4 είναι επαρκή για την διαμεσολάβηση της αλληλεπίδρασης με την GTPάση ARF6Q67L (Εικόνα 3.5A, διαδρομή 4). Επιπλέον, κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι HA, ανιχνεύεται μεγαλύτερο ποσό καταβυθιζόμενης ARF6Q67L-HA στην περίπτωση των 32-καρβοξυτελικών αμινοξέων της SMAD4 (Εικόνα 3.5A, διαδρομή 4), μικρότερο στην περίπτωση των 274-καρβοξυτελικών αμινοξέων της SMAD4 (Εικόνα 3.5A, διαδρομή 3) και ακόμη μικρότερο ποσό στην περίπτωση της πλήρους μήκους SMAD4 (Εικόνα 3.5A, διαδρομή 2). Δηλαδή, όσο περισσότερο κατακερματίζεται η SMAD4 τόσο μειώνεται η παρεμπόδιση που προκαλείται λόγω της στεροδιαμόρφωσής της και επομένως διευκολύνεται περισσότερο η πρόσβαση της ARF6Q67L-HA στο μικρότερο τμήμα των 32-καρβοξυτελικών αμινοξέων που αποτελεί την περιοχή αλληλεπίδρασης με την ARF6. Η σπουδαιότητα των 32 τελικών αμινοξέων της SMAD4 αποδείχθηκε με την απάλειψη

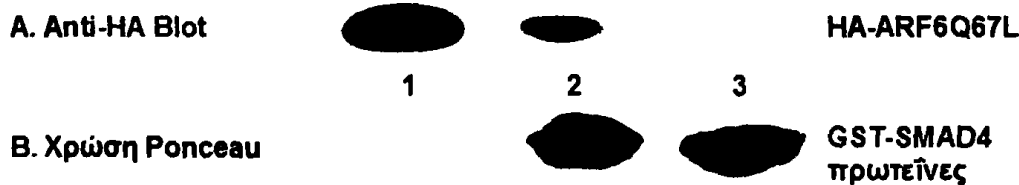
των 43 τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων από την SMAD4 (SMAD4ΔC43), οπότε η αλληλεπίδραση με την ARF6Q67L έπαυσε να υφίσταται (Εικόνα 3.6A, διαδρομή 3). Στο πείραμα αυτό, η GST-SMAD4FL πλήρους μήκους, που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας καταβύθισε την ARF6Q67L που εκφράστηκε σε λύματα προερχόμενα από 293 κύτταρα (Εικόνα 3.6A, διαδρομή 2), αντίθετα με την κατασκευή που φέρει την απάλειψη των 43 τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων η οποία δεν καταβυθίζει καθόλου ARF6Q67L (Εικόνα 3.6A, διαδρομή 3).

INPUT	+	-	-	-	-
GST-SMAD4 FL	-	+	-	-	-
GST-SMAD4(279-552)	-	-	+	-	-
GST-SMAD4(520-552)	-	-	-	+	-
GST negative ctrl	-	-	-	-	+



Εικόνα 3.5. Η GST-SMAD4(520-552), δηλ. τα τελευταία 32αα της SMAD4, αλληλεπιδρά με την ARF6Q67L. Α. Κύτταρα 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με την μόνιμα ενεργή, ARF6Q67L-HA (στη διαδρομή 1, φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης) και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία καταβύθισης. Παρατηρούμε ότι η ARF6Q67L-HA καταβυθίζεται τόσο από την πρωτεΐνη σύντηξης GST-SMAD4 πλήρους μήκους, όσο και από τις ελλειμματικές της μορφές SMAD4(279-552)-GST και SMAD4(520-552)-GST. **Β.** Χρώση Ponceau της μεμβράνης της δοκιμασίας καταβύθισης όπου φαίνεται η έκφραση των GST-SMAD4 πρωτεϊνών, όπως και της GST (αρνητικός μάρτυρας).

INPUT	+	-	-
GST-SMAD4 FL	-	+	-
GST-SMAD4ΔC42	-	-	+



Εικόνα 3.6. Η απάλειψη των 43 καρβοξυτελικών αμινοξέων της SMAD4 πρωτεΐνης συνεπάγεται την εξαφάνιση της αλληλεπίδρασης με την ARF6Q67L. Α. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με την μόνιμα ενεργή ARF6Q67L-HA (στη διαδρομή 1 φαίνονται τα επίπεδα έκφρασης) και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία καταβύθισης. Παρατηρούμε ότι η ARF6Q67L-HA πρωτεΐνη καταβυθίζεται μόνο από την πρωτεΐνη σύντηξης GST-SMAD4 πλήρους μήκους (FL=Full Length, ~87 KD, διαδρομή 2) και όχι από την ελλειμματική της μορφή GST-SMAD4ΔC43 (~82 KD, διαδρομή 3). **Β.** Χρώση Ponceau της μεμβράνης της δοκιμασίας καταβύθισης.

3.4 Η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με τις SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες

Προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανότητα η ARF6Q67L να αλληλεπιδρά και με άλλες SMAD πρωτεΐνες, πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειράματα καταβύθισης σε 293 κύτταρα, όπου οι SMAD πρωτεΐνες εκφράστηκαν ως πρωτεΐνες σύντηξης με GST. Πράγματι, αποδείχθηκε ότι όχι μόνο η κοινή SMAD4 πρωτεΐνη, αλλά και οι SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες καταβυθίζουν την πρωτεΐνη

ARF6Q67L-HA όπως φαίνεται στην αποτύπωση κατά Western, με το αντίσωμα HA (εικόνα 3.7A). Αντίθετα, δεν καταβυθίζεται καθόλου ARF6Q67L-HA στην περίπτωση της GST που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα ως αρνητικός μάρτυρας μολονότι το ποσό της εκφραζόμενης GST πρωτεΐνης είναι πολύ μεγαλύτερο από εκείνα των GST-SMAD2, GST-SMAD3 και GST-SMAD4 όπως φαίνεται στη χρώση της μεμβράνης με τη χρωστική Ponceau (εικόνα 3.7B). Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η ARF6Q67L αλληλεπιδρά *in vitro* και με τις τρεις SMAD πρωτεΐνες, δηλ. τις SMAD2, SMAD3 και SMAD4, που διαμεσολαβούν για την μετάδοση του σήματος καθοδικά των υποδοχέων των TGFβ και ακτιβίνης A.

INPUT	+	-	-	-	-
ARF6Q67L-HA	+	+	+	+	+
SMAD2-GST	-	-	-	-	+
SMAD3-GST	-	-	-	+	-
SMAD4-GST	-	-	+	-	-
GST	-	+	-	-	-

A. Blot: Anti-HA



ARF6Q67L-HA

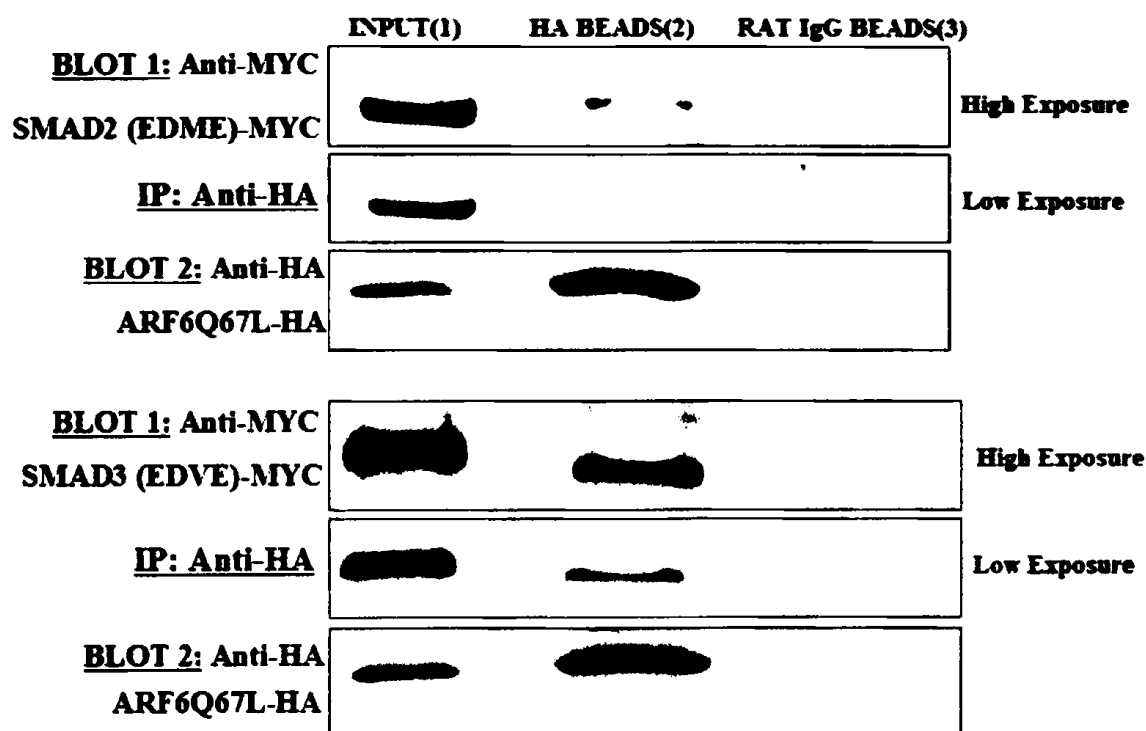
B. Χρώση Ponceau



Εικόνα 3.7. Η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με τις SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες. A. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με την μόνιμα ενεργή ARF6Q67L και πραγματοποιήθηκε δοκιμασία πρωτεϊνικής καταβύθισης χρησιμοποιώντας τις πρωτεΐνες σύντηξης GST-SMAD2 ή GST-SMAD3 ή GST-SMAD4. Αρχικά, τα κυτταρικά λύματα επωάστηκαν με τις πρωτεΐνες σύντηξης GST-SMAD2 ή GST-SMAD3 ή GST-SMAD4 για 30 λεπτά και ακολούθησε περαιτέρω επώαση του μίγματος με σφαιρίδια σεφαρόζης-γλουταθειόνης (GST) για 1 ώρα επιπλέον, στους 4°C. Η ποσότητα της ARF6Q67L-HA που αλληλεπιδρά με την προσδεμένη στα σφαιρίδια GST-SMAD ανιχνεύθηκε με αποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντι-HA αντίσωμα. Στην πρώτη διαδρομή φαίνεται η έκφραση της ARF6Q67L-HA. B. Χρώση Ponceau της μεμβράνης της δοκιμασίας πρωτεϊνικής καταβύθισης όπου εντοπίζονται οι πρωτεΐνες GST-SMAD2 (~78 kD), GST-SMAD3 (~73 kD), GST-SMAD4 (~87 kD) και GST (ως αρνητικός μάρτυρας).

Προκειμένου να μελετηθεί η παραπάνω αλληλεπίδραση σε περισσότερο φυσιολογικές συνθήκες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G κατασκευών SMAD σημασμένων με 6XMYC και ARF6Q67L-HA, σε κύτταρα 293. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι SMAD2/3 πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται/ενεργοποιούνται σε δύο καρβοξυτελικά κατάλοιπα σερίνης από τους τύπου I υποδοχείς των TGFβ και της ακτιβίνης A (Abdollah et al., 1997; Liu et al., 1997; Souchelnyskiy et al., 1997), σε αντίθεση με την SMAD4, που δεν φωσφορυλιώνεται, μελετήθηκε η αλληλεπίδρασή τους με την ARF6Q67L με την παρουσία ή όχι προσδέματος. Η συν-ανοσοκατακρήμνιση ανά δύο των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα αντι-HA και τα ποσά της ARF6Q67L-HA που κατακρημνίστηκαν σε κάθε περίπτωση ήταν ικανοποιητικά (Εικόνα 3.8, Blot 2). Ωστόσο, εντύπωση προκαλεί η διαφορετική αλληλεπίδραση μεταξύ των SMAD πρωτεϊνών και της ARF6Q67L-HA, παρουσία και απουσία του προσδέματος, όπως φαίνεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα αντι-MYC (Εικόνα 3.8, Blot 1). Πιο συγκεκριμένα, απουσία TGFβ1, οι

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με έναν ακόμη τρόπο, ο οποίος περιλαμβάνει τη χρήση κατασκευών SMAD2 και SMAD3 μόνιμα ενεργοποιημένων, όπου οι καρβοξυτελικές σερίνες που φωσφορυλιώνονται από τον υποδοχέα -SSXS-, μεταλλάχθηκαν σε γλουταμινικά και ασπαρτικό, ως -EDME- (Of et al., 2002) και -EDVE-, για τις SMAD2 και SMAD3, αντίστοιχα (εικόνα 3.9). Με δοκιμασία ανοσοκαταβύθισης με αντίσωμα έναντι HA, ελέγχθηκε η πιθανότητα οι παραπάνω κατασκευές να συν-ανοσοκαταβυθίζονται από την ARF6Q67L-HA. Αποδείχθηκε ότι η ARF6Q67L ανοσοκατακρημνίζει με καλή απόδοση την SMAD3(EDVE), ενώ ανοσοκατακρημνίζει οριακά την SMAD2(EDME) (εικόνα 3.9, Blot 1). Ακόμη, τα ποσά της ARF6Q67L-HA που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G είναι συγκρίσιμα καθώς επίσης και η έκφρασή της (Εικόνα 3.9, Blot 2). Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι μη φωσφορυλιωμένες SMAD2, SMAD3 και SMAD4 (απουσία προσδέματος) αλληλεπιδρούν με την ARF6Q67L, ενώ από τις φωσφορυλιωμένες SMAD πρωτεΐνες μόνο η SMAD3-P αλληλεπιδρά με την ARF6Q67L. Η SMAD4 δεν αλληλεπιδρά με την ARF6Q67L παρουσία προσδέματος, παρότι δεν φωσφορυλιώνεται, πιθανά λόγω ανταγωνιστικού ολιγομερισμού με τη φωσφορυλιωμένη SMAD2-P, η οποία δεν δεσμεύεται από την ARF6Q67L.



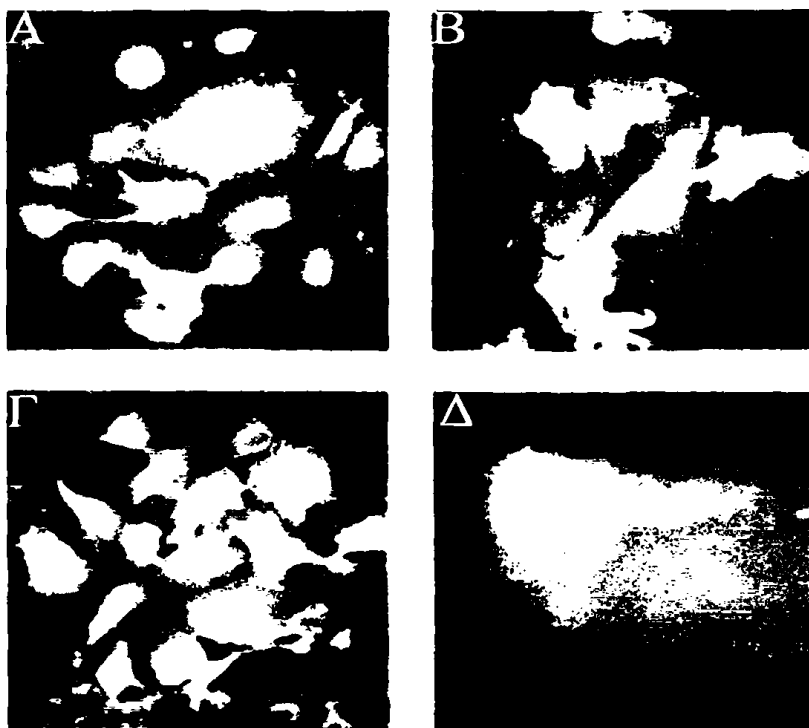
Εικόνα 3.9. Η ARF6Q67L ανοσοκατακρημνίζει εκλεκτικά τη SMAD3(EDVE) και όχι την SMAD2(EDMA). Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τα cDNA των HA-ARF6Q67L και τις μόνιμα ενεργοποιημένες μορφές των MYC-SMAD2(EDME) ή MYC-SMAD3(EDVE) και κατόπιν υποβλήθηκαν σε δοκιμασία συν-ανοσοκαταβύθισης με το HA αντίσωμα ή την ανοσοσφαιρίνη αρουαίου IgG ως αρνητικό μάρτυρα. Στην 1^η αποτύπωση (Blot 1) κατά Western με MYC αντίσωμα (τόσο σε χαμηλή όσο και σε υψηλή έκθεση) φαίνεται ότι η ARF6Q67L ανοσοκατακρημνίζει την MYC-SMAD3(EDVE) και όχι την MYC-SMAD2(EDME). Στην τελευταία διαδρομή, όπου χρησιμοποιήθηκε η ανοσοσφαιρίνη IgG ως αρνητικός μάρτυρας δεν ανιχνεύθηκε μη ειδικό σήμα. Στη 2^η αποτύπωση (Blot 2) κατά Western με HA αντίσωμα φαίνονται τα ποσά της ARF6Q67L-HA που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G.



3.5 Η ARF6 επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ1, αλλά όχι η ακτιβίνη A

Επειδή η φωσφορυλίωση των SMAD2/3 επηρεάζει την αλληλεπίδραση με την ακτιβίνη A, ήταν επιβεβλημένο να μελετήσουμε την πιθανότητα η ARF6Q67L να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ ή την ακτιβίνη A. Είναι γνωστό ότι η ARF6 ρυθμίζει την ενδοκυτταρική μεταγωγή του σήματος από αυτούς (βλέπε στη συζήτηση) και αυτό θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις στη κυκλοφορία των υποστρώματων στην μεταγωγή του σήματος από αυτούς.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί το παραπάνω πείραμα ελέγχθηκε η έκφραση της ARF6 (τόσο του φυσικού τύπου όσο και των μεταλλαγμένων της μορφών Q67L και K67R) σε κύτταρα HUVEC, τα οποία μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς της ARF6 σε ασυμμετρική πολλαπλασιαστική κατάσταση (Multiplicity of infection, MOI) 350 για 24 ώρες. Από τη μελέτη διαπιστώνουμε ότι οι αδενοϊοί εκφράζονται σε ικανοποιητικά επίπεδα και μολύνουν σχεδόν όλους τους κύτταρους. Επιπλέον, απουσία ορού, η φυσικού τύπου ARF6 εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικούς σχηματισμούς (Εικόνα 3.10Δ). Με βάση τα παραπάνω, μελετήθηκε η έκφραση των ARF6 (τόσο του φυσικού τύπου όσο και των μεταλλαγμένων) στη φωσφορυλίωση των ενδογενών SMAD2/3 πρωτεϊνών από τον TGFβ1 σε κύτταρα HUVEC.

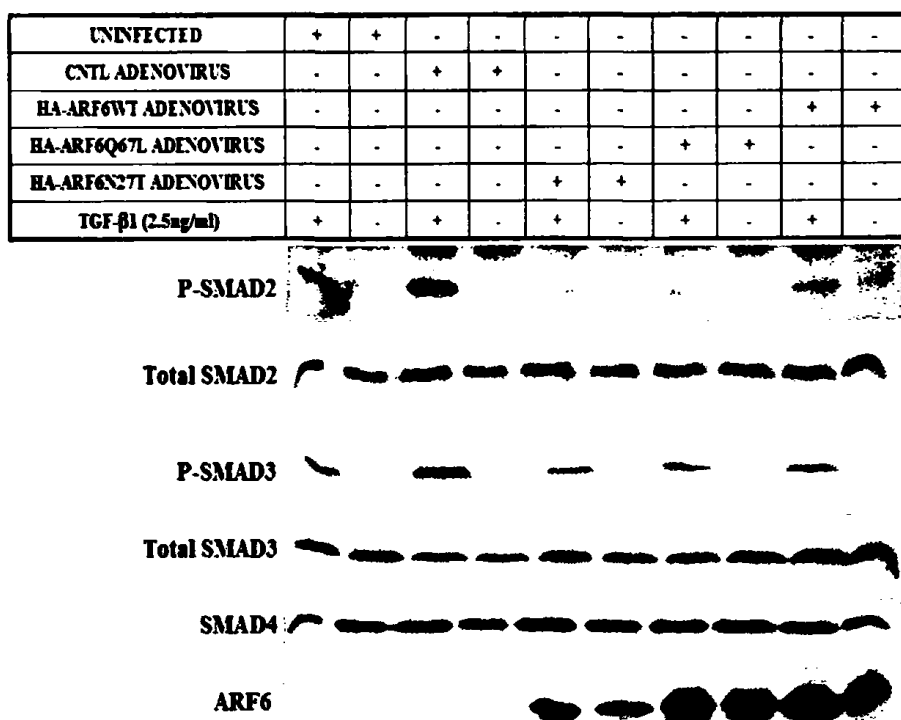


Εικόνα 3.10. Απεικονίζεται η έκφραση των αδενοϊών της ARF6, MOI 350 σε κύτταρα HUVEC του φυσικού τύπου (ωτ, **Εικόνα 3.10Α**) όσο και των μεταλλαγμένων της μορφών ανενεργού μορφής **Εικόνα 3.10Β** και συνεχώς ενεργού μορφής, **Εικόνα 3.10Γ**). Στη **3.10Δ**, φαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της ARF6, που εντοπίζεται εντός ενδοκυτταρικών σχηματισμών, απουσία ορού στο θρεπτικό μέσο.

Αποτύπωση κατά Western με ειδικά αντισώματα για κάθε περίπτωση, που φωσφορυλιωμένα και τα ολικά επίπεδα των SMAD2/3 πρωτεϊνών, έδειξε ότι και οι τ

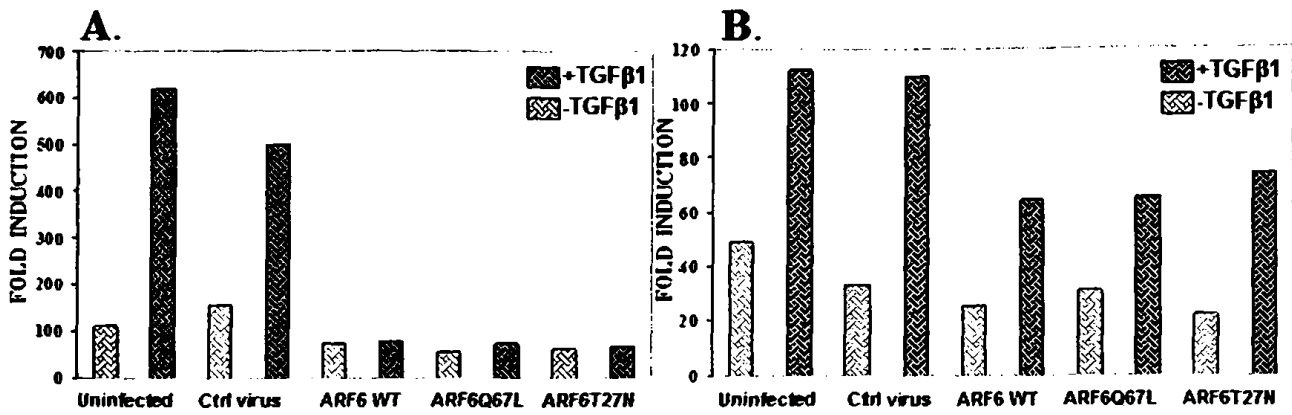
ARF6 (WT, Q67L και T27N) προκαλούν μεγάλη μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της SMAD2, μετά από επαγωγή με TGFβ, σε σύγκριση με τον αδενιοϊό μάρτυρα, ενώ η επίδραση τους στη φωσφορυλίωση της SMAD3 ήταν σαφώς ασθενέστερη (εικόνα 3.11). Οι παραπάνω παρατηρήσεις ποσοτικοποιήθηκαν (με το πρόγραμμα Quantity One), απ' όπου προέκυψε ότι η μεν φυσικού τύπου WT μείωσε τη φωσφορυλίωση της SMAD2 κατά 85%, οι δε μεταλλαγμένες της μορφές Q67L και T27N κατά 86% και 85%, αντίστοιχα, συγκρινόμενες με την φωσφορυλίωση που προκαλείται από το αδενιοϊό μάρτυρα (Εικόνα 3.12). Η αντίστοιχη μείωση στη φωσφορυλίωση της SMAD3 ήταν 42%, 41% και 33%, για τις ARF6WT, ARF6Q67L, και ARF6T27N, αντίστοιχα (Εικόνα 3.12). Τα ολικά επίπεδα της SMAD4 πρωτεΐνης παρέμειναν ανεπηρέαστα, ενώ οι ARF6 πρωτεΐνες εκφράστηκαν σε επαρκή επίπεδα (Εικόνα 3.11).

Εκτός από τα HUVEC κύτταρα, η επίδραση της ARF6Q67L στη φωσφορυλίωση των ενδογενών SMAD2/3 πρωτεϊνών από τον TGFβ μελετήθηκε επίσης σε 293 κύτταρα. Πράγματι, από την ανοσοαποτύπωση κατά Western φαίνεται ότι ο αδενιοϊός της μόνιμα ενεργής ARF6Q67L επιφέρει ισχυρή μείωση στη φωσφορυλίωση της SMAD2 και μικρότερη στη φωσφορυλίωση της SMAD3 (Εικόνα 3.13). Ποσοτικοποίηση των πειραματικών αποτελεσμάτων (με το πρόγραμμα Quantity One, BioRad) έδειξε ότι η ARF6Q67L μείωσε κατά 70% και 40% τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των SMAD2 και SMAD3, αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη φωσφορυλίωση που προκαλείται από το αδενιοϊό μάρτυρα (Εικόνα 3.14). Σαν επιπρόσθετη επιβεβαίωση, η υπερέκφραση της ARF6Q67L μείωσε δραστικά την από τον TGFβ επαγόμενη φωσφορυλίωση της υπερέκφρασμένης MYC-SMAD2 (Εικόνα 3.15).

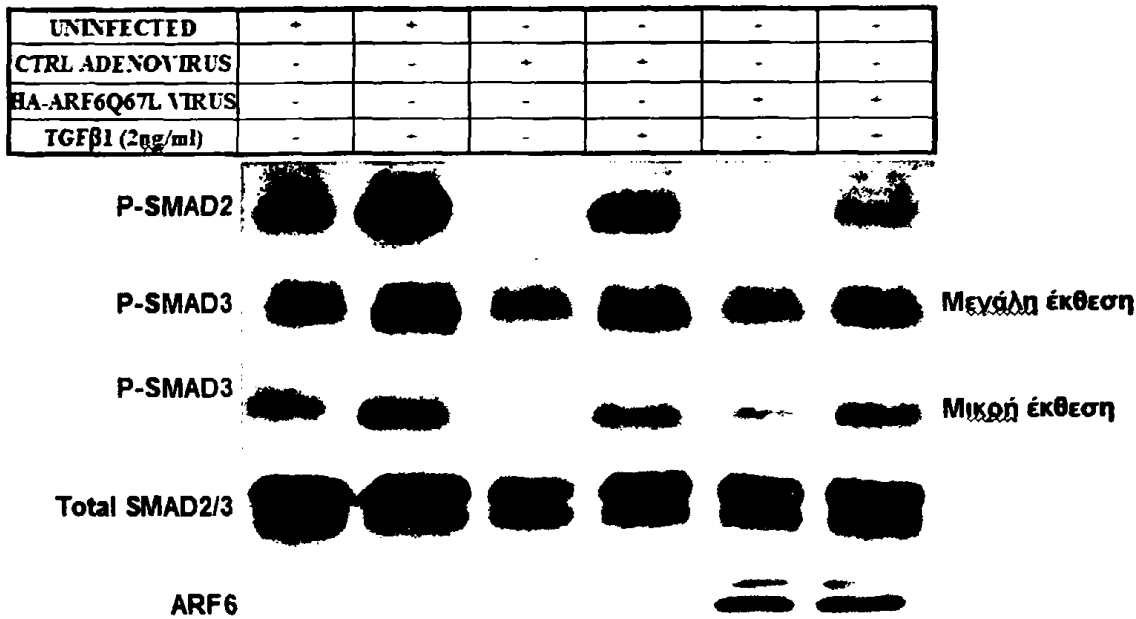


Εικόνα 3.11. Η ARF6 μειώνει την φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κύτταρα HUVEC μολύνθηκαν με τους αδενιοϊούς της ARF6 σε αναλογία ιικών σωματιών/αριθμό κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 350 για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (καθόλου προσθήκη ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή με TGF-β1 (2.5 ng/ml) για 45 λεπτά. Η επίδραση της ARF6 στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών μελετήθηκε με ανάλυση κατά Western.

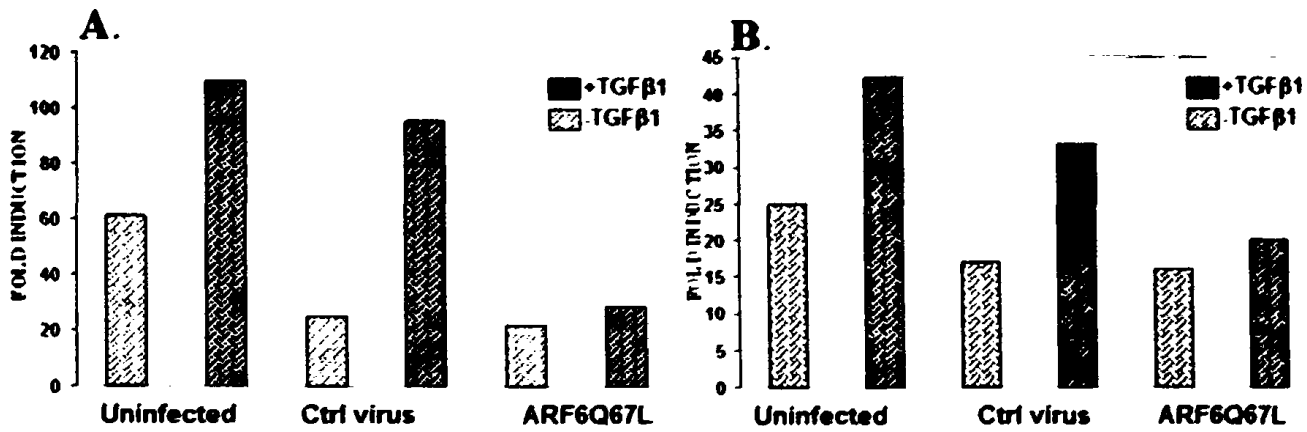




Εικόνα 3.12. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών της εικόνας 3.11. **A.** Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD2, και **B.** Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD3. Στο άξονα y παρουσιάζεται ο λόγος του ποσού της φωσφορυλιωμένης SMAD προς την μη φωσφορυλιωμένη από την εικόνα 3.11. Με μαύρο σχέδιο απεικονίζονται οι στήλες όπου έχει γίνει επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 ενώ με άσπρο εμφανίζονται οι στήλες όπου δεν έγινε επαγωγή.



Εικόνα 3.13. Η ARF6 μειώνει την φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ σε 293 κύτταρα. Κύτταρα 293 μολύνθηκαν με τους αδενιοίους της ARF6 σε αναλογία ιικών σωματίων/αριθμό κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 1 για 16 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (καθόλου προσθήκη ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή με TGF-β1 (2.5 ng/ml) για 45 λεπτά. Η επίδραση της ARF6 στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών μελετήθηκε με ανάλυση κατά Western.



Εικόνα 3.14. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών της εικόνας 3.13. **A.** Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD2, και **B.** Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD3. Στο άξονα γ παρουσιάζεται ο λόγος του ποσού της φωσφορυλιωμένης SMAD προς την μη φωσφορυλιωμένη από την εικόνα 3.13. Με μαύρο σχέδιο απεικονίζονται οι στήλες όπου έχει γίνει επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 ενώ με άσπρο εμφανίζονται οι στήλες όπου δεν έγινε επαγωγή.

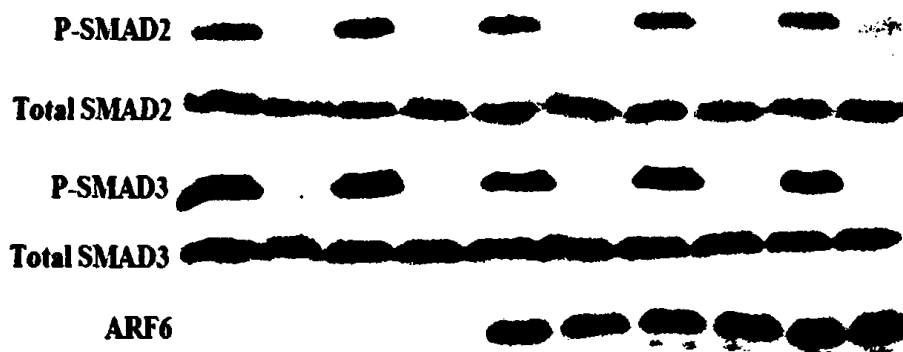
MYC-SMAD2	+	+	+	+
ARF6Q67L-HA	-	-	+	+
TGF-β1 (2.5ng/ml)	-	+	-	+



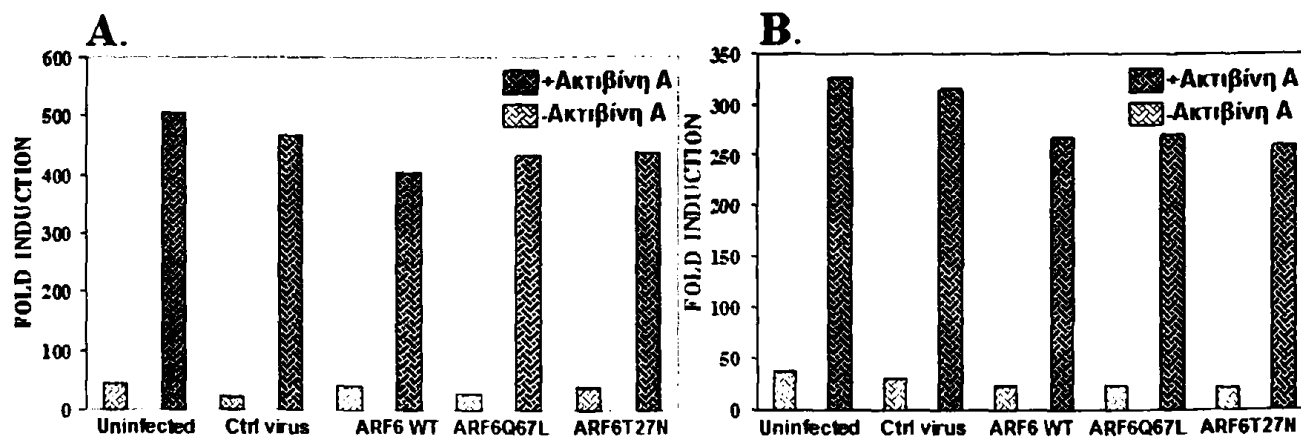
Εικόνα 3.15. Η ARF6Q67L-HA μειώνει τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της υπερεκφρασμένης MYC-SMAD2 πρωτεΐνης από τον TGFβ1. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με ίσες ποσότητες cDNA των SMAD2-MYC και ARF6Q67L-HA ή κενό πλασμιδιακό φορέα για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (καθόλου προσθήκη ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή με TGF-β1 (2.5 ng/ml) για 45 λεπτά. Η επίδραση της ARF6Q67L στη φωσφορυλίωση της SMAD2 πρωτεΐνης μελετήθηκε με ανάλυση κατά Western.

Αντίθετα, σε πειράματα όπου τα κύτταρα HUVEC επήχθησαν με ακτιβίνη A, η οποία μεταγεί τα μηνύματά της διαμέσου των SMAD2/3/4 όπως και ο TGFβ, οι αδενιοί της ARF6 (τόσο η φυσικού τύπου όσο και οι μεταλλαγμένες της μορφές) δεν επηρέασαν καθόλου τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών συγκριτικά με τον αδενιοί μάρτυρα (εικόνα 3.16). Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε με ποσοτικοποίηση, όπου δεν κατοχυρώθηκε ουσιαστική επίδραση στη φωσφορυλίωση, τόσο της SMAD2, όσο και της SMAD3, από καμία από τις ARF6 μορφές (εικόνα 3.17). Τα αποτελέσματα αναφορικά με την επίδραση των ARF6WT, ARF6Q67L, και ARF6T27N στη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από την Ακτιβίνη A σε 293 κύτταρα ήταν πανομοιότυπα με αυτά σε HUVEC κύτταρα. Δεν παρατηρήθηκε μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD2 και SMAD3 (Εικόνες 3.18 και 3.19).

UNINFECTED	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
CNTL ADENOVIRUS	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
HA-ARF6WT ADENOVIRUS	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
HA-ARF6Q67L ADENOVIRUS	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
HA-ARF6N27I ADENOVIRUS	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Activin A (50ng/ml)	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

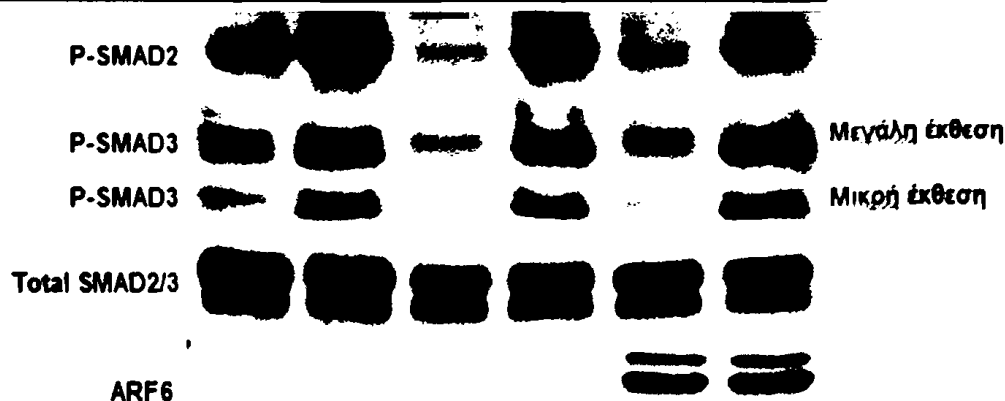


Εικόνα 3.16. Η ARF6 δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από την ακτιβίνη A σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Κύτταρα HUVEC μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς της ARF6 σε αναλογία ιικών σωματιδίων/αριθμό κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 350 για 24 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (καθόλου προσθήκη ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή με ακτιβίνη A (50 ng/ml) για 45 λεπτά. Η επίδραση της ARF6 στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών μελετήθηκε με ανάλυση κατά Western.

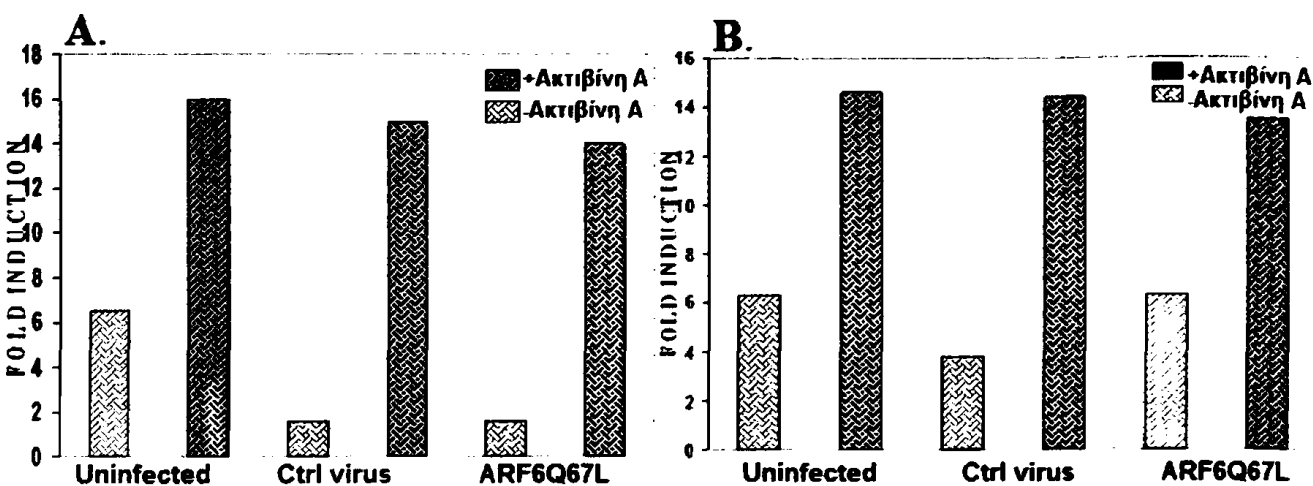


Εικόνα 3.17. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών της εικόνας 3.16. **A.** Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD2, και **B.** Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD3. Στο άξονα y παρουσιάζεται ο λόγος του ποσού της φωσφορυλιωμένης SMAD προς την μη φωσφορυλιωμένη από την εικόνα 3.16. Με μαύρο σχέδιο απεικονίζονται οι στήλες όπου έχει γίνει επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 ενώ με άσπρο εμφανίζονται οι στήλες όπου δεν έγινε επαγωγή.

UNINFECTED	+	+	-	-	-	-
CTRL ADENOVIRUS	-	-	+	+	-	-
HA-ARF6Q67L VIRUS	-	-	-	-	+	+
Actibin A (50ng/ml)	-	+	-	+	-	+

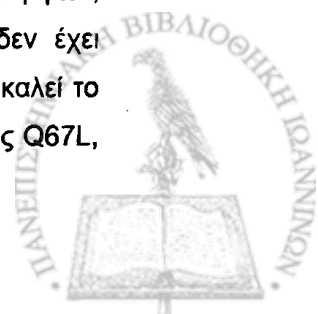


Εικόνα 3.18. Η ARF6 δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από την ακτιβίνη Α. Κύτταρα 293 μολύνθηκαν με τους αδενιοϊούς της ARF6 σε αναλογία ιικών σωματίων/αριθμό κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 1 για 16 ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού (καθόλου προσθήκη ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή με ακτιβίνη Α (50 ng/ml) για 45 λεπτά. Η επίδραση της ARF6 στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών μελετήθηκε με ανάλυση κατά Western.



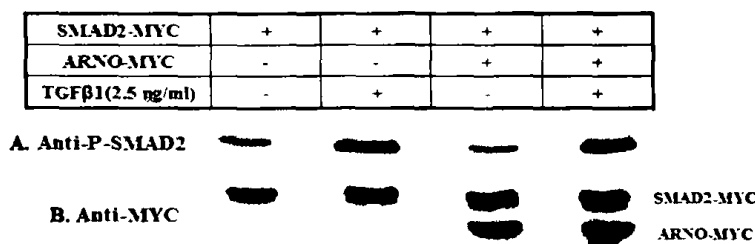
Εικόνα 3.19. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών της εικόνας 3.18. Α. Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD2, και Β. Φαίνεται η φωσφορυλίωση της SMAD3. Στο άξονα y παρουσιάζεται ο λόγος του ποσού της φωσφορυλιωμένης SMAD προς την μη φωσφορυλιωμένη από την εικόνα 3.18. Με μαύρο σχέδιο απεικονίζονται οι στήλες όπου έχει γίνει επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 ενώ με άσπρο εμφανίζονται οι στήλες όπου δεν έγινε επαγωγή.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της ARF6, και των μεταλλαγμένων της μορφών, μειώνει την από τον TGFβ επαγόμενη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3, ενώ δεν έχει επίδραση στη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από την Ακτιβίνη Α. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η υπερέκφραση όλων των μορφών της ARF6 (φυσικού τύπου WT, μόνιμα ενεργής Q67L,

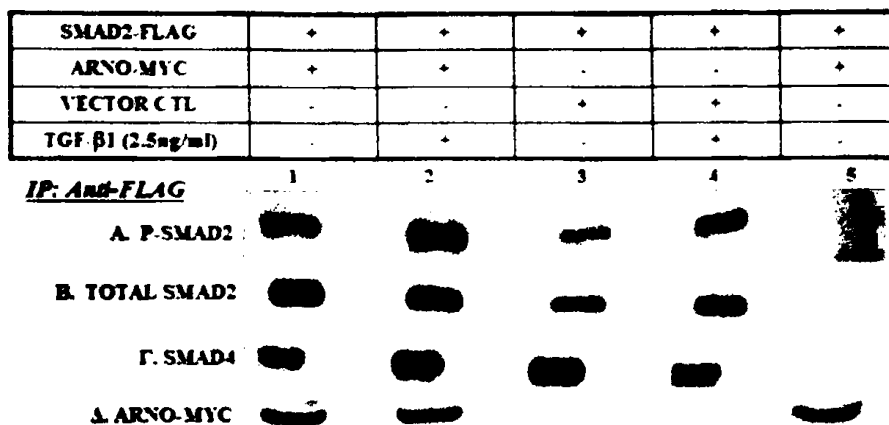


και μόνιμα ανενεργής T27N) προκαλεί το ίδιο αποτέλεσμα (μείωση) στη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από τον TGFβ. Όπως θα συζητηθεί διεδοξικά στο κεφάλαιο της συζήτησης, αυτό έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες και αποδίδεται στο γεγονός ότι η δραστηριότητα της ARF6 οφείλεται στους συνεχείς κύκλους μετατροπής του GTP σε GDP και το αντίθετο. Έτσι, 'κλειδωμά' της ARF6, είτε στη GTP (Q67L), είτε στη GDP (T27N) μορφή, προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας της ARF6. Ο μηχανισμός με το οποίο η υπερέκφραση της φυσικού τύπου ARF6 έχει επίσης ανασταλτική δράση σε λειτουργίες της ARF6 δεν είναι σαφής, αν και έχει επανειλημμένα αναφερθεί στη βιβλιογραφία (βλέπε στο κεφάλαιο της συζήτησης). Έτσι, θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει ότι η αναστολή της δραστηριότητας της ARF6 είναι υπεύθυνη για τη μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD2 και SMAD3 από τον TGFβ. Αναφορικά με την έλλειψη επίδρασης στην φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από την Ακτιβίνη Α, αυτό πρέπει να οφείλεται σε διαφορετική ενδοκυττάρωση του συμπλόκου TGFβ/ΤβRII/ALK5 σε σχέση με το σύμπλοκο ακτιβίνης Α ActRII/ALK4, με συνέπεια η αναστολή της δραστηριότητας της ARF6 να επηρεάζει την κυκλοφορία του ενός συμπλόκου και όχι του άλλου.

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση της ενεργού ARF6, αφού όπως δείχθηκε παραπάνω η υπερέκφραση της ARF6WT έχει την ίδια δραστηριότητα με τις ARF6Q67L και ARF6T27N, έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης ARNO, η οποία είναι ένας παράγοντας ανταλλαγής του GDP με GTP (GEF) με αποδεδειγμένη δράση στην ARF6 στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων (Frank et al., 1998a). Συγκεκριμένα σε 293 κύτταρα συνεκφράστηκαν οι πρωτεΐνες ARNO και SMAD2-MYC και εξετάστηκε η δράση της ARNO στη φωσφορυλίωση της SMAD2 από τον TGFβ. Από την αποτύπωση κατά Western φαίνεται σαφώς ότι η ARNO δεν επηρεάζει αρνητικά τη φωσφορυλίωση της SMAD2 από τον TGFβ1, ενώ η έκφραση και των δύο πρωτεϊνών είναι ικανοποιητική (Εικόνα 3.20). Στην προσπάθειά μας να διερευνηθεί το ζήτημα της φωσφορυλίωσης πιο αναλυτικά, πραγματοποιήθηκε σε 293 κύτταρα πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της SMAD2-FLAG παρουσία ή απουσία έκφρασης της ARNO-MYC. Η ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιήθηκε με αντίσωμα FLAG, οπότε και εκτιμήθηκαν τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης SMAD2 σε σχέση με τα ολικά ποσά SMAD2 που ανοσοκατακρήμνιστηκαν στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης Α (Εικόνα 3.21). Είναι λοιπόν προφανές ότι ενεργοποίηση της ARF6 με 'φυσιολογικό' τρόπο δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από τον TGFβ.



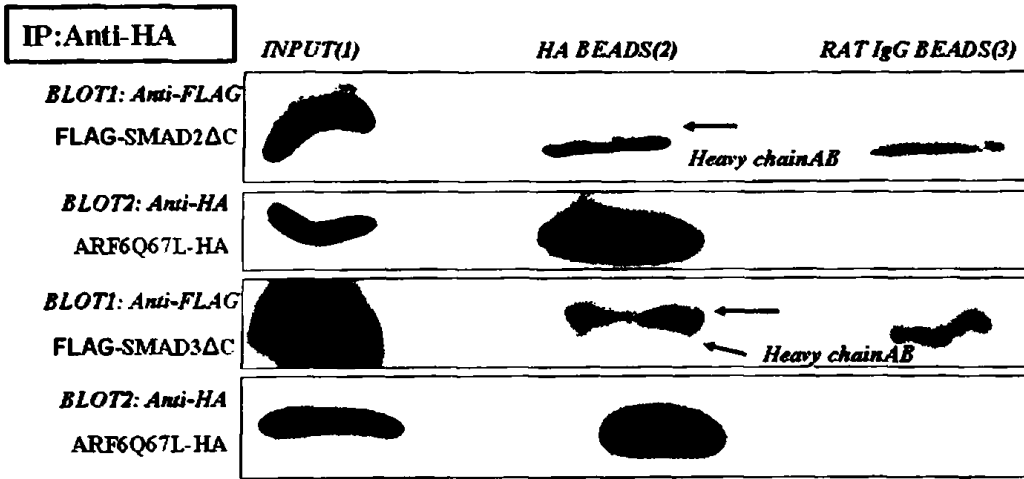
Εικόνα 3.20. Ο ARNO δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση της SMAD2 από τον TGFβ1. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τα cDNA των ARNO-MYC ή του κενού πλασμιδιακού φορέα και SMAD2-MYC. Στην 1^η αποτύπωση κατά Western (A) με αντίσωμα P-SMAD2 φαίνονται τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης SMAD2 τόσο απουσία όσο και παρουσία του επαγωγέα TGF-β1. Στην 2^η αποτύπωση κατά Western (B) με αντίσωμα MYC, απεικονίζεται η έκφραση των SMAD2-MYC και ARNO-MYC πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.21. Ο ARNO δεν επηρεάζει την φωσφορυλίωση της SMAD2 από τον TGFβ1. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τα cDNA των SMAD2-FLAG και τον ARNO-MYC ή τον κενό πλασμιδιακό φορέα αυτού. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή τους ή μη επαγωγή από τον TGF-β1 σε συγκέντρωση 2.5 ng/ml, για 45min. Κατόπιν, υποβλήθηκαν σε δοκιμασία συν-ανοσοκαταβύθισης με το FLAG αντίσωμα ή την ανοσοσφαιρίνη ποντικού IgG ως αρνητικό μάρτυρα. Στην 1^η αποτύπωση κατά Western (A) με P-SMAD2 αντίσωμα φαίνονται τα επίπεδα φωσφορυλίωσης από τον TGF-β1 (επαγωγή, διαδρομές 2 και 4) τόσο παρουσία (διαδρομές 1 και 2) όσο και απουσία (διαδρομές 3 και 4) ARNO-MYC, ενώ στη διαδρομή 5 όπου χρησιμοποιήθηκε η ανοσοσφαιρίνη IgG ως αρνητικός μάρτυρας, δεν ανιχνεύθηκε μη ειδικό σήμα. Στη 2^η αποτύπωση κατά Western (B) φαίνεται το ποσό της ολικής υπερεκφρασμένης πρωτεΐνης SMAD2-FLAG που ανοσοκαταβυθίστηκε με αντίσωμα FLAG στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A ενώ στην 3^η αποτύπωση κατά Western (Γ) απεικονίζονται τα επίπεδα της ενδογενούς SMAD4 που συν-ανοσοκατακρημνίζονται με την SMAD2-FLAG. Τέλος, η έκφραση της πρωτεΐνης ARNO-MYC ανιχνεύθηκε με αντίσωμα έναντι του MYC επιτόπου (Δ).

3.6 Η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με διαφορετικές περιοχές των SMAD2 και SMAD3

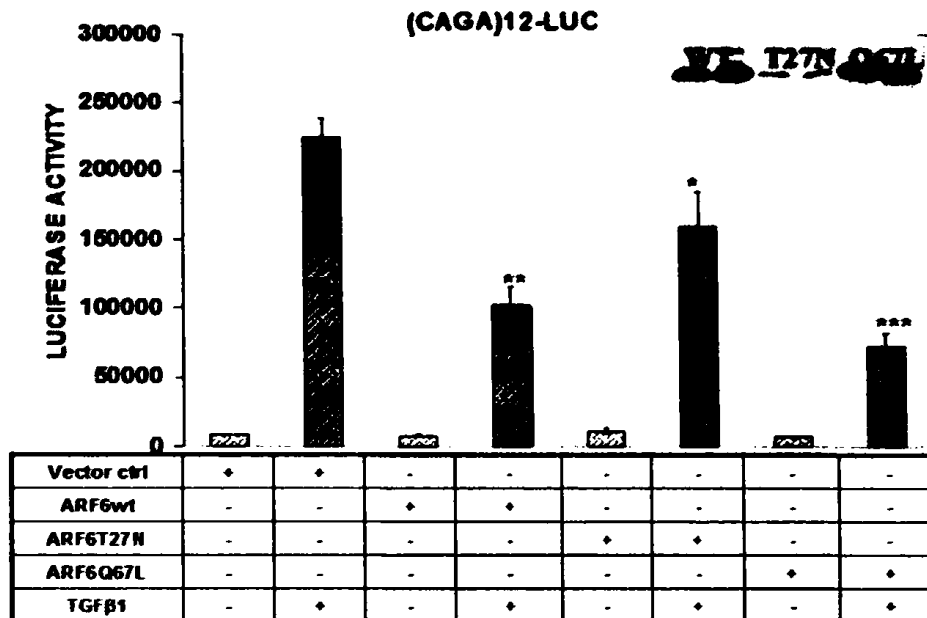
Επειδή παραπάνω δείξαμε ότι η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με τα τελευταία 32 καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD4, θελήσαμε να διερευνήσουμε, εάν το ίδιο ισχύει και για τις SMAD2/3 πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης, όπου χρησιμοποιήθηκαν κατασκευές των SMAD2 και SMAD3 πρωτεϊνών στις οποίες είχαν απαλειφθεί τα τελευταία 40 καρβοξυτελικά αμινοξέα, SMAD2ΔC και SMAD3ΔC, αντίστοιχα. Οι κατασκευές αυτές ήταν σημασμένες με FLAG. Η ARF6Q67L δεν ανοσοκατακρήμνισε τη SMAD2ΔC, ενώ η SMAD3ΔC ανοσοκατακρημνίστηκε (Εικόνα 3.22). Έτσι, η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με τα τελευταία 40 καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD2, όπως και στην περίπτωση της SMAD4, ενώ η περιοχή σύνδεσης με την SMAD3 πρέπει να βρίσκεται ανοδικά αυτών των τελευταίων 40 καρβοξυτελικών αμινοξέων. Αυτό μπορεί να εξηγήσει την διαφορετική αλληλεπίδραση της ARF6Q67L με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2 και SMAD3, καθότι η φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον ALK5 συμβαίνει στα τελευταία 4 καρβοξυτελικά αμινοξέα.



Εικόνα 3.22. Η ARF6Q67L αλληλεπιδρά με διαφορετικές περιοχές των SMAD2 και SMAD3. Κύτταρα 293 διαμολύνθηκαν με τα cDNA των HA-ARF6Q67L και τις ελλειμματικές μορφές των SMAD2 ή SMAD3, SMAD2ΔC και SMAD3ΔC, αντίστοιχα, σημασμένες με FLAG και κατόπιν υποβλήθηκαν σε δοκιμασία συν-ανοσοκαταβύθισης με το HA αντίσωμα ή την ανοσοσφαιρίνη αρουραίου IgG ως αρνητικό μάρτυρα. Στην 1^η αποτύπωση (Blot1) κατά Western με το αντίσωμα FLAG, φαίνεται ότι μόνον η FLAG-SMAD3ΔC αλληλεπιδρά με την HA-ARF6Q67L, ενώ αναφορικά με την FLAG-SMAD2ΔC δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση (η έντονη ζώνη που εικονίζεται είναι η βαριά αλυσίδα του αντισώματος). Στην διαδρομή όπου χρησιμοποιήθηκε η ανοσοσφαιρίνη IgG, ως αρνητικός μάρτυρας, δεν ανιχνεύτηκε μη ειδικό σήμα. Η ζώνη που ανιχνεύεται στην 3^η διαδρομή στην αποτύπωση με το αντίσωμα FLAG (Blot 1) είναι η βαριά αλυσίδα της ανοσοσφαιρίνης IgG. Στο 2^η αποτύπωση (Blot 2) κατά Western με HA αντίσωμα, φαίνονται τα ποσά της ARF6Q67L-HA που προσδέθηκαν στα σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης G.

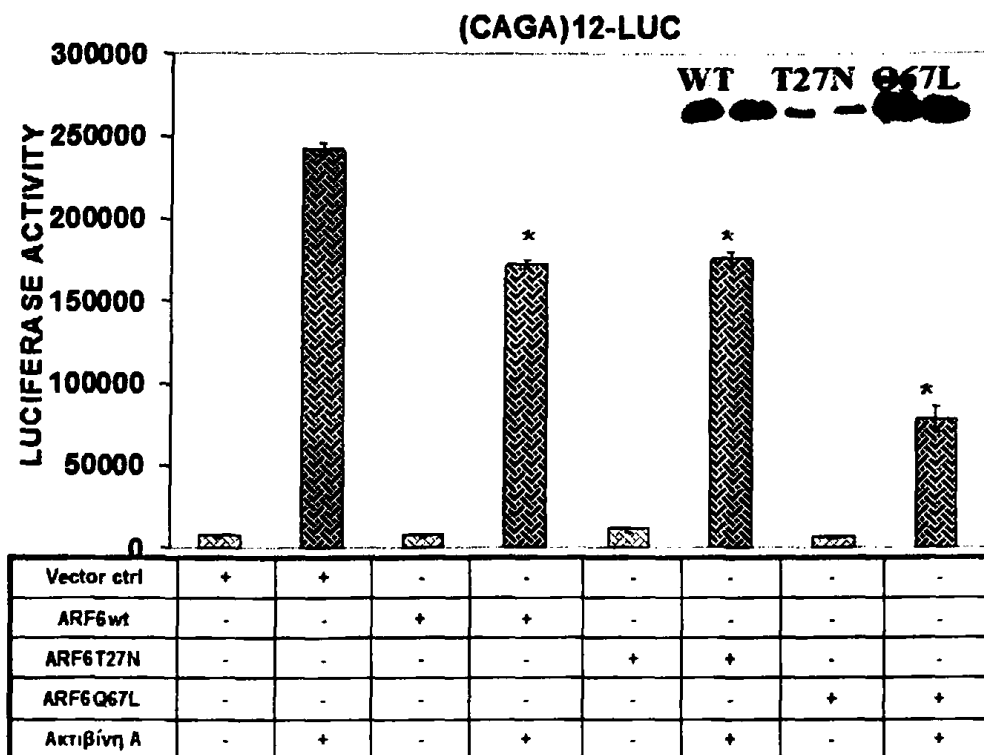
3.7 Η ARF6 μειώνει την από τις SMAD2/3 ρυθμιζόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση

Επειδή η ARF6 αλληλεπιδρά με τις SMAD2/3/4, ήταν απαραίτητο να ελεγχθεί η λειτουργική επίπτωση της αλληλεπίδρασης αυτής στην μεταγραφική ενεργοποίηση, η οποία ρυθμίζεται από τις SMAD πρωτεΐνες. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε αρχικά η επίδραση της ARF6 και των μεταλλαγμένων της μορφών στο σύστημα αναφοράς (CAGA)₁₂-LUC (SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή) τόσο παρουσία TGFβ όσο και παρουσία Ακτιβίνης Α σε 293 κύτταρα. Στην Εικόνα 3.23, παρατηρούμε την ανασταλτική δράση των ARF6 πρωτεϊνών στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή την επαγόμενη από TGFβ, με ισχυρότερη αναστολή (μείωση 68% συγκριτικά με το φορέα-μάρτυρα) να σημειώνεται από την μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6, ARF6Q67L, μικρότερη από την φυσικού τύπου ARF6WT (μείωση 55% συγκριτικά με το φορέα-μάρτυρα) και ακόμα πιο μικρή από την μόνιμα ανενεργή μορφή ARF6T27N (μείωση 29% συγκριτικά με το φορέα-μάρτυρα). Αναφορικά με την χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης που παρατηρείται στην αποτύπωση κατά Western (Εικόνα 3.23, επάνω δεξιά) η μόνιμα ανενεργή μορφή ARF6T27N είναι γνωστό ότι δεν αποτελεί σταθερή πρωτεΐνη, διότι έχει την τάση να χάνει το νουκλεοτίδιο της *in vitro* και να αποδιατάσσεται. Αυτό συνεπάγεται ότι το μεγαλύτερο ποσό της πρωτεΐνης εντοπίζεται σε δομές αδιάλυτες από απορρυπαντικό (Macia et al., 2004).



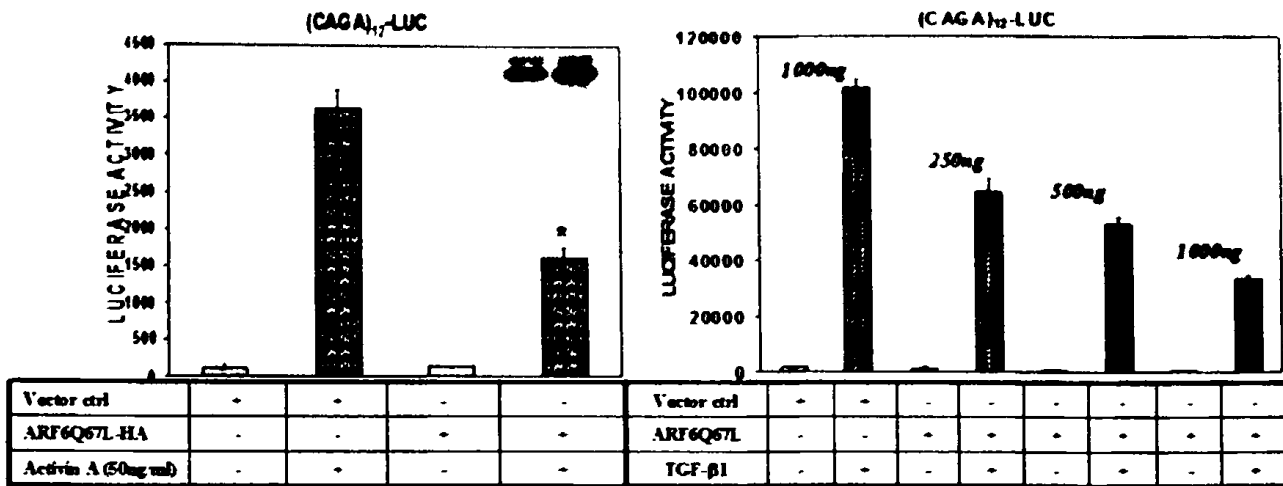
Εικόνα 3.23. Η ARF6 και οι μεταλλαγμένες της μορφές αναστέλλουν την από τον TGFβ1 επαγόμενη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή (CAGA)12-LUC σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν την ARF6 (WT-φυσικού τύπου, Q67L-μόνιμα ενεργή μορφή, και T27N-μόνιμα ανενεργή μορφή) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση TGFβ1 (2 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς (CAGA)12-LUC. Οι σχετικές μονάδες φωτός (SBE Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (μεταξύ των επαγόμενων με TGFβ1 δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6WT ή την ARF6T27N ή την ARF6Q67L επισημαίνονται στο γράφημα με αστερίσκους, ανάλογα με την στατιστική σημαντικότητα) πραγματοποιήθηκε με T-test και υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά $p^*=0,0108<0,05$, $p^{**}=0,0002<0,05$ και $p^{***}=0,0001<0,05$. Η έκφραση των ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.

Ανάλογη ήταν και η ανασταλτική δράση των ARF6 πρωτεϊνών στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή την επαγόμενη από ακτιβίνη A, επίσης σε 293 κύτταρα (Εικόνα 3.24), με ισχυρότερη αναστολή να σημειώνεται από την μόνιμα ενεργή μορφή ARF6Q67L (μείωση 67.5% συγκριτικά με το φορέα-μάρτυρα), ενώ μικρότερη είναι η αναστολή που προκαλείται από τη φυσικού τύπου ARF6WT και τη μόνιμα ανενεργή μορφή ARF6T27N (μείωση 29% και 27%, αντίστοιχα).

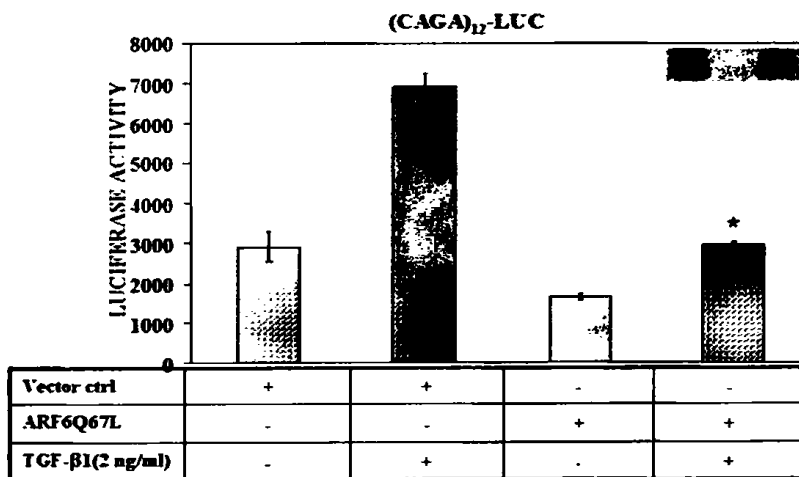


Εικόνα 3.24. Η ARF6 και οι μεταλλαγμένες της μορφές αναστέλλουν την από την ακτιβίνη A επαγόμενη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή (CAGA)12-LUC σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν την ARF6 (WT-φυσικού τύπου, Q67L-μόνιμα ενεργή μορφή, και T27N-μόνιμα ανενεργή μορφή) ή τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση Ακτιβίνης A (50 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς (CAGA)12-LUC. Οι σχετικές μονάδες φωτός (SBE Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (μεταξύ των επαγόμενων με Ακτιβίνη A δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6WT ή την ARF6T27N ή την ARF6Q67L), επισημαίνονται στο γράφημα με αστερίσκο πραγματοποιήθηκε με T-test, $p < 0,0001 < 0,05$ και υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά. Η έκφραση των ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.

Η ARF6Q67L ανέστειλε την SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφική ενεργοποίηση μετά από χορήγηση ακτιβίνης A και TGFβ σε ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE (Εικόνα 3.25A και B). Μάλιστα, η αναστολή αυτή ήταν δοσοεξαρτώμενη (Εικόνα 3.25B). Η ανασταλτική δράση της ARF6Q67L στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή που επάγεται από TGFβ1 επιβεβαιώθηκε και σε κύτταρα HeLa (Εικόνα 3.26).

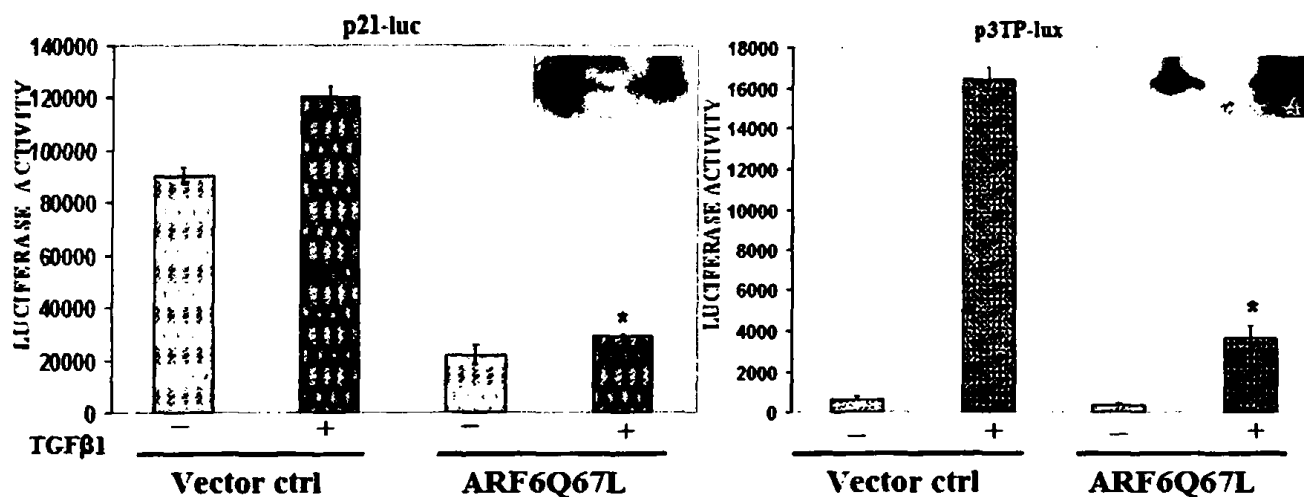


Εικόνα 3.25. Η ARF6Q67L αναστέλλει την από την ακτιβίνη A και TGFβ επαγόμενη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή (CAGA)₁₂-LUC σε ενδοθηλιακά κύτταρα (BBCE). Α) BBCE κύτταρα διαμολύνθηκαν με τις cDNA κατασκευές (CAGA)₁₂-LUC, CMV-β-gal και είτε τον φορέα μάρτυρα ή τη μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6Q67L. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 8 ώρες. Στην συνέχεια έγινε επαγωγή των κυττάρων με 50 ng/ml ακτιβίνης A και ακολούθησε επώαση για επιπλέον 16 ώρες. Οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (μεταξύ των επαγόμενων με Ακτιβίνη A δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6Q67L, επισημαίνονται στα γραφήματα με αστερίσκο) πραγματοποιήθηκε με T-test ($p=0,0001<0,05$). Β) Όπως το Α με την εξαίρεση ότι τα BBCE κύτταρα διαμολύνθηκαν με αυξανόμενες ποσότητες cDNA της ARF6Q67L cDNA (250 ng, 500 ng, 1000 ng) ή κενό πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και η επαγωγή έγινε με TGFβ1 (2 ng/ml). Η στατιστική ανάλυση με τεστ «Γραμμικής Παλινδρόμησης» (Linear Regression) απέδειξε ότι υπάρχει γραμμικότητα ($p=0,0001<0,05$).



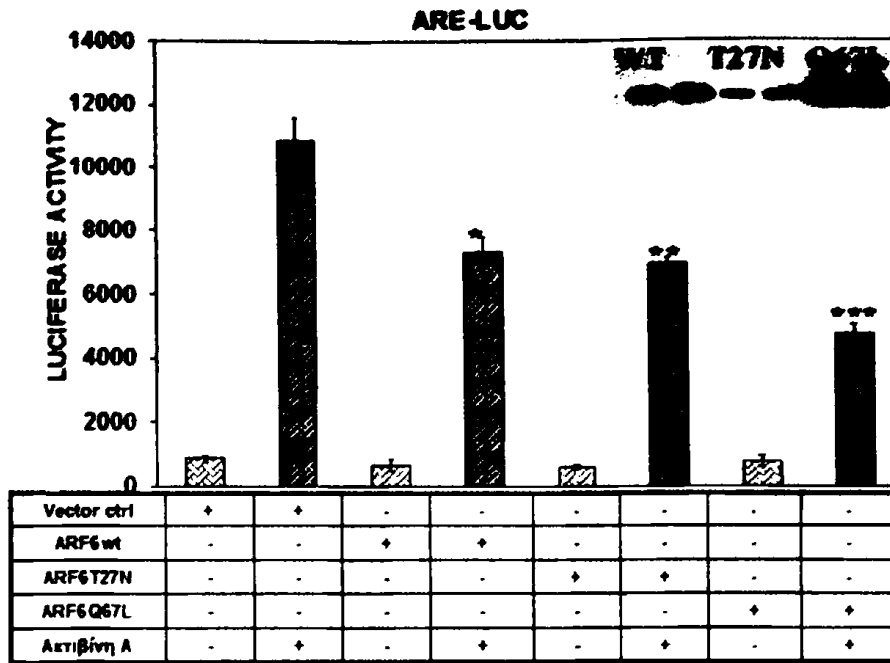
Εικόνα 3.26. Η ARF6Q67L αναστέλλει την από τον TGFβ1 επαγόμενη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή (CAGA)₁₂-LUC σε καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα (HeLa). HeLa κύτταρα διαμολύνθηκαν με το cDNA της ARF6Q67L ή τον πλασμιδιακό φορέα-μάρτυρα και το γονίδιο αναφοράς (CAGA)₁₂-LUC. Μετά από 24 ώρες, τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 1% ορό για επιπλέον 8 ώρες. Στην συνέχεια έγινε επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 (2ng/ml) και ακολούθησε επώαση για επιπλέον 16 ώρες. Οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) από τρία πειράματα. Η ARF6Q67L προκάλεσε μείωση ~58% της SMAD3-εξαρτώμενης μεταγραφής συγκριτικά με τον πλασμιδιακό φορέα-μάρτυρα και η στατιστική ανάλυση T-test έδωσε $p=0,0001<0,05$. Η έκφραση της ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.

Τέλος, η μόνιμα ενεργή ARF6Q67L αναστέλλει, σε ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE, την επαγωγή από τον TGFβ των γονιδίων αναφοράς p21-LUC και p3TP-LUX, επίσης εξαρτημένων από την ενεργοποίηση της SMAD3 (εικόνα 3.27).

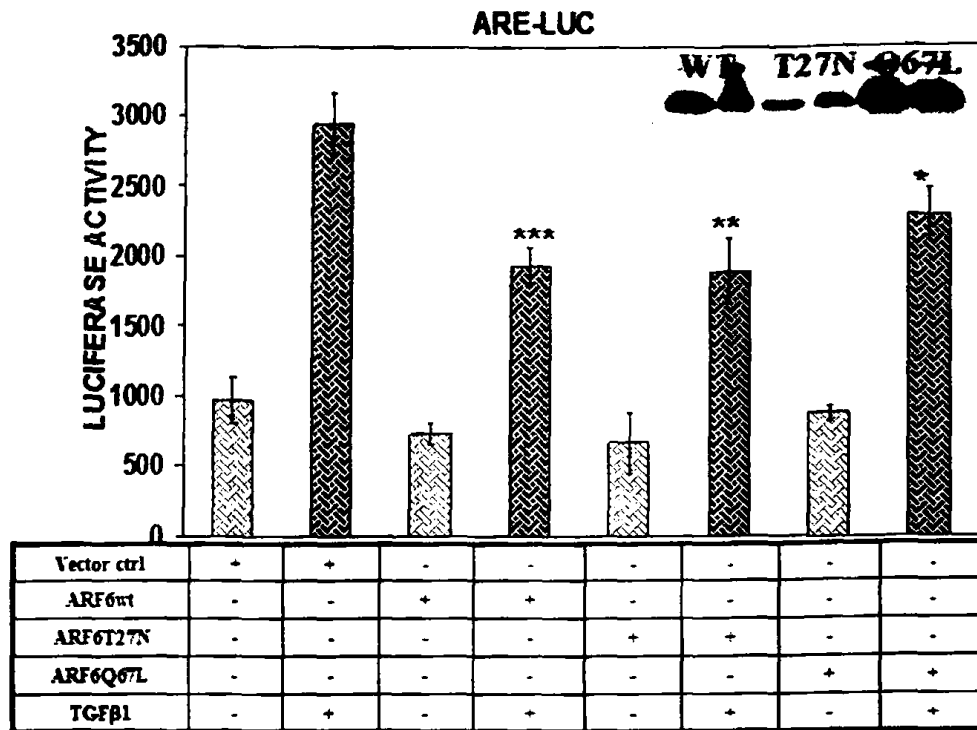


Εικόνα 3.27. Η ARF6Q67L αναστέλλει την από τον TGFβ1 επαγόμενη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή (p21-LUC και p3TP-LUX) σε ενδοθηλιακά κύτταρα (BBCE). BBCE κύτταρα διαμολύνθηκαν με το cDNA της ARF6Q67L ή τον πλασμιδιακό φορέα-μάρτυρα και τα γονίδια αναφοράς p21-LUC και p3TP-LUX (το οποίο περιέχει ένα τμήμα του γονιδίου του αναστολέα-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και τρεις διαδοχικές επαναλήψεις που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης AP-1 πάνω στο γονίδιο της κολλαγενάσης 1). Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 8 ώρες. Στην συνέχεια έγινε επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 (2 ng/ml) και ακολούθησε επώαση για επιπλέον 16 ώρες. Οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) τριών πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (μεταξύ των επαγόμενων με TGFβ1 δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6Q67L σε καθεμία από τις παραπάνω περιπτώσεις και επισημαίνονται στα γραφήματα με αστερίσκο) πραγματοποιήθηκε με T-test ($p=0,0001 < 0,05$). Η έκφραση της ARF6Q67L-HA εικονίζεται στο πάνω τμήμα των διαγραμμάτων.

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση των ARF6 πρωτεϊνών στη SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή τόσο παρουσία TGFβ όσο και παρουσία Ακτιβίνης Α. Στο σύστημα αναφοράς ARE-LUC (παρουσία του μεταγραφικού παράγοντα FAST) που ανταποκρίνεται καλύτερα στην Ακτιβίνη Α παρατηρήθηκε αναστολή της μεταγραφής από τις ARF6 πρωτεΐνες με εντονότερη (μείωση 56% συγκριτικά με το φορέα-μάρτυρα) την προκληθείσα από την ARF6Q67L, η οποία εμφανίζει και την ισχυρότερη έκφραση στην αποτύπωση κατά Western. Αναφορικά με την φυσικού τύπου ARF6WT και τη μόνιμα ανενεργή μορφή ARF6T27N, η παρατηρηθείσα μείωση είναι 32% και 36%, αντίστοιχα (Εικόνα 3.28). Αντιστοίχως, η επαγωγή του παραπάνω συστήματος από TGFβ έδειξε μικρή ανασταλτική δράση των ARF6 πρωτεϊνών στην μεταγραφική ενεργοποίησή του (ARF6WT: 34%, ARF6T27N: 35%, ARF6Q67L: 22%) (Εικόνα 3.29).

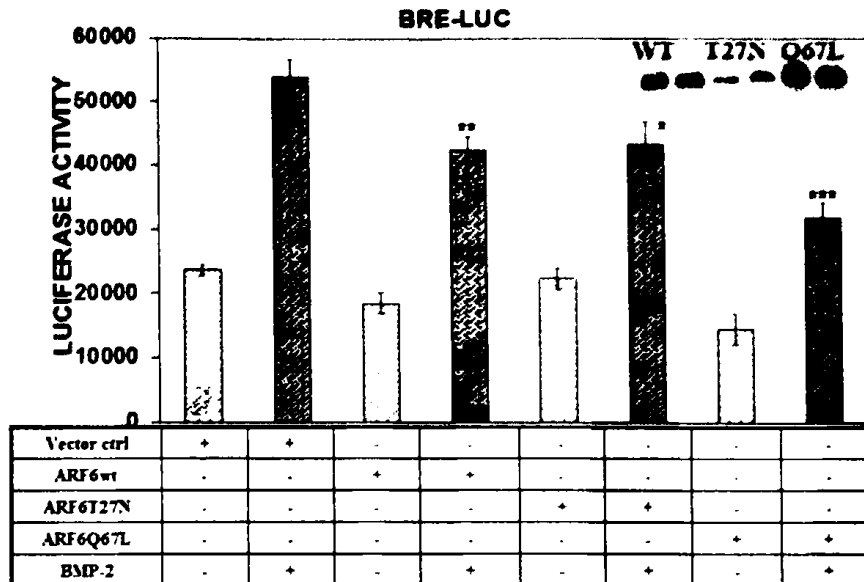


Εικόνα 3.28. Η ARF6 και οι μεταλλαγμένες της μορφές αναστέλλουν την από την ακτιβίνη A επαγόμενη SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή ARE-LUC/FAST σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν την ARF6 (WT-φυσικού τύπου, Q67L-μόνιμα ενεργή μορφή, και T27N-μόνιμα ανενεργή μορφή) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση Ακτιβίνης A (50 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς ARE-LUC και το μεταγραφικό παράγοντα FAST. Οι σχετικές μονάδες φωτός (Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (μεταξύ των επαγόμενων με ακτιβίνη A δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6WT ή την ARF6T27N ή την ARF6Q67L επισημαίνονται στο γράφημα με έναν ή δυο ή τρεις αστερίσκους, ανάλογα με την στατιστική σημαντικότητα) πραγματοποιήθηκε με T-test ($p^{***}=0,0001<0,05$, $p^{**}=0,0005<0,05$ και $p^{*}=0,0012<0,05$). Η έκφραση των ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.



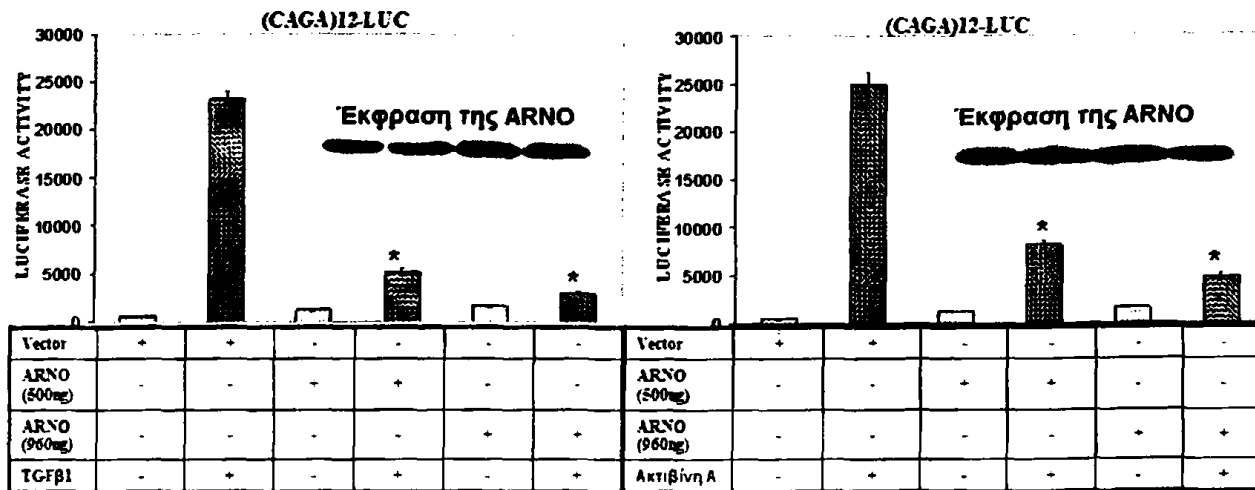
Εικόνα 3.29. Η ARF6 και οι μεταλλαγμένες της μορφές αναστέλλουν την από τον TGFβ1 επαγόμενη SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή ARE-LUC/FAST σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν την ARF6 (WT-φυσικού τύπου, Q67L- μόνιμα ενεργή μορφή, και T27N-μόνιμα ανενεργή μορφή) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση TGFβ1 (2 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς ARE-LUC και το μεταγραφικό παράγοντα FAST. Οι σχετικές μονάδες φωτός (Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (μεταξύ των επαγόμενων με TGFβ1 δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6WT ή την ARF6T27N ή την ARF6Q67L επισημαίνονται στο γράφημα με αστερίσκους, ανάλογα με την στατιστική σημαντικότητα) πραγματοποιήθηκε με T-test ($p^{***}=0,0016<0,05$, $p^{**}=0,0031<0,05$, $p^*=0,0116<0,05$). Η έκφραση των ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.

Επιπρόσθετα, πραγματοποιήθηκε μελέτη της επίδρασης των ARF6 πρωτεϊνών στην BMP σηματοδότηση. Ως γνωστό, οι ενεργοποιημένοι BMP υποδοχείς μετάγουν τις δράσεις τους μέσω μιας άλλης ομάδας SMAD πρωτεϊνών των SMAD1/5/8, αλλά βέβαια χρειάζονται την SMAD4 για ολιγομερισμό και μεταφορά στον πυρήνα. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η επίδραση των ARF6 πρωτεϊνών στην SMAD1-εξαρτώμενη μεταγραφή χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς BRE-LUC (Εικόνα 3.30). Παρατηρήθηκε μικρή ανασταλτική δράση από τις ARF6WT (21%) και ARF6T27N (20%), ενώ διπλάσια είναι η αναστολή που προκλήθηκε από την ARF6Q67L (40%).

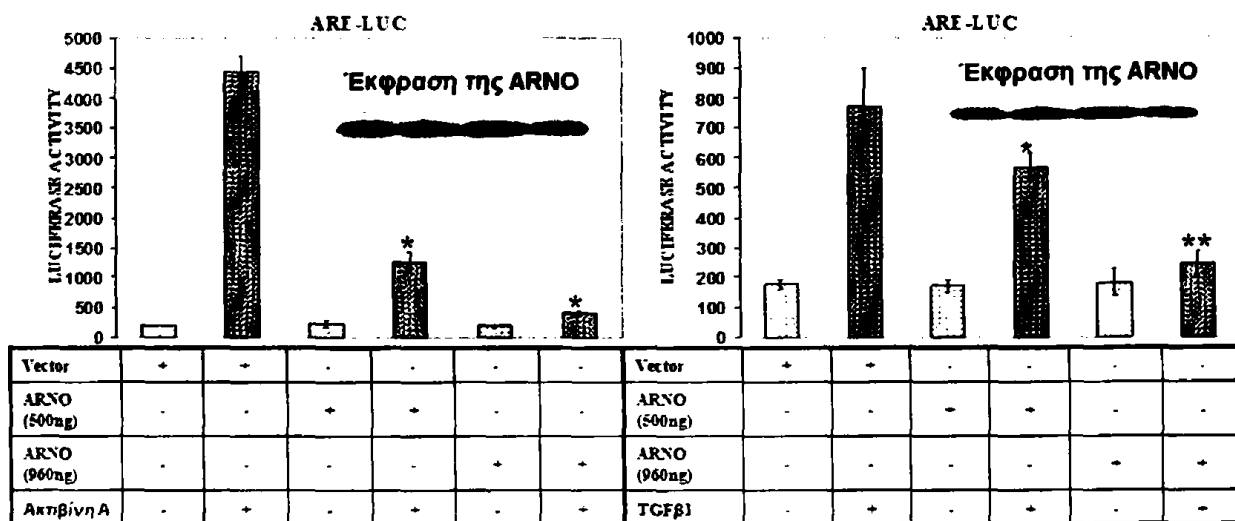


Εικόνα 3.30. Η ARF6 και οι μεταλλαγμένες της μορφές αναστέλλουν την από τον BMP-2 επαγόμενη μεταγραφή BRE-LUC σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν την ARF6 (WT-φυσικού τύπου, Q67L-μόνιμα ενεργή μορφή, και T27N-μόνιμα ανενεργή μορφή) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD1-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση BMP-2 (100 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς BRE-LUC. Οι σχετικές μονάδες φωτός (Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων (μεταξύ των επαγόμενων με BMP-2 δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARF6WT ή την ARF6T27N ή την ARF6Q67L επισημαίνονται στο γράφημα με αστερίσκους, ανάλογα με την στατιστική σημαντικότητα) πραγματοποιήθηκε με T-test ($p^*=0.0114<0.05$, $p^{**}=0.0035<0.05$ και $p^{***}=0.0003<0.05$). Η έκφραση των ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.

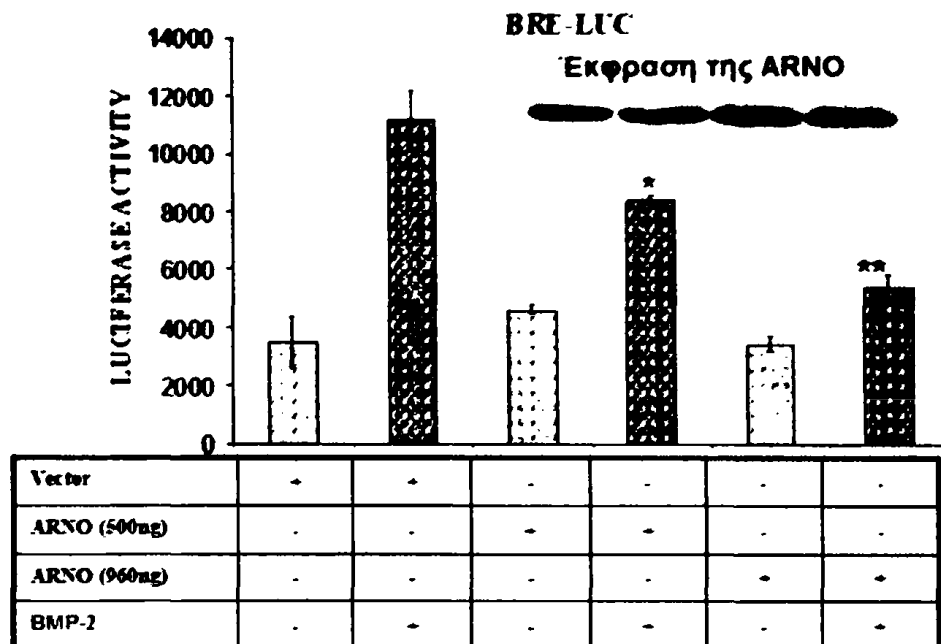
Προκειμένου να μελετηθεί ο ρόλος της ενεργής ARF6 στη SMAD-εξαρτώμενη μεταγραφή σε πιο φυσιολογικές συνθήκες έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης ARNO σε κύτταρα 293, τόσο σε χαμηλές (500 ng) όσο και σε υψηλές (960 ng) συγκεντρώσεις της. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή η οποία μελετήθηκε με το γονίδιο αναφοράς (CAGA)₁₂-LUC, παρουσία επαγωγέα TGFβ, η πρωτεΐνη ARNO (τα 500 ng και τα 960 ng) προκάλεσε μείωση της μεταγραφής κατά 78% και 87%, αντίστοιχα, ενώ όταν πραγματοποιήθηκε επαγωγή με ακτιβίνη A, παρατηρήθηκε μείωση 68% και 81% (Εικόνα 3.31). Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της ARNO (500 ng και 960 ng) στην SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή όπου παρουσία επαγωγέα ακτιβίνης A, σημειώθηκε πολύ ισχυρή μείωση, 72% και 91%, αντίστοιχα (Εικόνα 3.32). Μικρότερη ήταν η ανασταλτική δράση της ARNO (500 ng και 960 ng), 26% και 68%, αντίστοιχα, παρουσία προσδέματος TGFβ (Εικόνα 3.32). Τέλος, μελέτη της επίδρασης της ARNO (500 ng και 960 ng) στη SMAD1-εξαρτώμενη μεταγραφή, έδειξε λιγότερο ισχυρή μείωση (25% και 52%, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.33). Συμπερασματικά, οι παρέμβασεις στην ενεργότητα της ARF6 φαίνεται να μειώνουν την SMAD1-, SMAD2- και SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή σε διαφορετικό βαθμό η καθεμία.



Εικόνα 3.31. Ο ARF6 GEF ARNO αναστέλλει την από τους TGFβ1 ή ακτιβίνη A επαγόμενη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή (CAGA)12-LUC σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα ή τον ARNO (500ng και 960ng, αντίστοιχα) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση TGFβ1 (2 ng/ml) ή Ακτιβίνη Α (50 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς (CAGA)12-LUC. Οι σχετικές μονάδες φωτός (SBE Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα ολικά ποσά πρωτεΐνης επειδή η ARNO πρωτεΐνη προκαλεί μεγάλη αύξηση της έκφρασης της β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (μεταξύ των επαγόμενων με TGFβ1 ή ακτιβίνη Α, για κάθε περίπτωση, δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARNO, επισημαίνονται στα γραφήματα με αστερίσκο) πραγματοποιήθηκε με T-test, $p^{**} < 0.0001 < 0.05$. Η έκφραση του ARNO απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα MYC.



Εικόνα 3.32. Ο ARF6 GEF ARNO αναστέλλει την από τους ακτιβίνη Α ή TGFβ επαγόμενη SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή, ARE-LUC/FAST. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα ή την ARNO και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD2-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση Ακτιβίνη Α (50 ng/mg) ή TGFβ1 (2 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς ARE-LUC και τον μεταγραφικό παράγοντα FAST. Οι σχετικές μονάδες φωτός (SBE Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα ολικά ποσά πρωτεΐνης επειδή η ARNO πρωτεΐνη προκαλεί μεγάλη αύξηση της έκφρασης της β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (μεταξύ των επαγόμενων με ακτιβίνη Α ή TGFβ1, για κάθε περίπτωση, δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARNO, επισημαίνονται στα γραφήματα με αστερίσκους) πραγματοποιήθηκε με T-test και στην περίπτωση επαγωγής με ακτιβίνη Α είναι $p^{**} < 0.0001 < 0.05$, ενώ στην περίπτωση επαγωγής με TGFβ1 για $p^{**} = 0.0015 < 0.05$ ενώ $p^* = 0.0412 > 0.05$. Η έκφραση της ARNO απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα MYC.

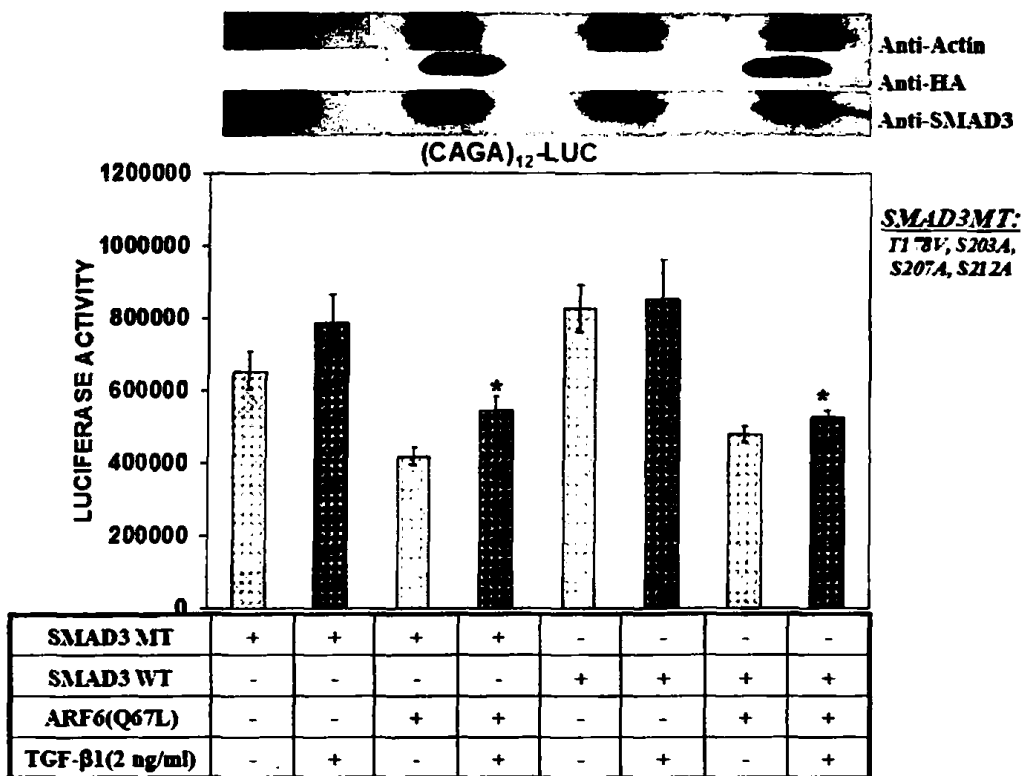


Εικόνα 3.33. Ο ARF6 GEF ARNO αναστέλλει την από τον BMP-2 επαγόμενη SMAD1-εξαρτώμενη μεταγραφή, BRE-LUC, σε 293 κύτταρα. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα ή τον ARNO και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD1-εξαρτώμενη μεταγραφή μετά από χορήγηση BMP-2 (100 ng/ml) για 16 ώρες, σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%), χρησιμοποιώντας το γονίδιο αναφοράς BRE-LUC. Οι σχετικές μονάδες φωτός (SBE Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα ολικά ποσά πρωτεΐνης επειδή η ARNO πρωτεΐνη προκαλεί αύξηση της έκφρασης της β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (μεταξύ των επαγόμενων με BMP-2, δειγμάτων που εκφράζουν τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και εκείνων που εκφράζουν την ARNO, επισημαίνονται στο γράφημα με αστερίσκους) πραγματοποιήθηκε με T-test, $p^*=0,0063<0,05$ και $p^{**}=0,0005<0,05$. Η έκφραση της ARNO απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα MYC.

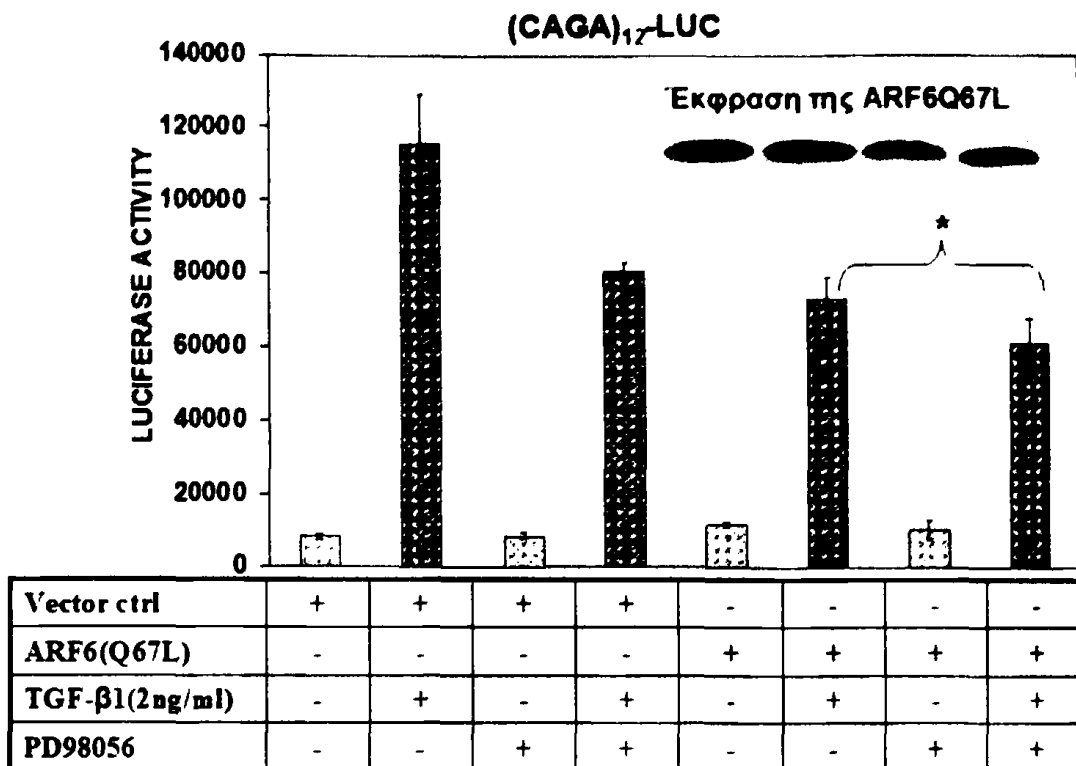
3.8 Η αναστολή της ARF6Q67L στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK

Η GTP μορφή της ARF6 οδηγεί σε ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK (Tague et al., 2004), οι οποίες φωσφορυλιώνουν τις SMAD2/3 πρωτεΐνες στην συνδετική περιοχή τους (linker region). Επειδή η φωσφορυλίωση αυτή έχει αναφερθεί ότι μπορεί να αναστείλει την μετακίνηση των SMAD πρωτεϊνών στον πυρήνα και φυσικά την μεταγραφική ενεργοποίηση (Kretzschmar et al., 1999), έπρεπε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι η παρατηρηθείσα αναστολή της ARF6Q67L στην μεταγραφική ενεργοποίηση από τον TGFβ ή την ακτιβίνη A προκλήθηκε έμμεσα διαμέσου της ενεργοποίησης των ERK1/2 από αυτή. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε δύο προσεγγίσεις i) την μεταλλαγμένη μορφή της SMAD3, την SMAD3MT, η οποία φέρει τις μεταλλάξεις T178V, S203A, S207A και S212A, οι οποίες δεν επιτρέπουν την φωσφορυλίωσή της από τις ERK1/2 MAPK (Kretzschmar et al., 1999) και ii) τον αναστολέα PD98056 (10 μM), ο οποίος αναστέλλει την ανοδική των ERK1/2 κίνηση, MEK1/2. Η πρώτη προσέγγιση έδειξε ότι η ARF6Q67L προκάλεσε την ίδια αναστολή στην μεταγραφική ενεργοποίηση από τον TGFβ, είτε παρουσία της SMAD3WT, είτε παρουσία SMAD3MT (Εικόνα 3.34). Η αυξημένη ενεργοποίηση της μεταγραφικής ενεργότητας απουσία προσδέματος TGFβ οφείλεται στην υπερέκφραση των SMAD3 πρωτεϊνών τόσο του φυσικού τύπου όσο και της μεταλλαγμένης της μορφής. Επίσης, η παρουσία του αναστολέα PD98056 δεν

φαίνεται να έχει καμία επίδραση στην από την ARF6Q67L προκληθείσα αναστολή της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον TGFβ (Εικόνα 3.35).



Εικόνα 3.34. Η αναστολή της ARF6Q67L στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK. BBCE διαμολύνθηκαν με cDNA της ARF6Q67L ή του πλασμιδιακού φορέα μάρτυρα και την φυσικού τύπου SMAD3WT ή την μεταλλαγμένη SMAD3MT (κατασκευή που φέρει τις σημειακές μεταλλάξεις T178V, S203A, S207A, S212A, οι οποίες εμποδίζουν τη φωσφορυλίωσή της από τις κινάσες ERK και JNK) και μελετήθηκε η επίδρασή τους στη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή. Οι σχετικές μονάδες φωτός (Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με T-τεστ (μεταξύ των επαγόμενων με TGFβ δειγμάτων που συνεκφράζουν τις ARF6Q67L και SMAD3MT ή SMAD3WT, επισημαίνονται στο γράφημα με έναν αστερίσκο) έδειξε ότι τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά ($p=0,4963>0,05$). Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών ARF6Q67L-HA και SMAD3 στις περιπτώσεις επαγωγής ελέγχθηκαν με αποτυπώσεις κατά Western και βρέθηκαν να είναι όμοια. Η ισοφόρτιση των δειγμάτων επιβεβαιώθηκε από τα ποσά της ακτίνης.



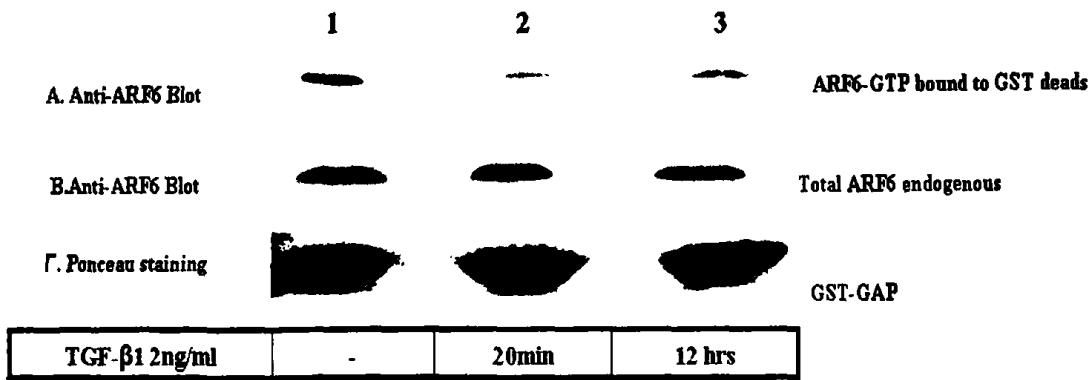
Εικόνα 3.35. Η παρουσία του αναστολέα PD98056 δεν έχει επίδραση στην από την ARF6Q67L αναστολή της SMAD3-εξαρτώμενης μεταγραφής. 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με cDNA που εκφράζουν την συνεχώς ενεργή μορφή ARF6Q67L ή τον πλασμιδιακό φορέα μάρτυρα και μελετήθηκε η επίδρασή τους στην SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή [(CAGA)₁₂-LUC], χωρίς ή με την παρουσία του αναστολέα PD98056 για 1 ώρα, μετά από χορήγηση TGFβ (2 ng/ml), σε συνθήκες στέρησης ορού (0.2%). Οι σχετικές μονάδες φωτός (SBE Luciferase activity) μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι μέσες τιμές ± SEM (Standard Error of the Mean) εις τριπλούν πειραμάτων. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων με T-τεστ (μεταξύ των επαγόμενων με TGFβ δειγμάτων που εκφράζουν την ARF6Q67L, τόσο απουσία όσο και παρουσία του αναστολέα, επισημαίνονται στο γράφημα με έναν αστερίσκο) έδειξε ότι τα αποτελέσματα δεν είναι στατιστικά σημαντικά ($p=0,0562>0,05$). Η έκφραση των ARF6 απεικονίζεται στην αποτύπωση κατά Western με αντίσωμα HA.

3.9 Ο TGFβ απενεργοποιεί (την μετατατρέπει στην GDP μορφή) την ARF6

Επειδή από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η ενεργοποίηση της ARF6 έχει αρνητική επίδραση στην μεταγραφική ικανότητα του TGFβ ή της ακτιβίνης, θελήσαμε να διερευνήσουμε μήπως ο TGFβ απενεργοποιεί την ARF6, την μετατρέπει στην GDP μορφή, μεγιστοποιώντας την μεταγραφική ενεργοποίηση την οποία προκαλεί. Προς τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε την GAP της ARF6 (σημασμένη με GST, GST-GAP), η οποία συνδέεται μόνο με την ARF6-GTP και είναι δείκτης της παρουσίας της. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.36, απουσία TGFβ, σημαντικό μέρος της ARF6 είναι στη GTP μορφή (καταβυθίζεται από την GST-GAP), ενώ 20 λεπτά μετά από χορήγηση TGFβ τα ποσά της ARF6-GTP μειώνονται δραματικά. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι ο TGFβ ρυθμίζει τον κύκλο ενεργοποίησης/απενεργοποίησης (GTP/GDP) της ARF6.

Ποσοτική ανάλυση της πυκνότητας των ζωνών (Εικόνα 3.36) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Quantity One έδειξε ότι η ενεργή μορφή της ARF6 μειώθηκε κατά 78% στη διαδρομή 2 και κατά 64% στη διαδρομή 3, στις οποίες έγινε επαγωγή των κυττάρων με TGFβ1 για 20 min και 12 hr, αντίστοιχα,

συγκριτικά με τα επίπεδα της ενεργού μορφής της ARF6 που εμφανίζονται απουσία επαγωγής (διαδρομή 1).



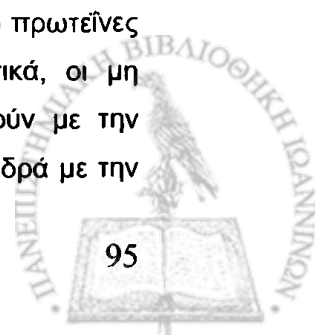
Εικόνα 3.36. Ο TGFβ απενεργοποιεί (την μετατρέπει στην GDP μορφή) την ARF6. BBCE κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού 0.2% NCS για 8 ώρες και στη συνέχεια επήχθησαν ή όχι με TGF-β1 (2 ng/ml) για 20 λεπτά ή 12 ώρες. Τα υπερκείμενα επώαστηκαν με την πρωτεΐνη GST-GAP (πρωτεΐνη ενεργοποιούσα τη δραστικότητα GTPάσης) παρουσία 0.1% BSA, για 30 λεπτά, στους 4°C. Στο παραπάνω μίγμα, προστέθηκαν τα σφαιρίδια γλουταθειόνης (τα οποία είχαν προεπωαστεί με διάλυμα λύσης περιεκτικότητας 20 mg/ml σε BSA) και η επώαση συνεχίστηκε για 1 ώρα περαιτέρω. Η παρουσία της ενδογενούς ARF6 στα σφαιρίδια ανιχνεύτηκε με ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας το αντίσωμα αντι-ARF6. Με τη χρώση Ponceau φαίνεται ότι προσδέθηκε στα σφαιρίδια γλουταθειόνης ισόποσα η πρωτεΐνη σύντηξης GST-GAP.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η υπεροικογένεια του TGFβ περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο σε πλειάδα λειτουργιών σε κυτταρικό, ιστικό και οργανισμικό επίπεδο. Σημαντικό συστατικό της μεταγωγής του σήματος όλων των μελών της υπεροικογένειας αυτής αποτελεί η κοινή SMAD4 (co-SMAD), η οποία ολιγομερίζεται με τις SMAD πρωτεΐνες οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς (R-SMADs). Ακολούθως, τα ολιγομερή μεταφέρονται στον πυρήνα, όπου ασκούν μεταγραφική ρύθμιση. Προκαταρκτικά πειράματά μας, σε συνεργασία με τον Δρ. Philippe Chavrier, έδειξαν ότι η SMAD4 αλληλεπιδρά με την ARF6 στο σύστημα δύο υβριδίων σε ζυμομύκητα. Η ARF6 GTPάση, ανήκει στην οικογένεια των Ras GTPασών και αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της ενδοσωματικής δυναμικής. Έτσι, η άμεση αλληλεπίδραση της SMAD4 με την ARF6 θεωρήθηκε σημαντική διασυνδέοντας πιθανά το μηχανισμό της ενδοσωματικής δυναμικής με ένα κείμενο συστατικό της μεταγωγής του σήματος της οικογένειας του TGFβ. Άλλωστε, η καθοδική μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και την ακτιβίνη A επηρεάζεται από την πορεία ενδοκυττάρωσης και ανακύκλωσης των υποδοχέων τους, η οποία είναι άρρηκτα συνυφασμένη με την γενικότερη ενδοσωματική δυναμική του κυττάρου.

Έτσι, η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε βιοχημικά με πειράματα καταβύθισης (pull-down assays) από τα οποία προέκυψε ότι μεταξύ των τριών μορφών της ARF6 (φυσικού τύπου WT, μόνιμα ενεργής Q67L και μόνιμα ανενεργής T27N), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, μόνο η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6 αλληλεπιδρά με την SMAD4. Επίσης, πραγματοποιήθηκε περαιτέρω διερεύνηση της παραπάνω αλληλεπίδρασης, με πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης σε 293 κύτταρα από τα οποία επιβεβαιώθηκε για ακόμη μια φορά η αλληλεπίδραση μεταξύ SMAD4-ARF6Q67L. Επιπροσθέτως, με πειράματα καταβύθισης σε 293 κύτταρα, δείχθηκε ότι η αλληλεπίδραση ARF6Q67L-SMAD4 είναι ειδική: δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της SMAD4 με καμιά από τις ενεργές μορφές των ARF1 (ARF1Q71L) και ARF5 (ARF5Q71L) εκπροσώπων των τάξης I και II, των ARF GTPασών αντίστοιχα.

Εκτός από την SMAD4, η οποία αποτελεί τον κοινό διαμεσολαβητή της σηματοδότησης της υπεροικογένειας του TGFβ, θεωρήσαμε απαραίτητο να διερευνηθεί η πιθανή φυσική σύνδεση της ARF6 με τις SMAD2/SMAD3 πρωτεΐνες, οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου I των TGFβ/Ακτιβίνης A προκειμένου να ενεργοποιηθούν (R-SMADs). Πράγματι, πειράματα καταβύθισης επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση της ARF6Q67L με τις SMAD2 και SMAD3. Περαιτέρω πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης της ARF6Q67L, με καθεμία από τις SMAD2/3/4, έδειξαν ότι απουσία TGFβ, οι SMAD2/3/4 πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίζονται από την ARF6Q67L, ενώ παρουσία TGFβ, μόνο η SMAD3 ανοσοκατακρημνίζεται. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την χρήση μόνιμα ενεργοποιημένων SMAD2(EDME) και SMAD3(EDVE), όπου οι καρβοξυτελικές σερίνες που φωσφορυλιώνονται από τον υποδοχέα –SSXS- μεταλλάχθηκαν σε γλουταμινικά και ασπαρτικό, ως –EDME- και –EDVE-. Πράγματι, η ARF6Q67L ανοσοκατακρήμνισε με καλή απόδοση την SMAD3(EDVE), ενώ μόνο οριακά την SMAD2(EDME). Εντύπωση προκαλεί η διαφορετική φυσική σύνδεση των SMAD2-P και SMAD3-P με την ARF6Q67L δεδομένου ότι πρόκειται για δύο πρωτεΐνες των οποίων το ποσοστό αμινοξικής ταυτότητάς τους αγγίζει το 92%. Συμπερασματικά, οι μη φωσφορυλιωμένες SMAD2, SMAD3 και SMAD4 (απουσία προσδέματος) αλληλεπιδρούν με την ARF6Q67L, ενώ από τις φωσφορυλιωμένες SMAD πρωτεΐνες μόνο η SMAD3-P αλληλεπιδρά με την



ARF6Q67L. Η SMAD4 δεν συνδέεται με την ARF6Q67L παρουσία προσδέματος, παρότι δεν φωσφορυλιώνεται, πιθανά λόγω ανταγωνιστικού ολιγομερισμού με τη φωσφορυλιωμένη SMAD2-P, η οποία δεν δεσμεύεται από την ARF6Q67L.

Η φυσική σύνδεση της ARF6Q67L με SMAD4 είναι άμεση καθώς ανιχνεύθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων. Η φυσική σύνδεση της ARF6Q67L με τις SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες πιθανά να είναι και αυτή άμεση, καθώς ανιχνεύεται και με καταβύθιση υπερεκφρασμένων SMAD2/3 και ARF6 πρωτεϊνών, όπου η συγκέντρωση της πιθανής ενδογενούς συνδετικής πρωτεΐνης (πρωτεΐνη X) θα ήταν ανεπαρκής για να επιτρέψει την δημιουργία ικανοποιητικής συγκέντρωσης συμπλέγματος (SMAD2/3-πρωτεΐνης X-ARF6Q67L) με τις υπερεκφρασμένες SMAD2/3 και ARF6Q67L πρωτεΐνες.

Με στόχο την αναλυτικότερη διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων πραγματοποιήθηκαν πειράματα χαρτογράφησης των δομικών περιοχών των SMAD2/3/4 οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με την ARF6Q67L. Με καταβύθιση εντοπίστηκε η περιοχή της SMAD4 πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την φυσική σύνδεση με την μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6. Πρόκειται για τα 32-καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD4 πρωτεΐνης, τα οποία είναι επαρκή για την διαμεσολάβηση της σύνδεσης με την ARF6. Επιπλέον, απάλειψη των 43-καρβοξυτελικών αμινοξέων είχε ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της σύνδεσης με την ARF6Q67L (De Bosscher et al., 2004; Maurice et al., 2001). Παραπέρα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης ARF6Q67L με κατασκευές των SMAD2 και SMAD3 απέδειξαν ότι η ARF6Q67L συνδέεται με τα τελευταία 40 καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD2, όπως και στην περίπτωση της SMAD4, ενώ η περιοχή σύνδεσης με την SMAD3 βρίσκεται ανοδικά των τελευταίων 40 καρβοξυτελικών αμινοξέων. Το γεγονός αυτό είναι αξιοπερίεργο, αφού τα 40 καρβοξυτελικά αμινοξέα εμφανίζουν ομολογία 95% μεταξύ SMAD2-SMAD3, ενώ μεταξύ SMAD2-SMAD4 η ομολογία είναι μόλις 42% (βλέπε Παράρτημα). Βέβαια η σύνδεση της ARF6Q67L με διαφορετικές περιοχές των SMAD2 και SMAD3 μπορεί να εξηγήσει την παρατήρηση ότι η ARF6Q67L συνδέεται κυρίως με τη SMAD3-P, ενώ η σύνδεση με τη SMAD2-P είναι πολύ ασθενέστερη.

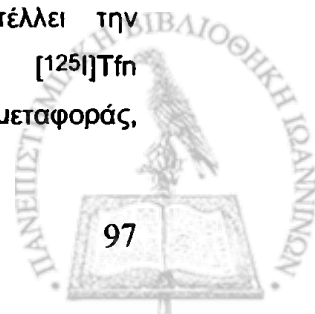
Επειδή η ARF6Q67L συνδέεται φυσικά με τις SMAD2 και SMAD3 απουσία προσδέματος, ήταν επιβεβλημένο να ελεγχθεί η δυνατότητα η σύνδεση αυτή να μειώνει, λόγω ανταγωνιστικής δέσμευσης, τη διαθεσιμότητα των SMAD2 και SMAD3 προς φωσφορυλίωση από τους ενεργοποιημένους από το πρόσδεμα, τύπου I υποδοχείς. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της υπερεκφρασμένης ARF6 (φυσικού τύπου WT, μόνιμα ενεργής Q67L και μόνιμα ανενεργής T27N) στη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από τον TGFβ και την Ακτιβίνη Α. Παρουσία TGFβ, τόσο σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, όσο και σε εμβρυονικά νεφρικά κύτταρα 293, δείχθηκε ότι η ARF6 (και οι τρεις μορφές της) προκαλεί δραματική μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της SMAD2 σε ποσοστό άνω του 80%. Αναφορικά με την SMAD3, η προκαλούμενη από την ARF6 (και από τις τρεις μορφές της) μείωση της από τον TGFβ προκαλούμενης φωσφορυλίωσής της ήταν επίσης σημαντική, περίπου 40%. Αντίθετα, η ARF6 (και οι τρεις μορφές της) δεν επηρέασε καθόλου την φωσφορυλίωση των SMAD2/SMAD3 από την Ακτιβίνη Α, σε HUVEC και 293 κύτταρα. Η παντελής έλλειψη αρνητικής επίδρασης της ARF6 στην φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από την Ακτιβίνη Α υποδεικνύει ότι η σύνδεση της ARF6 με αυτές τις SMAD δεν επηρεάζει την διαθεσιμότητα τους, λόγω ανταγωνιστικής δέσμευσης, προς φωσφορυλίωση από τους ενεργοποιημένους τύπου I υποδοχείς.



Αξίζει να σημειωθεί ότι η ARF6 (και οι τρεις μορφές) δεν επηρέασαν τη σταθερότητα των SMAD πρωτεϊνών, αφού δεν προκλήθηκε καμία μείωση των ολικών επιπέδων έκφρασής τους.

Τότε πως εξηγείται η δραματικά αρνητική επίδραση της ARF6 στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ, ενώ η φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από την Ακτιβίνη Α έμεινε ανεπηρέαστη; Επίσης, πως εξηγείται το γεγονός ότι και οι τρεις χρησιμοποιηθείσες μορφές της ARF6 (φυσικού τύπου WT, μόνιμα ενεργής Q67L και μόνιμα ανενεργής T27N) ανέστειλαν τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ; Θα περίμενε κανείς ότι η μόνιμα ενεργή ARF6Q67L θα είχε τελείως αντίθετα αποτελέσματα από τη μόνιμα ανενεργή μορφή ARF6T27N. Επιπλέον, μόνο η ARF6Q67L συνδέεται με την SMAD4, ενώ η ARF6WT και η ARF6T27N δεν συνδέονται. Το ίδιο είναι πολύ πιθανό να ισχύει και για τις SMAD2/3, αν και αυτό δεν ελέγχθηκε.

Η απάντηση στα ερωτήματα αυτά θεωρούμε ότι οφείλεται στη δραστικότητα της ARF6 στη κυκλοφορία μεμβρανών/υποδοχέων. Όπως αναπτύχθηκε στην εισαγωγή, πράγματι, η ARF6 ρυθμίζει την κλαθρίνο-εξαρτώμενη και την κλαθρίνο-ανεξάρτητη ενδοκυττάρωση. Η δραστικότητα αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση υποδοχέων διαφόρων ορμονών ή αυξητικών παραγόντων επηρεάζοντας την καθοδική μεταγωγή του σήματός τους. Αυτή ακριβώς η δραστικότητα της ARF6 επηρεάζεται από τον κύκλο της GTP-GDP μετατροπής της απαιτώντας συνεχείς κύκλους μετατροπής του GTP σε GDP και το αντίθετο. Πράγματι, η ARF6-GTP είναι η κύρια μορφή στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων διευκολύνοντας, διαμέσου των αλληλεπιδράσεών της, την κλαθρίνο-εξαρτώμενη καθώς επίσης και κλαθρίνο-ανεξάρτητη εσωτερικευση των προσδεμάτων/υποδοχέων. Η υδρόλυση της ARF6-GTP από συγκεκριμένες GAP απαιτείται για την περαιτέρω κυκλοφορία κατά μήκος κάθε οδού, ενώ η ενεργοποίηση της ARF6 μέσω συγκεκριμένων GEF προάγει την ανακύκλωση και την επακόλουθη σύντηξη ενδοσωματικής προέλευσης μεμβρανών με την κυτταρική μεμβράνη (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Ετσι, 'κλειδωμα' της ARF6, είτε στη GTP (Q67L), είτε στη GDP (T27N) μορφή, προκαλεί αναστολή της δραστικότητας της ARF6 αναφορικά με τον κύκλο ενδοκυττάρωσης/ανακύκλωσης υποδοχέων, οι οποίοι ακολουθούν την κλαθρίνο-εξαρτώμενη πορεία. Πράγματι, η έκφραση της μόνιμα ενεργής ARF6Q67L (κλειδωμένης στην GTP μορφή) και της μόνιμα ανενεργής ARF6T27N (κλειδωμένης στην GDP μορφή) προκάλεσε μείωση της εσωτερικοποίησης του β2-αδρενεργικού υποδοχέα (Clainig et al., 2001), όπως βέβαια και η αποσιώπηση του γονιδίου της ARF6 (Clainig, 2004). Αντίθετα, η έκφραση της πρωτεΐνης ARNO (ενός από τους GEF παράγοντες της ARF6), ενίσχυσε την εσωτερικοποίηση του β2-αδρενεργικού υποδοχέα (Clainig et al., 2001). Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και για πρωτεΐνες οι οποίες ακολουθούν την πορεία της κλαθρίνο-ανεξάρτητης ενδοκυττάρωσης, όπου η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6 (ARF6Q67L) εμποδίζει την ενδοκυττάρωση, ενώ η μόνιμα ανενεργή μορφή της (ARF6T27N) εμποδίζει την ανακύκλωση τους από τα ενδοσώματα ανακύκλωσης προς την κυτταρική μεμβράνη (Brown et al., 2001; Radhakrishna and Donaldson, 1997). Τα παραπάνω σαφώς εξηγούν το παράδοξο ότι η ARF6 παίζει μεν θετικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση μεμβρανών/υποδοχέων, αλλά η μόνιμα ενεργή ARF6Q67L και η μόνιμα ανενεργή ARF6T27N έχουν την ίδια (αρνητική) επίδραση στην διαδικασία αυτή. Ακόμη πιο παράδοξο είναι το γεγονός ότι και η υπερέκφραση της φυσικού τύπου ARF6 αναστέλλει την ενδοκυττάρωση/ανακύκλωση υποδοχέων. Πράγματι, ο ρυθμός απελευθέρωσης [125I]Tfn (τρανσφερίνης) στο υπερέκφραστο TRVb-1 κυττάρων, κατά τη διάρκεια ενός κύκλου μεταφοράς,



μειώθηκε δραστικά μετά από υπερέκφραση της ARF6wt, της ARF6Q67L, ή της ARF6T27N (D'Souza-Schorey et al., 1995). Παραπέρα πειράματα, στην ίδια εργασία, έδειξαν ότι η ARF6wt και η ARF6Q67L αναστέλλουν την εσωτερικοποίηση της ραδιενεργού Tfn, ενώ η ARF6T27N την ανακύκλωσή της. Έτσι, φαίνεται ότι η υπερέκφραση της ARF6wt αναστέλλει την ενδοκυττάρωση, όπως και η υπερέκφραση της ARF6Q67L, όμως ο ακριβής μοριακός μηχανισμός δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Έτσι, σε τελική ανάλυση, η υπερέκφραση είτε της ARF6wt, είτε της ARF6Q67L, είτε της ARF6T27N, για διαφορετικούς λόγους η καθεμιά, οδηγεί στην αναστολή του κύκλου ενδοκυττάρωσης/ανακύκλωσης μεμβρανικών υποδοχέων. Είναι όμως γνωστό ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων του TGFβ (TβRII/ALK5) παίζει ενισχυτικό ρόλο στην μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ, όπως αναλύθηκε στο κεφάλαιο 1.1.4.2 της εισαγωγής. Πράγματι, όχι μόνο η SARA πρωτεΐνη εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα (Panopoulou et al., 2002a), αλλά επίσης αναστολή της κλαθρίνο-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης (είτε με μείωση των επιπέδων καλίου, είτε με χρήση της επικρατούσας μεταλλαγμένης μορφής της δυναμίνης, K44A dynamin II) οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης των SMAD2/3 πρωτεϊνών (Hayes et al., 2002a; Penheiter et al., 2002). Έτσι και στο δικό μας σύστημα, η υπερέκφραση των ARF6wt, ARF6Q67L και ARF6T27N φαίνεται να ανέστειλε την ενδοκυττάρωση του συμπλόκου TGFβ/TβRII/ALK5 προς τα πρώιμα ενδοσώματα (η ερμηνεία αυτή χρήζει πειραματικής τεκμηρίωσης, η οποία θα αποτελέσει το αντικείμενο μελλοντικής μελέτης) με συνέπεια και οι τρεις μορφές της ARF6 να μειώσουν δραστικά την φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ. Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ARNO, η οποία οδηγεί σε επιτάχυνση της ενδοκυττάρωσης/ανακύκλωσης, δεν είχε αρνητική επίδραση στη φωσφορυλίωση αυτή, επιβεβαιώνοντας τη σημασία των συνεχιζόμενων διαδοχικών κύκλων GTP/GDP μετατροπής της ARF6 στη διαδικασία αυτή. Βεβαίως, η υπερέκφραση της ARNO δεν οδήγησε σε υπερφωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ, πιθανά επειδή αντιρροπιστικοί μηχανισμοί ελέγχουν το επίπεδο φωσφορυλίωσης των SMAD πρωτεϊνών (κεφάλαιο 1.1.7, εισαγωγή) και δεν επιτρέπουν η αύξηση του ρυθμού ενδοκυττάρωσης/ανακύκλωσης των υποδοχέων του TGFβ να οδηγήσει σε υπερφωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών.

Αλλά γιατί η αναστολή της ενδοκυττάρωσης/ανακύκλωσης από την υπερέκφραση των τριών μορφών της ARF6 δεν οδήγησε στη μείωση της φωσφορυλίωσης των SMAD2/3 πρωτεϊνών από την ακτιβίνη A; Η παρατήρηση αυτή επιδέχεται εναλλακτικών ερμηνειών, οι οποίες πρέπει να τύχουν πειραματικής υποστήριξης στο εγγύς μέλλον. Πρώτο, η ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος ακτιβίνης A/ActRII/ALK4 μπορεί να είναι ARF6-ανεξάρτητη, ενώ αυτή του συμπλέγματος TGFβ/TβRII/ALK5 να είναι ARF6-εξαρτώμενη με συνέπεια η υπερέκφραση των ARF6wt, ARF6Q67L και ARF6T27N να αναστέλλει την ενδοκυττάρωση του ενός συμπλέγματος και όχι του άλλου. Στη βιβλιογραφία δεν υπάρχει καμία ένδειξη προς την κατεύθυνση αυτή. Πάντως, το σύμπλεγμα TGFβ/TβRII/ALK5 ενδοκυτταρώνεται με την κλασική κλαθρίνο-εξαρτώμενη ενδοκυττάρωση (Chen, 2009), ενώ το σύμπλεγμα ακτιβίνης A/ActRII/ALK4 ενδοκυτταρώνεται διαμέσου της πρωτεΐνης ARIP2, η οποία φέρει μια PDZ περιοχή (Matsuzaki et al., 2002). Πράγματι, η ARIP2 συνδέεται με τους υποδοχείς τύπου II της Ακτιβίνης A σε ειδικές αλληλουχίες σύνδεσης με PDZ πρωτεΐνες (ESSL για την ActRIIA και ESSII για την ActRIIB) και τους ενδοκυτταρώνει με τη βοήθεια της GTPάσης Ral και του τελεστή της RalBP1 (Matsuzaki et al., 2002). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο υποδοχέας τύπου II του TGFβ (TβRII) δεν φέρει



καμιά αλληλουχία σύνδεσης με PDZ πρωτεΐνες και δεν ενδοκυτταρώνεται με το σύστημα αυτό. Είναι το σύστημα ARIP2/Ral/RalBP1 ARF6-ανεξάρτητο; Αυτό πρέπει να διευκρινιστεί πειραματικά. Δεύτερο, η ενδοκυττάρωση του σύμπλεγματος TGFβ/TbRII/ALK5 να είναι απαραίτητη για την φωσφορυλίωση των SMAD2/3 στα πρώιμα ενδοσώματα, αλλά το σύμπλεγμα Ακτιβίνης A/ActRII/ALK5 να ενεργοποιεί τις SMAD2/3 πρωτεΐνες στην πλασματική μεμβράνη. Πράγματι, οι περισσότερες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ενδοκυττάρωση είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών από τον TGFβ (κεφάλαιο 1.1.4.2 και (Chen, 2009). Για την Ακτιβίνη A και τους υποδοχείς της υπάρχουν ελάχιστες μελέτες για το θέμα αυτό. Η παραπάνω αναφερθείσα ενδοκυττάρωση από την ARIP2 οδηγεί τις ActRII πρωτεΐνες σε ένα περιπυρηνικό διάμερισμα, το οποίο δεν έχει χαρακτηριστεί επακριβώς και το οποίο δεν έχει αναφερθεί να σχετίζεται με τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών (Matsuzaki et al., 2002). Επιπλέον, μια μεταλλαγμένη μορφή της ALK4 πρωτεΐνης (ALK4W77A), η οποία δεν ενδοκυτταρώνεται παρουσία Ακτιβίνης A, διατηρεί την ικανότητα να φωσφορυλιώνει τις SMAD2/3 (Zhou et al., 2004). Επίσης, σε βλαστιδικά (βλαστοκυστιδικά) κύτταρα βατράχου (*Xenopus blastula cells*), οι συνδεδεμένοι με ακτιβίνη A υποδοχείς της δεν υφίστανται ενδοκυττάρωση, αλλά συνεχίζουν να σηματοδοτούν από την πλασματική μεμβράνη (Dyson and Gurdon, 1998). Βέβαια, υπάρχει και μια μελέτη, πάλι σε εμβυϊκά κύτταρα βατράχου, στην οποία η ενδοκυττάρωση της Ακτιβίνης A στα ενδοσώματα είναι προϋπόθεση για τη φωσφορυλίωση της SMAD2 πρωτεΐνης (Jullien and Gurdon, 2005). Φαίνεται, όμως, ότι υπάρχουν σαφείς ενδείξεις ότι, τουλάχιστο σε ορισμένες περιπτώσεις, η Ακτιβίνη A φωσφορυλιώνει τις SMAD2/3 πρωτεΐνες στην πλασματική μεμβράνη και όχι στα ενδοσώματα.

Η φυσική σύνδεση της ARF6 με τις SMAD πρωτεΐνες, αλλά και η επίδρασή της στην φωσφορυλίωσή τους, έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας των SMAD2 και SMAD3. Πράγματι, η ARF6Q67L κατά κύριο λόγο, αλλά και οι άλλες μορφές της ARF6, προκαλεί μείωση τόσο της SMAD2-, όσο και της SMAD3-εξαρτώμενης μεταγραφής, σε 293, HeLa και BBCE κύτταρα. Αυτό είναι το γενικό συμπέρασμα. Προσεκτικότερη, όμως, ανάλυση των αποτελεσμάτων αναφορικά με την επίδραση της ARF6 στη μεταγραφική ρύθμιση των SMAD2/3 πρωτεϊνών, σε σχέση με τα αποτελέσματα της φυσικής αλληλεπίδρασης ARF6-SMAD2/3/4, αλλά και με βάση την επίδραση της ARF6 στην φωσφορυλίωση των SMAD2/3, οδηγεί στα παρακάτω συμπληρωματικά συμπεράσματα. Πρώτο, η φυσική σύνδεση της ARF6 με τις SMAD πρωτεΐνες παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφικής δραστηριότητάς τους, επειδή, τόσο οι τρεις μορφές της ARF6, όσο και η ARNO, παρόλο ότι δεν επηρεάζουν της φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από την ακτιβίνη A και τον TGFβ, αντίστοιχα, αναστέλλουν τη SMAD2/3-εξαρτώμενη μεταγραφή από τους παράγοντες αυτούς. Δεύτερο, η ARF6 μειώνει, σε μικρότερο βαθμό βέβαια, τη SMAD1/5-εξαρτώμενη μεταγραφή, η οποία επάγεται από το BMP-2, παρατήρηση η οποία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανά η ARF6 να αλληλεπιδρά με τις SMAD1/5, αν και αυτό δεν ελέγχθηκε στα πλαίσια της παρούσας μελέτης. Τρίτο, θα περίμενε κανείς ότι η επίδραση της ARF6 στη SMAD3-εξαρτώμενη μεταγραφή θα ήταν μεγαλύτερη από αυτή στη SMAD2, επειδή αυτή αλληλεπιδρά ισχυρότερα με τη SMAD3-P. Αυτό βέβαια συμβαίνει στην περίπτωση της επαγωγής με TGFβ, αλλά δεν παρατηρείται στην περίπτωση επαγωγής με ακτιβίνη A. Οι παρατηρήσεις αυτές μας οδηγούν στην εκτίμηση ότι η αλληλεπίδραση της ARF6 με τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος των μελών της οικογένειας πρέπει

να είναι πολυεπίπεδη και να περιλαμβάνει την επίδραση στην κυκλοφορία των υποδοχέων τους όπως και την φυσική σύνδεση με τις SMAD πρωτεΐνες.

Επειδή η ARF6-GTP οδηγεί σε ενεργοποίηση των ERK1/2 MAPK (Tague et al., 2004), οι οποίες όπως έχει αναφερθεί φωσφορυλιώνουν τις SMAD2/SMAD3 στη συνδυαστική περιοχή αναστέλλοντας την μετακίνησή τους στον πυρήνα και συνεπώς την μεταγραφική τους δραστηριότητα (Kretzschmar et al., 1999), ήταν επιβεβλημένο να ελεγχθεί ότι η μεταγραφική αναστολή της ARF6Q67L στη SMAD2/3-εξαρτώμενη μεταγραφή δεν οφειλόταν στην ενεργοποίηση των ERK1/2. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δύο πειραματικές προσεγγίσεις: α) υπερεκφράστηκαν ξεχωριστά τόσο η SMAD3WT φυσικού τύπου όσο και η μεταλλαγμένη της μορφή SMAD3MT, η οποία φέρει μεταλλάξεις που δεν επιτρέπουν την φωσφορυλίωσή της από τις ERK1/2, και β) χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας PD98056 της MEK1/2 που βρίσκεται ανοδικά της ERK1/2. Στην πρώτη περίπτωση δείχθηκε ότι η ARF6Q67L προκάλεσε τη ίδια αναστολή στην μεταγραφική ενεργοποίηση από τον TGFβ, ενώ και στη δεύτερη περίπτωση η παρουσία του αναστολέα δεν είχε καμία επίδραση στην από την ARF6Q67L προκληθείσα αναστολή της μεταγραφικής ρύθμισης από τον TGFβ.

Λόγω της εντόπισης της ARF6 στην πλασματική και τις ενδοσωματικές μεμβάνες, η σύνδεση με τις SMAD2/3/4 πρέπει να συμβαίνει έξω από τον πυρήνα. Αυτό διαφοροποιεί τη σύνδεση/αλληλεπίδραση ARF6-SMAD2/3/4 από τη σύνδεση/αλληλεπίδραση μιας πλειάδας πυρηνικών πρωτεϊνών (μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών, αποσιωποποιητών) με τις SMAD πρωτεΐνες, οι οποίες τροποποιούν τη SMAD2/3-δραστικότητα (κεφάλαια 1.1.6.7 και 1.1.6.8, (Ross and Hill, 2008)). Η σύνδεση ARF6-SMAD2/3/4 συμβαίνει εκτός πυρήνα και πιθανά επηρεάζει την μεταφορά του ενεργοποιημένου SMAD2-P/SMAD3-P/SMAD4 συμπλέγματος στον πυρήνα. Σε αυτό συμβάλλει και η δραστικότητα της ARF6 στη κυκλοφορία των υποδοχέων των TGFβ/ακτιβίνης, η οποία τουλάχιστο στην περίπτωση του TGFβ, επηρεάζει επιπλέον τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών. Η κατηγορία των εξωπυρηνικών πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται/αλληλεπιδρούν με τις SMAD πρωτεΐνες είναι λιγότερο εξερευνημένη και ταξινομημένη. Στη προσπάθειά μας να συγκρίνουμε την ARF6 με άλλες εξωπυρηνικές πρωτεΐνες οι οποίες συνδέονται με τις SMAD πρωτεΐνες κατατάξαμε τις τελευταίες σε διακριτές κατηγορίες. Πρώτο, σε αυτές οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα των SMAD πρωτεϊνών (Πίνακας 4.1). Δεύτερο, σε αυτές οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά τη μεταγραφική ενεργότητα των SMAD πρωτεϊνών, αλλά είναι λιγότερο ουβικιτινυλίωσης και δρουν διαμέσου αποικοδόμησης (Πίνακας 4.2). Τρίτο, σε αυτές οι οποίες ρυθμίζουν θετικά τη μεταγραφική ενεργότητα των SMAD πρωτεϊνών (Πίνακας 4.3). Τέταρτο, σε αυτές οι οποίες ρυθμίζουν διπλά (σε άλλες SMAD θετικά και σε άλλες αρνητικά) τη μεταγραφική ενεργότητα των SMAD πρωτεϊνών (Πίνακας 4.4). Πέμπτο, σε αυτές οι οποίες δεν σχετίζονται με τη μεταγραφική ενεργότητα των SMAD πρωτεϊνών (Πίνακας 4.5). Επειδή η δραστικότητα της ARF6 (και των τριών μορφών της) ήταν ομοιογενώς αρνητική αναφορικά με τη SMAD-επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση και επειδή η ARF6 δεν είναι λιγότερο ουβικιτινική, ούτε είχαμε ενδείξεις αποικοδόμησης των SMAD πρωτεϊνών, θεωρούμε ότι ανήκει στην κατηγορία του Πίνακα 4.1. Αν επιδιώξουμε να συγκρίνουμε το πρότυπο σύνδεσης μεταξύ ARF6 και SMAD2/3/4 πρωτεϊνών (σύνδεση με SMAD2/3/4 χωρίς πρόδεμα και σύνδεση μόνο με SMAD3-P παρουσία προσδέματος) με τις πρωτεΐνες, θα διαπιστώσουμε ότι δεν



υπάρχει όμοιο πρότυπο. Το γεγονός ότι η ARF6 είναι μια μεμβρανική GTPάση τη διαφοροποιεί παραπέρα από τις λοιπές πρωτεΐνες του Πίνακα 1 καθιστώντας την μια ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα πρωτεΐνη για παραιτέρω μελέτη αναφορικά με τη εξιχνίαση της ρύθμισης των σηματοδοτικών μονοπατιών της οικογένειας του TGFβ και των αλληλεπιδράσεών τους.

Πίνακας 4.1) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις SMAD και ρυθμίζουν αρνητικά την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση

Πρωτεΐνη	SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ								Άλληλεπιδρώσα περιοχή	Εξάρτηση από σήμα	Περιγραφή	Αναφορά
	1	2	3	4	5	6	7	8				
B-Τουμπουλίνη		■	■	■						ΝΑΙ, αποσύνδεση από μικροσωληνίσκους	Συστατικό των μικροσωληνίσκων	(Dong et al., 2000)
ARIP1		♦	■							ΝΑΙ, σχηματίζει σύμπλοκο με τους υποδοχείς ActRIIA, ActRIIB, και την Smad3	Πρωτεΐνη προσαρμοστής στους Υποδοχείς Ακτιβίνης τύπου II	(Shoji et al., 2000)
STRAP	□	■	■	□		■				ΝΑΙ	Αλληλεπιδρά και με τους υποδοχείς TGFβ I και II	(Datta and Moses, 2000)
GRK2		♦	♦						MH1, MH2 Smad4 (MH1.L, MH2)	ΝΑΙ	Φωσφορυλιώνει το συνδεδετικό τμήμα των R-Smad και εμποδίζει τη φωσφορυλίωσή τους από τον υποδοχέα	(Ho et al., 2005)
PDK1(3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1)		■	■	■					MH2	ΝΑΙ, μείωση αλληλεπιδράσεως	αλληλεπιδρά επίσης με την STRAP	(Seong et al., 2005; Seong et al., 2007)
ERBIN	□	■	■	□					MH2	OXI	Αναστέλλει την TGFβ/Ακτιβίνη EMTΦ	(Dai et al., 2007)
RGS3		■	■	■					MH2		Ρυθμιστική πρωτεΐνη των G πρωτεϊνών	(Yau et al., 2008)
HEF1	♦	♦	■	□					HEF1-Smad3 MH1, MH2 (σα 301-330), APC10-Smad3 (σα 237-362) Οι Smad3-HEF1- APC10 μπορούν να υπάρχουν στο ίδιο σύμπλοκο	OXI	Κυταροπλασματική πρωτεΐνη ελιμενισμού (της οικογένειας Cas)	(Liu et al., 2000; Nouny et al., 2004)
SnoN (κυταροπλασματική)		♦	♦	♦							Κατακράτηση των SMAD πρωτεϊνών στο κυταρόπλασμα μετά από επαγωγή με TGFβ	(Krakowski et al., 2005)
β-catenin		■	■	□						ΝΑΙ, αποσύνδεση από TGFβRII και συνδέση κυρίως με SMAD3,4	Ρύθμιση απόπτωσης και διακυταρικής προσκόλλησης	(Edlund et al., 2005; Tang et al., 2008; Tian and Phillips, 2002)
TMEPAI (Transmembrane prostate androgen-induced RNA)	□	■	■	□						OXI	Ανταγωνισμός με την SARA	(Watanabe et al. 2007)
CKI2 (casein kinase 1 gamma 2)	□	□	■	□					MH2, η SMAD3ΔC δεν αλληλεπιδρά	ενισχύεται ελάχιστα η αλληλεπιδράση	ουβιπίνωση και αποικοδόμηση της SMAD3	(Guo et al., 2008)
Akt			■								Αναστέλλει την TGFβ/Smad3-επαγόμενη απόπτωση	(Conery et al., 2004; Remy et al., 2004; Song et al., 2006)

Πίνακας 4.2) Λιγάσες ουβικιτινυλίωσης που αλληλεπιδρούν με τις SMAD και ρυθμίζουν αρνητικά την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση

Πρωτεΐνη	SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ								Άλληλεπιδρώσα περιοχή	Εξάρτηση από σήμα	Περιγραφή	Αναφορά
	1	2	3	4	5	6	7	8				
NEDD4-2	□	♦	♦	□	□	■	■	□	PY μοτίβο	ΝΑΙ	αποικοδόμηση Smad2, αλληλεπιδράση και αποικοδόμηση TGFβRI* και BMPRI*	(Kuratomi et al., 2005)
WW/Tiul2	□	■	■	■		■	■			ΝΑΙ, ενίσχυση αλληλεπιδράσεως με SMAD2/3	Σύνδεση με SMAD7 επάγει την αποικοδόμηση του TGFβRI, αλληλεπιδράση WW/Tiul2 με TGIF απαιτείται για αποικοδόμηση της SMAD2	(Komuro et al., 2004; Seo et al., 2004)

Smurf1	■	□	◆	□	■	■	■	□	L(PY)	OXI	Αποικοδόμηση των BMP R-SMADs και TGFR1	(Ebisawa et al., 2001; Zhu et al., 1999)
Smurf2	■	■	◆	□					L(PY)	OXI	αποικοδόμηση της SMAD2* από το πρωτεόσωμα	(Lin et al., 2000; Zhang et al., 2001)
SCF/Roc1				■	■				MH2	ΝΑΙ, μόνο P-SMAD3	Ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση SMAD3	(Fukuchi et al., 2001)
SCF ^{FRCP1}		□	◆	■						ΝΑΙ, ενισχύει αποικοδόμηση Smad4	Αποδόμηση της SMAD4	(Wan et al., 2004)
Jab1	□		□	■					MH2	OXI	Αποδόμηση της SMAD4	(Wan et al., 2002)
CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein)	■	■	■	■					MH2	OXI	Αναστέλλει την TGFβ /BMP EMTφ	(Li et al., 2004a; Xin et al., 2005)

Πίνακας 4.3) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις SMAD και ρυθμίζουν θετικά την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα

Πρωτεΐνη	SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ								Άλληλεπιδρώσα περιοχή	Εξάρτηση από σήμα	Περιγραφή	Αναφορά
	1	2	3	4	5	6	7	8				
AMSH	□	□	□	□	□	□	■	□	MH2	ΝΑΙ	Ενίσχυση της αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης	(Itoh et al., 2001)
APC	□	◆	◆	□					MH2	ΝΑΙ, ενίσχυση της αλληλεπίδρασης	Λύγωση ουβικιτίνωσης, πρωτεασωματική αποικοδόμηση, σε συνεργασία με την Smad3 κυρίως, της πρωτεΐνης HEF1 και του καταστολέα SnrN	(Nourty et al., 2004; Stroschein et al., 2001)
SARA	□	■	■	□	□	□	□		Smad2 MH2 (aa 253-462)	ΝΑΙ, Αποδέσμευση	Πρωτεΐνη αγκυροβόλησης, αλληλεπιδρά με TGFβR(1,2)	(Goto et al., 2001; Tsukazaki et al., 1998; Wu et al., 2000)
HRS	◆	■	■	□		□			MH2	OXI	Πρωτεΐνη αγκυροβόλησης, ενίσχυση σύνδεσης SARA-Smad2	(Miura et al., 2000)
cPML		■	■						Smad3 MH1	ΝΑΙ	Συμβάλλει στην ενδοσωμική εντόπιση των TGFβR(1,2)-Sara-SMADs	(Lin et al., 2004)
AxIn	□	■	■	□	□				MH2	ΝΑΙ, Αποδέσμευση	Προσαρμοστής στον TGFβR1* διαμέσου Smad3 της οποίας ενισχύει τη φωσφορυλίωση. Άλληλεπιδρά με Arkadia SMAD7 προάγει SMAD7 αποικοδόμηση	(Furuhashi et al., 2001; Liu et al., 2006)
Dab2		■	■	□			□		MH2	ΝΑΙ	Προσαρμοστής στους TGFβR (1,2) τόσο παρουσία όσο και απουσία προσδέματος	(Hocavar et al., 2001)
Dok-1		■	■	■						ΝΑΙ, ενίσχυση αλληλεπίδρασης SMAD3- SMAD4	Πρωτεΐνη πρόσδεσης σε Ras-GAP, προσαρμοστής στους ACTRIB, ACTRIIA	(Yamakawa et al., 2002)
ELF	□	□	■							ΝΑΙ	Απάλειψη του γονιδίου του σε ποντίκια προκαλεί απώλεια των TGFβ επαγόμενων αποκρίσεων. Απαραίτητη για τη σωστή εντόπιση των SMAD3/4	(Krakowski et al., 2005)
Filamin	■	■		■	■				MH1, L		Κυτταροσκελετική πρωτεΐνη προσδένουσα την ακτίνη, απαιτείται για ενεργοποίηση φωσφορυλίωσης των SMAD	(Sasaki et al., 2001)
Kinesin-1 (light chain subunit)		■								ΝΑΙ	Μεταφέρει την μη φωσφορυλιωμένη SMAD2 στους ενεργοποιημένους υποδοχείς	(Batut et al., 2007)
TRAP-1	□	□	□	■	□	□	□	□	MH1, MH2, δυο θέσεις πρόσδεσης	ΝΑΙ, αλληλεπίδραση παρουσία προσδέματος	Προσαρμοστής στους ανενεργούς υποδοχείς TGFβ και ακτιβίνης, φέρει την Smad4 σε γεινίαση με τους ενεργοποιημένους υποδοχείς	(Wurthner et al., 2001)
Arkadia	□	□	□	□	□	□	■	□		ΝΑΙ, πρόσδεση μόνο σε P-SMAD2/3	Ενισχύει την P-SMAD2/3 μεταγραφική ενεργοποίηση και ταυτόχρονα επάγει την αποικοδόμηση των P-SMAD2/3, SMAD7	(Koinuma et al., 2003; Mavrikis et al., 2007)
Irch (Smurf-like λήγση)		■								OXI, συνεχής αλληλεπίδραση SMAD2-Irch, παρουσία TGFβ, σχηματισμός συμπλόκου TGFR1-SMAD2-Irch	Πολυουβικιτίνωση και αύξηση της SMAD2 φωσφορυλίωσης, ενίσχυση της TGFβ/ SMAD2 επαγόμενης μεταγραφής με τρόπο ανεξάρτητο πρωτεόλυσης	(Bai et al., 2004)



Πίνακας 4.4) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις SMAD και ρυθμίζουν διττά την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργότητα

Πρωτεΐνη	SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ								Άλληλεπι-δρώσα περιοχή	Εξάρτηση από σήμα	Περιγραφή	Αναφορά	
	1	2	3	4	5	6	7	8					
TLP		□	□								ΝΑΙ	Αλληλεπιδρά με TGFβRII και ACVR2 (ενεργούς και ανενεργούς), αναστέλλει την Smad3 εξαρτώμενη μεταγραφή ενώ προάγει την Smad2 εξαρτώμενη μεταγραφή	(Felici et al., 2003)
Calmodulin	■	■	■	■							Προσδένει τις Smad1 και Smad2, σα1-49 και σα 86-95 (MH1)	Ασβέστιο δεσμευτική πρωτεΐνη, καταστέλλει τη SMAD2-επαγόμενη μεταγραφή και αυξάνει τη SMAD1-επαγόμενη μεταγραφή. πρόσδεση της στις R-Smads αναστέλλει την φωσφορυλίωσή τους από ERK2	(Scherer and Graff, 2000; Zimmerman et al., 1998)

Πίνακας 4.5) Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις SMAD και δεν σχετίζονται με την TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση

Πρωτεΐνη	SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ								Άλληλεπι-δρώσα περιοχή	Εξάρτηση από σήμα	Περιγραφή	Αναφορά	
	1	2	3	4	5	6	7	8					
PAR-3			■	+						MH2		Ρυθμιστής της κυτταρικής πολικότητας	(Wamer et al., 2003)
Disevelled	♦	♦	■	■						MH2		Ρυθμιστής της κυτταρικής πολικότητας	(Wamer et al., 2003)
TAK1 (MAPKKK)								■		MH2	ΝΑΙ	Η SMAD6 εμποδίζει την BMP επαγόμενη ενεργοποίηση της TAK1 και τη φωσφορυλίωση της p38	Kimura et al., 2000)
Mps1 κινάση		■	■	■						R-SMADs: -SSXS, MH1 περιοχή της SMAD4	Ανεξάρτητη από TGFβ. ενεργοποίηση Mps1 από νοκοδοζόλη	Η Mps1 παίζει ρόλο στην μιτωτική εξέλιξη και τη σχετιζόμενη με το σημείο ελέγχου σηματοδότηση. πιθανόν οι SMADs να ενεργοποιούν γονίδια που είναι σημαντικά στη μίτωση	(Zhu et al., 2007)

(Η πρώτη σειρά, στην στήλη "SMAD ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ" αντιπροσωπεύει μη φωσφορυλιωμένες SMAD (ανενεργές) ενώ η δεύτερη φωσφορυλιωμένες. Ο ρόμβος συμβολίζει ασθενή αλληλεπίδραση, το μαύρο τετραγωνάκι συμβολίζει επιβεβαιωμένη αλληλεπίδραση ενώ το άχρωμο τετραγωνάκι συμβολίζει επιβεβαιωμένη απουσία αλληλεπίδρασης. Όταν δεν υπάρχει ένδειξη, σημαίνει ότι είναι άγνωστο και δεν έχει ελεγχθεί. Όπου υπάρχει * συμβολίζει ενεργοποιημένο μόριο, EMTΦ = Επαγόμενη Μεταγραφή).

Από τα μέχρι τώρα συζητηθέντα, προκύπτει ότι η κατάσταση ενεργοποίησης της ARF6 επηρεάζει την μεταγωγή του σήματος από μέλη της οικογένειας του TGFβ. Φαίνεται όμως ότι και η ενεργοποίηση των καθοδικών μονοπατιών του TGFβ επηρεάζει το επίπεδο ενεργοποίησης της ARF6. Πράγματι, τα πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι εντός 20 min ο TGFβ μετατρέπει ένα μεγάλο ποσό της ARF6 στην ανενεργή μορφή της (GDP προσδένουσα). Η κινητική αυτή δείχνει ότι κάποιο από τα μονοπάτια του TGFβ, αμέσως μετά την ενεργοποίησή του, είτε αναστέλλει κάποιο GEF της ARF6, είτε επάγει κάποια από τις GAP της. Φαίνεται λοιπόν ότι λόγω της ανασταλτικής δραστηριότητας της ARF6-GTP στη SMAD-εξαρτώμενη μεταγραφή, ο TGFβ μεγιστοποιεί την μεταγωγή των σημάτων του μετατρέποντας την ARF6 στην ανενεργή GDP μορφή της. Ανοίγει, λοιπόν, η δυνατότητα παραπέρα μελετών για την λεπτομερέστερη διερεύνηση της αμφίδρομης αλληλεπίδρασης μεταξύ της ARF6 και TGFβ/ακτιβίνης, όπου το ένα σύστημα επηρεάζει τη λειτουργικότητα του άλλου. Επειδή και τα δύο συστήματα παίζουν κύριους ρόλους στη ρύθμιση της ομοιοστασίας των κυττάρων, η μελλοντική αυτή έρευνα αναμένεται να παράξει σημαντική νέα γνώση.

Πράγματι, η ARF6 ενεργοποιείται από σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες και λαμβάνει μέρος στα μονοπάτια μεταγωγής του σήματός τους και στα λειτουργικά τους επακόλουθα. Ο VEGF ενεργοποιεί την ARF6 και η ενεργοποίησή αυτή είναι απαραίτητη για την αυτοφωσφορυλίωση του VEGFR2 καθώς και για την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (η

ARF6T27N μορφή εμποδίζει τις ενδοθηλιακές αυτές αποκρίσεις) (Ikeda et al., 2005). Ένας άλλος σημαντικός αυξητικός παράγοντας, ο οποίος ενεργοποιεί την ARF6, είναι ο EGF (Honda et al., 1999). Πράγματι, ο υποδοχέας EGFR (ErbB1) συνδέεται ειδικά και ενεργοποιεί την πρωτεΐνη GEP100/BRAG2, έναν GEF της ARF6, ο οποίος με την σειρά του ενεργοποιεί την ARF6, με σκοπό την αύξηση της διεισδυτικότητας και μεταστατικότητας των καρκινικών κυττάρων (Morishige et al., 2008). Παράλληλα, ο υποδοχέας EGFR προσελκύει μια GAP της ARF6 (Valderrama and Ridley, 2008), πιθανότατα την centaurin-a2 (Venkateswarlu et al., 2007), με σκοπό να εξασφαλίσει την διεξαγωγή των διαδοχικών κύκλων GTP-GDP μετατροπής. Επίσης σε επιθηλιακά κύτταρα, ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (hepatocyte growth factor, HGF) επάγει την ενεργοποίηση της ενδογενούς ARF6 οδηγώντας στην αποσυναρμολόγηση των συνδέσμων προσκόλλησης και επακόλουθη κυτταρική μετανάστευση (Palacios et al., 2001). Επειδή, ο TGFβ μετατρέπει την ARF6 στην GDP μορφή, απενεργοποιώντας την, η ARF6 μπορεί να αποτελεί ένα κομβικό σημείο, όπου συμβαίνει αμοιβαία αλληλεπίδραση μεταξύ TGFβ και άλλων αυξητικών παραγόντων, με αντίθετη κυτταρική δραστηριότητα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι έμβρυα ποντικών στα οποία έγινε απάλειψη του γονιδίου της ARF6 πεθαίνουν κατά το μέσο προς το τέλος της κύησης εξαιτίας ανωμαλιών στο σχηματισμό του ήπατος (Suzuki et al., 2006). Το ήπαρ των παραπάνω εμβρύων εμφανίζεται μικρότερο σε μέγεθος, εκδηλώνεται υποκυτταρικότητα (hypocellularity) και ελαττωματικός σχηματισμός της ηπατικής χορδής. Πράγματι, στα παραπάνω έμβρυα, διαταράσσεται η ικανότητα του HGF να επάγει τον σχηματισμό δομών που ομοιάζουν την ηπατική χορδή. Τα ηπατικά κύτταρα κατά την έξοδό τους από το πρωτογενές ηπατικό επιθηλιακό φύλλο (primordial hepatic epithelial sheet) μεταναστεύουν κατά τρόπο ανώμαλο και μάλλον συσσωρεύονται παρά διασπείρονται. Η θετική δραστηριότητα της ARF6 στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (κεφάλαιο 1.2.5) και στην ενδοκυττάρωση της E-καντχερίνης (Palacios et al., 2001; Suzuki et al., 2006), η οποία ενισχύει τη μεταναστευτικότητα των επιθηλιακών κυττάρων, πρέπει να σχετίζεται με το φαινότυπο του εμβρυϊκού ήπατος με ARF6^{-/-}. Πράγματι, κατά την ανάπτυξη του ήπατος απαιτείται μείωση των επιπέδων της E-καντχερίνης, ώστε να επιτευχθεί μετανάστευση εμβρυϊκών ηπατοκυττάρων (Sosa-Pineda et al., 2000). Η καταστολή σχηματισμού των HGF-επαγόμενων δομών που ομοιάζουν την ηπατική χορδή και η οποία παρατηρείται στα ARF6^{-/-} εμβρυϊκά ηπατοκύτταρα δεν είναι ολοκληρωτική, γεγονός που υποδηλώνει ότι θα πρέπει παράλληλα να επιδρούν και άλλοι παράγοντες που προάγουν το σχηματισμό ηπατικής χορδής όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF) και ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β) (Michalopoulos et al., 1993; Sanchez et al., 1999).



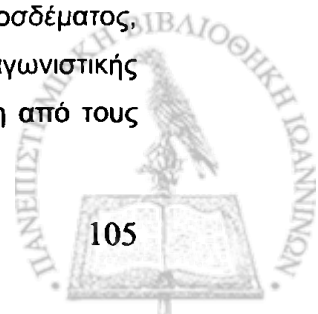
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Η υπεροικογένεια του TGFβ περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο σε πλειάδα λειτουργιών σε κυτταρικό, ιστικό και οργανισμικό επίπεδο. Σημαντικό συστατικό της μεταγωγής του σήματος όλων των μελών της υπεροικογένειας αυτής αποτελεί η κοινή SMAD4 (co-SMAD), η οποία ολιγομερίζεται με τις SMAD πρωτεΐνες οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς (R-SMADs). Στη διατριβή αυτή εστίασαμε την προσοχή μας σε μια πρώτη παρατήρηση, σε συνεργασία με τον Δρ. Philippe Chavrier, όπου η SMAD4 βρέθηκε να συνδέεται με την ARF6 στο σύστημα δύο υβριδίων σε ζυμομύκητα. Αρχικά, η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε βιοχημικά με πειράματα καταβύθισης και συν-ανοσοκατακρήμνισης από τα οποία προέκυψε ότι μεταξύ των τριών μορφών της ARF6 (φυσικού τύπου WT, μόνιμα ενεργής Q67L και μόνιμα ανενεργής T27N), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν, μόνο η μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6 αλληλεπιδρά με την SMAD4. Επιπροσθέτως, με πειράματα καταβύθισης σε 293 κύτταρα, δείχθηκε ότι η σύνδεση ARF6Q67L-SMAD4 είναι ειδική: δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της SMAD4 με καμία από τις ενεργές μορφές των ARF1 (ARF1Q71L) και ARF5 (ARF5Q71L) εκπροσώπων των τάξης I και II, των ARF GTPασών αντίστοιχα.

Ακολούθως διερευνήθηκε η πιθανή φυσική σύνδεση της ARF6 με τις SMAD2/SMAD3 (R-SMADs). Πράγματι, πειράματα καταβύθισης επιβεβαίωσαν τη σύνδεση της ARF6Q67L με τις SMAD2 και SMAD3. Περαιτέρω πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης της ARF6Q67L, με καθεμία από τις SMAD2/3/4, έδειξαν ότι απουσία TGFβ, οι SMAD2/3/4 πρωτεΐνες ανοσοκατακρημνίζονται από την ARF6Q67L, ενώ παρουσία TGFβ, μόνο η SMAD3 ανοσοκατακρημνίζεται. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την χρήση μόνιμα ενεργοποιημένων SMAD2(EDME) και SMAD3(EDVE), όπου οι καρβοξυτελικές σερίνες που φωσφορυλιώνονται από τον υποδοχέα –SSXS- μεταλλάχθηκαν σε γλουταμινικά και ασπαρτικό, ως –EDME- και –EDVE-. Πράγματι, η ARF6Q67L ανοσοκατακρήμνισε με καλή απόδοση την SMAD3(EDVE), ενώ μόνο οριακά την SMAD2(EDME). Συμπερασματικά, οι μη φωσφορυλιωμένες SMAD2, SMAD3 και SMAD4 (απουσία προσδέματος) συνδέονται με την ARF6Q67L, ενώ παρουσία προσδέματος μόνο η SMAD3-P συνδέεται με την ARF6Q67L.

Αμέσως μετά πραγματοποιήθηκαν πειράματα χαρτογράφησης των δομικών περιοχών των SMAD2/3/4 οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη σύνδεση με την ARF6Q67L. Με καταβύθιση εντοπίστηκε η περιοχή της SMAD4 πρωτεΐνης η οποία είναι υπεύθυνη για την φυσική σύνδεση με την μόνιμα ενεργή μορφή της ARF6. Πρόκειται για τα 32-καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD4 πρωτεΐνης, τα οποία είναι επαρκή για την διαμεσολάβηση της σύνδεσης με την ARF6. Επιπλέον, απάλειψη των 43-καρβοξυτελικών αμινοξέων είχε ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση της σύνδεσης με την ARF6Q67L. Παραπέρα πειράματα συν-ανοσοκατακρήμνισης ARF6Q67L με κατασκευές των SMAD2 και SMAD3 έδειξαν ότι η ARF6Q67L συνδέεται με τα τελευταία 40 καρβοξυτελικά αμινοξέα της SMAD2, όπως και στην περίπτωση της SMAD4, ενώ η περιοχή σύνδεσης με την SMAD3 βρίσκεται ανοδικά.

Επειδή η ARF6Q67L συνδέεται φυσικά με τις SMAD2 και SMAD3 απουσία προσδέματος, ήταν επιβεβλημένο να ελεγχθεί η δυνατότητα η σύνδεση αυτή να μειώνει, λόγω ανταγωνιστικής δέσμησης, τη διαθεσιμότητα των SMAD2 και SMAD3 πρωτεϊνών προς φωσφορυλίωση από τους



ενεργοποιημένους από το πρόσδεμα τύπου I υποδοχείς. Έτσι, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασμένης ARF6 (φυσικού τύπου WT, μόνιμα ενεργής Q67L και μόνιμα ανενεργής T27N) στη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από τον TGFβ και την Ακτιβίνη A. Παρουσία TGFβ, τόσο σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, όσο και σε εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα 293, δείχθηκε ότι η ARF6 (και οι τρεις μορφές της) προκαλεί δραματική μείωση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της SMAD2 σε ποσοστό άνω του 80%. Αναφορικά με την SMAD3, η προκαλούμενη από την ARF6 (και από τις τρεις μορφές της) μείωση της από τον TGFβ προκαλούμενης φωσφορυλίωσής της ήταν επίσης σημαντική, περίπου 40%. Αντίθετα, η ARF6 (και οι τρεις μορφές της) δεν επηρέασε καθόλου την φωσφορυλίωση των SMAD2/SMAD3 από την Ακτιβίνη A, σε HUVEC και 293 κύτταρα. Η παντελής έλλειψη αρνητικής επίδρασης της ARF6 στην φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3 από την Ακτιβίνη A υποδεικνύει ότι η σύνδεση της ARF6 με αυτές τις SMAD δεν επηρεάζει την διαθεσιμότητα τους, λόγω ανταγωνιστικής δέσμευσης, προς φωσφορυλίωση από τους ενεργοποιημένους τύπου I υποδοχείς. Παράλληλα όμως, από τα παραπάνω πειράματα εξήχθησαν και αλλά δύο συμπεράσματα. Πρώτο, η αναστολή της φωσφορυλίωσης των SMAD2/3 (μετά από χορήγηση TGFβ) από τις ARF6wt, ARF6Q67L και ARF6T27N πρέπει να οφείλεται στην αναστολή της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων του TGFβ, διαδικασία η οποία θεωρείται απαραίτητη προκειμένου να ενεργοποιηθούν οι SMAD2/3 στα πρώιμα ενδοσώματα. Αυτή ακριβώς η δραστηριότητα της ARF6 επηρεάζεται από τον κύκλο της GTP-GDP μετατροπής της απαιτώντας συνεχείς κύκλους μετατροπής του GTP σε GDP με συνέπεια η μόνιμα ενεργή και η μόνιμα ανενεργή μορφή της ARF6 να έχουν αμφότερες ανασταλτική δραστηριότητα στην ενδοκυττάρωση/ανακύκλωση υποδοχέων. Το ίδιο έχει αναφερθεί να συμβαίνει και με την υπερέκφραση της ARF6wt, αν και ο μηχανισμός δεν είναι διευκρινισμένος. Πράγματι, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ARNO (GEF της ARF6), η οποία ενεργοποιεί την ARF6 χωρίς να 'κλειδώνει' την ARF6 στην GTP μορφή, δεν είχε αρνητική επίδραση στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 από τον TGFβ. Δεύτερο, ο μη επηρεασμός της από την Ακτιβίνη A επαγόμενης φωσφορυλίωσης των SMAD2/3 από τις ARF6wt, ARF6Q67L και ARF6T27N οδηγεί στο συμπέρασμα ότι είτε οι υποδοχείς της Ακτιβίνης A ενδοκυτταρώνονται με διαδικασίες οι οποίες είναι ARF6-ανεξάρτητες, είτε οι υποδοχείς της Ακτιβίνης A δεν χρειάζονται ενδοκυττάρωση για να φωσφορυλιώσουν τις SMAD2/3 πρωτεΐνες.

Σειρά πειραμάτων μεταγραφικής ρύθμισης οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η φυσική σύνδεση της ARF6 με τις SMAD πρωτεΐνες, αλλά και η επίδρασή της στην φωσφορυλίωσή τους διαμέσου αναστολής της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων τους, έχει σαν αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφικής δραστηριότητας των SMAD2 και SMAD3. Τέλος δείξαμε ότι όχι μόνο η κατάσταση ενεργοποίησης της ARF6 επηρεάζει την μεταγωγή του σήματος από μέλη της οικογένειας του TGFβ, αλλά και η ενεργοποίηση των καθοδικών μονοπατιών του TGFβ επηρεάζει το επίπεδο ενεργοποίησης της ARF6. Πράγματι, τα πειραματικά μας δεδομένα έδειξαν ότι εντός 20 min ο TGFβ μετατρέπει ένα μεγάλο ποσό της ARF6 στην ανενεργή μορφή της (GDP προσδένουσα). Φαίνεται λοιπόν ότι λόγω της ανασταλτικής δραστηριότητας της ARF6-GTP στη SMAD-εξαρτώμενη μεταγραφή, ο TGFβ μεγιστοποιεί την μεταγωγή των σημάτων του μετατρέποντας την ARF6 στην ανενεργή GDP μορφή της. Ανοίγει, λοιπόν, η δυνατότητα παραπέρα μελετών για την λεπτομερέστερη διερεύνηση της αμφίδρομης αλληλεπίδρασης μεταξύ της ARF6 και TGFβ/ακτιβίνης, όπου το ένα σύστημα επηρεάζει τη λειτουργικότητα του άλλου.



B. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY

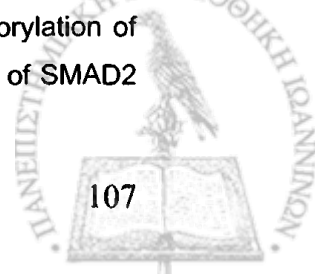
TGF β superfamily is comprised of a large number of growth factors, which play an important role in a variety of cellular functions. The common SMAD4 (co-SMAD), oligomerizes with receptor phosphorylated SMAD proteins (R-SMADs), and therefore constitutes an important component of the signal transduction of all members of this superfamily, and indeed is essential for propagation of the signal. In this thesis, in collaboration with Philippe Chavier, SMAD4 was found to interact with ARF6 in a yeast-two-hybrid screen. This interaction was confirmed biochemically with pull-down and co-immunoprecipitation experiments. We expressed three forms of ARF6 (wild type WT, constitutively active Q67L mutant and GDP-bound inactive mutant T27N) and found that only the constitutively active form of ARF6 interacts with SMAD4. Moreover, we have shown that the ARF6Q67L-SMAD4 interaction is specific for ARF6: it was not observed with the constitutively active forms of ARF1 (ARF1Q71L) or ARF5 (ARF5Q71L), representatives of class I and II, of ARF GTPases, respectively.

Subsequently, we addressed whether ARF6 interacts with the R-SMADS, SMAD2/SMAD3. Indeed, pull down experiments confirmed that ARF6Q67L associates with both SMAD2 and SMAD3. Further, co-immunoprecipitation experiments of ARF6Q67L, with either SMAD2, 3 or 4, showed that in the absence of TGF β , SMAD2,3, and 4 proteins co-immunoprecipitated with ARF6Q67L, while in the presence of TGF β , only SMAD3 co-immunoprecipitated. The above results were confirmed with the use of constitutively activated SMAD2 (EDME) and SMAD3 (EDVE), constructed by mimicking the receptor phosphorylation sites on both proteins. Indeed, ARF6Q67L co-immunoprecipitated SMAD3 (EDVE), while SMAD2 (EDME) was only marginally co-immunoprecipitated. In conclusion, SMAD4 and unphosphorylated SMAD2 and 3 (in the absence of ligand) are associated with ARF6Q67L, while in the presence of ligand, only SMAD3-P associates with ARF6Q67L.

Domain mapping experiments of SMAD2, 3, and 4 mediating the association with ARF6Q67L were carried out. The SMAD4 domain responsible for the association with constitutively active ARF6Q67L is contained within the last 32-carboxy-terminal amino acids. In agreement, deletion of this domain in full length SMAD4 disrupted the interaction with ARF6Q67L. Furthermore, co-immunoprecipitation experiments of ARF6Q67L with SMAD2 and SMAD3 deletion constructs demonstrated that ARF6Q67L is associated with the last 40-carboxyterminal amino acids of SMAD2, as in the case of SMAD4, while the interaction domain of SMAD3 lies upstream.

Due to the fact that ARF6Q67L physically associated with SMAD2 and SMAD3 in the absence of ligand, it was imperative to check the possibility that this association decreases, due to competitive binding, the availability of SMAD2 and SMAD3 proteins for phosphorylation from the ligand activated type I receptors. Thus, we investigated the effect of overexpressed ARF6 (WT, Q67L and T27N) on SMAD2 and SMAD3 phosphorylation induced by TGF β and Activin A.

In the presence of TGF β , in HUVE endothelial cells, as well as in embryonic renal 293 cells, we found that all forms of ARF6 dramatically reduced SMAD2 phosphorylation levels by approximately 80%. In the case of SMAD3, all forms of ARF6 reduced SMAD3 phosphorylation levels by approximately 40% following TGF β . On the contrary, ARF6 did not influence the phosphorylation of SMAD2/SMAD3 induced by Activin A in HUVE and 293 cells. The lack of ARF6 reduction of SMAD2



and SMAD3 phosphorylation upon Activin A addition indicates that the association of ARF6 with these SMADs does not influence their availability, due to competitive binding, for phosphorylation from activated type I receptor. In parallel, two other conclusions were drawn from previous experiments. First, the inhibition of SMAD2/3 phosphorylation (after TGF β treatment) by ARF6wt, ARF6Q67L and ARF6T27N, could be attributed to the inhibition of TGF β receptor endocytosis, a process which is considered essential so that SMAD2/3 are activated at the level of the early endocytic compartment. This specific activity of ARF6 is influenced by the cycle of its GTP-GDP exchange so that both constitutively active and constitutively inactive form of ARF6 have inhibitory action towards receptor endocytosis/recycling. The same has been reported to happen with the overexpressed ARF6wt as well, however the mechanism has not been clarified. Indeed, overexpression of ARNO protein (GEF of ARF6), which activates ARF6 without "locking" ARF6 in the GTP form, did not have any negative effect on SMAD2/3 phosphorylation upon TGF β treatment. Second, the fact that SMAD2/3 phosphorylation upon Activin A is not influenced by ARF6wt, ARF6Q67L and ARF6T27N leads to the conclusion that either Activin A receptors are endocytosed via ARF6-independent processes, or that Activin A does not need endocytosis to phosphorylate SMAD2/3 proteins.

A number of transcriptional regulation experiments led to the conclusion that the physical association of ARF6 and SMAD proteins, and its effect on phosphorylation through the inhibition of receptor phosphorylation, result in the inhibition of SMAD2 and SMAD3 transcriptional activity. Finally, we show that not only does the ARF6 activation status influence TGF β superfamily signal transduction, but TGF β also influences the level of ARF6 activation. In fact, our experimental data showed that within 20 min TGF β converts ARF6 to the inactive form (GDP bound). Therefore, it appears that due to the ARF6-GTP inhibitory action on SMAD-dependent transcription, TGF β maximizes its signal transduction by shifting ARF6 to its inactive GDP form. Therefore, our experimental data raise the possibility for further studies including detailed investigation of bidirectional interaction between ARF6 and TGF β /Activin A, where the one system influences the functionality of the other.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdollah, S., Macias-Silva, M., Tsukazaki, T., Hayashi, H., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1997). TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *The Journal of biological chemistry* 272, 27678-27685.

Aikawa, Y., and Martin, T.F. (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *The Journal of cell biology* 162, 647-659.

Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *The Journal of biological chemistry* 274, 35269-35277.

Al-Awar, O., Radhakrishna, H., Powell, N.N., and Donaldson, J.G. (2000). Separation of membrane trafficking and actin remodeling functions of ARF6 with an effector domain mutant. *Molecular and cellular biology* 20, 5998-6007.

Albertinazzi, C., Za, L., Paris, S., and de Curtis, I. (2003). ADP-ribosylation factor 6 and a functional PIX/p95-APP1 complex are required for Rac1B-mediated neurite outgrowth. *Molecular biology of the cell* 14, 1295-1307.

Alexandrow, M.G., and Moses, H.L. (1995). Transforming growth factor beta and cell cycle regulation. *Cancer research* 55, 1452-1457.

Alliston, T., Choy, L., Ducy, P., Karsenty, G., and Derynck, R. (2001). TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *The EMBO journal* 20, 2254-2272.

Alliston, T., Ko, T.C., Cao, Y., Liang, Y.Y., Feng, X.H., Chang, C., and Derynck, R. (2005). Repression of bone morphogenetic protein and activin-inducible transcription by Evi-1. *The Journal of biological chemistry* 280, 24227-24237.

Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A., and Ringe, D. (1994). Structure of the human ADP-ribosylation factor 1 complexed with GDP. *Nature* 372, 704-708.

Attisano, L., Silvestri, C., Izzi, L., and Labbe, E. (2001). The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signalling. *Molecular and cellular endocrinology* 180, 3-11.

Bader, M.F., Doussau, F., Chasserot-Golaz, S., Vitale, N., and Gasman, S. (2004). Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochimica et biophysica acta* 1742, 37-49.

Bai, Y., Yang, C., Hu, K., Elly, C., and Liu, Y.C. (2004). Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF-beta signaling by modulating smad2 phosphorylation. *Molecular cell* 15, 825-831.

Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K., and Arteaga, C.L. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *Journal of cell science* 115, 3193-3206.

Balana, M.E., Niedergang, F., Subtil, A., Alcover, A., Chavrier, P., and Dautry-Varsat, A. (2005). ARF6 GTPase controls bacterial invasion by actin remodelling. *Journal of cell science* 118, 2201-2210.

Balasubramanian, N., Scott, D.W., Castle, J.D., Casanova, J.E., and Schwartz, M.A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nature cell biology* 9, 1381-1391.

Batut, J., Howell, M., and Hill, C.S. (2007). Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGF-beta ligands. *Developmental cell* 12, 261-274.

Bennett, D., and Alphey, L. (2002). PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics* 31, 419-423.

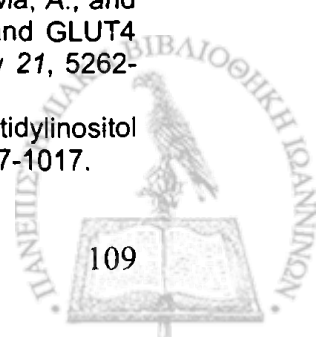
Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Aakre, M., Brown, K., Singh, V., and Moses, H.L. (2003). TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15548-15553.

Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153-166.

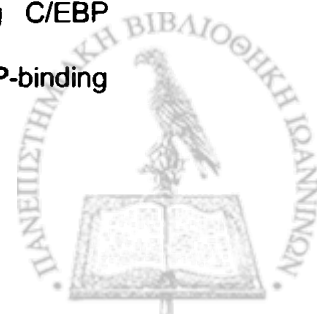
Bonni, S., Wang, H.R., Causing, C.G., Kavsak, P., Stroschein, S.L., Luo, K., and Wrana, J.L. (2001). TGF-beta induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nature cell biology* 3, 587-595.

Bose, A., Cherniack, A.D., Langille, S.E., Nicoloso, S.M., Buxton, J.M., Park, J.G., Chawla, A., and Czech, M.P. (2001). G(alpha)11 signaling through ARF6 regulates F-actin mobilization and GLUT4 glucose transporter translocation to the plasma membrane. *Molecular and cellular biology* 21, 5262-5275.

Brown, F.D., Rozelle, A.L., Yin, H.L., Balla, T., and Donaldson, J.G. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. *The Journal of cell biology* 154, 1007-1017.



- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C., and Sternweis, P.C. (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* 75, 1137-1144.
- Brown, J.D., DiChiara, M.R., Anderson, K.R., Gimbrone, M.A., Jr., and Topper, J.N. (1999). MEK1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 8797-8805.
- Brown, K.A., Pietenpol, J.A., and Moses, H.L. (2007). A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *Journal of cellular biochemistry* 101, 9-33.
- Brugger, S.M., Merrill, A.E., Torres-Vazquez, J., Wu, N., Ting, M.C., Cho, J.Y., Dobias, S.L., Yi, S.E., Lyons, K., Bell, J.R., et al. (2004). A phylogenetically conserved cis-regulatory module in the *Msx2* promoter is sufficient for BMP-dependent transcription in murine and *Drosophila* embryos. *Development (Cambridge, England)* 131, 5153-5165.
- Buccione, R., Orth, J.D., and McNiven, M.A. (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nature reviews* 5, 647-657.
- Burd, C.G., Strohlic, T.I., and Gangi Setty, S.R. (2004). Arf-like GTPases: not so Arf-like after all. *Trends in cell biology* 14, 687-694.
- Burgoyne, R.D., and Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews* 83, 581-632.
- Caplan, S., Naslavsky, N., Hartnell, L.M., Lodge, R., Polishchuk, R.S., Donaldson, J.G., and Bonifacino, J.S. (2002). A tubular EHD1-containing compartment involved in the recycling of major histocompatibility complex class I molecules to the plasma membrane. *The EMBO journal* 21, 2557-2567.
- Casanova, J.E. (2007). Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8, 1476-1485.
- Caumont, A.S., Vitale, N., Gense, M., Galas, M.C., Casanova, J.E., and Bader, M.F. (2000). Identification of a plasma membrane-associated guanine nucleotide exchange factor for ARF6 in chromaffin cells. Possible role in the regulated exocytotic pathway. *The Journal of biological chemistry* 275, 15637-15644.
- Cavalli, V., Corti, M., and Gruenberg, J. (2001). Endocytosis and signaling cascades: a close encounter. *FEBS letters* 498, 190-196.
- Chacko, B.M., Qin, B., Correia, J.J., Lam, S.S., de Caestecker, M.P., and Lin, K. (2001). The L3 loop and C-terminal phosphorylation jointly define Smad protein trimerization. *Nature structural biology* 8, 248-253.
- Chai, J., Wu, J.W., Yan, N., Massague, J., Pavletich, N.P., and Shi, Y. (2003). Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding. *The Journal of biological chemistry* 278, 20327-20331.
- Chardin, P., Paris, S., Antony, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C.L., and Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature* 384, 481-484.
- Chen, H.B., Rud, J.G., Lin, K., and Xu, L. (2005). Nuclear targeting of transforming growth factor-beta-activated Smad complexes. *The Journal of biological chemistry* 280, 21329-21336.
- Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J., and Blobel, G.C. (2003). Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science (New York, NY)* 301, 1394-1397.
- Chen, X., Rubock, M.J., and Whitman, M. (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling. *Nature* 383, 691-696.
- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G., and Whitman, M. (1997). Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389, 85-89.
- Chen, Y.G. (2009). Endocytic regulation of TGF-beta signaling. *Cell research* 19, 58-70.
- Chen, Y.G., Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., and Massague, J. (1998). Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes & development* 12, 2144-2152.
- Chen, Y.G., and Massague, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *The Journal of biological chemistry* 274, 3672-3677.
- Choy, L., and Derynck, R. (2003). Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *The Journal of biological chemistry* 278, 9609-9619.
- Claing, A. (2004). Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis by ARF6 GTP-binding proteins. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82, 610-617.



- Claing, A., Chen, W., Miller, W.E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 276, 42509-42513.
- Claing, A., Perry, S.J., Achiriloaie, M., Walker, J.K., Albanesi, J.P., Lefkowitz, R.J., and Premont, R.T. (2000). Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1119-1124.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemsky, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M., and Melancon, P. (1999). GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant guanine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *The Journal of cell biology* 146, 71-84.
- Cockcroft, S., Thomas, G.M., Fensome, A., Geny, B., Cunningham, E., Gout, I., Hiles, I., Totty, N.F., Truong, O., and Hsuan, J.J. (1994). Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science (New York, NY)* 263, 523-526.
- Cohen, S.B., Nicol, R., and Stavnezer, E. (1998). A domain necessary for the transforming activity of SnoN is required for specific DNA binding, transcriptional repression and interaction with TAF(II)110. *Oncogene* 17, 2505-2513.
- Conery, A.R., Cao, Y., Thompson, E.A., Townsend, C.M., Jr., Ko, T.C., and Luo, K. (2004). Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nature cell biology* 6, 366-372.
- Correia, J.J., Chacko, B.M., Lam, S.S., and Lin, K. (2001). Sedimentation studies reveal a direct role of phosphorylation in Smad3:Smad4 homo- and hetero-trimerization. *Biochemistry* 40, 1473-1482.
- Crawford, S.E., Stellmach, V., Murphy-Ullrich, J.E., Ribeiro, S.M., Lawler, J., Hynes, R.O., Boivin, G.P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93, 1159-1170.
- Czech, M.P. (2003). Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annual review of physiology* 65, 791-815.
- D'Souza-Schorey, C. (2005). Disassembling adherens junctions: breaking up is hard to do. *Trends in cell biology* 15, 19-26.
- D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *The EMBO journal* 16, 5445-5454.
- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews* 7, 347-358.
- D'Souza-Schorey, C., Li, G., Colombo, M.I., and Stahl, P.D. (1995). A regulatory role for ARF6 in receptor-mediated endocytosis. *Science (New York, NY)* 267, 1175-1178.
- D'Souza-Schorey, C., van Donselaar, E., Hsu, V.W., Yang, C., Stahl, P.D., and Peters, P.J. (1998). ARF6 targets recycling vesicles to the plasma membrane: insights from an ultrastructural investigation. *The Journal of cell biology* 140, 603-616.
- Dai, F., Chang, C., Lin, X., Dai, P., Mei, L., and Feng, X.H. (2007). Erbin inhibits transforming growth factor beta signaling through a novel Smad-interacting domain. *Molecular and cellular biology* 27, 6183-6194.
- Dai, J., Li, J., Bos, E., Porcionatto, M., Premont, R.T., Bourgoin, S., Peters, P.J., and Hsu, V.W. (2004). ACAP1 promotes endocytic recycling by recognizing recycling sorting signals. *Developmental cell* 7, 771-776.
- Datta, P.K., and Moses, H.L. (2000). STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling. *Molecular and cellular biology* 20, 3157-3167.
- De Bosscher, K., Hill, C.S., and Nicolas, F.J. (2004). Molecular and functional consequences of Smad4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells. *The Biochemical journal* 379, 209-216.
- de Caestecker, M. (2004). The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 15, 1-11.
- de Caestecker, M.P., Parks, W.T., Frank, C.J., Castagnino, P., Bottaro, D.P., Roberts, A.B., and Lechleider, R.J. (1998). Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes & development* 12, 1587-1592.
- 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.
- Dennler, S., Goumans, M.J., and ten Dijke, P. (2002). Transforming growth factor beta signal transduction. *Journal of leukocyte biology* 71, 731-740.

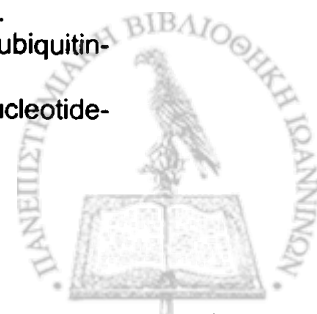
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *The EMBO journal* 17, 3091-3100.
- Dennler, S., Pendaries, V., Tacheau, C., Costas, M.A., Mauviel, A., and Verrecchia, F. (2005). The steroid receptor co-activator-1 (SRC-1) potentiates TGF-beta/Smad signaling: role of p300/CBP. *Oncogene* 24, 1936-1945.
- Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics* 29, 117-129.
- 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.
- Donaldson, J.G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 278, 41573-41576.
- Donaldson, J.G. (2005). Arfs, phosphoinositides and membrane traffic. *Biochemical Society transactions* 33, 1276-1278.
- Donaldson, J.G., Finazzi, D., and Klausner, R.D. (1992). Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360, 350-352.
- Donaldson, J.G., and Honda, A. (2005). Localization and function of Arf family GTPases. *Biochemical Society transactions* 33, 639-642.
- Donaldson, J.G., Porat-Shliom, N., and Cohen, L.A. (2008). Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling*.
- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Jr., Feng, X.H., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (2000). Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Molecular cell* 5, 27-34.
- Duan, X., Liang, Y.Y., Feng, X.H., and Lin, X. (2006). Protein serine/threonine phosphatase PPM1A dephosphorylates Smad1 in the bone morphogenetic protein signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 281, 36526-36532.
- Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., and Piccolo, S. (2005). Germ-layer specification and control of cell growth by Ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 121, 87-99.
- Dyson, S., and Gurdon, J.B. (1998). The interpretation of position in a morphogen gradient as revealed by occupancy of activin receptors. *Cell* 93, 557-568.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *The Journal of biological chemistry* 276, 12477-12480.
- Ehrlich, M., Shmueli, A., and Henis, Y.I. (2001). A single internalization signal from the di-leucine family is critical for constitutive endocytosis of the type II TGF-beta receptor. *Journal of cell science* 114, 1777-1786.
- Engel, M.E., McDonnell, M.A., Law, B.K., and Moses, H.L. (1999). Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* 274, 37413-37420.
- Ethier, J.F., and Findlay, J.K. (2001). Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction (Cambridge, England)* 121, 667-675.
- Fang, Z., Miao, Y., Ding, X., Deng, H., Liu, S., Wang, F., Zhou, R., Watson, C., Fu, C., Hu, Q., et al. (2006). Proteomic identification and functional characterization of a novel ARF6 GTPase-activating protein, ACAP4. *Mol Cell Proteomics* 5, 1437-1449.
- Felici, A., Wurthner, J.U., Parks, W.T., Giam, L.R., Reiss, M., Karpova, T.S., McNally, J.G., and Roberts, A.B. (2003). TLP, a novel modulator of TGF-beta signaling, has opposite effects on Smad2- and Smad3-dependent signaling. *The EMBO journal* 22, 4465-4477.
- Feng, X.H., and Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *The EMBO journal* 16, 3912-3923.
- Feng, X.H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *The EMBO journal* 19, 5178-5193.
- Feng, X.H., Zhang, Y., Wu, R.Y., and Derynck, R. (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes & development* 12, 2153-2163.
- Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P., and Chavrier, P. (1998). ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9926-9931.



- Franco, M., Peters, P.J., Boretto, J., van Donselaar, E., Neri, A., D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *The EMBO journal* 18, 1480-1491.
- Frank, S., Upender, S., Hansen, S.H., and Casanova, J.E. (1998a). ARNO is a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factor 6. *The Journal of biological chemistry* 273, 23-27.
- Frank, S.R., Adelstein, M.R., and Hansen, S.H. (2006). GIT2 represses Crk- and Rac1-regulated cell spreading and Cdc42-mediated focal adhesion turnover. *The EMBO journal* 25, 1848-1859.
- Frank, S.R., Hatfield, J.C., and Casanova, J.E. (1998b). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Molecular biology of the cell* 9, 3133-3146.
- Fukuchi, M., Imamura, T., Chiba, T., Ebisawa, T., Kawabata, M., Tanaka, K., and Miyazono, K. (2001). Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Molecular biology of the cell* 12, 1431-1443.
- Funaba, M., Zimmerman, C.M., and Mathews, L.S. (2002). Modulation of Smad2-mediated signaling by extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of biological chemistry* 277, 41361-41368.
- Furuhashi, M., Yagi, K., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Shimada, S., Nakamura, Y., Kikuchi, A., Miyazono, K., and Kato, M. (2001). Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Molecular and cellular biology* 21, 5132-5141.
- Garamszegi, N., Dore, J.J., Jr., Penheiter, S.G., Edens, M., Yao, D., and Leof, E.B. (2001). Transforming growth factor beta receptor signaling and endocytosis are linked through a COOH terminal activation motif in the type I receptor. *Molecular biology of the cell* 12, 2881-2893.
- Germain, S., Howell, M., Esslemont, G.M., and Hill, C.S. (2000). Homeodomain and winged-helix transcription factors recruit activated Smads to distinct promoter elements via a common Smad interaction motif. *Genes & development* 14, 435-451.
- Gomis, R.R., Alarcon, C., Nadal, C., Van Poznak, C., and Massague, J. (2006). C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. *Cancer cell* 10, 203-214.
- Gordon, K.J., and Blobel, G.C. (2008). Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et biophysica acta* 1782, 197-228.
- Goto, D., Nakajima, H., Mori, Y., Kurasawa, K., Kitamura, N., and Iwamoto, I. (2001). Interaction between Smad anchor for receptor activation and Smad3 is not essential for TGF-beta/Smad3-mediated signaling. *Biochemical and biophysical research communications* 281, 1100-1105.
- Guo, X., Waddell, D.S., Wang, W., Wang, Z., Liberati, N.T., Yong, S., Liu, X., and Wang, X.F. (2008). Ligand-dependent ubiquitination of Smad3 is regulated by casein kinase 1 gamma 2, an inhibitor of TGF-beta signaling. *Oncogene* 27, 7235-7247.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271, 350-353.
- Hanai, J., Chen, L.F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W.Y., Guo, W.H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M.J., et al. (1999). Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *The Journal of biological chemistry* 274, 31577-31582.
- Harradine, K.A., and Akhurst, R.J. (2006). Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Annals of medicine* 38, 403-414.
- Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Kojima, C., Yamamoto, H., Tsutsumi, T., Higashi, M., Mizoguchi, A., Yagi, R., and Sabe, H. (2004a). A novel mode of action of an ArfGAP, AMAP2/PAG3/Papa lpha, in Arf6 function. *The Journal of biological chemistry* 279, 37677-37684.
- Hashimoto, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Onodera, Y., and Sabe, H. (2005) Assays and properties of the ArfGAPs, AMAP1 and AMAP2, in Arf6 function. *Methods in enzymology* 404, 216-231.
- Hashimoto, S., Hirose, M., Hashimoto, A., Morishige, M., Yamada, A., Hosaka, H., Akagi, K., Ogawa, E., Oneyama, C., Agatsuma, T., et al. (2006). Targeting AMAP1 and cortactin binding bearing an atypical src homology 3/proline interface for prevention of breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7036-7041.
- Hashimoto, S., Onodera, Y., Hashimoto, A., Tanaka, M., Hamaguchi, M., Yamada, A., and Sabe, H. (2004b). Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6647-6652.
- Hata, A., Lo, R.S., Wotton, D., Lagna, G., and Massague, J. (1997). Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 388, 82-87.

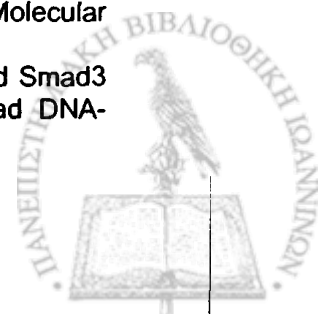


- Hayes, S., Chawla, A., and Corvera, S. (2002a). TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *The Journal of cell biology* 158, 1239-1249.
- Hayes, S., Chawla, A., and Corvera, S. (2002b). TGFbeta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol* 158, 1239-1249.
- He, W., Dorn, D.C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Moore, M.A., and Massague, J. (2006). Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell* 125, 929-941.
- Helms, J.B., and Rothman, J.E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 360, 352-354.
- Hernandez-Deviez, D.J., Roth, M.G., Casanova, J.E., and Wilson, J.M. (2004). ARNO and ARF6 regulate axonal elongation and branching through downstream activation of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha. *Molecular biology of the cell* 15, 111-120.
- Hilpela, P., Vartiainen, M.K., and Lappalainen, P. (2004). Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Current topics in microbiology and immunology* 282, 117-163.
- Ho, J., Cocolakis, E., Dumas, V.M., Posner, B.I., Laporte, S.A., and Lebrun, J.J. (2005). The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGFbeta-inducible antagonist of TGFbeta signal transduction. *The EMBO journal* 24, 3247-3258.
- Hocevar, B.A., Smine, A., Xu, X.X., and Howe, P.H. (2001). The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *The EMBO journal* 20, 2789-2801.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A., *et al.* (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99, 521-532.
- Houndolo, T., Boulay, P.L., and Claing, A. (2005). G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 5598-5604.
- Howell, M., Inman, G.J., and Hill, C.S. (2002). A novel *Xenopus* Smad-interacting forkhead transcription factor (XFast-3) cooperates with XFast-1 in regulating gastrulation movements. *Development (Cambridge, England)* 129, 2823-2834.
- Hu, P.P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., and Wang, X.F. (1999). The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 274, 35381-35387.
- Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J., and Massague, J. (2001). The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Molecular cell* 8, 671-682.
- I, S.T., Nie, Z., Stewart, A., Najdovska, M., Hall, N.E., He, H., Randazzo, P.A., and Lock, P. (2004). ARAP3 is transiently tyrosine phosphorylated in cells attaching to fibronectin and inhibits cell spreading in a RhoGAP-dependent manner. *Journal of cell science* 117, 6071-6084.
- Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N.A., and Alexander, R.W. (2005). Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation research* 96, 467-475.
- Inman, G.J., and Hill, C.S. (2002). Stoichiometry of active smad-transcription factor complexes on DNA. *The Journal of biological chemistry* 277, 51008-51016.
- Inman, G.J., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. (2002). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Molecular cell* 10, 283-294.
- Inoue, H., and Randazzo, P.A. (2007). Arf GAPs and their interacting proteins. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8, 1465-1475.
- Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M., and Miyazono, K. (2000). Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *The Journal of biological chemistry* 275, 6075-6079.
- Itoh, F., Asao, H., Sugamura, K., Heldin, C.H., ten Dijke, P., and Itoh, S. (2001). Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *The EMBO journal* 20, 4132-4142.
- Itoh, S., and ten Dijke, P. (2007). Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Current opinion in cell biology* 19, 176-184.
- Izutsu, K., Kurokawa, M., Imai, Y., Maki, K., Mitani, K., and Hirai, H. (2001). The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood* 97, 2815-2822.
- Izzi, L., and Attisano, L. (2004). Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* 23, 2071-2078.
- Jackson, C.L., and Casanova, J.E. (2000). Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in cell biology* 10, 60-67.

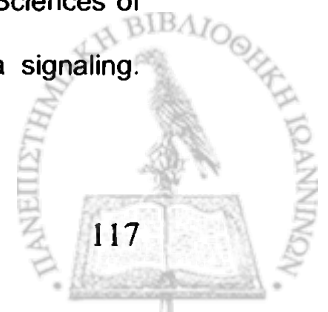


- Jackson, T.R., Brown, F.D., Nie, Z., Miura, K., Foroni, L., Sun, J., Hsu, V.W., Donaldson, J.G., and Randazzo, P.A. (2000a). ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *The Journal of cell biology* **151**, 627-638.
- Jackson, T.R., Kearns, B.G., and Theibert, A.B. (2000b). Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase-regulated Arf signaling. *Trends in biochemical sciences* **25**, 489-495.
- Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., and Minick, C.R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation* **52**, 2745-2756.
- Janknecht, R., Wells, N.J., and Hunter, T. (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes & development* **12**, 2114-2119.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2005). Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis. *Oncogene* **24**, 5742-5750.
- Jayaraman, L., and Massague, J. (2000). Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *The Journal of biological chemistry* **275**, 40710-40717.
- Jin, W., Kim, B.C., Tognon, C., Lee, H.J., Patel, S., Lannon, C.L., Maris, J.M., Triche, T.J., Sorensen, P.H., and Kim, S.J. (2005). The ETV6-NTRK3 chimeric tyrosine kinase suppresses TGF-beta signaling by inactivating the TGF-beta type II receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 16239-16244.
- Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C.H., ten Dijke, P., and Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *The Journal of biological chemistry* **273**, 21145-21152.
- Jovanovic, O.A., Brown, F.D., and Donaldson, J.G. (2006). An effector domain mutant of Arf6 implicates phospholipase D in endosomal membrane recycling. *Molecular biology of the cell* **17**, 327-335.
- Jullien, J., and Gurdon, J. (2005). Morphogen gradient interpretation by a regulated trafficking step during ligand-receptor transduction. *Genes & development* **19**, 2682-2694.
- Jurado-Pueyo, M., Campos, P.M., Mayor, F., and Murga, C. (2008). GRK2-dependent desensitization downstream of G proteins. *Journal of receptor and signal transduction research* **28**, 59-70.
- Kahn, R.A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R.C., Munro, S., and Schurmann, A. (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *The Journal of cell biology* **172**, 645-650.
- Kahn, R.A., and Gilman, A.G. (1986). The protein cofactor necessary for ADP-ribosylation of Gs by cholera toxin is itself a GTP binding protein. *The Journal of biological chemistry* **261**, 7906-7911.
- Kamaraju, A.K., and Roberts, A.B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *The Journal of biological chemistry* **280**, 1024-1036.
- Kanamarlapudi, V. (2005). Centaurin-alpha1 and KIF13B kinesin motor protein interaction in ARF6 signalling. *Biochemical Society transactions* **33**, 1279-1281.
- Kang, J.S., Alliston, T., Delston, R., and Derynck, R. (2005). Repression of Runx2 function by TGF-beta through recruitment of class II histone deacetylases by Smad3. *The EMBO journal* **24**, 2543-2555.
- Kang, Y., Chen, C.R., and Massague, J. (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Molecular cell* **11**, 915-926.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell* **6**, 1365-1375.
- Kawabata, M., Inoue, H., Hanyu, A., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Smad proteins exist as monomers in vivo and undergo homo- and hetero-oligomerization upon activation by serine/threonine kinase receptors. *The EMBO journal* **17**, 4056-4065.
- Kawasaki, M., Nakayama, K., and Wakatsuki, S. (2005). Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Current opinion in structural biology* **15**, 681-689.
- Kim, J., Johnson, K., Chen, H.J., Carroll, S., and Laughon, A. (1997). Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* **388**, 304-308.
- Kim, S.G., Jong, H.S., Kim, T.Y., Lee, J.W., Kim, N.K., Hong, S.H., and Bang, Y.J. (2004). Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Molecular biology of the cell* **15**, 420-434.

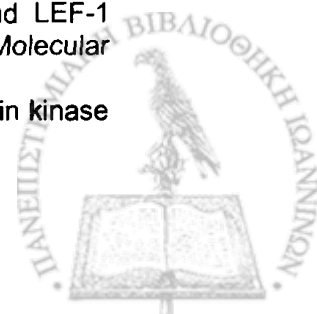
- Kivinen, L., and Laiho, M. (1999). Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. *Cell Growth Differ* 10, 621-628.
- Klarlund, J.K., Guilherme, A., Holik, J.J., Virbasius, J.V., Chawla, A., and Czech, M.P. (1997). Signaling by phosphoinositide-3,4,5-trisphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. *Science (New York, NY)* 275, 1927-1930.
- Koinuma, D., Shinozaki, M., Komuro, A., Goto, K., Saitoh, M., Hanyu, A., Ebina, M., Nukiwa, T., Miyazawa, K., Imamura, T., *et al.* (2003). Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *The EMBO journal* 22, 6458-6470.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitzmann, L., Godar, S., Stockinger, H., and Seed, B. (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-242.
- Komuro, A., Imamura, T., Saitoh, M., Yoshida, Y., Yamori, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2004). Negative regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta) signaling by WW domain-containing protein 1 (WWP1). *Oncogene* 23, 6914-6923.
- Kon, S., Tanabe, K., Watanabe, T., Sabe, H., and Satake, M. (2008). Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Experimental cell research* 314, 1415-1428.
- Krakowski, A.R., Laboureau, J., Mauviel, A., Bissell, M.J., and Luo, K. (2005). Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF-beta signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 12437-12442.
- Krauss, M., Kinuta, M., Wenk, M.R., De Camilli, P., Takei, K., and Haucke, V. (2003). ARF6 stimulates clathrin/AP-2 recruitment to synaptic membranes by activating phosphatidylinositol phosphate kinase type Igamma. *The Journal of cell biology* 162, 113-124.
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massague, J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & development* 13, 804-816.
- Krishnan, K.S., Rikhy, R., Rao, S., Shivalkar, M., Mosko, M., Narayanan, R., Etter, P., Estes, P.S., and Ramaswami, M. (2001). Nucleoside diphosphate kinase, a source of GTP, is required for dynamin-dependent synaptic vesicle recycling. *Neuron* 30, 197-210.
- Krugmann, S., Anderson, K.E., Ridley, S.H., Risso, N., McGregor, A., Coadwell, J., Davidson, K., Eguinoa, A., Ellson, C.D., Lipp, P., *et al.* (2002). Identification of ARAP3, a novel PI3K effector regulating both Arf and Rho GTPases, by selective capture on phosphoinositide affinity matrices. *Molecular cell* 9, 95-108.
- Krugmann, S., Andrews, S., Stephens, L., and Hawkins, P.T. (2006). ARAP3 is essential for formation of lamellipodia after growth factor stimulation. *Journal of cell science* 119, 425-432.
- Krugmann, S., Williams, R., Stephens, L., and Hawkins, P.T. (2004). ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr Biol* 14, 1380-1384.
- Kuge, O., Dascher, C., Orci, L., Rowe, T., Amherdt, M., Plutner, H., Ravazzola, M., Tanigawa, G., Rothman, J.E., and Balch, W.E. (1994). Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not Golgi compartments. *The Journal of cell biology* 125, 51-65.
- Kuratomi, G., Komuro, A., Goto, K., Shinozaki, M., Miyazawa, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2005). NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF-beta (transforming growth factor-beta) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-beta type I receptor. *The Biochemical journal* 386, 461-470.
- Kurisasi, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2001). Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Molecular biology of the cell* 12, 1079-1091.
- Kurisasi, A., Kurisasi, K., Kowanetz, M., Sugino, H., Yoneda, Y., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2006). The mechanism of nuclear export of Smad3 involves exportin 4 and Ran. *Molecular and cellular biology* 26, 1318-1332.
- Kurokawa, M., Mitani, K., Irie, K., Matsuyama, T., Takahashi, T., Chiba, S., Yazaki, Y., Matsumoto, K., and Hirai, H. (1998). The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* 394, 92-96.
- Kusanagi, K., Inoue, H., Ishidou, Y., Mishima, H.K., Kawabata, M., and Miyazono, K. (2000). Characterization of a bone morphogenetic protein-responsive Smad-binding element. *Molecular biology of the cell* 11, 555-565.
- Labbe, E., Silvestri, C., Hoodless, P.A., Wrana, J.L., and Attisano, L. (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Molecular cell* 2, 109-120.



- LaBonne, C., and Whitman, M. (1994). Mesoderm induction by activin requires FGF-mediated intracellular signals. *Development (Cambridge, England)* 120, 463-472.
- Lagna, G., Hata, A., Hemmati-Brivanlou, A., and Massague, J. (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383, 832-836.
- Lamorte, L., Rodrigues, S., Sangwan, V., Turner, C.E., and Park, M. (2003). Crk associates with a multimolecular Paxillin/GIT2/beta-PIX complex and promotes Rac-dependent relocalization of Paxillin to focal contacts. *Molecular biology of the cell* 14, 2818-2831.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.
- Langille, S.E., Patki, V., Klarlund, J.K., Buxton, J.M., Holik, J.J., Chawla, A., Corvera, S., and Czech, M.P. (1999). ADP-ribosylation factor 6 as a target of guanine nucleotide exchange factor GRP1. *The Journal of biological chemistry* 274, 27099-27104.
- Lawrence, J., Mundell, S.J., Yun, H., Kelly, E., and Venkateswarlu, K. (2005). Centaurin-alpha 1, an ADP-ribosylation factor 6 GTPase activating protein, inhibits beta 2-adrenoceptor internalization. *Molecular pharmacology* 67, 1822-1828.
- Le Roy, C., and Wrana, J.L. (2005). Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature reviews* 6, 112-126.
- Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor (beta) (TGF-beta) target genes and distinguishes TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. *Molecular and cellular biology* 25, 8108-8125.
- Levy, L., Howell, M., Das, D., Harkin, S., Episkopou, V., and Hill, C.S. (2007). Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Molecular and cellular biology* 27, 6068-6083.
- Li, J., and Li, W.X. (2006). A novel function of Drosophila eIF4A as a negative regulator of Dpp/BMP signalling that mediates SMAD degradation. *Nature cell biology* 8, 1407-1414.
- Li, L., Xin, H., Xu, X., Huang, M., Zhang, X., Chen, Y., Zhang, S., Fu, X.Y., and Chang, Z. (2004a). CHIP mediates degradation of Smad proteins and potentially regulates Smad-induced transcription. *Molecular and cellular biology* 24, 856-864.
- Li, Y., Kelly, W.G., Logsdon, J.M., Jr., Schurko, A.M., Harfe, B.D., Hill-Harfe, K.L., and Kahn, R.A. (2004b). Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *Faseb J* 18, 1834-1850.
- Lin, F., Morrison, J.M., Wu, W., and Worman, H.J. (2005). MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Human molecular genetics* 14, 437-445.
- Lin, H.K., Bergmann, S., and Pandolfi, P.P. (2004). Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature* 431, 205-211.
- Lin, X., Duan, X., Liang, Y.Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicardi, F.C., *et al.* (2006). PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 125, 915-928.
- Lin, X., Liang, M., and Feng, X.H. (2000). Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 275, 36818-36822.
- Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321, 779-782.
- Liu, W., Rui, H., Wang, J., Lin, S., He, Y., Chen, M., Li, Q., Ye, Z., Zhang, S., Chan, S.C., *et al.* (2006). Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. *The EMBO journal* 25, 1646-1658.
- Liu, X., Elia, A.E., Law, S.F., Golemis, E.A., Farley, J., and Wang, T. (2000). A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *The EMBO journal* 19, 6759-6769.
- Liu, X., Sun, Y., Constantinescu, S.N., Karam, E., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. (1997). Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10669-10674.
- Liu, X., Sun, Y., Weinberg, R.A., and Lodish, H.F. (2001). Ski/Sno and TGF-beta signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 12, 1-8.



- Lo, R.S., Chen, Y.G., Shi, Y., Pavletich, N.P., and Massague, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *The EMBO journal* 17, 996-1005.
- Lo, R.S., and Massague, J. (1999). Ubiquitin-dependent degradation of TGF-beta-activated smad2. *Nature cell biology* 1, 472-478.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *The Journal of biological chemistry* 277, 3176-3185.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Rosa, J.L., Bartrons, R., and Ventura, F. (2000). Interaction and functional cooperation of NF-kappa B with Smads. Transcriptional regulation of the junB promoter. *The Journal of biological chemistry* 275, 28937-28946.
- Lu, Z., Murray, J.T., Luo, W., Li, H., Wu, X., Xu, H., Backer, J.M., and Chen, Y.G. (2002). Transforming growth factor beta activates Smad2 in the absence of receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 29363-29368.
- Luo, K., Stroschein, S.L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., and Zhou, Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes & development* 13, 2196-2206.
- Lutz, M., and Knaus, P. (2002). Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cellular signalling* 14, 977-988.
- Ma, Z., Nie, Z., Luo, R., Casanova, J.E., and Ravichandran, K.S. (2007). Regulation of Arf6 and ACAP1 signaling by the PTB-domain-containing adaptor protein GULP. *Curr Biol* 17, 722-727.
- Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P., and Franco, M. (2004). The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *Journal of cell science* 117, 2389-2398.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, NY)* 298, 1912-1934.
- Martin, T.F. (2001). PI(4,5)P(2) regulation of surface membrane traffic. *Current opinion in cell biology* 13, 493-499.
- Martini, L., Masuda-Robens, J.M., Robertson, S.E., Santy, L.C., Casanova, J.E., and Chou, M.M. (2004). The TBC (Tre-2/Bub2/Cdc16) domain protein TRE17 regulates plasma membrane-endosomal trafficking through activation of Arf6. *Molecular and cellular biology* 24, 9752-9762.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry* 67, 753-791.
- Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230.
- Massague, J., and Chen, Y.G. (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes & development* 14, 627-644.
- Massague, J., and Gomis, R.R. (2006). The logic of TGFbeta signaling. *FEBS letters* 580, 2811-2820.
- Massague, J., Seoane, J., and Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & development* 19, 2783-2810.
- Massague, J., and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO journal* 19, 1745-1754.
- Masuyama, N., Hanafusa, H., Kusakabe, M., Shibuya, H., and Nishida, E. (1999). Identification of two Smad4 proteins in Xenopus. Their common and distinct properties. *The Journal of biological chemistry* 274, 12163-12170.
- Matsuura, I., Wang, G., He, D., and Liu, F. (2005). Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* 44, 12546-12553.
- Matsuzaki, T., Hanai, S., Kishi, H., Liu, Z., Bao, Y., Kikuchi, A., Tsuchida, K., and Sugino, H. (2002). Regulation of endocytosis of activin type II receptors by a novel PDZ protein through Ral/Ral-binding protein 1-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 277, 19008-19018.
- Maurice, D., Pierreux, C.E., Howell, M., Wilentz, R.E., Owen, M.J., and Hill, C.S. (2001). Loss of Smad4 function in pancreatic tumors: C-terminal truncation leads to decreased stability. *The Journal of biological chemistry* 276, 43175-43181.
- Mavrikakis, K.J., Andrew, R.L., Lee, K.L., Petropoulou, C., Dixon, J.E., Navaratnam, N., Norris, D.P., and Episkopou, V. (2007). Arkadia enhances Nodal/TGF-beta signaling by coupling phospho-Smad2/3 activity and turnover. *PLoS biology* 5, e67.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nature reviews* 5, 121-132.
- Medici, D., Hay, E.D., and Goodenough, D.A. (2006). Cooperation between snail and LEF-1 transcription factors is essential for TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecular biology of the cell* 17, 1871-1879.
- Melendez, A.J., Harnett, M.M., and Allen, J.M. (2001). Crosstalk between ARF6 and protein kinase Calpha in Fc(gamma)RI-mediated activation of phospholipase D1. *Curr Biol* 11, 869-874.



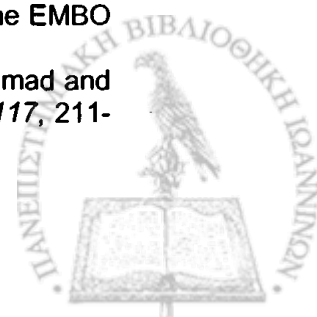
- Meyer, M.Z., Deliot, N., Chasserot-Golaz, S., Premont, R.T., Bader, M.F., and Vitale, N. (2006). Regulation of neuroendocrine exocytosis by the ARF6 GTPase-activating protein GIT1. *The Journal of biological chemistry* 281, 7919-7926.
- Michalopoulos, G.K., Bowen, W., Nussler, A.K., Becich, M.J., and Howard, T.A. (1993). Comparative analysis of mitogenic and morphogenic effects of HGF and EGF on rat and human hepatocytes maintained in collagen gels. *Journal of cellular physiology* 156, 443-452.
- Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J.I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J.L., *et al.* (2000). Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Molecular and cellular biology* 20, 9346-9355.
- Mori, S., Matsuzaki, K., Yoshida, K., Furukawa, F., Tahashi, Y., Yamagata, H., Sekimoto, G., Seki, T., Matsui, H., Nishizawa, M., *et al.* (2004). TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23, 7416-7429.
- Morishige, M., Hashimoto, S., Ogawa, E., Toda, Y., Kotani, H., Hirose, M., Wei, S., Hashimoto, A., Yamada, A., Yano, H., *et al.* (2008). GEP100 links epidermal growth factor receptor signalling to Arf6 activation to induce breast cancer invasion. *Nature cell biology* 10, 85-92.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2002). From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes & development* 16, 1867-1871.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *Journal of cell science* 118, 3573-3584.
- Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998). Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6733-6738.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C.H. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *Journal of cell science* 114, 4359-4369.
- Mueller, A.G., Joost, H.G., and Schurmann, A. (2002). Mouse ARF-related protein 1: genomic organization and analysis of its promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 292, 113-120.
- Mukherjee, S., Gurevich, V.V., Jones, J.C., Casanova, J.E., Frank, S.R., Maizels, E.T., Bader, M.F., Kahn, R.A., Palczewski, K., Aktories, K., *et al.* (2000). The ADP ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO promotes beta-arrestin release necessary for luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor desensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5901-5906.
- Mulder, K.M. (2000). Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine & growth factor reviews* 11, 23-35.
- Murtagh, J.J., Jr., Mowatt, M.R., Lee, C.M., Lee, F.J., Mishima, K., Nash, T.E., Moss, J., and Vaughan, M. (1992). Guanine nucleotide-binding proteins in the intestinal parasite *Giardia lamblia*. Isolation of a gene encoding an approximately 20-kDa ADP-ribosylation factor. *The Journal of biological chemistry* 267, 9654-9662.
- Naga Prasad, S.V., Laporte, S.A., Chamberlain, D., Caron, M.G., Barak, L., and Rockman, H.A. (2002). Phosphoinositide 3-kinase regulates beta2-adrenergic receptor endocytosis by AP-2 recruitment to the receptor/beta-arrestin complex. *The Journal of cell biology* 158, 563-575.
- Nagano, Y., Mavrikis, K.J., Lee, K.L., Fujii, T., Koinuma, D., Sase, H., Yuki, K., Isogaya, K., Saitoh, M., Imamura, T., *et al.* (2007). Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 20492-20501.
- Nagarajan, R.P., Zhang, J., Li, W., and Chen, Y. (1999). Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *The Journal of biological chemistry* 274, 33412-33418.
- Naslavsky, N., Weigert, R., and Donaldson, J.G. (2003). Convergence of non-clathrin- and clathrin-derived endosomes involves Arf6 inactivation and changes in phosphoinositides. *Molecular biology of the cell* 14, 417-431.
- Natsume, W., Tanabe, K., Kon, S., Yoshida, N., Watanabe, T., Torii, T., and Satake, M. (2006). SMAP2, a novel ARF GTPase-activating protein, interacts with clathrin and clathrin assembly protein and functions on the AP-1-positive early endosome/trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell* 17, 2592-2603.
- Nicol, R., and Stavnezer, E. (1998). Transcriptional repression by v-Ski and c-Ski mediated by a specific DNA binding site. *The Journal of biological chemistry* 273, 3588-3597.
- Nicolas, F.J., De Bosscher, K., Schmierer, B., and Hill, C.S. (2004). Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *Journal of cell science* 117, 4113-4125.
- Nie, Z., Fei, J., Premont, R.T., and Randazzo, P.A. (2005). The Arf GAPs AGAP1 and AGAP2 distinguish between the adaptor protein complexes AP-1 and AP-3. *Journal of cell science* 118, 3555-3566.

- Nie, Z., and Randazzo, P.A. (2006). Arf GAPs and membrane traffic. *Journal of cell science* 119, 1203-1211.
- Niedergang, F., Colucci-Guyon, E., Dubois, T., Raposo, G., and Chavrier, P. (2003). ADP ribosylation factor 6 is activated and controls membrane delivery during phagocytosis in macrophages. *The Journal of cell biology* 161, 1143-1150.
- Nishihara, A., Hanai, J.I., Okamoto, N., Yanagisawa, J., Kato, S., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1998). Role of p300, a transcriptional coactivator, in signalling of TGF-beta. *Genes Cells* 3, 613-623.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., and Petersen, N.O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cellular signalling* 16, 291-299.
- Nourry, C., Maksumova, L., Pang, M., Liu, X., and Wang, T. (2004). Direct interaction between Smad3, APC10, CDH1 and HEF1 in proteasomal degradation of HEF1. *BMC cell biology* 5, 20.
- Oft, M., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2002). Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nature cell biology* 4, 487-494.
- Ogunjimi, A.A., Briant, D.J., Pece-Barbara, N., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Seet, B.T., Sicheri, F., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Molecular cell* 19, 297-308.
- Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J., and Niehrs, C. (1999). Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* 401, 480-485.
- Otsuki, Y., Tanaka, M., Yoshii, S., Kawazoe, N., Nakaya, K., and Sugimura, H. (2001). Tumor metastasis suppressor nm23H1 regulates Rac1 GTPase by interaction with Tiam1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 4385-4390.
- Padron, D., Tall, R.D., and Roth, M.G. (2006). Phospholipase D2 is required for efficient endocytic recycling of transferrin receptors. *Molecular biology of the cell* 17, 598-606.
- Palacios, F., and D'Souza-Schorey, C. (2003). Modulation of Rac1 and ARF6 activation during epithelial cell scattering. *The Journal of biological chemistry* 278, 17395-17400.
- Palacios, F., Price, L., Schweitzer, J., Collard, J.G., and D'Souza-Schorey, C. (2001). An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *The EMBO journal* 20, 4973-4986.
- Palacios, F., Schweitzer, J.K., Boshans, R.L., and D'Souza-Schorey, C. (2002). ARF6-GTP recruits Nm23-H1 to facilitate dynamin-mediated endocytosis during adherens junctions disassembly. *Nature cell biology* 4, 929-936.
- Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., Kirchhausen, T., and Franco, M. (2005). The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *The Journal of biological chemistry* 280, 21661-21666.
- Pan, D., Estevez-Salmeron, L.D., Stroschein, S.L., Zhu, X., He, J., Zhou, S., and Luo, K. (2005). The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad proteins to repress signaling by the transforming growth factor-beta superfamily of cytokines. *The Journal of biological chemistry* 280, 15992-16001.
- Panopoulou, E., Gillooly, D.J., Wrana, J.L., Zerial, M., Stenmark, H., Murphy, C., and Fotsis, T. (2002a). Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 18046-18052.
- Panopoulou, E., Gillooly, D.J., Wrana, J.L., Zerial, M., Stenmark, H., Murphy, C., and Fotsis, T. (2002b). Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 18046-18052.
- Pardali, K., and Moustakas, A. (2007). Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1775, 21-62.
- Paris, S., Beraud-Dufour, S., Robineau, S., Bigay, J., Antony, B., Chabre, M., and Chardin, P. (1997). Role of protein-phospholipid interactions in the activation of ARF1 by the guanine nucleotide exchange factor Arno. *The Journal of biological chemistry* 272, 22221-22226.
- Pasqualato, S., Menetrey, J., Franco, M., and Cherfils, J. (2001). The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO reports* 2, 234-238.
- Pearson, K.L., Hunter, T., and Janknecht, R. (1999). Activation of Smad1-mediated transcription by p300/CBP. *Biochimica et biophysica acta* 1489, 354-364.
- Penheiter, S.G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Dore, J.J., Jr., and Leof, E.B. (2002). Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Molecular and cellular biology* 22, 4750-4759.
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C.H., Funa, K., and ten Dijke, P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS letters* 434, 83-87.



- Peters, P.J., Hsu, V.W., Ooi, C.E., Finazzi, D., Teal, S.B., Oorschot, V., Donaldson, J.G., and Klausner, R.D. (1995). Overexpression of wild-type and mutant ARF1 and ARF6: distinct perturbations of nonoverlapping membrane compartments. *The Journal of cell biology* 128, 1003-1017.
- Peters, P.J., Ning, K., Palacios, F., Boshans, R.L., Kazantsev, A., Thompson, L.M., Woodman, B., Bates, G.P., and D'Souza-Schorey, C. (2002). Arfaptin 2 regulates the aggregation of mutant huntingtin protein. *Nature cell biology* 4, 240-245.
- Petraglia, F., Vaughan, J., and Vale, W. (1989). Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5114-5117.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A., and Oft, M. (2000). TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes & development* 14, 3093-3101.
- Peyroche, A., Paris, S., and Jackson, C.L. (1996). Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* 384, 479-481.
- Pierreux, C.E., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. (2000). Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and cellular biology* 20, 9041-9054.
- Porat-Shliom, N., Kloog, Y., and Donaldson, J.G. (2008). A Unique Platform for H-Ras Signaling Involving Clathrin-independent Endocytosis. *Molecular biology of the cell* 19, 765-775.
- Pouponnot, C., Jayaraman, L., and Massague, J. (1998). Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *The Journal of biological chemistry* 273, 22865-22868.
- Powelka, A.M., Sun, J., Li, J., Gao, M., Shaw, L.M., Sonnenberg, A., and Hsu, V.W. (2004). Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5, 20-36.
- Powner, D.J., and Wakelam, M.J. (2002). The regulation of phospholipase D by inositol phospholipids and small GTPases. *FEBS letters* 531, 62-64.
- Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J.L., Pitcher, J.A., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M., and Lefkowitz, R.J. (1998). beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14082-14087.
- Premont, R.T., Perry, S.J., Schmalzigaug, R., Roseman, J.T., Xing, Y., and Claing, A. (2004). The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cellular signalling* 16, 1001-1011.
- Prigent, M., Dubois, T., Raposo, G., Derrien, V., Tenza, D., Rosse, C., Camonis, J., and Chavrier, P. (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *The Journal of cell biology* 163, 1111-1121.
- Puceat, M. (2007). TGFbeta in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovascular research* 74, 256-261.
- Qin, B.Y., Chacko, B.M., Lam, S.S., de Caestecker, M.P., Correia, J.J., and Lin, K. (2001). Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Molecular cell* 8, 1303-1312.
- Qing, J., Zhang, Y., and Derynck, R. (2000). Structural and functional characterization of the transforming growth factor-beta -induced Smad3/c-Jun transcriptional cooperativity. *The Journal of biological chemistry* 275, 38802-38812.
- Qiu, W., Schonleben, F., Li, X., and Su, G.H. (2007). Disruption of transforming growth factor beta-Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4. *Cancer letters* 245, 163-170.
- Raaijmakers, J.H., Deneubourg, L., Rehmann, H., de Koning, J., Zhang, Z., Krugmann, S., Erneux, C., and Bos, J.L. (2007). The PI3K effector Arap3 interacts with the PI(3,4,5)P3 phosphatase SHIP2 in a SAM domain-dependent manner. *Cellular signalling* 19, 1249-1257.
- Radhakrishna, H., Al-Awar, O., Khachikian, Z., and Donaldson, J.G. (1999). ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. *Journal of cell science* 112 (Pt 6), 855-866.
- Radhakrishna, H., and Donaldson, J.G. (1997). ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. *The Journal of cell biology* 139, 49-61.
- Radhakrishna, H., Klausner, R.D., and Donaldson, J.G. (1996). Aluminum fluoride stimulates surface protrusions in cells overexpressing the ARF6 GTPase. *The Journal of cell biology* 134, 935-947.
- Rahimi, R.A., and Leof, E.B. (2007). TGF-beta signaling: a tale of two responses. *Journal of cellular biochemistry* 102, 593-608.

- Randall, R.A., Germain, S., Inman, G.J., Bates, P.A., and Hill, C.S. (2002). Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *The EMBO journal* 21, 145-156.
- Randall, R.A., Howell, M., Page, C.S., Daly, A., Bates, P.A., and Hill, C.S. (2004). Recognition of phosphorylated-Smad2-containing complexes by a novel Smad interaction motif. *Molecular and cellular biology* 24, 1106-1121.
- Randazzo, P.A., and Hirsch, D.S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cellular signalling* 16, 401-413.
- Razani, B., Zhang, X.L., Bitzer, M., von Gersdorff, G., Bottinger, E.P., and Lisanti, M.P. (2001). Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *The Journal of biological chemistry* 276, 6727-6738.
- Remy, I., Montmarquette, A., and Michnick, S.W. (2004). PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nature cell biology* 6, 358-365.
- Ribas, C., Penela, P., Murga, C., Salcedo, A., Garcia-Hoz, C., Jurado-Pueyo, M., Aymerich, I., and Mayor, F., Jr. (2007). The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. *Biochimica et biophysica acta* 1768, 913-922.
- Riley, K.N., Maldonado, A.E., Tellier, P., D'Souza-Schorey, C., and Herman, I.M. (2003). Betacap73-ARF6 interactions modulate cell shape and motility after injury in vitro. *Molecular biology of the cell* 14, 4155-4161.
- Roberts, A.B., and Derynck, R. (2001). Meeting report: signaling schemes for TGF-beta. *Sci STKE* 2001, PE43.
- Roelen, B.A., Cohen, O.S., Raychowdhury, M.K., Chadee, D.N., Zhang, Y., Kyriakis, J.M., Alessandrini, A.A., and Lin, H.Y. (2003). Phosphorylation of threonine 276 in Smad4 is involved in transforming growth factor-beta-induced nuclear accumulation. *American journal of physiology* 285, C823-830.
- Ross, S., Cheung, E., Petrakis, T.G., Howell, M., Kraus, W.L., and Hill, C.S. (2006). Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *The EMBO journal* 25, 4490-4502.
- Ross, S., and Hill, C.S. (2008). How the Smads regulate transcription. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 383-408.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., and Anderson, R.G. (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Sanchez, A., Alvarez, A.M., Lopez Pedrosa, J.M., Roncero, C., Benito, M., and Fabregat, I. (1999). Apoptotic response to TGF-beta in fetal hepatocytes depends upon their state of differentiation. *Experimental cell research* 252, 281-291.
- Santy, L.C., and Casanova, J.E. (2001). Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. *The Journal of cell biology* 154, 599-610.
- Santy, L.C., Ravichandran, K.S., and Casanova, J.E. (2005). The DOCK180/Elmo complex couples ARNO-mediated Arf6 activation to the downstream activation of Rac1. *Curr Biol* 15, 1749-1754.
- Sasaki, A., Masuda, Y., Ohta, Y., Ikeda, K., and Watanabe, K. (2001). Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 17871-17877.
- Scherer, A., and Graff, J.M. (2000). Calmodulin differentially modulates Smad1 and Smad2 signaling. *The Journal of biological chemistry* 275, 41430-41438.
- Schmierer, B., and Hill, C.S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nature reviews* 8, 970-982.
- Schultz-Cherry, S., Ribeiro, S., Gentry, L., and Murphy-Ullrich, J.E. (1994). Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *The Journal of biological chemistry* 269, 26775-26782.
- Selvamurugan, N., Kwok, S., and Partridge, N.C. (2004). Smad3 interacts with JunB and Cbfa1/Runx2 for transforming growth factor-beta1-stimulated collagenase-3 expression in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 279, 27764-27773.
- Seo, S.R., Lallemand, F., Ferrand, N., Pessah, M., L'Hoste, S., Camonis, J., and Atfi, A. (2004). The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *The EMBO journal* 23, 3780-3792.
- Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A., and Massague, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 117, 211-223.

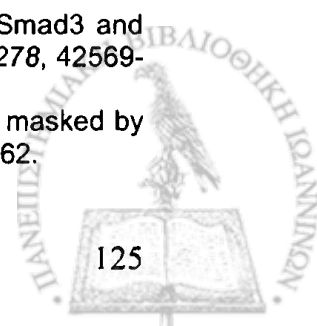


- Seto, E.S., Bellen, H.J., and Lloyd, T.E. (2002). When cell biology meets development: endocytic regulation of signaling pathways. *Genes & development* 16, 1314-1336.
- Shen, X., Hu, P.P., Liberati, N.T., Datto, M.B., Frederick, J.P., and Wang, X.F. (1998). TGF-beta-induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. *Molecular biology of the cell* 9, 3309-3319.
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., and Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *The Journal of cell biology* 164, 291-300.
- Shi, Y., Hata, A., Lo, R.S., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1997). A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388, 87-93.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700.
- Shi, Y., Wang, Y.F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., and Pavletich, N.P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585-594.
- Shin, O.H., Couvillon, A.D., and Exton, J.H. (2001). Arfophilin is a common target of both class II and class III ADP-ribosylation factors. *Biochemistry* 40, 10846-10852.
- Shin, O.H., and Exton, J.H. (2001). Differential binding of arfaptin 2/POR1 to ADP-ribosylation factors and Rac1. *Biochemical and biophysical research communications* 285, 1267-1273.
- Shioda, T., Lechleider, R.J., Dunwoodie, S.L., Li, H., Yahata, T., de Caestecker, M.P., Fenner, M.H., Roberts, A.B., and Issebacher, K.J. (1998). Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9785-9790.
- Shoji, H., Tsuchida, K., Kishi, H., Yamakawa, N., Matsuzaki, T., Liu, Z., Nakamura, T., and Sugino, H. (2000). Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors. *The Journal of biological chemistry* 275, 5485-5492.
- Siegel, P.M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-821.
- Song, K., Wang, H., Krebs, T.L., and Danielpour, D. (2006). Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *The EMBO journal* 25, 58-69.
- Sosa-Pineda, B., Wigle, J.T., and Oliver, G. (2000). Hepatocyte migration during liver development requires Prox1. *Nature genetics* 25, 254-255.
- Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engstrom, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., and Heldin, C.H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* 272, 28107-28115.
- Stroschein, S.L., Bonni, S., Wrana, J.L., and Luo, K. (2001). Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes & development* 15, 2822-2836.
- Stroschein, S.L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., and Luo, K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science (New York, NY)* 286, 771-774.
- Su, Y., Zhang, L., Gao, X., Meng, F., Wen, J., Zhou, H., Meng, A., and Chen, Y.G. (2007). The evolutionally conserved activity of Dapper2 in antagonizing TGF-beta signaling. *Faseb J* 21, 682-690.
- Sun, P.D., and Davies, D.R. (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 24, 269-291.
- Sun, Y., Liu, X., Eaton, E.N., Lane, W.S., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. (1999a). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Molecular cell* 4, 499-509.
- Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H.F., and Weinberg, R.A. (1999b). SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12442-12447.
- Suzuki, T., Kanai, Y., Hara, T., Sasaki, J., Sasaki, T., Kohara, M., Maehama, T., Taya, C., Shitara, H., Yonekawa, H., *et al.* (2006). Crucial role of the small GTPase ARF6 in hepatic cord formation during liver development. *Molecular and cellular biology* 26, 6149-6156.
- Tada, K., Inoue, H., Ebisawa, T., Makuuchi, M., Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1999). Region between alpha-helices 3 and 4 of the mad homology 2 domain of Smad4: functional roles in oligomer formation and transcriptional activation. *Genes Cells* 4, 731-741.
- Tague, S.E., Muralidharan, V., and D'Souza-Schorey, C. (2004). ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9671-9676.
- Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K., and Nakayama, K. (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *The Biochemical journal* 365, 369-378.

- Tanabe, K., Kon, S., Ichijo, N., Funaki, T., Natsume, W., Watanabe, T., and Satake, M. (2008). A SMAP gene family encoding ARF GTPase-activating proteins and its implication in membrane trafficking. *Methods in enzymology* 438, 155-170.
- Tanabe, K., Kon, S., Natsume, W., Torii, T., Watanabe, T., and Satake, M. (2006). Involvement of a novel ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer science* 97, 801-806.
- Tanabe, K., Torii, T., Natsume, W., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., and Satake, M. (2005). A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Molecular biology of the cell* 16, 1617-1628.
- Tang, Y., Katuri, V., Dillner, A., Mishra, B., Deng, C.X., and Mishra, L. (2003). Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science (New York, NY)* 299, 574-577.
- Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of cellular physiology* 191, 1-16.
- ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends in biochemical sciences* 29, 265-273.
- Thacker, E., Kearns, B., Chapman, C., Hammond, J., Howell, A., and Theibert, A. (2004). The arf6 GAP centaurin alpha-1 is a neuronal actin-binding protein which also functions via GAP-independent activity to regulate the actin cytoskeleton. *European journal of cell biology* 83, 541-554.
- Topper, J.N., DiChiara, M.R., Brown, J.D., Williams, A.J., Falb, D., Collins, T., and Gimbrone, M.A., Jr. (1998). CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9506-9511.
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Matsuzaki, T., Yamakawa, N., Liu, Z., Bao, Y., Arai, K.Y., Murakami, T., Takehara, Y., Kurisaki, A., *et al.* (2004). Novel factors in regulation of activin signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 225, 1-8.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-791.
- Uchida, H., Kondo, A., Yoshimura, Y., Mazaki, Y., and Sabe, H. (2001). PAG3/Papalpha/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *The Journal of experimental medicine* 193, 955-966.
- Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2005). TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Molecular biology of the cell* 16, 1987-2002.
- Valderrama, F., and Ridley, A.J. (2008). Getting invasive with GEP100 and Arf6. *Nature cell biology* 10, 16-18.
- Valdimarsdottir, G., and Mummery, C. (2005). Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells. *Apmis* 113, 773-789.
- Venkateswarlu, K., Brandom, K.G., and Lawrence, J.L. (2004). Centaurin-alpha1 is an in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent GTPase-activating protein for ARF6 that is involved in actin cytoskeleton organization. *The Journal of biological chemistry* 279, 6205-6208.
- Venkateswarlu, K., Brandom, K.G., and Yun, H. (2007). PI-3-kinase-dependent membrane recruitment of centaurin-alpha2 is essential for its effect on ARF6-mediated actin cytoskeleton reorganization. *Journal of cell science* 120, 792-801.
- Venkateswarlu, K., and Cullen, P.J. (2000). Signalling via ADP-ribosylation factor 6 lies downstream of phosphatidylinositide 3-kinase. *The Biochemical journal* 345 Pt 3, 719-724.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavare, J.M., and Cullen, P.J. (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol* 8, 463-466.
- Verrecchia, F., Vindevoghel, L., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B., and Mauviel, A. (2001). Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* 20, 3332-3340.
- Vindevoghel, L., Kon, A., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B., and Mauviel, A. (1998). Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 273, 13053-13057.
- Vitale, N., Mawet, J., Camonis, J., Regazzi, R., Bader, M.F., and Chasserot-Golaz, S. (2005). The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *The Journal of biological chemistry* 280, 29921-29928.



- Vitale, N., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R.J., and Premont, R.T. (2000). GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *The Journal of biological chemistry* 275, 13901-13906.
- Wan, M., Tang, Y., Tytler, E.M., Lu, C., Jin, B., Vickers, S.M., Yang, L., Shi, X., and Cao, X. (2004). Smad4 protein stability is regulated by ubiquitin ligase SCF beta-TrCP1. *The Journal of biological chemistry* 279, 14484-14487.
- Warner, D.R., Pisano, M.M., Roberts, E.A., and Greene, R.M. (2003). Identification of three novel Smad binding proteins involved in cell polarity. *FEBS letters* 539, 167-173.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO reports* 1, 176-182.
- Weigert, R., and Donaldson, J.G. (2005). Fluorescent microscopy-based assays to study the role of Rab22a in clathrin-independent endocytosis. *Methods in enzymology* 403, 243-253.
- Wenk, M.R., and De Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8262-8269.
- Wilkes, M.C., Murphy, S.J., Garamszegi, N., and Leof, E.B. (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Molecular and cellular biology* 23, 8878-8889.
- Wong, C., Rougier-Chapman, E.M., Frederick, J.P., Datto, M.B., Liberati, N.T., Li, J.M., and Wang, X.F. (1999). Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Molecular and cellular biology* 19, 1821-1830.
- Wong, K.W., and Isberg, R.R. (2003). Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake. *The Journal of experimental medicine* 198, 603-614.
- Wotton, D., Knoepfler, P.S., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Massague, J. (2001). The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 12, 457-463.
- Wotton, D., Lo, R.S., Lee, S., and Massague, J. (1999). A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97, 29-39.
- Wotton, D., and Massague, J. (2001). Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Current topics in microbiology and immunology* 254, 145-164.
- Wrana, J.L. (2002). Phosphoserine-dependent regulation of protein-protein interactions in the Smad pathway. *Structure* 10, 5-7.
- Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massague, J., and Shi, Y. (2000). Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science (New York, NY)* 287, 92-97.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., *et al.* (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Molecular cell* 8, 1277-1289.
- Wurthner, J.U., Frank, D.B., Felici, A., Green, H.M., Cao, Z., Schneider, M.D., McNally, J.G., Lechleider, R.J., and Roberts, A.B. (2001). Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *The Journal of biological chemistry* 276, 19495-19502.
- Xiao, Z., Latek, R., and Lodish, H.F. (2003). An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* 22, 1057-1069.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2000a). A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7853-7858.
- Xiao, Z., Liu, X., and Lodish, H.F. (2000b). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *The Journal of biological chemistry* 275, 23425-23428.
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C., and Lodish, H.F. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *The Journal of biological chemistry* 276, 39404-39410.
- Xin, H., Xu, X., Li, L., Ning, H., Rong, Y., Shang, Y., Wang, Y., Fu, X.Y., and Chang, Z. (2005). CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor-beta signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry* 280, 20842-20850.
- Xu, L., Alarcon, C., Col, S., and Massague, J. (2003). Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *The Journal of biological chemistry* 278, 42569-42577.
- Xu, L., Chen, Y.G., and Massague, J. (2000). The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nature cell biology* 2, 559-562.



- Tanabe, K., Kon, S., Ichijo, N., Funaki, T., Natsume, W., Watanabe, T., and Satake, M. (2008). A SMAP gene family encoding ARF GTPase-activating proteins and its implication in membrane trafficking. *Methods in enzymology* 438, 155-170.
- Tanabe, K., Kon, S., Natsume, W., Torii, T., Watanabe, T., and Satake, M. (2006). Involvement of a novel ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein, SMAP, in membrane trafficking: implications in cancer cell biology. *Cancer science* 97, 801-806.
- Tanabe, K., Torii, T., Natsume, W., Braesch-Andersen, S., Watanabe, T., and Satake, M. (2005). A novel GTPase-activating protein for ARF6 directly interacts with clathrin and regulates clathrin-dependent endocytosis. *Molecular biology of the cell* 16, 1617-1628.
- Tang, Y., Katuri, V., Dillner, A., Mishra, B., Deng, C.X., and Mishra, L. (2003). Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science (New York, NY)* 299, 574-577.
- Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of cellular physiology* 191, 1-16.
- ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004). New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends in biochemical sciences* 29, 265-273.
- Thacker, E., Kearns, B., Chapman, C., Hammond, J., Howell, A., and Theibert, A. (2004). The arf6 GAP centaurin alpha-1 is a neuronal actin-binding protein which also functions via GAP-independent activity to regulate the actin cytoskeleton. *European journal of cell biology* 83, 541-554.
- Topper, J.N., DiChiara, M.R., Brown, J.D., Williams, A.J., Falb, D., Collins, T., and Gimbrone, M.A., Jr. (1998). CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 9506-9511.
- Tsuchida, K., Nakatani, M., Matsuzaki, T., Yamakawa, N., Liu, Z., Bao, Y., Arai, K.Y., Murakami, T., Takehara, Y., Kurisaki, A., *et al.* (2004). Novel factors in regulation of activin signaling. *Molecular and cellular endocrinology* 225, 1-8.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., and Wrana, J.L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-791.
- Uchida, H., Kondo, A., Yoshimura, Y., Mazaki, Y., and Sabe, H. (2001). PAG3/Papalpha/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fc gamma receptor-mediated phagocytosis of macrophages. *The Journal of experimental medicine* 193, 955-966.
- Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2005). TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Molecular biology of the cell* 16, 1987-2002.
- Valderrama, F., and Ridley, A.J. (2008). Getting invasive with GEP100 and Arf6. *Nature cell biology* 10, 16-18.
- Valdimarsdottir, G., and Mummery, C. (2005). Functions of the TGFbeta superfamily in human embryonic stem cells. *Apmis* 113, 773-789.
- Venkateswarlu, K., Brandom, K.G., and Lawrence, J.L. (2004). Centaurin-alpha1 is an in vivo phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent GTPase-activating protein for ARF6 that is involved in actin cytoskeleton organization. *The Journal of biological chemistry* 279, 6205-6208.
- Venkateswarlu, K., Brandom, K.G., and Yun, H. (2007). PI-3-kinase-dependent membrane recruitment of centaurin-alpha2 is essential for its effect on ARF6-mediated actin cytoskeleton reorganization. *Journal of cell science* 120, 792-801.
- Venkateswarlu, K., and Cullen, P.J. (2000). Signalling via ADP-ribosylation factor 6 lies downstream of phosphatidylinositide 3-kinase. *The Biochemical journal* 345 Pt 3, 719-724.
- Venkateswarlu, K., Oatey, P.B., Tavare, J.M., and Cullen, P.J. (1998). Insulin-dependent translocation of ARNO to the plasma membrane of adipocytes requires phosphatidylinositol 3-kinase. *Curr Biol* 8, 463-466.
- Verrecchia, F., Vindevoghel, L., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B., and Mauviel, A. (2001). Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. *Oncogene* 20, 3332-3340.
- Vindevoghel, L., Kon, A., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B., and Mauviel, A. (1998). Smad-dependent transcriptional activation of human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor-beta. *The Journal of biological chemistry* 273, 13053-13057.
- Vitale, N., Mawet, J., Camonis, J., Regazzi, R., Bader, M.F., and Chasserot-Golaz, S. (2005). The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *The Journal of biological chemistry* 280, 29921-29928.



- Vitale, N., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M., Lefkowitz, R.J., and Premont, R.T. (2000). GIT proteins, A novel family of phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-stimulated GTPase-activating proteins for ARF6. *The Journal of biological chemistry* 275, 13901-13906.
- Wan, M., Tang, Y., Tytler, E.M., Lu, C., Jin, B., Vickers, S.M., Yang, L., Shi, X., and Cao, X. (2004). Smad4 protein stability is regulated by ubiquitin ligase SCF beta-TrCP1. *The Journal of biological chemistry* 279, 14484-14487.
- Warner, D.R., Pisano, M.M., Roberts, E.A., and Greene, R.M. (2003). Identification of three novel Smad binding proteins involved in cell polarity. *FEBS letters* 539, 167-173.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO reports* 1, 176-182.
- Weigert, R., and Donaldson, J.G. (2005). Fluorescent microscopy-based assays to study the role of Rab22a in clathrin-independent endocytosis. *Methods in enzymology* 403, 243-253.
- Wenk, M.R., and De Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8262-8269.
- Wilkes, M.C., Murphy, S.J., Garamszegi, N., and Leof, E.B. (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Molecular and cellular biology* 23, 8878-8889.
- Wong, C., Rougier-Chapman, E.M., Frederick, J.P., Datto, M.B., Liberati, N.T., Li, J.M., and Wang, X.F. (1999). Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Molecular and cellular biology* 19, 1821-1830.
- Wong, K.W., and Isberg, R.R. (2003). Arf6 and phosphoinositol-4-phosphate-5-kinase activities permit bypass of the Rac1 requirement for beta1 integrin-mediated bacterial uptake. *The Journal of experimental medicine* 198, 603-614.
- Wotton, D., Knoepfler, P.S., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Massague, J. (2001). The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 12, 457-463.
- Wotton, D., Lo, R.S., Lee, S., and Massague, J. (1999). A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97, 29-39.
- Wotton, D., and Massague, J. (2001). Smad transcriptional corepressors in TGF beta family signaling. *Current topics in microbiology and immunology* 254, 145-164.
- Wrana, J.L. (2002). Phosphoserine-dependent regulation of protein-protein interactions in the Smad pathway. *Structure* 10, 5-7.
- Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massague, J., and Shi, Y. (2000). Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science (New York, NY)* 287, 92-97.
- Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., et al. (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Molecular cell* 8, 1277-1289.
- Wurthner, J.U., Frank, D.B., Felici, A., Green, H.M., Cao, Z., Schneider, M.D., McNally, J.G., Lechleider, R.J., and Roberts, A.B. (2001). Transforming growth factor-beta receptor-associated protein 1 is a Smad4 chaperone. *The Journal of biological chemistry* 276, 19495-19502.
- Xiao, Z., Latek, R., and Lodish, H.F. (2003). An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* 22, 1057-1069.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2000a). A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7853-7858.
- Xiao, Z., Liu, X., and Lodish, H.F. (2000b). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *The Journal of biological chemistry* 275, 23425-23428.
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C., and Lodish, H.F. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *The Journal of biological chemistry* 276, 39404-39410.
- Xin, H., Xu, X., Li, L., Ning, H., Rong, Y., Shang, Y., Wang, Y., Fu, X.Y., and Chang, Z. (2005). CHIP controls the sensitivity of transforming growth factor-beta signaling by modulating the basal level of Smad3 through ubiquitin-mediated degradation. *The Journal of biological chemistry* 280, 20842-20850.
- Xu, L., Alarcon, C., Col, S., and Massague, J. (2003). Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *The Journal of biological chemistry* 278, 42569-42577.
- Xu, L., Chen, Y.G., and Massague, J. (2000). The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nature cell biology* 2, 559-562.

- Xu, L., Kang, Y., Col, S., and Massague, J. (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Molecular cell* 10, 271-282.
- Xu, L., Yao, X., Chen, X., Lu, P., Zhang, B., and Ip, Y.T. (2007). Msk is required for nuclear import of TGF-(beta)/BMP-activated Smads. *The Journal of cell biology* 178, 981-994.
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M., and Miyazono, K. (1999). Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *The Journal of biological chemistry* 274, 703-709.
- Yahata, T., de Caestecker, M.P., Lechleider, R.J., Andriole, S., Roberts, A.B., Isselbacher, K.J., and Shioda, T. (2000). The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors. *The Journal of biological chemistry* 275, 8825-8834.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science (New York, NY)* 270, 2008-2011.
- Yamakawa, N., Tsuchida, K., and Sugino, H. (2002). The rasGAP-binding protein, Dok-1, mediates activin signaling via serine/threonine kinase receptors. *The EMBO journal* 21, 1684-1694.
- Yao, D., Ehrlich, M., Henis, Y.I., and Leof, E.B. (2002). Transforming growth factor-beta receptors interact with AP2 by direct binding to beta2 subunit. *Molecular biology of the cell* 13, 4001-4012.
- Yau, D.M., Sethakorn, N., Taurin, S., Kregel, S., Sandbo, N., Camoretti-Mercado, B., Sperling, A.I., and Dulin, N.O. (2008). Regulation of Smad-mediated gene transcription by RGS3. *Molecular pharmacology* 73, 1356-1361.
- Yin, H.L., and Janmey, P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annual review of physiology* 65, 761-789.
- Ying, S.Y. (1988). Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine reviews* 9, 267-293.
- Yingling, J.M., Datto, M.B., Wong, C., Frederick, J.P., Liberati, N.T., and Wang, X.F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Molecular and cellular biology* 17, 7019-7028.
- Yoon, H.Y., Miura, K., Cuthbert, E.J., Davis, K.K., Ahvazi, B., Casanova, J.E., and Randazzo, P.A. (2006). ARAP2 effects on the actin cytoskeleton are dependent on Arf6-specific GTPase-activating-protein activity and binding to RhoA-GTP. *Journal of cell science* 119, 4650-4666.
- Yue, J., and Mulder, K.M. (2000). Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 275, 30765-30773.
- Zawel, L., Dai, J.L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Kern, S.E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Molecular cell* 1, 611-617.
- Zhang, Q., Cox, D., Tseng, C.C., Donaldson, J.G., and Greenberg, S. (1998a). A requirement for ARF6 in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *The Journal of biological chemistry* 273, 19977-19981.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A., and Derynck, R. (2001). Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 974-979.
- Zhang, Y., Feng, X.H., and Derynck, R. (1998b). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription. *Nature* 394, 909-913.
- Zhou, Y., Scolavino, S., Funderburk, S.F., Ficociello, L.F., Zhang, X., and Klibanski, A. (2004). Receptor internalization-independent activation of Smad2 in activin signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 18, 1818-1826.
- Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., and Thomsen, G.H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* 400, 687-693.
- Zhu, S., Wang, W., Clarke, D.C., and Liu, X. (2007). Activation of Mps1 promotes transforming growth factor-beta-independent Smad signaling. *The Journal of biological chemistry* 282, 18327-18338.
- Zimmerman, C.M., Kariapper, M.S., and Mathews, L.S. (1998). Smad proteins physically interact with calmodulin. *The Journal of biological chemistry* 273, 677-680.
- Zwaagstra, J.C., Kassam, Z., and O'Connor-Mccourt, M.D. (1999). Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors: cooperativity between the types I, II, and III receptors and modulation at the cell surface. *Experimental cell research* 252, 352-362.



SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1 SMAD2	467	2 SMAD3	425	92
1 SMAD2	467	3 SMAD4	552	38
2 SMAD3	425	3 SMAD4	552	41

SMAD2	MSSI-LPFTPPVVKRLLGWKSAGGSGGAGGGEQNGQEERKICEKAVKSLVKKLR-KTGRL	58
SMAD3	MSSI-LPFTPPVVKRLLGWCK-----GEQNGQEERKICEKAVKSLVKKLR-KTGRL	48
SMAD4	MDNMSITNTPTSNDACLSIVHS-----LMCHRQGGSETFAKRAIESLVKLRKEKDEL	54
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	DELEKAITTQNCN-TKCVTIPSTCSEIWGLSTPNTIDQMDTTGLYSFSEQTRSLDGRLQV	117
SMAD3	DELEKAITTQNVN-TKCVTIP-----RSLDGRLQV	77
SMAD4	DSLITAITTNGAHPKCVTIQ-----RTL DGRLQV	84
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	SHRKGPHVIYICRLWRWPDLSHHELEKAIENCEYAFNLKKDEVCVNPYHYQRVE TPVLP	177
SMAD3	SHRKGPHVIYICRLWRWPDLSHHELEKAIENCEYAFNLKKDEVCVNPYHYQRVE TPVLP	137
SMAD4	AGRKGFPHVIYARLWRWPDLSHHELEKAIENCEYAFNLKKDEVCVNPYHYQRVE TPVLP	143
	: *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	VLVPRHTEILTELPPLDQYTHSIP-----	201
SMAD3	VLVPRHTEIPAEFPPLDQYTHSIP-----	161
SMAD4	SGLTLQSNAPSMNVKDEYVHDFEGQPSLSTEGHSIQTIQHPPSNRASTETYSTPALLAP	203
	: : : : : : *.: : *.: : *	
SMAD2	-----ENTNFP-----AGIEPQSNY-----IPETPPPG-----YISE	228
SMAD3	-----ENTNFP-----AGIEPQSN-----IPE T P P P G-----YLSE	187
SMAD4	SESNATSTANFNPIMPVASTSQPASILGGSHSEGLLQIASGPPGQQQNGFTGQPATYHNM	263
	: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	DGETSD-----QQLNQSMDTGSPAELSPTTLSPVNHSLDLQP--VTYSEPAFW	274
SMAD3	DGETSD-----HQMNHSMOAGSP-NLSPNPMSPAHNNL DLQP--VTYCEPAFW	232
SMAD4	STTTWTGSR TAPYTPNLPHIQMGHLQHHPMPHPGHYWPVHNE LAFQPPISNHPAPEYW	323
	: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	CSIAYYELNQRVGETTFHASQ--PSLTVDGF TDP SNSERFCLGLLSNVNRNATVEMTRRHI	332
SMAD3	CSISYYELNQRVGETTFHASQ--PSMTVDGF TDP SNSERFCLGLLSNVNRNAAVEL TRRHI	290
SMAD4	CSIAYFEMDQVQGETTFKVPSSCPIVTVDGYVDP SGGDRFCLGQLSNVHRTEAIERARLHI	383
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	GRGVRLYYIG-GEVFAECLSDSAIFVQSPNCNQRYGWHP-ATVCKIPPGCNLKIFNN---	387
SMAD3	GRGVRLYYIG-GEVFAECLSDSAIFVQSPNCNQRYGWHP-ATVCKIPPGCNLKIFNN---	345
SMAD4	GKGVQLCKEGEDVWRVRLSDHIAVFVQSYL DREAGRAPGDAVHKIYPSAYIKVFDLRQC	443
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	-----QEFAALLAQSVNQGF EA-----VYQLTRMCTIRM	416
SMAD3	-----QEFAALLAQSVNQGF EA-----VYQLTRMCTIRM	374
SMAD4	HRQMQQQAATAAATAAAAVAGNIPGPGSVGGIAPAISLSAAAGIYVDDLRLCILRN	503
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	
SMAD2	SFVKMGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVL TQMGSPSVRCSSMS	467
SMAD3	SFVKMGAEYRRQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVL TQMGSPSIRCSSVS	425
SMAD4	SFVKMGDPYRQSIKETPCWIEIHLHRLALQLLDEVLHTM--PIADPQPLD--	552
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	

Γ. Σύγκριση καρβοξυτελικών τμημάτων των SMAD πρωτεϊνών (αναφέρεται στο Κεφ. 3.6 των Αποτελεσμάτων και στη Συζήτηση)

SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1 SMAD2	40	2 SMAD3	40	95
1 SMAD2	40	3 SMAD4	40	42
2 SMAD3	40	3 SMAD4	40	42

SMAD2	--RQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVL TQMGSPSVRCSSMS	40
SMAD3	--RQTVTSTPCWIELHLNGPLQWLDKVL TQMGSPSIRCSSVS	40
SMAD4	YPRQSIKETPCWIEIHLHRLALQLLDEVLHTM--PIADPQPLD	40
	*.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *.: : *	



SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1 SMAD2	40	2 SMAD4	40	42

SMAD2 --RQTVTSTPCWIELHLNGPLQWL DKVL TQMGSPSVRCSSMS 40
SMAD4 YPRQSIKETPCWIEIHLHRAQLLDEVLHTM--PIADPQPLD 40
 ::..***::: .** **:* * *

SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score
1 SMAD3	40	2 SMAD4	40	42

SMAD3 --RQTVTSTPCWIELHLNGPLQWL DKVL TQMGSPSIRCSSVS 40
SMAD4 YPRQSIKETPCWIEIHLHRAQLLDEVLHTM--PIADPQPLD 40
 ::..***::: .** **:* * *

