



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

**Πρωτογενείς κροσσοί και το αναπτυξιακό  
μονοπάτι Hedgehog: ο ρόλος των  
φαρμακολογικών αναστολέων της  
ογκοπρωτεΐνης SET/I2PP2A**

**ΚΛΗΜΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ**

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

---

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το χρονικό διάστημα 2017-2018, στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Ειδίκευσης με τίτλο «Βιοτεχνολογία».

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Κα Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου της. Χάρη σε αυτήν έμαθα πολύ παραπάνω από ότι περίμενα, σε επιστημονικό και όχι μόνο επίπεδο. Ήτανε πάντα πρόθυμη να συζητήσουμε τον κάθε μου προβληματισμό και την ευχαριστώ ιδιαιτέρως για την εμπιστοσύνη που είχε σε εμένα. Από το εργαστήριο αυτό έμαθα μέσα από αποτυχίες, επιτυχίες και πολλές αναζητήσεις να μην τα παρατάω και πως η υπομονή και η επιμονή είναι σύμμαχοι στην προσωπική μου εξέλιξη.

Οφείλω να ευχαριστήσω την διδάκτορα Ηλιάννα Σερίφη, η οποία στάθηκε δίπλα μου μέχρι το τέλος και θυσίασε πολύ από τον προσωπικό της χρόνο για εμένα. Με συμβούλευε και με βοηθούσε σαν να ήταν αδελφή μου και δεν θα ξεχάσω ποτέ το πόσο μου στάθηκε και το πόσα πολλά έμαθα δίπλα της.

Ευχαριστώ επίσης την Δρ. Ζωή Καρέτσου για τη βοήθεια που μου παρείχε και για το ειλικρινές ενδιαφέρον της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κατερίνα Σουψανά για τη συνεισφορά της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων των qPCR, αλλά και για τις συμβουλές που μου έδωσε σε διάφορες άλλες τεχνικές.

Θα ήθελα ακόμη, να ευχαριστήσω τα μέλη των υπόλοιπων εργαστηρίων στον τομέα Βιολογικής Χημείας για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ οφείλω να το εκφράσω στην οικογένειά μου και στα αγαπημένα μου πρόσωπα για την υποστήριξή τους τόσα χρόνια, διότι χωρίς αυτούς δεν θα μπορούσα να προχωρήσω και να εξελιχθώ. Είναι η δύναμή μου και ο λόγος που συνεχίζω να προχωρώ.

Σας ευχαριστώ όλους...

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

---

<b>ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....</b>	<b>-3-</b>
<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>-5-</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>-7-</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>-9-</b>
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>-10-</b>
<b>1. Πρωτογενείς κροσσοί.....</b>	<b>-10-</b>
1.1 Γενικά.....	-10-
1.2 Κροσσογένεση.....	-11-
<b>2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog.....</b>	<b>-15-</b>
2.1 Γενικά.....	-15-
2.2 Η μεταγωγή σήματος Hedgehog στα σπονδυλωτά.....	-16-
2.3 Χημική επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog.....	-18-
2.4 Ο ρόλος της φωσφατάσης PP2A στο μονοπάτι Hedgehog.....	-20-
<b>3. Η φωσφατάση PP2A.....</b>	<b>-23-</b>
3.1 Δομή και λειτουργία.....	-23-
<b>4. Η ογκοπρωτεΐνη SET/12PP2A.....</b>	<b>-26-</b>
4.1 Γενικά.....	-26-
4.2 Δομή και λειτουργία.....	-29-
<b>5. Φαρμακολογικοί αναστολείς της SET/12PP2A.....</b>	<b>-33-</b>
5.1. Το πεπτίδιο COG112.....	-33-
5.2 COG112 και SET-PP2A.....	-34-
5.3. Το φάρμακο FTY720.....	-36-
5.4 FTY720 και SET-PP2A.....	-38-
<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....</b>	<b>-42-</b>
<b>ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>-43-</b>
1. Κυτταρική σειρά.....	-43-
1.1 Συνθήκες καλλιέργειας.....	-43-
1.2 Χειρισμός κυττάρων.....	-44-
1.3 Κρυοσυντήρηση κυττάρων.....	-44-
2. Έκθεση των κυττάρων στα φάρμακα FTY720 και COG112, παρουσία και απουσία του αγωνιστή Purmorphamine.....	-45-
3. Έμμεσος διπλός ανοσοφθορισμός.....	-46-
3.1 Μονιμοποίηση κυττάρων με 100% μεθανόλη.....	-46-
3.2 Μονιμοποίηση κυττάρων με PFA 4%.....	-46-
3.3 Παρεμπόδιση μη ειδικής δέσμευσης (blocking).....	-47-
3.4 Πρωτογενές αντίσωμα.....	-47-

3.5 Δευτερογενές αντίσωμα.....	-47-
3.6 Χρώση πυρήνα και τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρους πλάκες.....	-48-
3.7 Συνεστιακή μικροσκοπία.....	-48-
4. Απομόνωση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων.....	-48-
4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	-49-
5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western.....	-50-
5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτική SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). ..	-50-
5.2 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	-51-
5.3 Ανοσοαποτύπωση.....	-51-
5.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.....	-52-
6. Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα NIH/3T3.....	-52-
7. Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription).....	-53-
8. Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου.....	-53-
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>-55-</b>
1. Υποκυτταρική κατανομή της SET και της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σε σχέση με τον κυτταρικό κύκλο.....	-55-
2. Επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog με τη χρήση του αγωνιστή Purmorphamine.....	-58-
3. Επίδραση του φαρμακολογικού ανταγωνιστή της SET, FTY720, στους πρωτογενείς κροσσούς και το μονοπάτι Hedgehog.....	-60-
4. Επίδραση της ανταγωνιστικής αναστολής της SET, μέσω του COG112, στους πρωτογενείς κροσσούς και το μονοπάτι Hedgehog.....	-66-
5. Επίδραση της ανταγωνιστικής αναστολής της SET, μέσω του FTY720 και του COG112 στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog ,σε μεταγραφικό επίπεδο.....	-72-
<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>-74-</b>
1. Η κατανομή της SET στα NIH/3T3 κύτταρα.....	-76-
2. Η εντόπιση της SET μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog.....	-76-
3. Φαρμακολογική αναστολή της SET από το FTY720.....	-77-
4. Φαρμακολογική αναστολή της SET από το COG112.....	-79-
5. Συμπεράσματα-Μελλοντικά σχέδια.....	-80-
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>-82-</b>

## ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

---

<b>Εικόνα 1.</b> Διάγραμμα της δομής του κροσσού.....	<b>-11-</b>
<b>Εικόνα 2.</b> Τα στάδια της της κροσσογένεσης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου.....	<b>-13-</b>
<b>Εικόνα 3.</b> Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών και των μοτίβων των Gli πρωτεϊνών.....	<b>-16-</b>
<b>Εικόνα 4.</b> Η πρόσδεση του συνδέτη του Sonic Hedgehog και η έναρξη της μεταγωγής σήματος.....	<b>-18-</b>
<b>Εικόνα 5.</b> Χειρισμοί του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog με μικρά μόρια.....	<b>-20-</b>
<b>Εικόνα 6.</b> Η συμμετοχή της PP2A στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog στα σπονδυλωτά.....	<b>-22-</b>
<b>Εικόνα 7.</b> Η ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα της PP2A. Πολλοί μηχανισμοί ελέγχουν την PP2A.....	<b>-24-</b>
<b>Εικόνα 8.</b> Η μετακίνηση της SET στο κυτταρόπλασμα και η αλληλεπίδρασή της με τη Rac1.....	<b>-27-</b>
<b>Εικόνα 9.</b> Σχηματική απεικόνιση των φυσιολογικών λειτουργιών της SET και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά.....	<b>-28-</b>
<b>Εικόνα 10.</b> Η κρυσταλλική δομή της SET.....	<b>-31-</b>
<b>Εικόνα 11.</b> Η οργάνωση του ολοενζύμου της PP2A χωρίς και με την αλληλεπίδραση με τη SET/I2PP2A.....	<b>-32-</b>
<b>Εικόνα 12.</b> Η στόχευση της λειτουργίας της ογκοπρωτεΐνης SET έχει πολλαπλές επιδράσεις.....	<b>-35-</b>
<b>Εικόνα 13.</b> Χημική δομή του FTY720.....	<b>-36-</b>
<b>Εικόνα 14.</b> Το FTY720 έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και ανοσοκατασταλτική δράση.....	<b>-38-</b>
<b>Εικόνα 15.</b> Ο ρόλος της SET/I2PP2A και του κεραμιδίου/FTY720 στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μέσω της PP2A.....	<b>-40-</b>
<b>Εικόνα 16.</b> Η καταστολή του όγκου του πνεύμονα μέσω του FTY720 η οποία περιλαμβάνει την κινάση του RIPK1.....	<b>-41-</b>
<b>Εικόνα 17.</b> Πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης SET κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα NIH/3T3.....	<b>-57-</b>
<b>Εικόνα 18.</b> Η επίδραση της Purmorphamine στα κύτταρα NIH/3T3.....	<b>-59-</b>

<b>Εικόνα 19.</b> Επίδραση του FTY720 στα κύτταρα NIH/3T3 παρουσία ή όχι Purmorphamine.....	<b>-61-</b>
<b>Εικόνα 20.</b> Επίδραση του FTY720 στο ποσοστό και μήκος των πρωτογενών κροσσών στα κύτταρα NIH/3T3.....	<b>-63-</b>
<b>Εικόνα 21.</b> Η επίδραση του FTY720 στα κύτταρα NIH/3T3 σε επίπεδο πρωτεϊνών.....	<b>-65-</b>
<b>Εικόνα 22.</b> Επίδραση του COG112 στα κύτταρα NIH/3T3 παρουσία ή όχι Purmorphamine.....	<b>-67-</b>
<b>Εικόνα 23.</b> Επίδραση του COG112 στο ποσοστό και μήκος των πρωτογενών κροσσών στα κύτταρα NIH/3T3.....	<b>-69-</b>
<b>Εικόνα 24.</b> Η επίδραση του COG112 στα κύτταρα NIH/3T3 σε επίπεδο πρωτεϊνών.....	<b>-71-</b>
<b>Εικόνα 25.</b> Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Gli1, SET....	<b>-75-</b>

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

---

- APS** (Ammonium Persulfate): υπερθειικό αμμώνιο
- BSA** (Bovine Serum Albumin): αλβουμίνη ορού βοός
- cDNA** (complementary DNA): συμπληρωματικό DNA
- CK1** (Casein kinase 1): κινάση καζεΐνης I
- ddH<sub>2</sub>O** (double distilled H<sub>2</sub>O): δισταπεσταγμένο H<sub>2</sub>O
- DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium): θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας
- DMSO** (Dimethyl Sulfoxide): διμέθυλο-σουλφοξείδιο
- DTT** (Dithiothreitol): διθειοθρεϊτόλη
- EDTA** (Ethylenediaminetetraacetic acid): αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
- FBS** (Fetal Bovine Serum): εμβρυϊκός ορός βοός
- FL** (Full Length): Πλήρους μήκους
- g** (Gravity-relative centrifuge force): σχετική φυγόκεντρος δύναμη
- Gli** (Glioma-associated oncogene)
- GSK3β** (glycogen synthase kinase 3-beta)
- GzmA** (Granzyme A): Σερينوπρωτεάση Κυτταροτοξικών κοκκίων
- Hh** (Hedgehog)
- I2PP2A** (Inhibitor 2 of PP2A): Αναστολέας 2 της Πρωτεϊνικής Φωσφατάσης 2A
- IFT** (Intraflagellar transport): ενδοκροσσωτή μεταφορά
- IGAAD** (Inhibitor of GzmA-activated DNase)
- INHAT** (Inhibitor of Histone Acetyltransferases): Σύμπλοκο αναστολής των ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών
- kDa** (kilo Dalton)
- Kif7** (kinesis family member 7)
- mA** (milliampere)
- MEFs** (Mouse embryonic fibroblasts): Ινοβλάστες εμβρύων ποντικών
- NAPI** (Nucleosome Assembly Protein I)
- O/N** (Overnight): ολονύκτια επώαση
- PAGE** (Polyacrylamide Gel Electrophoresis): ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου
- PBS** (Phosphate Buffered Saline): ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- PFA** (Paraformaldehyde): παραορμαλδεΐδη
- PHAP II** (Putative HLA Class II Associated Protein II)



**PKA** (Protein kinase A): Πρωτεϊνική κινάση A

**PMSF** (Phenylmethylsulfonyl Fluoride): φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο φθορίδιο

**PP2A** (Protein Phosphatase 2A): Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A

**Ptch** (Patched)

**qPCR** (Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction): Ποσοτική PCR  
πραγματικού χρόνου

**R** (repressor): καταστολέας

**Rac1** (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)

**RhoA** (Ras homolog gene family member A)

**RPE** (retinal pigment epithelial): Μελάγχρουν επιθήλιο του αμφιβληστροειδούς

**rpm** (rounds per minute): στροφές το λεπτό

**SAG** (Smoothened Agonist)

**SET** (SE Translocation)

**Shh** (Sonic Hedgehog)

**Smo** (Smoothened)

**SuFu** (Suppressor of Fused)

**TAF-I** (Template Activating Factor I)

**OMA** (οξεία λεμφογενής λευχαιμία)

**XMA** (χρόνια λεμφογενής λευχαιμία)

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

---

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές των αναπτυξιακών διεργασιών των πολυκύτταρων οργανισμών. Εκτός από το ρόλο του στην κυτταρική διαφοροποίηση και στο σχηματισμό οργάνων κατά την εμβρυογένεση, παίζει σημαντικό ρόλο στις διεργασίες αναγέννησης και αποκατάστασης ιστών. Λάθη κατά την ενεργοποίησή του έχουν φανεί σε ποικιλία ανθρώπινων καρκίνων. Η ογκογένεση, η εξέλιξη του όγκου και η θεραπευτική απόκριση έχουν αποδειχθεί ότι επηρεάζονται από το μονοπάτι αυτό.

Πολλά βασικά συστατικά του μονοπατιού Hedgehog υφίστανται αντιστραπτές φωσφορυλιώσεις μέσω πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατάσων και έτσι επιτυγχάνεται η σωστή ρύθμιση της σηματοδότησης. Η πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A), συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών. Είναι η πιο καλά μελετημένη φωσφατάση στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog και μάλιστα λειτουργεί ως ένας θετικός ρυθμιστής της σηματοδότησης.

Η ογκοπρωτεΐνη SET/12PP2A είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη με ένα ευρύ φάσμα δράσεων σε διάφορες περιοχές του κυττάρου ενώ χαρακτηριστική είναι η δράση της ως αναστολέας της PP2A. Έχοντας μια τέτοια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών, η SET αποτελεί αντικείμενο ερευνών που αφορούν την αξιοποίησή της ως φαρμακευτικό στόχο.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης που έχει η αναστολή της πρωτεΐνης SET στο μονοπάτι Hedgehog και στους πρωτογενείς κροσσούς, όπου εκεί λαμβάνει χώρα ο σηματοδοτικός καταρράκτης. Για την αναστολή της SET χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί αναστολείς, το φάρμακο FTY720 και το πεπτίδιο COG112. Αρχικά αναλύθηκε η υποκυτταρική εντόπιση της SET μετά από την αναστολή της και αν επηρεάζει το μήκος και την ποσότητα των πρωτογενών κροσσών στα κύτταρα NIH/3T3. Βρέθηκε ότι η αναστολή από το φάρμακο FTY720 ωθεί τον εντοπισμό της SET στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και μειώνει την ποσότητα των κροσσών στον πληθυσμό των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η αναστολή από το πεπτίδιο COG112 φαίνεται να μην επηρεάζει τον εντοπισμό της SET αλλά και εδώ φαίνεται να υπάρχει μείωση των κροσσών με παράλληλη αύξηση του μήκους τους. Παράλληλα, εξετάστηκε πώς η αναστολή αυτή επηρεάζει την πρωτεΐνη Gli1, η οποία είναι ένας ισχυρός ενεργοποιητής του μονοπατιού. Φάνηκε πως η αναστολή της SET και από το FTY720 και από το

COG112, μείωνε την Gli1 και σε πρωτεϊνικό και σε μεταγραφικό επίπεδο, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα της SET.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης βγαίνει το συμπέρασμα ότι η φαρμακολογική αναστολή της SET επηρεάζει το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog σε επίπεδο ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Gli1 αλλά και σε επίπεδο αριθμού των πρωτογενών κροσσών, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για τη σηματοδότηση. Η εργασία αυτή μπορεί να χρησιμεύσει ως βάση για μελλοντικές μελέτες που θα αφορούν τη συμμετοχή της SET στο μονοπάτι αυτό με βάση το πως επηρεάζει άλλους παράγοντες του σηματοδοτικού καταρράκτη.

## **SUMMARY**

---

The Hedgehog signaling pathway is a major regulator of the developmental processes of multicellular organisms. Aside of its role in cellular differentiation and in organ formation during embryogenesis, it is also important in the regeneration and repair of the tissues. Aberrant activation of this pathway has been linked with a variety of human cancers. Several studies have shown that the major components of the Hedgehog pathway undergo reversible phosphorylation and dephosphorylation by protein kinases and phosphatases which are important regulators for fine-tuning of this pathway. Among these enzymes, protein phosphatase 2A (PP2A) is the best studied phosphatase in the Hedgehog signaling pathway and it has been shown to act as a positive regulator of the pathway. The SET/I2PP2A is a multifunctional protein with a wide range of functions in different cellular compartments and it is an inhibitor of PP2A. Having such a variety of functions, the protein SET is considered as a pharmaceutical target for several cancers.

The aim of this work was to investigate the effect of the inhibition of SET function on the Hedgehog signaling pathway and on the formation of primary cilia, a unique microenvironment where the signaling cascade takes place. For the inhibition of SET function, two different inhibitors were used, the drug FTY720 and the peptide COG112. Our results showed that the percentage of cilia within the cell population was decreased upon treatment of NIH3T3 cells with FTY720. In addition, under these conditions, the translocation of SET from the cytoplasm to the plasma membrane was more pronounced. On the contrary, inhibition of SET function by COG112 did not affect the subcellular localization of SET. Interestingly, treatment of NIH3T3 cells by FTY720 and COG112 led to a significant decrease of the protein and mRNA levels of the Gli1 transcriptional factor, a strong activator of the Hedgehog pathway, without affecting SET expression.

Taken together, the results of this work suggest that the pharmacological inhibition of SET affects and the formation of primary cilia and the Hedgehog pathway. Future studies will investigate in more detail the involvement of the oncoprotein SET in the Hedgehog signaling cascade.

### **1. Πρωτογενείς κροσσοί**

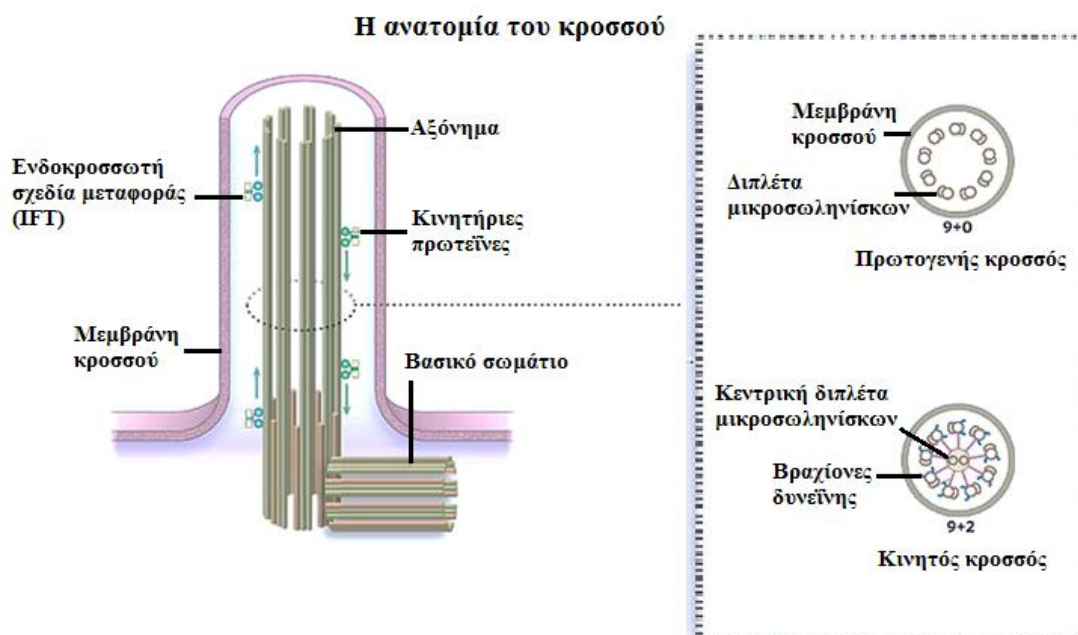
#### *1.1 Γενικά*

Η πρώτη αναφορά σχετικά με τους πρωτογενείς κροσσούς έγινε το 1898 από τον Zimmerman <sup>[1]</sup>, και η ονομασία τους δόθηκε από τον Sergei Sorokin το 1968 <sup>[2]</sup>. Το ενδιαφέρον των επιστημόνων για αυτά τα οργανίδια ενισχύθηκε όταν αναγνωρίστηκε ότι αυτά λειτουργούν ως σημαντικά σηματοδοτικά κέντρα στο κύτταρο <sup>[3]</sup>. Πράγματι, οι διάφορες μεταφορικές εκφράσεις που χρησιμοποιούνται κατά καιρούς για να περιγράψουν τους κροσσούς, όπως «κυτταρικές κεραίες» ή «σταθμοί παρακολούθησης», υπογραμμίζουν τον εξέχοντα ρόλο που παίζουν στην ανίχνευση και στην ενσωμάτωση ποικίλων σηματοδοτήσεων <sup>[4]</sup>. Οι πρωτογενείς κροσσοί βρίσκονται σε ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων στο σώμα των θηλαστικών όπως στα βλαστοκύτταρα, στα επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, στον συνδετικό ιστό, στα μυϊκά κύτταρα καθώς και στους νευρώνες <sup>[5]</sup>.

Σε αντίθεση με τους πιο γνωστούς κινητούς κροσσούς, που βρίσκονται σε αφθονία σε επιφάνειες όπως οι αεραγωγοί, οι πρωτογενείς κροσσοί είναι μοναδιαίες προεξοχές αποτελούμενες από μικροσωληνίσκους που προεκτείνονται από την πλασματική μεμβράνη των περισσότερων κυττάρων. Πρόκειται για μη κινητά οργανίδια, με εξαίρεση εκείνα που εντοπίζονται στην περιοχή του εμβρυϊκού κόμβου που ευθύνεται για την δεξιά-αριστερή συμμετρία <sup>[6]</sup>. Είναι επίσης δυναμικές δομές που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της μεσόφασης και στη συνέχεια απορροφούνται κατά την έναρξη της μίτωσης <sup>[7]</sup>. Η ρυθμιζόμενη αυτή συναρμολόγηση πιστεύεται ότι είναι απαραίτητη για τη σωστή μίτωση επειδή η βάση του κροσσού, γνωστή και ως βασικό σωματίο (basal body), περιέχει ένα κεντριόλιο που πρέπει να απελευθερωθεί από την συγκεκριμένη θέση για να μετακινηθεί στον πόλο της νέο-σχηματιζόμενης ατράκτου <sup>[4]</sup>.

Ο σχηματισμός ενός πρωτογενούς κροσσού αρχίζει κατά τη φάση G0-G1, όταν τα κεντριόλια μετακινούνται στη πλασματική μεμβράνη. Κυστίδια που εκβλασταίνουν από το Golgi μεταφέρουν πρωτεΐνες απαραίτητες για τον σχηματισμό του πρωτογενούς κροσσού οδηγώντας έτσι στη συσσώρευση περικεντριολικού υλικού

που προάγει τον πολυμερισμό των μικροσωληνίσκων. Οι μικροσωληνίσκοι αυτοί, οι οποίοι υπάρχουν ως τριπλέτες στο βασικό σωματίο, εκτείνονται ως διπλέτες σε έναν σχηματισμό 9+0 κατά μήκος του κροσσού, δημιουργώντας έτσι μια μορφή που ονομάζεται αξόνημα. Αυτή η διαμόρφωση διαφέρει από τη διαμόρφωση των κινητών κροσσών, όπου εκεί υπάρχει ένα επιπλέον ζεύγος μικροσωληνίσκων σε διάταξη 9+2 (Εικόνα 1) [6, 8].



**Εικόνα 1. Διάγραμμα της δομής του κροσσού.** Το οργανίδιο συνδέεται με τη μεμβράνη και περιέχει πολλαπλούς μικροσωληνίσκους που έχουν στηρικτικό ρόλο και εκτείνονται κατά μήκος του. Οι κινητοί κροσσοί έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά με τους πρωτογενείς κροσσούς καθώς και μια επιπλέον κεντρική διπλέτα μικροσωληνίσκων, όπως επίσης εσωτερικούς και εξωτερικούς βραχίονες δυνεΐνης οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την κίνηση [9].

## 1.2 Κροσσογένεση

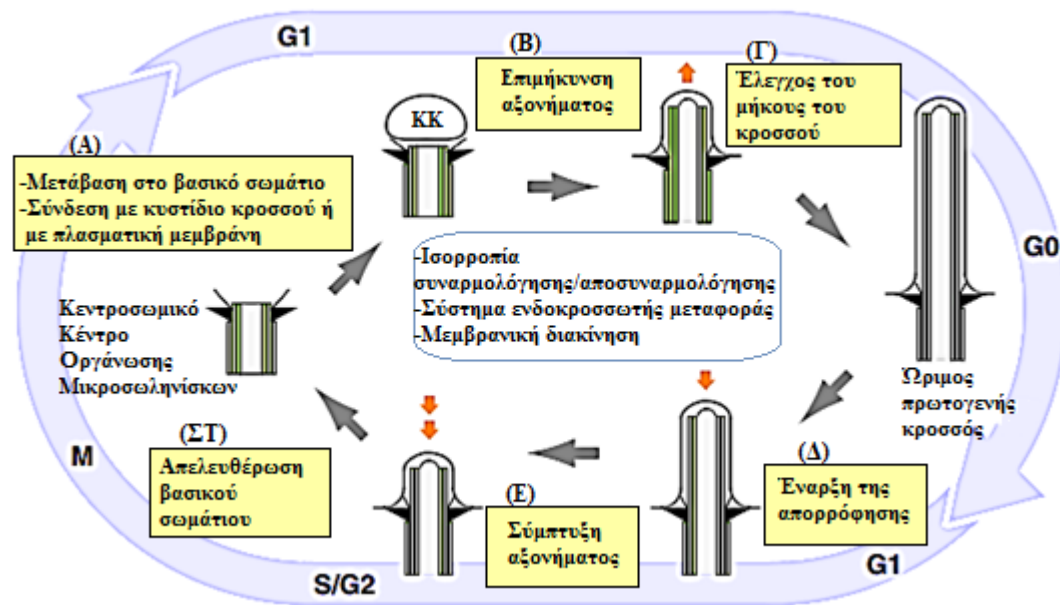
Η κροσσογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων. Ο σχηματισμός των πρωτογενών κροσσών αρχίζει στη φάση G0/G1 του κυτταρικού κύκλου και η αποσυναρμολόγησή τους ξεκινά καθώς τα κύτταρα επανεισάγονται στον κυτταρικό κύκλο [10-12]. Με την έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, η μετανάστευση του κεντροσώματος στην κυτταρική επιφάνεια είναι το πρώτο ρυθμιστικό γεγονός της

κροσσογένεσης, κατά τη διάρκεια της οποίας το μητρικό κεντριόλιο σχηματίζει το βασικό σωματίο για να πυροδοτήσει το ακτινωτή αξόνημα (Εικόνα 2Α) <sup>[13]</sup>.

Ο Sorokin περιέγραψε δυο οδούς για την παραγωγή των πρωτογενών κροσσών, την εξωκυτταρική και την ενδοκυτταρική οδό <sup>[14]</sup>. Στην εξωκυτταρική οδό, το μητρικό κεντριόλιο αρχικά αγκυροβολεί στη πλασματική μεμβράνη και μετά οι μικροσωληνίσκοι του αξονήματος αρχίζουν να δομούνται. Στην ενδοκυττάρια οδό, η επέκταση του αξονήματος ξεκινάει στο κυτταρόπλασμα με την σύμπτυξη του μητρικού κεντριολίου με τα κροσσωτά κυστίδια τα οποία προέρχονται από το Golgi (Εικόνα 2Α) <sup>[15]</sup>. Η συναρμολόγηση και επιμήκυνση του αξονήματος απαιτεί το συντονισμό της ενδοκροσσωτής μεταφοράς (IFT intraflagellar transport), της μεμβρανικής διακίνησης και της επιλεκτικής εισαγωγής κροσσο-ειδικών πρωτεϊνών μέσω ενός φράγματος στη ζώνη μετάβασης του κροσσού (Εικόνα 2Β) <sup>[16-18]</sup>.

Η σταθερότητα του μήκους των κροσσών καθορίζεται από την ισορροπία της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης τους <sup>[16]</sup>. Πρόσφατα αποκαλύφθηκε ότι ένα σήμα ελέγχου του μήκους του κροσσού μπορεί να ρυθμίσει το φορτίο που θα μετακινηθεί μέσω του IFT (Εικόνα 2Γ) <sup>[19]</sup>. Κατά την επανείσοδο στη G1 φάση του κυτταρικού κύκλου, ξεκινάει και η απορρόφηση του κροσσού (Εικόνα 2Δ) και η ισορροπία μεταξύ συναρμολόγησης/αποσυναρμολόγησης μετατοπίζεται προς την αποσυναρμολόγηση (Εικόνα 2Ε) <sup>[20]</sup>.

Η απορρόφηση αυτή έχει μελετηθεί εκτεταμένα σε κυτταρικές καλλιέργειες, όπου τα κύτταρα παραμένουν στη φάση G0 ύστερα από στέρηση ορού, για να σχηματίσουν κροσσούς, ενώ μετά από προσθήκη ορού ή αυξητικών παραγόντων ωθούνται στην επανένταξη στον κυτταρικό κύκλο <sup>[10, 12, 21]</sup>. Συγκεκριμένα, έπειτα από την προσθήκη ορού σε καλλιέργεια ανθρώπινων κυττάρων RPE (telomerase reverse transcriptase-immortalized retinal pigment epithelial), η αποσυναρμολόγηση των κροσσών γίνεται σε δυο φάσεις, με την πρώτη να πραγματοποιείται εντός των πρώτων 1-2 ωρών και η δεύτερη μετά από 18-24 ώρες <sup>[11, 22]</sup>. Τέλος, από το βασικό σωματίο απελευθερώνονται τα κεντριόλια ώστε να λειτουργήσουν ως κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων ή ως πόλοι ατράκτου κατά την μίτωση (Εικόνα 2ΣΤ) <sup>[13, 23]</sup>.



**Εικόνα 2.** Τα στάδια της της κροσσογένεσης κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Παρουσιάζεται η αλληλουχία των βημάτων (Α-ΣΤ) που ακολουθούνται κατά τον σχηματισμό των πρωτογενών κροσσών σε σχέση με τον κυτταρικό κύκλο <sup>[24]</sup>.

Εντός της πλασματικής μεμβράνης, μια συμπυκνωμένη λιπιδική ζώνη περικλείει τη βάση του κροσσού η οποία επίσης μπορεί να χρησιμεύει στον περιορισμό της εισόδου των μεμβρανικών πρωτεϊνών <sup>[25, 26]</sup>. Το βασικό σωματίο, σε συντονισμό με αυτές τις δομές «φρουρούς», πιστεύεται ότι ρυθμίζει τη μεταφορά των πρωτεϊνών του κροσσού στα σωματίδια IFT (intraflagellar transport) και την είσοδό τους στον κροσσό.

Το IFT είναι μια εξελικτικά διατηρημένη διαδικασία μετακίνησης που απαιτείται για την ανάπτυξη και την συντήρηση όλων των κροσσών <sup>[27]</sup>. Βασίζεται στην αλληλεπίδραση των κροσσωτών δομικών στοιχείων (π.χ τουμπουλίνη, περιφερειακές μεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι παράγοντες ανταλλαγής γουανίνης-νουκλεοτιδίων) με ένα ικρίωμα πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων IFT-σωματιδίων, τα συστατικά των οποίων είναι ομόλογα σε οργανισμούς από το *Chlamydomonas reinhardtii* έως τον άνθρωπο. Τα IFT σωματίδια και οι συναφείς πρωτεΐνες-φορτία μεταφέρονται κατά μήκος του αξονήματος με τη βοήθεια των κινητικών πρωτεϊνών κινεσίνης 2 στην ανοδική κατεύθυνση (από τη βάση προς στην άκρη), μετά από την οποία το φορτίο μεταφέρεται στο αναπτυσσόμενο άκρο, και από την κυτταροπλασματική δυνεΐνη 2 στην ανάδρομη κατεύθυνση (προς τη βάση) <sup>[17]</sup>.



Διαταραχές που σχετίζονται με την ανάπτυξη, τη μορφολογία ή/και τη λειτουργία των πρωτογενών κροσσών, οδηγούν σε μια ευρεία κατηγορία παθήσεων γνωστών ως κροσσοπάθειες. Οι κροσσοπάθειες έχουν ένα εξαιρετικά ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων. Ειδικότερα, οι περιπτώσεις που περιλαμβάνουν την ανάπτυξη κρανιοπροσωπικών ανωμαλιών, εντάσσονται τα σύνδρομα Bardet-Biedl, Meckel-Gruber, Joubert και Eliss van Creveld <sup>[28, 29]</sup>.

Η σηματοδότηση μέσω των πρωτογενών κροσσών είναι υψίστης σημασίας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και πιθανώς το ίδιο σημαντική παραμένει σε πληθυσμούς βλαστικών κυττάρων σε διάφορους ιστούς. Στον ενήλικα, οι πρωτογενείς κροσσοί λειτουργούν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου των ινοβλαστών ή/και στη μετανάστευση των κυττάρων κατά την αναγέννηση των ιστών και την επούλωση των πληγών. Τα περισσότερα διαφοροποιημένα, μη διαιρούμενα κύτταρα του ενήλικου σώματος, μεταξύ αυτών και οι νευρώνες και τα νεφρικά κύτταρα, έχουν πρωτογενείς κροσσούς <sup>[5]</sup>.

Επειδή ο πρωτογενής κροσσός προεκβάλλει στον εξωκυττάριο χώρο, έχει προταθεί ότι λειτουργεί ως «κεραία» για τη διευκόλυνση της λήψης των σημάτων διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών, ένα εκ των οποίων είναι και το Hedgehog το οποίο αναλύεται εκτενώς παρακάτω. Είναι γνωστό ότι η μηχανή μεταφοράς μέσα στον κροσσό παρέχει μια συσκευή η οποία είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή σήματος Hedgehog στα θηλαστικά. Μάλιστα το IFT, το οποίο είναι απαραίτητο για την κατασκευή και τη διατήρηση των κροσσών, ρυθμίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog <sup>[30]</sup>.

## 2. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog

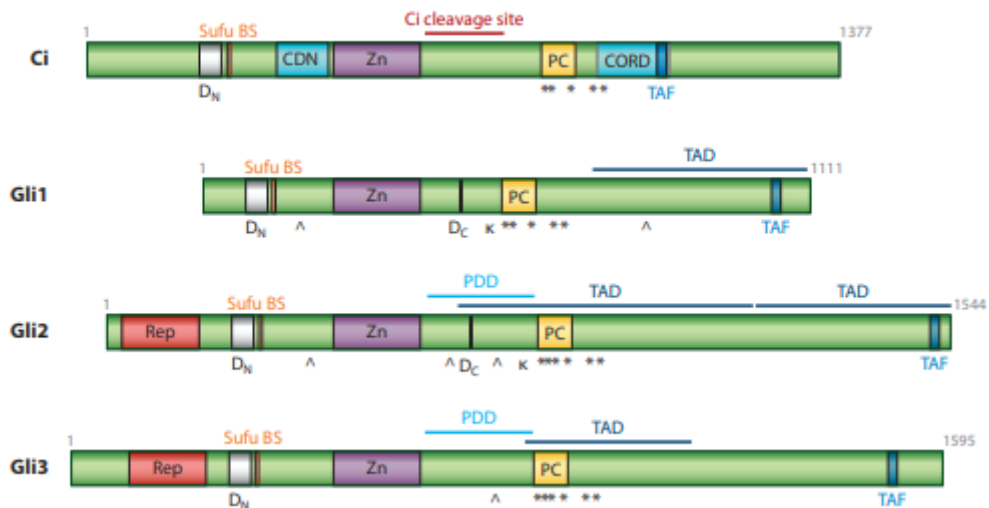
### 2.1 Γενικά

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog (Hh) χαρακτηρίστηκε αρχικά μέσω του ρόλου του στη διαμόρφωση της επιδερμίδας της προνύμφης *Drosophila*, όπου η περιορισμένη χωρικά έκφραση της Hh – της μοναδικής πρωτεΐνης της ομώνυμης οικογένειας Hh που υπάρχει στις μύγες – διατηρεί την έκφραση του Wnt1 (wingless wg) της *Drosophila* στα γειτονικά κύτταρα <sup>[31]</sup>. Το Hh εκφράζεται σε ολόκληρο το οπίσθιο τμήμα του πτερυγίου του εμβρυϊκού δίσκου και δίνει σήματα σε όλο το όριο του διαμερίσματος για την ενεργοποίηση διαφόρων γονιδίων-στόχων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και την ταυτότητα θέσης των κυττάρων σε όλο τον δίσκο.

Στα σπονδυλωτά, η καλύτερα μελετημένη πρωτεΐνη του εν λόγω μονοπατιού είναι η Shh (Sonic Hedgehog). Η περιορισμένη χωρικά, έκφραση της Shh στον αναπτυσσόμενο βλαστό των άκρων, παρουσιάζει σημαντικές λειτουργικές ομοιότητες με την ομόλογη Hh της *Drosophila* καθώς συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και στον σχεδιασμό των προσαρτημάτων <sup>[31]</sup>. Ένας καλά χαρακτηρισμένος ρόλος της Shh σχετίζεται με την εξειδίκευση των κυτταρικών τύπων εντός του νευρικού σωλήνα. Στο πλαίσιο αυτό, τα διαφορετικά επίπεδα και η διάρκεια έκθεσης στο Shh δρουν συνδυαστικά για την κατανομή των κυττάρων σε μοναδικές νευρωνικές ταυτότητες <sup>[32]</sup>. Παράλληλα, το μονοπάτι αυτό εμπλέκεται στην ανάπτυξη ενός πλήθους οργάνων και δομών, συμπεριλαμβανομένου του επινεφριδιακού φλοιού, της παρεγκεφαλίδας, του οφθαλμού, του προσώπου, του γαστρεντερικού σωλήνα, του τριχοθυλακίου, των νεφρών, των μακρών οστών, των πνευμόνων, του παγκρέατος, της υπόφυσης, του προστάτη, των σκελετικών μυών και των δοντιών. Επιπλέον, το Shh λειτουργεί ως άξονας και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ομοίωση ιστών καθώς και στην αναγεννητική απόκριση στον τραυματισμό <sup>[33]</sup>.

## 2.2 Η μεταγωγή σήματος Hedgehog στα σπονδυλωτά

Το γονίδιο *hh* έχει τρία παράλογα στα πουλιά και στα θηλαστικά (*desert*, *indian* και *sonic*), δυο εκ των οποίων, το *indian* και το *sonic*, είναι εις διπλούν στα ψάρια. Το γονίδιο *ptch* (το οποίο έχει δυο παράλογα σε όλα τα σπονδυλωτά) και το γονίδιο *gli*, οι λειτουργίες του οποίου κατανέμονται μεταξύ τριών πρωτεϊνών της οικογένειας Gli στα πουλιά και στα θηλαστικά (Gli1-3), έχει ένα πρόσθετο *gli2* παράλογο στα ψάρια. Οι πρωτεΐνες Gli2 και Gli3 περιέχουν τόσο περιοχές ενεργοποίησης όσο και καταστολής του σηματοδοτικού μονοπατιού και έτσι υποβάλλονται σε πρωτεολυτική διάσπαση εξαρτώμενη από το πρωτεάσωμα (Εικόνα 3). Η διαδικασία αυτή προωθείται από την κινάση PKA και έτσι οι μεταγραφικοί αυτοί παράγοντες μετασχηματίζονται σε ενεργοποιητές και καταστολείς έκφρασης γονιδίων-στόχων [34], με το Gli3 να είναι κυρίως καταστολέας και το Gli2 να είναι ως επί το πλείστον ενεργοποιητής. Το Gli1 αντίθετα, στερείται της αμινοτελικής περιοχής που έχει λειτουργία αναστολέα και δρα αποκλειστικά ως ενεργοποιητής (Εικόνα 3). Το γονίδιο *gli1* είναι επίσης στόχος της σηματοδότησης Hh και έτσι ενεργεί για να ενισχύσει την απόκριση στο σήμα [35].



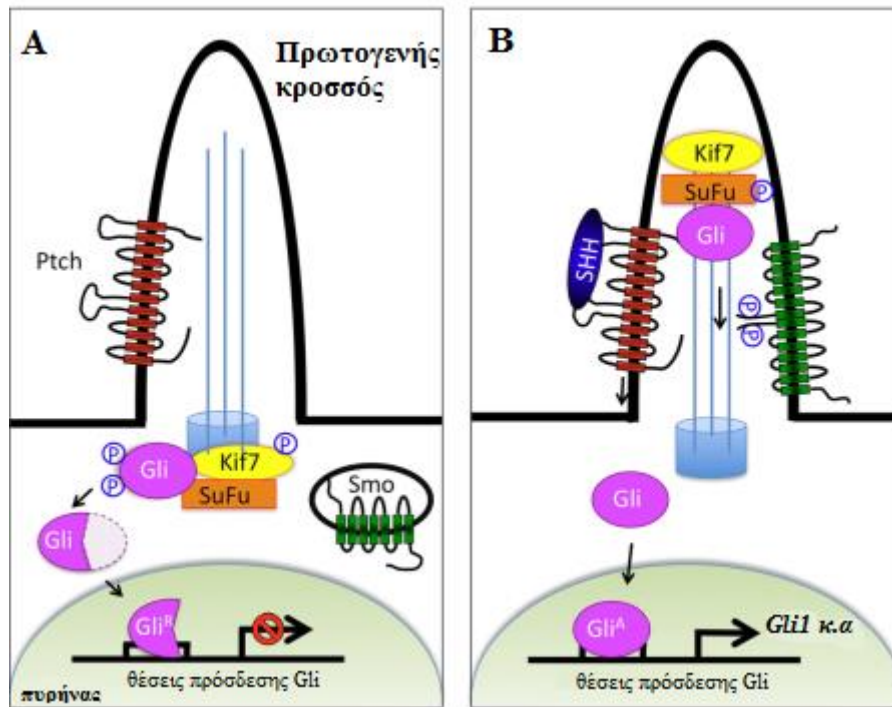
**Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών και των μοτίβων των Gli πρωτεϊνών. Εμφανίζονται διάφοροι τομείς και περιοχές τροποποίησης της Gli πρωτεΐνης *Cubitus interruptus* (Ci) της *Drosophila* και των Gli1,2,3 του ποντικού [36].**

Κατά την απουσία συνδέτη Hh, η σηματοδότηση διατηρείται σε κατασταλμένη κατάσταση από το Patched. Παρόλο που ο λεπτομερής μηχανισμός καταστολής του

μονοπατιού από το Ptch δεν έχει διευκρινιστεί, μελέτες έδειξαν ότι αποτρέπει τη μετατόπιση του Smo στον πρωτογενή κροσσό. Αυτό οδηγεί στη πρωτεολυτική διάσπαση των Gli2,3 σε μορφές καταστολέα (repressor R) που έχουν περικοπεί στο καρβοξυτελικό άκρο. Ο σχηματισμός Gli2,3R περιλαμβάνει τη διαδοχική φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), την GSK3β (glycogen synthase kinase 3-beta) και την κινάση καζεΐνης I (CKI) όπως επίσης και έναν λειτουργικό κροσσό. Μετά την επεξεργασία, τα GliR μεταφέρονται στον πυρήνα και καταστέλλουν την έκφραση των γονιδίων στόχων. Τα Gli ρυθμίζονται επίσης αρνητικά από την αποικοδόμησή τους από το πρωτεάσωμα και από την σύνδεσή τους με τον Suppressor of Fused, η οποία απομονώνει τα Gli στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 4A) <sup>[37]</sup>.

Συμπερασματικά, η ακριβής ρύθμιση του λόγου GliA(activator)/GliR(repressor) είναι η πιο κρίσιμη παράμετρος για την ορθή ανάπτυξη και ομοιόσταση. Αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το κλάσμα αυτό καθορίζει όχι μόνο τη δύναμη και το αποτέλεσμα του μονοπατιού, αλλά και το πεπρωμένο του κυττάρου. Ο υψηλός λόγος GliA/GliR σχετίζεται κυρίως με τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αυτοανανέωση των βλαστοκυττάρων, ενώ ο χαμηλός λόγος ευνοεί την διαφοροποίηση και την ηρεμία <sup>[38]</sup>.

Κατά την παρουσία συνδέτη, το Smo κινείται προς τον κροσσό με πλευρική μεταφορά. Η μεταφορά του Smo στον κροσσό είναι απαραίτητη, αν και όχι επαρκής, για την ενεργοποίησή του. Ύστερα από την ενεργοποίηση του Smo, οι μεταγραφικοί παράγοντες Gli, που είναι σε σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη Suppressor of Fused (SuFu), μεταφέρονται στην άκρη του κροσσού και η μετατόπιση αυτή είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό του συμπλέγματος αυτού και επομένως για την ενεργοποίηση των Gli. Αποτέλεσμα αυτών των σύνθετων ρυθμιστικών βημάτων είναι η μορφή ενεργοποιητή των Gli2 και Gli3 πλήρους μήκους (full length FL), τα οποία πλέον είναι σε θέση να μετακινηθούν στον πυρήνα όπου ενεργοποιούν γονίδια στόχους όπως το Gli1. Όντας ένας ισχυρός μεταγραφικός ενεργοποιητής το Gli1, προκαλεί ενίσχυση του σήματος των Gli2-FL, Gli3-FL (Εικόνα 4B) <sup>[37]</sup>.



**Εικόνα 4.** Η πρόσδεση του συνδέτη του Sonic Hedgehog και η έναρξη της μεταγωγής σήματος <sup>[39]</sup>. (A) Απουσία του SHH, στη βάση του κροσσού, οι GLI πρωτεΐνες *GLI2*, *GLI3* φωσφορυλιώνονται από τις *PKA*, *CKI* και *GSK3β*. Αυτό οδηγεί στην πρωτεολυτική τους διάσπαση για τη δημιουργία των μορφών καταστολής (*GLI2R*, *GLI3R*). (B) Παρουσία του συνδέτη SHH, το *SMO* ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης, και μετακινείται προς τον κροσσό. Η ενεργοποίηση του *SMO* έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου παραμονής των *SUFU* και *GLI2,3* στον κροσσό, τον διαχωρισμό του συμπλέγματος *GLI-SUFU* μέσα στον κροσσό και την μεταφορά των ενεργοποιημένων πρωτεϊνών *GLI2,3 FL* (*Full Length*, πλήρους μήκους) από τον κροσσό στον πυρήνα παρακάμπτοντας την πρωτεολυτική επεξεργασία <sup>[40]</sup>.

### 2.3 Χημική επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog

Τα συστατικά του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά σε μελέτες μεγάλης κλίμακας για γονίδια εμβρυονικής διαμόρφωσης <sup>[41]</sup> και πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι αυτές οι σηματοδοτικές πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση των ιστών και των βλαστικών κυττάρων. Συνεπώς, η ελαττωματική ενεργοποίηση του μονοπατιού μπορεί να έχει σοβαρές συνέπειες όπως η μη φυσιολογική αναγέννηση ιστού και η ογκογένεση <sup>[42]</sup>. Επομένως, η χημική ρύθμιση της σηματοδότησης αυτής μπορεί να έχει βιοϊατρικές εφαρμογές,

συμπεριλαμβανομένης της θεραπείας των καρκίνων που εξαρτώνται από το μονοπάτι και στο χειρισμό πληθυσμών βλαστικών κυττάρων <sup>[43]</sup>.

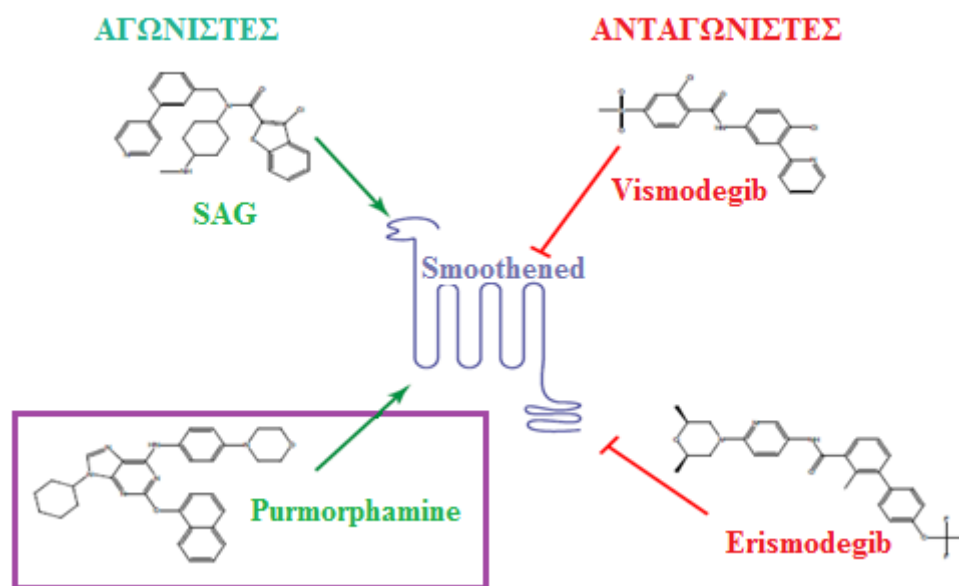
Το πρώτο μικρό μόριο που φάνηκε να διαταράσσει ειδικά το μονοπάτι Hedgehog ήταν η κυκλοπαμίνη (cyclopamine), μια ένωση-ανταγωνιστής του Smo. Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν και άλλους ρυθμιστές, συμπεριλαμβανομένου του αγωνιστή του Smo, SAG, ενώ αναλύσεις για οστεογόνες ενώσεις οδήγησαν στην ανακάλυψη της πουρμορφαμίνης (purmorphamine), που είναι ένα παράγωγο πουρίνης που προωθεί την διαφοροποίηση των πολυδύναμων μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων σε οστεοβλάστες (Εικόνα 5). Αναλύσεις μικροσυστοιχιών σε κύτταρα που έχουν καλλιιεργηθεί παρουσία purmorphamine έδειξαν ότι αυτή η οστεογόνος δραστηριότητα είναι λόγω της ενεργοποίησης του μονοπατιού Hedgehog <sup>[44]</sup>.

Στην έρευνα του Wu και των συνεργατών του <sup>[45]</sup>, μέσα σε μόλις 24 ώρες από την επώαση προγονικών μεσεγχυματικών κυττάρων ποντικού με purmorphamine, υπήρχε αυξορύθμιση των γονιδίων κυτταρικού κύκλου όπως η *Cyclin B2*, *Cyclin D1*, *Cyclin B1*, *Cyclin A2* και *CDK2*, αλλά επίσης και γονιδίων υπεύθυνων για τη σύνθεση του DNA. Παράλληλα, βρέθηκε αύξηση στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες όπως το *Gli1* και *Gli2* και σε γονιδίων διαμεμβρανικών υποδοχέων και μεταγωγών σήματος όπως το *Patched*, *Patched 2* και *insulin growth factor binding protein 3 (IGFBP-3)*. Για να καθορίσουν ποια βιολογικά μονοπάτια επηρεάζονται από την purmorphamine, μέσω εξειδικευμένης ανάλυσης (Ingenuity Pathway Analysis) βρήκαν ότι το μονοπάτι Hedgehog είχε το υψηλότερο σκορ.

Για να επιβεβαιώσουν ότι όντως η purmorphamine ενεργοποιεί το μονοπάτι, χρησιμοποίησαν τη cyclopamine και τη forskolin που είναι ειδικοί ανταγωνιστές του μονοπατιού. Η έκθεση των κυττάρων στους δυο ανταγωνιστές ταυτόχρονα με την Purmorphamine έδειξε πως και τα δυο εμπόδιζαν την μεταγραφική δραστηριότητα του Gli που επαγόταν από την purmorphamine. Μάλιστα όντας γνωστό ότι η cyclopamine μπλοκάρει το μονοπάτι Hedgehog στο επίπεδο του Smoothened, πρότειναν ότι η purmorphamine ενεργοποιεί το Smoothened ή κάποια πρωτεΐνη πριν από αυτή στο μονοπάτι Hedgehog <sup>[45]</sup>.

Η απάντηση στο που ακριβώς ενεργεί η Purmorphamine στο μονοπάτι δόθηκε το 2006 από τον Sinha και τους συνεργάτες του <sup>[44]</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα Smo-/- MEFs (mouse embryonic fibroblasts) τα οποία εκτέθηκαν σε purmorphamine όπου διαπιστώθηκε αδυναμία επαγωγής του μονοπατιού, ενώ έπειτα από παροδική

διαμόλυνση των εν λόγω κυττάρων με τον παράγοντα Smo, υπήρξε επαναφορά της λειτουργίας της Purmorphamine άρα και ενεργοποίηση του μονοπατιού. Τέλος, για να φανεί αν ο συγκεκριμένος αγωνιστής επηρεάζει έμμεσα ή άμεσα το Smo, ελέγχθηκε βιοχημικά αν υπάρχει σύνδεση με το Smo (Smo binding assay). Η συγκεκριμένη ανάλυση αποκάλυψε πως η ρύθμιση της δραστηριότητας του Smo γίνεται μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης με την πρωτεΐνη [44].



**Εικόνα 5. Χειρισμοί του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog με μικρά μόρια.** Αριστερά φαίνονται οι κύριοι αγωνιστές μικρών μορίων και δεξιά οι ανταγωνιστές του Smoothed. Οι δύο κύριοι αγωνιστές, το SAG (Hh-Ag1.3) και η Purmorphamine, χρησιμοποιούνται για την άμεση διαφοροποίηση των βλαστοκυττάρων σε μια ποικιλία κυττάρων [46].

#### 2.4 Ο ρόλος της φωσφατάσης PP2A στο μονοπάτι Hedgehog

Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση πρωτεϊνών είναι μια από τις πιο σημαντικές αντιδράσεις ρύθμισης της λειτουργίας των πρωτεϊνών στο ευκαρυωτικά κύτταρα και εμπλέκεται στην αλλαγή των κυτταρικών δραστηριοτήτων από τη μια κατάσταση στην άλλη και με τον τρόπο αυτό στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική διαφοροποίηση. Πρόκειται για ένα κρίσιμο μηχανισμό στον οποίο τα κύτταρα απαντούν σε εξωκυτταρικά σήματα, όπως οι ορμόνες και οι αυξητικοί παράγοντες, και ελέγχουν όλα τα συμβάντα σε διάφορα

στάδια του κυτταρικού κύκλου αλλά και σαν απάντηση του κυττάρου σε καταστάσεις στρες <sup>[47]</sup>. Η ενδοκυτταρική φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών καταλύεται από πρωτεϊνικές κινάσες, ενώ για την αντιστρεπτή διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης, υπεύθυνες είναι οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες <sup>[48]</sup>.

Ο συντονισμένος έλεγχος κινασών και φωσφατασών παρέχει την ικανότητα στο κύτταρο για γρήγορη εναλλαγή καταστάσεων φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης πρωτεϊνών για την κάλυψη διαφορετικών φυσιολογικών απαιτήσεων. Η ικανότητα αυτή μπορεί να παρομοιαστεί με ένα διακόπτη ή με σημεία ελέγχου τα οποία εξασφαλίζουν ότι το κύτταρο πληροί όλες τις προδιαγραφές για να μεταβεί σε μια άλλη κατάσταση. Συχνά, λάθη σε αυτά τα σημεία ελέγχου οδηγούν στην ανώμαλη ανάπτυξη των κυττάρων ενώ σοβαρές μπορούν να είναι και οι συνέπειες που μπορούν να προκαλέσουν σε επίπεδο ανάπτυξης οργανισμού <sup>[49]</sup>.

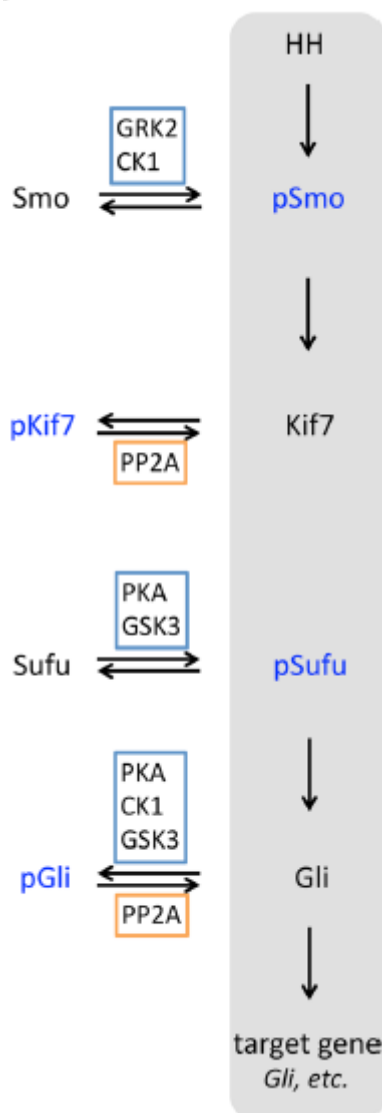
Και οι δυο ομάδες ενζύμων έχουν ένα μεγάλο βαθμό πολυπλοκότητας στη δομή και είναι αντικείμενα στενής ρύθμισης <sup>[50]</sup>. Από εξελικτική πλευρά, όλες οι κινάσες προέρχονται από ένα πρωταρχικό γονίδιο, ενώ οι φωσφατάσες από δυο προγονικά γονίδια: το ένα οδήγησε στην οικογένεια φωσφατασών φωσφοτυροσίνης (οικογένεια PTP) και το άλλο στην οικογένεια φωσφατασών φωσφοσερίνης/φωσφοθρεονίνης (οικογένεια PPP και PPM) <sup>[51, 52]</sup>. Στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον μας εστιάζεται στην PP2A που είναι μέλος της οικογένειας PPP.

Η αρχική σύνδεση της PP2A με το μονοπάτι Hedgehog βρέθηκε στην έρευνα των Krishnan και συνεργατών <sup>[53]</sup> στην ποντικίσια κυτταρική σειρά P19. Στην έρευνα αυτή, χρησιμοποίησαν το οκαδαϊκό οξύ, που είναι γνωστό για την αναστολή της δράσης της PP2A, και βρήκαν πως η αναστολή αυτή εμποδίζει την έκφραση του COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II). Το COUP-TFII είναι ένας στοιχείο απόκρισης του Sonic Hedgehog το οποίο είναι ανεξάρτητο των Gli <sup>[53]</sup>.

Χρήση του οκαδαϊκού οξέος έγινε και σε άλλη μελέτη όπου φάνηκε να αναστέλλει τη διακίνηση του Kif7 στους κροσσούς και να εμποδίζει το μονοπάτι Hedgehog. Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Kif7 καθορίζει την διαμερισματοποίησή της. Ως απόκριση στην ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog, η Kif7 αποφωσφορυλιώνεται από την PP2A, μετακινείται στην κορυφή του πρωτογενούς κροσσού και επάγει το, μεσολαβούμενο από τα Gli, μεταγραφικό αποτέλεσμα της σηματοδότησης αυτής (Εικόνα 6) <sup>[54]</sup>.



Παράλληλα, σε ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών θηλαστικών που έχουν ενεργό το μονοπάτι Hedgehog, βρέθηκε ότι η αυξημένη ενεργότητα της PP2A οδηγεί σε κατακράτηση του πλήρους μήκους Gli3 και της μειωμένης μεταγραφικής ενεργότητάς του, ενώ η αναστολή της PP2A οδηγεί σε αύξηση της συσσώρευσης του Gli3 στον πυρήνα και της μεταγραφικής του ενεργότητας <sup>[55, 56]</sup>. Το γεγονός αυτό έρχεται σε σύγκρουση με το ότι το Gli3 υπόκειται σε πέψη εξαρτώμενη από τη φωσφορυλίωση για να σχηματιστεί η μορφή αναστολέα. Με τον τρόπο αυτό υποστηρίζεται ότι πιθανότατα η PP2A να μην έχει έναν άμεσο ρόλο στη διαμερισματοποίηση και ενεργότητα του Gli3 (Εικόνα 6). Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται ακόμη περισσότερο από την έρευνα του Jin και των συνεργατών του <sup>[57]</sup> οι οποίοι βρήκαν πως η PP2A μειορρυθμίζει έμμεσα τη σταθερότητα των πρωτεϊνών Gli με το να ελέγχει την αποφωσφορυλίωση του παράγοντα Dzip1 <sup>[57]</sup>, ενός ρυθμιστή της κροσσογένεσης στο zebrafish <sup>[58]</sup>.

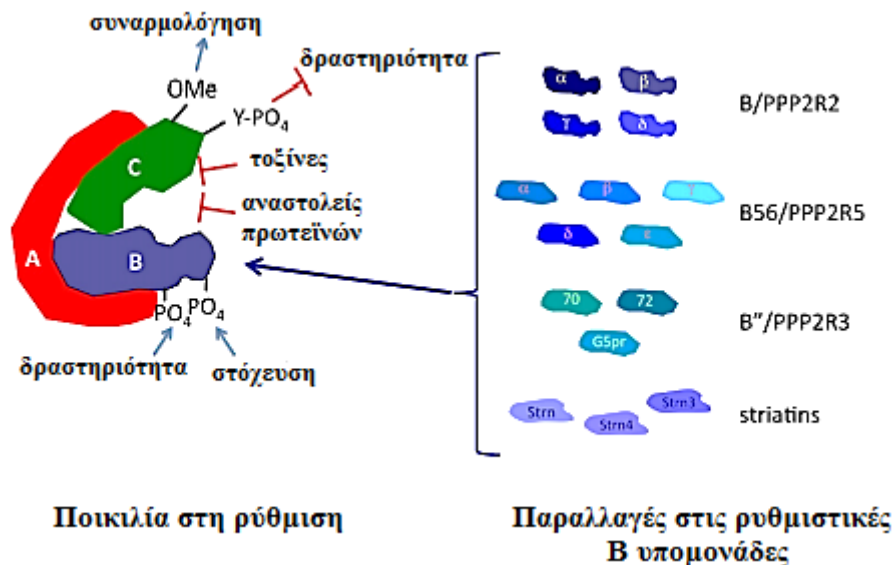


**Εικόνα 6. Η συμμετοχή της PP2A στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog στα σπονδυλωτά.** Η PP2A εμπλέκεται σε διάφορα στάδια του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog. Στα μπλέ πλαίσια απεικονίζονται οι κυριότερες κινήσεις που εμπλέκονται στο μονοπάτι ενώ με πορτοκαλί πλαίσιο η κυριότερη φωσφατάση που εμπλέκεται, η PP2A. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες απεικονίζονται με μπλε γράμματα <sup>[39]</sup>

### 3. Η φωσφατάση PP2A

#### 3.1 Δομή και λειτουργία

Η PP2A λειτουργεί ως πολυμερές ένζυμο. Οι καταλυτικές (C) υπομονάδες συνδέονται με μια υπομονάδα ικριώματος (A) και μια από μια μεγάλη σειρά ρυθμιστικών υπομονάδων (B) (Εικόνα 7). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν μεγάλη ποικιλία αυτών των συμπλεγμάτων. Η PP2A είναι ένα βασικό ένζυμο και καταστολή της καταλυτικής του υπομονάδας ή υποσυνόλου της ρυθμιστικής υπομονάδας οδηγεί σε απόπτωση. Υπάρχουν τέσσερις οικογένειες γονιδίων που εκφράζουν τις υπομονάδες B, η καθεμία εκ των οποίων αποτελείται από δυο με πέντε γονίδια και πολλαπλά προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Ένα μικρό κλάσμα της PP2A υπάρχει επίσης και ως ετεροδιμερές, με την καταλυτική του υπομονάδα να είναι δεσμευμένη σε άλλες πρωτεΐνες. Η ποικιλομορφία της PP2A προέρχεται από το γεγονός ότι τα κύτταρα μπορούν να συναρμολογήσουν πάνω από 200 βιοχημικά διακριτά σύμπλοκα που περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς A,B,C, υπομονάδων (Εικόνα 7). Για τη βέλτιστη αξιοποίηση αυτής της ποικιλομορφίας, οι οργανισμοί εκφράζουν διαφορετικές ρυθμιστικές υπομονάδες σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικούς χρόνους, οδηγώντας στην παρουσία διαφόρων συμπλεγμάτων της PP2A σε διαφορετικά θηλαστικά. Επιπλέον, η ρυθμιστική υπομονάδα παρέχει στην PP2A εξαιρετική εξειδίκευση υποστρώματος και κατευθύνει την αποφωσφορυλίωση των διαφόρων φωσφορυλιωμένων υπολειμμάτων πάνω στην ίδια πρωτεΐνη <sup>[59]</sup>.



**Εικόνα 7. Η ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα της PP2A. Πολλοί μηχανισμοί ελέγχουν την PP2A.** *Αριστερά:* Η PP2A υπάρχει κυρίως ως ετεροτριμερές με συντηρημένες τις υπομονάδες A,C και με μεταβλητές B υπομονάδες. Αυτό το ετεροτριμερές ρυθμίζεται σε πολλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης της συναρμολόγησης του ολοενζύμου, των μικροβιακών τοξινών (όπως το οκαδαϊκό οξύ και η μικροκυστίνη) με ανασταλτική δράση έναντι της PP2A, των πρωτεϊνών αναστολέων όπως η SET και της φωσφορυλίωσης των υπομονάδων B,C για τη ρύθμιση της δραστηριότητας, της συναρμολόγησης και της στόχευσης. *Δεξιά:* οι υπομονάδες B κωδικοποιούνται από τουλάχιστον 15 διαφορετικά γονίδια, καθένα από αυτά με πολλαπλά προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος <sup>[59]</sup>.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι ρυθμιστικές υπομονάδες (B υπομονάδες) καθορίζουν την εξειδίκευση του υποστρώματος. Επειδή υπάρχουν περισσότερες από 20 διαφορετικές B υπομονάδες, ο αριθμός των υποστρωμάτων που θα μπορούσε να στοχευθεί από την PP2A είναι μεγάλος <sup>[60]</sup>. Η PP2A μειορρυθμίζει τις πολυάριθμες σηματοδοτικές οδούς που ενεργοποιούνται ή/και διατηρούνται από διάφορες κινάσες, συμπεριλαμβανομένων των μονοπατιών RAS/ERK <sup>[61]</sup>, PI3K <sup>[62]</sup> και WNT <sup>[63]</sup>. Η ρύθμιση της δραστηριότητας της PP2A εξαρτάται από τις μεταμεταφραστικές της τροποποιήσεις, για παράδειγμα, η PP2A απενεργοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσής της τυροσίνης 307 στην καταλυτική της υπομονάδα <sup>[60]</sup>. Άλλοι μηχανισμοί ελέγχου περιλαμβάνουν τη δράση πρωτεϊνών με λειτουργία αναστολέα οι οποίες καταστέλλουν την ενεργότητα φωσφατάσης της PP2A όπως η SET <sup>[64]</sup>.

Η ικανότητα της PP2A να καταστείλει τη μιτογόνο σηματοδότηση υποδηλώνει την πιθανή ογκοκατασταλτική της δράση. Τα αποδεικτικά στοιχεία που υποστηρίζουν

αυτή την υπόθεση προέρχονται από μια παρατήρηση πως ο ογκοϊός του DNA Simian 40 (SV40) εκφράζει το μικρό T αντιγόνο που καταστέλλει την ενεργότητα φωσφατάσης της PP2A μέσω της εκτόπισης των B υπομονάδων της από το ετεροτριμερικό σύμπλοκο <sup>[65]</sup>. Παράλληλα, σωματικές μεταλλάξεις στις υπομονάδες της PP2A έχουν παρατηρηθεί επίσης σε πολυάριθμους συμπαγείς όγκους <sup>[66]</sup>.

Στη χρόνια λεμφογενή λευχαιμία (ΧΜΛ), και συγκεκριμένα σε προγονικά κύτταρα CD34, έχει βρεθεί ότι η ενεργότητα της PP2A παρουσιάζει μια σχετική πτώση όταν αυτά βρίσκονται σε χρόνια φάση, ενώ μειώνεται σημαντικά όταν περάσουν στη βλαστική φάση. Η αυξημένη ενεργότητα της PP2A έχει επίσης δειχθεί ότι εμποδίζει την BCR-ABL1 ογκογένεση, *in vitro* και *in vivo*, πράγμα που προτείνει την δράση της PP2A ως ογκοκαταστολέα της ΧΜΛ. Οι μοριακοί μηχανισμοί που οδηγούν στη μειωμένη ενεργότητά της στη ΧΜΛ εμπλέκουν την αυξορύθμιση της SET καθώς και τη σηματοδότηση που μεσολαβείται από την κινάση σφιγγοσίνης 1 και τον υποδοχέα φωσφορικής σφιγγοσίνης 2 <sup>[64]</sup>.

## 4. Η ογκοπρωτεΐνη SET/12PP2A

### 4.1 Γενικά

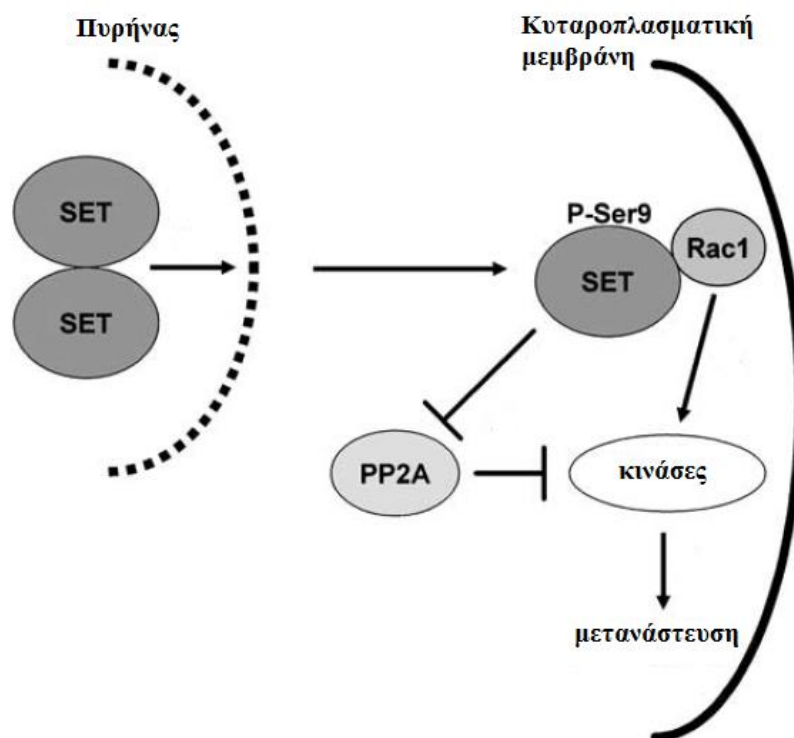
Ο αναστολέας 2 της PP2A (I2PP2A/SET) αναγνωρίστηκε αρχικά ως προϊόν σύντηξης του γονιδίου *SET-CAN* (επίσης ονομαζόμενο και ως *NUP214*) που δημιουργήθηκε από χρωμοσωμική μετατόπιση σε ασθενή (S.E) με οξεία αδιαφοροποίητη λευχαιμία και από εκεί μάλιστα πήρε και το όνομά της (SET: SE Translocation) [67, 68]. Στη βιβλιογραφία μπορεί να αναφέρεται ανάλογα με τον λειτουργικό της ρόλο και ως I2PP2A (Protein Phosphatase 2A Inhibitor 2), PHAP II (Putative HLA Class II Associated Protein II), TAF-Iβ (Template Activating Factor-1β) και IGAAD (Inhibitor of GzmA-activated DNase)

Ως ένα εξελικτικά διατηρημένο γονίδιο που βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 9q34, εκφράζεται σε πολλά όργανα όπως στο ήπαρ, στους νεφρούς, στο σπλήνα, στον πνεύμονα, στην καρδιά, στο γοναδικό σύστημα και στον εγκέφαλο. Στο γοναδικό σύστημα, η SET εκφράζεται στα κύτταρα Leydig, στα σπερματοκύτταρα, στα ωοκύτταρα και στα κύτταρα θήκης [69, 70]. Η πολύ μεγαλύτερη έκφραση της SET στις προγονικές γονάδες του εμβρύου σε σχέση με τις ενήλικες γονάδες δείχνουν ότι μπορεί να συμμετέχει στην πρώιμη οντογένεση του γοναδικού συστήματος [71].

Πρόκειται για μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία συμμετέχει στη ρύθμιση της κυτταρικής κίνησης, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στον κυτταρικό κύκλο και στη μεταγραφή γονιδίων μέσω της δέσμευσης στις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων. Η SET αλληλεπιδρά με ιστόνες ενώ παράλληλα με το σχηματισμό του συμπλόκου INHAT (inhibitor of histone acetyltransferase), αναστέλλει την ακετυλίωση των ιστονών και έμμεσα ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων (Εικόνα 9). Επιπλέον, η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να αλληλεπιδράσει με την πρωτεΐνη p53 και να αναστείλει την ακετυλίωση της οδηγώντας έτσι στην καταστολή της δράσης της p53 και επακόλουθα στη αναστολή της μεσολαβούμενης από την p53 παύσης του κυτταρικού κύκλου και στην απόπτωση (Εικόνα 9). Επίσης η SET είναι αρνητικός ρυθμιστής στην ανάπτυξη νευρώνων [72] και εμπλέκεται στην παθογένεση της πρωτογενούς μικροκεφαλίας [73] και της νόσου Alzheimer [74].

Μια σημαντική μετα-μεταφραστική τροποποίηση που έχει ανιχνευθεί στη SET είναι η φωσφορυλίωση της σερίνης στο κατάλοιπο 9. Στον πυρήνα, η SET βρίσκεται σε μορφή διμερούς και η φωσφορυλίωση της σερίνης 9 είναι το σήμα που καταργεί

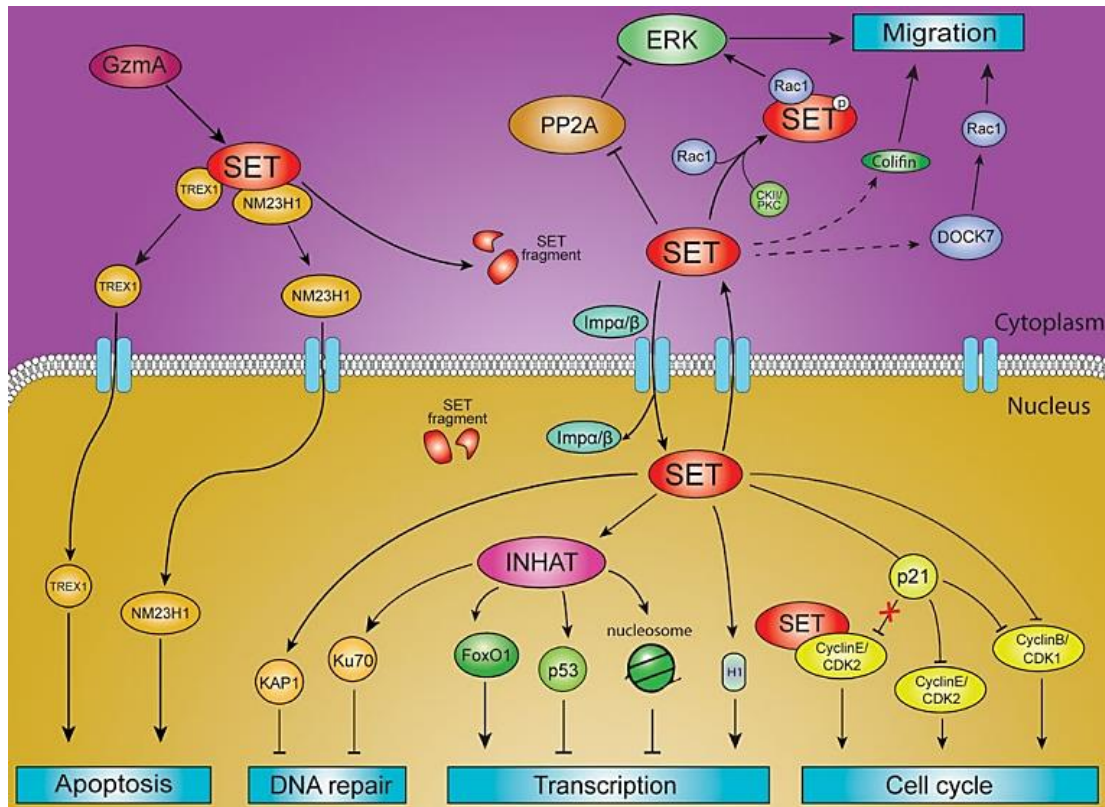
τη μορφή αυτή και οδηγεί τη μονομερή πλέον πρωτεΐνη στο κυτταρόπλασμα όπου και αλληλεπιδρά με την Rho GTPase Rac1. Η μετατόπισή της στο κυτταρόπλασμα και η αλληλεπίδρασή της με τη Rac1 διεγείρει τη μετανάστευση των κυττάρων με τρόπο εξαρτώμενο της Rac1 (Εικόνα 8,9) <sup>[75]</sup>.



**Εικόνα 8. Η μετακίνηση της SET στο κυτταρόπλασμα και η αλληλεπίδρασή της με τη Rac1.** Μέσα στον πυρήνα η μη φωσφορυλιωμένη SET είναι σε μορφή διμερούς. Μετά από τη φωσφορυλίωσή της στη σερίνη 9, το διμερές διαχωρίζεται επιτρέποντας έτσι την ανακατανομή της SET σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα. Μετά από την ενεργοποίηση της Rac1, η SET μετακινείται στην κυταροπλασματική μεμβράνη. Εκεί, η Rac1 μπορεί να διεγείρει τη μετανάστευση μέσω κινασών με την προϋπόθεση η SET να αναστείλει τη φωσφατάση PP2A <sup>[75]</sup>.

Η πρωτεΐνη SET σχηματίζει επίσης ένα ανασταλτικό σύμπλεγμα με την πρωτεΐνη nm23-H1. Η nm23-H1 είναι μια πολύ-λειτουργική πρωτεΐνη με δράση κινάσης ιστιδίνης, κινάσης διφοσφορικού νουκλεοσιδίου, 3'-5' εξωνουκλεάσης και επίσης με δράση καταστολέα της μετάστασης. Η ενεργότητα εξωνουκλεάσης που έχει είναι βασική στην καταστολή της μετάστασης <sup>[76]</sup> και η SET ρυθμίζει την ενεργότητα αυτή σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που απομονώνει την nm23-H1 στο κυτταρόπλασμα και συγκεκριμένα στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο, εμποδίζοντας τη δράση της και

προάγοντας έτσι τη μετάσταση. Μετά από τη δράση των κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, η SET διασπάται από το Granzyme A και απελευθερώνεται η nm23-H1 η οποία στη συνέχεια μπορεί να πάει στον πυρήνα και να ασκήσει την ενεργότητα εξωνουκλεάσης που έχει (Εικόνα 9) <sup>[77]</sup>.



**Εικόνα 9.** Σχηματική απεικόνιση των φυσιολογικών λειτουργιών της SET και των πρωτεϊνών με τις οποίες αλληλεπιδρά. Η SET λαμβάνει μέρος σε πολλαπλές κυτταρικές διεργασίες όπως η κυτταρική μετανάστευση, ο κυτταρικός κύκλος, η απόπτωση, η μεταγραφή γονιδίων και η επιδιόρθωση του DNA. Ρυθμίζει τις λειτουργίες ενός υποσυνόλου πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε κάθε διεργασία. Η μούρη γραμμή δείχνει τις άμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της SET με τις πρωτεΐνες, ενώ η στικτή γραμμή δείχνει τις έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους <sup>[78]</sup>.

## 4.2 Δομή και λειτουργία

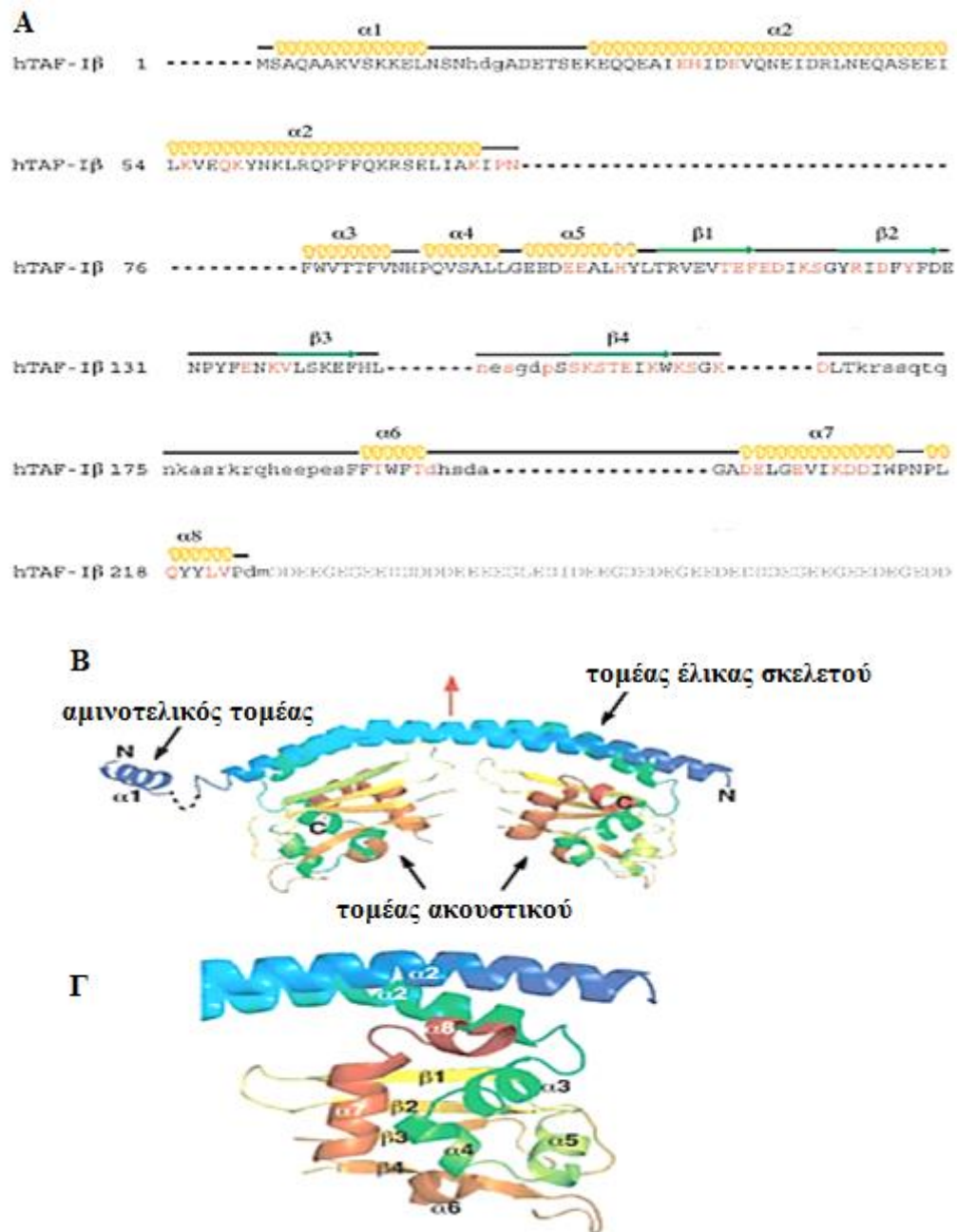
Το 1994 ο Adachi και οι συνεργάτες του ταυτοποίησαν τη SET και την χαρακτήρισαν ως μια πρωτεΐνη 39 kDa. Η SET αποτελείται από 277 αμινοξέα με μια προβλεπόμενη μοριακή μάζα των 32 kDa <sup>[67]</sup>. Η διαφορά στο μοριακό βάρος της SET όπως αυτό βρέθηκε πειραματικά, 39 kDa, σε σχέση με το προβλεπόμενο μέγεθος των 32 kDa πιθανότατα να οφείλεται στη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης αυτής ή/και στην υψηλή περιεκτικότητα σε όξινα κατάλοιπα στην αμινοξική αλληλουχία της <sup>[68]</sup>. Παράλληλα έδειξαν ότι η SET εκφράζεται σε διάφορες κυτταρικές σειρές του ανθρώπου με το μοριακό βάρος να είναι 39 kDa σε κάθε περίπτωση. Μάλιστα τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα της έρευνας του von Lindern, αποδίδοντας έτσι στη SET ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους <sup>[67]</sup>. Η εργασία του von Lindern και των συνεργατών <sup>[68]</sup> απέδειξε επίσης ότι η SET φωσφορυλιώνεται *in vivo* και πως η σερίνη 9 ήταν εκείνο το αμινοξύ που φωσφορυλιωνόταν κατά κόρον, υποδεικνύοντας ότι η SET είναι υπόστρωμα κινασών σερίνης/θρεονίνης. Τέλος, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα και η διαμερισματοποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην περιεκτικότητά της σε ένα μεγάλο ποσοστό όξινων καταλοίπων, μισά εκ των οποίων είναι παρόντα στο καρβοξυτελικό κομμάτι της πρωτεΐνης, σχηματίζοντας έτσι μια μακριά όξινη ουρά.

Αξιοσημείωτο είναι ότι πολλές πρωτεΐνες με όξινες τέτοιες περιοχές, βρίσκονται στον πυρήνα. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι η SET έχει μεγάλη ομολογία με την πυρηνική πρωτεΐνη NAP-1 (nucleosome assembly protein), γνωστή για τη δράση της ως συνοδός ιστονών, υποδηλώνοντας έτσι τον πιθανό ρόλο της στη συναρμολόγηση της χρωματίνης <sup>[70]</sup>.

Ο Muto και οι συνεργάτες <sup>[79]</sup> του περιέγραψαν λεπτομερώς τη δομή της SET. Καθόρισαν την κρυσταλλική δομή της με τη μέθοδο MAD (multi-wavelength anomalous dispersion). Σύμφωνα με αυτήν, η πρωτεΐνη σχηματίζει ένα διμερές που εμφανίζει ένα σχήμα ακουστικού «headphone». Το διμερές είναι περίπου 110 x 50 x 50 x Å<sup>3</sup> σε μέγεθος και η κάθε υπομονάδα αποτελείται από το αμινοτελικό άκρο, μια έλικα σκελετού «backbone» και έναν τομέα όμοιο ακουστικού «earmuff domain» (αμινοξέα 1-24, 25-78, 79-225 αντίστοιχα). Κατά τη μελέτη των αμινοτελικών άκρων, δεν ήταν εφικτή η παρατήρηση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των καταλοίπων μεταξύ των α1 και α2 ελίκων (Εικόνα 10Α). Στην κρυσταλλική μορφή, η α1 έλικα είναι μεταξύ των δυο earmuff περιοχών και παραμένει άγνωστο αν αυτή η



αλληλεπίδραση είναι βιολογικά σημαντική. Η έλικα σκελετού μήκους 51 αμινοξέων, λυγίζει στις 50 μοίρες, και στο διμερές, οι δυο αυτές έλικες αλληλεπιδρούν υδροφοβικά με αντιπαράλληλο τρόπο. Η συμμετρία μεταξύ των δύο υπομονάδων ορίζεται από έναν νοητό, κατακόρυφο άξονα (Εικόνα 10B). Η δομή ακουστικού, η οποία είναι προσανατολισμένη προς την κοίλη πλευρά της έλικας σκελετού, σχηματίζει μια δομή α+β στην οποία 6 α-έλικες βρίσκονται αντιπαράλληλα, πάνω σε τετρακλωνικά β-πτυχωτά φύλλα (Εικόνα 10Γ). Η ηλεκτρονιακή πυκνότητα των καταλοίπων μεταξύ της β4-αλυσίδας και της α6-έλικας (κατάλοιπα 168-188) δεν μπορούσε να παρατηρηθεί (Εικόνα 10Α), το οποίο σημαίνει ότι το χαμηλότερο κομμάτι του τομέα ακουστικού είναι ιδιαίτερα ευκίνητο σε υδατικό διάλυμα <sup>[79]</sup>.



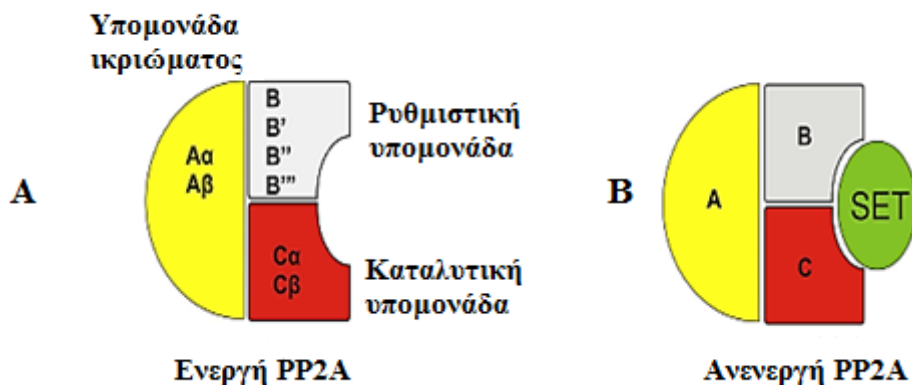
**Εικόνα 10. Η κρυσταλλική δομή της SET.** (A) Στοιχίση των αμινοξικών αλληλουχιών της πρωτεΐνης SET. Οι α-έλικες και τα β-φύλλα υποδεικνύονται στις αλληλουχίες με **κίτρινο** και **πράσινο** χρώμα αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα στο όξινο τμήμα είναι γκρι. (B) Ο άξονας συμμετρίας του διμερούς αποδίδεται με **κόκκινο**. (Γ) Η δομή του τομέα ακουστικού (*ear*uff).

Αν και ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η SET αναστέλλει την PP2A πιστεύεται ότι γίνεται μέσω της άμεσης πρόσδεσης στην καταλυτική της υπομονάδα, οι λεπτομέρειες αυτής της αλληλεπίδρασης δεν είναι ακόμη γνωστές (Εικόνα 11) [80]. Μηχανιστικά, η SET αναστέλλει την PP2A σε δοκιμασίες ελεύθερες κυττάρων σε

χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ δεν αναστέλλει συγγενείς φωσφατάσες, δηλαδή παρουσιάζει μια εξειδίκευση προς το συγκεκριμένο ένζυμο [81]. Από τότε που ανακαλύφθηκε η SET, έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται σε διάφορους καρκίνους, με σημαντικό ρόλο σε αυτό να έχει η δράση της ως αναστολέας της PP2A. Αλλαγές στο ενδογενές κεραμίδιο (αναστολέας της SET) είναι επίσης συχνά εμφανιζόμενες σε διάφορους καρκίνους [82].

Υπάρχουν συγκεκριμένες δομικές περιοχές της SET οι οποίες εμπλέκονται στην αλληλεπίδρασή της με την PP2A. Χαρακτηριστικά έχει βρεθεί ότι στο εσωτερικό της τμήμα η περιοχή κοντά στο αμινοτελικό άκρο (κατάλοιπα 36-124) είναι υπεύθυνη για την αναστολή της PP2A [83]. Δημοσιευμένα δεδομένα δείχνουν πως η αμινοτελική και η καρβοξυτελική περιοχή του Granzyme A [84] κόβει τη SET στο κατάλοιπο N175 για να προσδεθεί και να αναστείλει την PP2A [85]. Η περιοχή διπλής ελίκωσης (E25-Q65), που είναι κρίσιμη για το διμερισμό της SET, ρυθμίζει επίσης κάποιες αλλά όχι όλες τις πυρηνικές λειτουργίες της SET. Ο διμερισμός δεν είναι απαραίτητος για να αναστείλει η SET την PP2A. Τέλος, είναι ενδιαφέρον ότι δεν έχουν ακόμα περιγραφεί οι λεπτομέρειες των ειδικών αλληλεπιδράσεων της SET και του ολοενζύμου της PP2A με τις ειδικές του υπομονάδες A,B,C με λειτουργίες ογκοκαταστολής, δεν έχουν ακόμα περιγραφεί [86].

### Το ολοένζυμο PP2A



**Εικόνα 11. Η οργάνωση του ολοενζύμου της PP2A χωρίς και με την αλληλεπίδραση με τη SET/I2PP2A.** A) Το ολοένζυμο περιέχει την υπομονάδα ικρίωματος A, τη ρυθμιστική υπομονάδα B και την καταλυτική υπομονάδα C. Κάθε τύπος υπομονάδας μπορεί να συμπεριλάβει καθένα από τα πολλαπλά είδη για κάθε υπομονάδα. B) Η SET αναστέλλει τη δράση της PP2A μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με την καταλυτική υπομονάδα της PP2A [80].

## 5. Φαρμακολογικοί αναστολείς της SET/I2PP2A

### 5.1. Το πεπτίδιο COG112

Το COG112 είναι ένα μιμητικό πεπτίδιο της απολιποπρωτεΐνης E. Η απολιποπρωτεΐνη E (apoE) είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη 299 καταλοίπων με κεντρικούς ρόλους στο μεταβολισμό των λιπιδίων, στη νευροβιολογία και στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Έχει τρεις κύριες ισομορφές (apoE2, apoE3 και apoE4) οι οποίες έχουν διαφορετικές επιδράσεις στη λιπιδική και νευρωνική ομοιόσταση. Μια σημαντική λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι να μεσολαβεί στη διανομή/ανακατανομή των λιπιδίων μεταξύ των διαφόρων ιστών και κυττάρων του σώματος. Επιπλέον, η ενδοκυτταρική apoE μπορεί να ρυθμίζει διάφορες κυτταρικές διεργασίες φυσιολογικά ή παθοφυσιολογικά συμπεριλαμβανομένης της συναρμολόγησης του κυτταροσκελετού και της σταθερότητάς του, της μιτοχονδριακής ακεραιότητας και λειτουργίας και της δενδριτικής μορφολογίας και λειτουργίας<sup>[87]</sup>.

Λόγω της μακρομοριακής φύσης και της αδυναμίας της apoE να διεισδύσει στον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο Li και οι συνεργάτες του ανέπτυξαν το πεπτίδιο COG133 το οποίο προέρχεται από τα αμινοξέα 133-149 της ολοπρωτεΐνης apoE. Απέδειξαν πως το COG133 διατηρεί τις νευροπροστατευτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της apoE τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

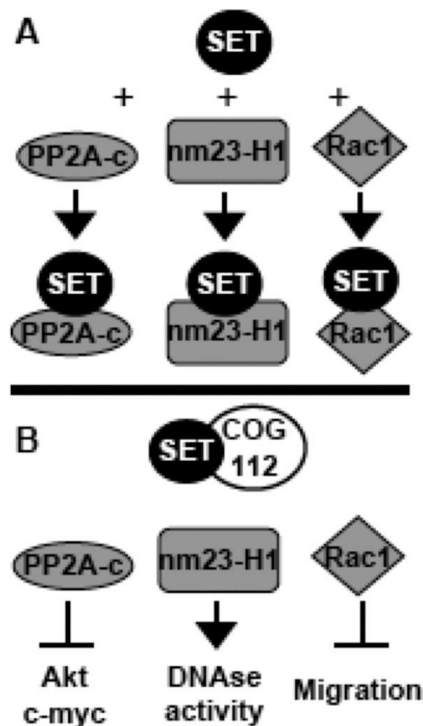
Για να διευκολυνθεί η διαμεμβρανική διαπερατότητα του COG133, σύντηξαν έναν τομέα μεταγωγής πρωτεΐνης (protein transduction domain) που προέρχεται από τη πρωτεΐνη antennapedia της *Drosophila* με το COG133 και δημιούργησαν το COG112. Η σύντηξη αυτή ενίσχυσε δραματικά όλες τις εξεταζόμενες βιοενεργότητες του COG133, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της απελευθέρωσης φλεγμονωδών κυτοκινών και της μείωσης του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων *in vitro*, παρέχοντας έτσι πιο ισχυρές θεραπευτικές επιδράσεις<sup>[88, 89]</sup>.

Παράλληλα, το COG112 επιδεικνύει θεραπευτική αποτελεσματικότητα στη λειτουργική και ιστολογική ανάκτηση σε ποντίκια με αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα που χρησιμοποιούνται ως μοντέλα ανθρώπινης σκλήρυνσης κατά πλάκα. Συνδυάζει ευνοϊκά την καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης, την άμβλυνση της απομυελίνωσης, την προαγωγή της επαναμυελίνωσης και την σχετική λειτουργική ανάκτηση σε ζωικό μοντέλο απομυελίνωσης του ΚΝΣ<sup>[90]</sup>.

Η δημιουργία του COG112 οδήγησε τον Singh <sup>[91, 92]</sup> και τους συνεργάτες του στο να αναφέρουν πρώτοι την ανασταλτική επίδραση αυτού του πεπτιδίου στο μονοπάτι του NF-κB. Αναστέλλει τη συσσώρευση του p65 στον πυρήνα και την επακόλουθη μεταγραφή προ-φλεγμονωδών γονιδίων, τη φωσφορυλίωση και την αποικοδόμηση της IκB-α αλλά και τη δραστηριότητα της IKK κινάσης που οδηγούν στην ενεργοποίηση του NF-κB <sup>[91, 92]</sup>.

## **5.2 COG112 και SET-PP2A**

Λόγω των διαφορετικών ρόλων που παίζει η ογκοπρωτεΐνη SET σε πολλά μονοπάτια που οδηγούν στην εξέλιξη του καρκίνου και στη μετάσταση, η φαρμακολογική στόχευσή της θα μπορούσε να παράσχει μια νέα προσέγγιση στην αντικαρκινική θεραπεία. Το COG112 δεσμεύει τη SET που εκφράζεται στα ανοσοκύτταρα και αυτό οδηγεί στην αύξηση της δραστηριότητας της PP2A <sup>[93]</sup>. Η θεραπεία αυτή έχει επιπρόσθετα ως αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα της PP2A που αντιστοιχεί στη μειωμένη σηματοδότηση Akt και στη σταθερότητα του c-Myc. Παράλληλα, το COG112 εμποδίζει την αλληλεπίδραση της SET με την NM23-H1 οδηγώντας έτσι σε αύξηση της κατασταλτικής λειτουργίας της πρωτεΐνης αυτής στη μετάσταση. Επιπλέον, το πεπτίδιο αναστέλλει τη μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων μέσω της αναστολής της δέσμευσης της SET με την Rac1 (Εικόνα 12) <sup>[94]</sup>.



**Εικόνα 12.** Η στόχευση της λειτουργίας της ογκοπρωτεΐνης SET έχει πολλαπλές επιδράσεις. Σχηματική απεικόνιση της αναστολής των λειτουργιών της SET από το COG112. A) Η SET αναστέλλει τόσο την PP2A όσο και την nm23-H1. Η SET απαιτείται επίσης για τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω της Rac1. B) Παρουσία του COG112, η SET δεν είναι σε θέση να σχηματίσει σύμπλοκα πρωτεϊνών με την PP2A, την nm23-H1 και τη Rac1<sup>[94]</sup>.

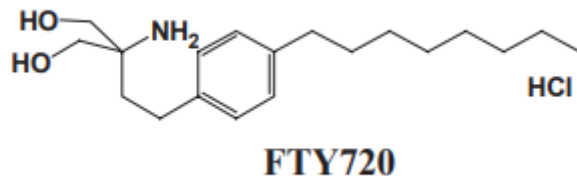
Στη μελέτη του Zhang<sup>[95]</sup> αναφέρεται το πλεονέκτημα της χρήσης του COG112 για τη μείωση της SET σε κύτταρα MCF-7/PTX (human breast carcinoma paclitaxel-resistant cells) και βρέθηκε ότι το πεπτίδιο μπορούσε να αυξήσει την ευαισθησία των κυττάρων αυτών στο paclitaxel. (Το paclitaxel είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του καρκίνου του μαστού στο οποίο όμως όλοι σχεδόν οι ασθενείς τελικά αναπτύσσουν αντοχή, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητά του). Εν τω μεταξύ, το COG112 προήγαγε επίσης την απόπτωση των κυττάρων, τη μειωμένη έκφραση των μεταφορέων ABC (ATP-binding cassette transporters, μεταφορείς που έχουν στενή σχέση με την εμφάνιση αντοχής σε φάρμακα στους καρκίνους), τη μειωμένη έκφραση της Bcl-2 και την αύξηση της έκφρασης της Bax για να αντιστραφεί η αντοχή στο paclitaxel. Επιπλέον, διαπίστωσαν πως η μείωση της έκφρασης της SET συνοδευόταν από αυξημένη δραστηριότητα της PP2A και μειωμένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Akt, προτείνοντας έτσι ότι το σηματοδοτικό

μονοπάτι PI3K/Akt μπορεί να εμπλέκεται στην αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων και στην επακόλουθη αντοχή τους στα φάρμακα [95].

### 5.3. Το φάρμακο FTY720

Η δομή της Φινγκολιμόδης (FTY720) αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1995 ύστερα από ένα πρόγραμμα χημικής σύνθεσης μορίων με βάση τον χημικό μεταβολίτη ISP-I (Εικόνα 13) [96]. Το ISP-I, ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό φυσικό προϊόν, είναι μεταβολίτης του *Isaria sinclairii*, ενός είδους εντομοπαθογόνου μύκητα που χρησιμοποιείται ως πανάκεια στην κινέζικη ιατρική για την «αιώνια νεότητα». Η χημική δομή του ISP-I αποδείχθηκε ότι είναι πανομοιότυπη με εκείνη της Myriocin και της Thermozyomicidine, που απομονώθηκαν από το *Myriococcum albomyces* και το *Mycelia sterilia* αντίστοιχα.

Παρά το μικρό μοριακό του βάρος, το ISP-I ήταν τοξικό και είχε μη ευνοϊκές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως χαμηλή διαλυτότητα. Απλοποιήσεις στη δομή του οδήγησαν σε μια νέα συνθετική ένωση, τη 2-άμινο-2[2-(4-οκτυλφαινυλ)αιθυλ]υδροχλωρική προπανο-1,3-διόλη ή αλλιώς Φινγκολιμόδη [FTY720 (Gilenya; Novartis)]. Η ένωση αυτή είχε ισχυρότερη ανοσοκατασταλτική δράση και λιγότερη τοξικότητα από το ISP-I [97]. Το ISP-I αναφέρεται ότι αναστέλλει την παλμιτοϋλοτρανσφεράση σερίνης η οποία εμπλέκεται στη βιοσύνθεση σφιγγολιπιδίων. Περίεργο ήταν ότι το FTY720 δεν εμφάνισε την ανασταλτική αυτή δράση υποδηλώνοντας ότι ο μηχανισμός δράσης άλλαξε κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια βελτιστοποίησης του ISP-I προς το FTY720 [98].



Εικόνα 13. Χημική δομή του FTY720 [97].

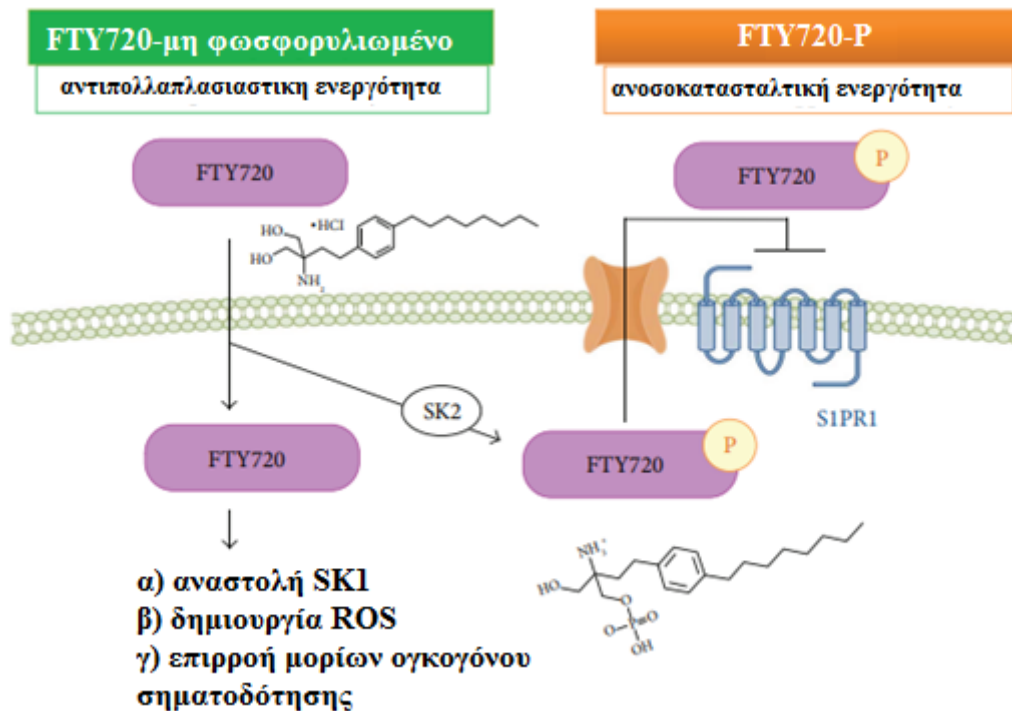
Το FTY720 εγκρίθηκε για τη θεραπεία υποτροπιάζουσών μορφών σκλήρυνσης κατά πλάκας το 2010 ως ένα ισχυρό ανοσοκατασταλτικό. Πρόκειται για ένα δομικό ανάλογο της φυσικής σφιγγοσίνης που δρα και ως αγωνιστής του υποδοχέα S1P (sphingosine-1-phosphate).

Το S1P παράγεται από τη φωσφορυλίωση της σφιγγοσίνης από κινάσες σφιγγοσίνης. Είναι ένας πλειοτροπικός διαμεσολαβητής λιπιδικής σηματοδότησης που εκκινεί πλήθος σηματοδοτικών μονοπατιών μέσω της δέσμευσης και ενεργοποίησης πέντε GPCRs (G protein-coupled receptors), από τον S1P<sub>1</sub>-S1P<sub>5</sub>, που του προσδίδει ρόλους σε διαδικασίες σχετικές με τη σκλήρυνση κατά πλάκας, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής και της επιδιόρθωσης. Οι υποδοχείς S1P εμπλέκονται σε πολλαπλές βιολογικές διαδικασίες όπως η ανακύκλωση των λευκοκυττάρων, ο πολλαπλασιασμός των νευρικών κυττάρων, η μετανάστευση, η λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων κ.α.<sup>[99]</sup>.

Το FTY720 φωσφορυλιώνεται από κινάσες σφιγγοσίνης (SKs) στο κύτταρο και από αυτή την οπτική πλευρά, θεωρείται ως προ-φάρμακο, με την ανοσοκατασταλτική του δράση να εμφανίζεται μετά από την φωσφορυλίωσή του, για τον σχηματισμό φωσφο-FTY720 (FTY720-P). Το φωσφο-FTY720 οδηγεί στην εσωτερίκευση των S1P (S1P<sub>1/3/4/5</sub>) υποδοχέων με αποτέλεσμα τη λεμφοπενία μέσω της δέσμευσης των λεμφοκυττάρων στους λεμφικούς ιστούς, εμποδίζοντας έτσι τη μετάβασή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα και προκαλώντας υποτροπή στη σκλήρυνση κατά πλάκας (Εικόνα 14)<sup>[100]</sup>.

Εκτός από τον ήδη γνωστό τρόπο λειτουργίας του ως τροποποιητή του υποδοχέα S1P, το FTY720 διαθέτει πληθώρα άλλων επιδράσεων στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αρκετά στοιχεία που δείχνουν ότι στη φωσφορυλιωμένη του μορφή, είναι επίσης ένα ενεργό μόριο και έχει αντικαρκινικές και αντιμεταστατικές ιδιότητες, με τις αντικαρκινικές του ιδιότητες να έχουν αναφερθεί σε διάφορους τύπους καρκίνων όπως στον καρκίνο του μαστού, στη λευχαιμία, στο γλοιοβλάστωμα κ.α.<sup>[101]</sup>. Το μη φωσφορυλιωμένο FTY720 εμποδίζει την ιδιότητα των κυτταροτοξικών CD8 T κυττάρων να θανατώσουν τα κύτταρα-στόχους τους με έναν διαφορετικό μηχανισμό που περιλαμβάνει το μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος, το οποίο δεν σχετίζεται με τους υποδοχείς σφιγγοσίνης (Εικόνα 14). Αυτό έχει επιπτώσεις τόσο στην αύξηση της επιδεκτικότητας σε ιικές μολύνσεις όσο και στην ενίσχυση της θεραπευτικής του αποτελεσματικότητας στη σκλήρυνση κατά πλάκας<sup>[102]</sup>.





**Εικόνα 14.** Το FTY720 έχει αντικαρκινικές ιδιότητες και ανοσοκατασταλτική δράση. Η μη φωσφορυλιωμένη μορφή του FTY720 παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστική δράση μέσω της αναστολής της SKI και της δημιουργίας ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) και επηρεάζει επίσης μόρια ογκογόνου σηματοδότησης. Αντίθετα, η φωσφορυλιωμένη μορφή στην οποία το FTY720 μετατρέπεται μέσω κινάσων σφιγγοσίνης όπως η SK2, εξάγεται μέσω μεταφοράς και δρα ως λειτουργικός ανταγωνιστής στον υποδοχέα SIP αναστέλλοντας έτσι την έξοδο των λεμφοκυττάρων από τα λεμφοειδή όργανα <sup>[103]</sup>.

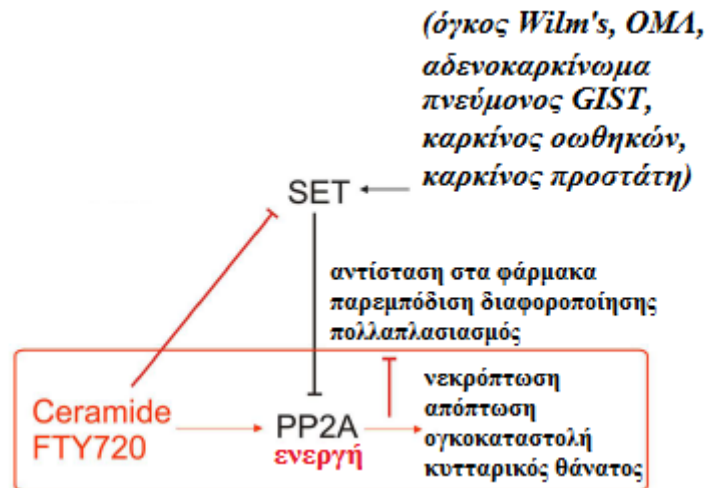
#### 5.4 FTY720 και SET-PP2A

Σε έρευνα που διεξήχθη από τον Matsuoka <sup>[104]</sup> και τους συνεργάτες του, που αφορούσε την επαγωγή της αποφωσφορυλίωσης της Akt κινάσης (παράγοντας επιβίωσης των κυττάρων) από το FTY720, βρέθηκε ότι το FTY720 μπορεί να ενεργοποιεί φωσφατάσες οι οποίες στη συνέχεια αποφωσφορυλιώνουν πρωτεϊνικές κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Η Akt κινάση αποφωσφορυλιώνεται από την PP2A. Το εύρημα ότι τα κύτταρα που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με FTY720 είχαν ενεργοποίηση πρωτεϊνικών φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης και το ότι με οκαθαϊκό οξύ αυτή η αλλαγή καταργούνταν, υπέδειξε η πρωτεϊνική φωσφατάση που ενεργοποιεί το FTY720 είναι η PP2A. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας

καταλήγουν στο ότι το FTY720 θα μπορούσε να ενεργεί άμεσα και έμμεσα στην ενεργοποίηση της PP2A χωρίς ωστόσο να προτείνουν κάποιον μηχανισμό <sup>[104]</sup>.

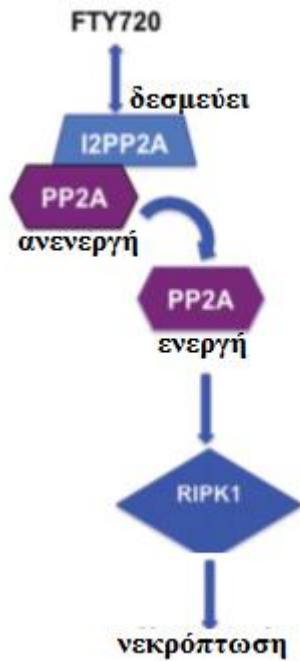
Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η λειτουργική απώλεια της δραστηριότητας της PP2A είναι σημαντική για κάποιες μυελογενείς κακοήθειες όπως η χρόνια μυελογενής λευχαιμία και η οξεία μυελογενής λευχαιμία. Η απώλεια δραστηριότητας μπορεί να συμβεί σε διαφορετικά επίπεδα, όπως μέσω της απώλειας της έκφρασης ή μέσω της αναστολής επαγόμενη από τη φωσφορυλίωση, είτε μέσω της δράσης εξωτερικών τελεστών όπως η SET που είναι αναστολέας της PP2A. Στην έρευνα των Yang και συνεργατών <sup>[105]</sup>, παρουσιάζονται αποτελέσματα τα οποία δείχνουν ότι ο μηχανισμός ενεργοποίησης της PP2A που επάγεται από το FTY720 σε κύτταρα με OML, μπορεί να περιλαμβάνει τη μειορρύθμιση της SET και την αποφωσφορυλίωση της καταλυτικής υπομονάδας της PP2A. Στη C-KIT/TKD υποομάδα της OML, η δραστηριότητα της PP2A μειώνεται σημαντικά και το FTY720 είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα κύτταρα αυτά. Το βιολογικό αποτέλεσμα της δράσης του FTY720 μπορεί να συσχετισθεί με την επανενεργοποίηση της PP2A, διαχωρίζοντάς το από άλλα θεραπευτικά που χρησιμοποιούνται σήμερα στην ασθένεια αυτή και υποστηρίζοντας έτσι την εισαγωγή του φαρμάκου αυτού στη θεραπεία της OML <sup>[105]</sup>.

Το FTY720 διεγείρει επίσης επιλεκτικά την απόπτωση των νεοπλασματικών αλλά όχι των φυσιολογικών κυττάρων. Η αντικαρκινική αυτή δραστηριότητα δεν απαιτεί φωσφορυλίωση αλλά εξαρτάται από την ικανότητά του να ενεργοποιεί την PP2A (Εικόνα 15). Τα Ph<sup>-</sup> μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα (MPNs) εκφράζουν μια ιδιοσυστατικά ενεργή JAK2 κινάση. Η κινάση αυτή μετασχηματίζει βλαστικά/προγονικά κύτταρα μυελού των οστών μέσω της εκτροπής ενεργοποιητικών μονοπατιών μετασχηματίζοντας έτσι σήματα επιβίωσης που οδηγούν σε ανεξάρτητη-κυτοκίνης ανάπτυξη προγονικών ερυθροειδών κυττάρων. Στα νεοπλάσματα αυτά, η PP2A αναστέλλεται από τη SET έπειτα από φωσφορυλίωση της τελευταίας από την JAK2 κινάση. Η επανενεργοποίηση της PP2A από το FTY720 ασκεί ισχυρή αντιλευχαιμική δράση χωρίς να υπάρχει τοξική επίδραση στα φυσιολογικά κύτταρα. Η αντικαρκινική δράση του FTY720, η οποία βασίζεται στην αδρανοποίηση/μειορρύθμιση της PP2A, εξαρτάται από την αλληλεπίδραση/δέσμευση της SET χωρίς να απαιτεί την μετατροπή του σε FTY720-P (Εικόνα 15), που απροσδόκητα φαίνεται να ευνοεί την ογκογόνο σηματοδότηση της JAK2 παρεμποδίζοντας την PP2A, όταν ενεργεί ως αγωνιστής του S1PR1 <sup>[106]</sup>.



**Εικόνα 15. Ο ρόλος της SET/I2PP2A και του κεραμιδίου/FTY720 στη ρύθμιση του κυτταρικού θανάτου μέσω της PP2A.** Η αναστολή της PP2A επάγεται μέσω διάφορων μηχανισμών στον καρκίνο, όπως μέσω της αύξησης της έκφρασης της SET και μέσω αλλαγών στο πρότυπο φωσφορυλίωσης της SET. Η στόχευση της SET με το κεραμίδιο ή και το FTY720 αναστέλλει τη SET, ενεργοποιεί την PP2A και επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε διάφορα καρκινικά κύτταρα <sup>[80]</sup>.

Παράλληλα, έγινε μια προσπάθεια να αναπτυχθεί μια νέα στρατηγική για τη θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα μέσω της άμεσης στόχευσης της SET από το FTY720. Το FTY720 αλλά όχι το FTY720-P δεσμεύεται άμεσα και στοχεύει τη SET μιμούμενο το κεραμίδιο, που ενεργοποιεί την ογκοκατασταλτική PP2A μέσω της άμεσης σύνδεσης με τη SET. Η σύνδεση του FTY720 με τη SET γίνεται μέσα στα τελευταία 100 αμινοξέα του καρβοξυτελικού τμήματος της πρωτεΐνης και ιδιαίτερα κρίσιμο κατάλοιπο είναι η λυσίνη 209 για την σύνδεση αυτή. Αυτό έχει ως συνέπεια την καταστολή της ανάπτυξης του όγκου του πνεύμονα επιλεκτικά μέσω της επαγωγής της νεκρόπτωσης από το RIPK1 (Εικόνα 16) <sup>[107]</sup>.



**Εικόνα 16.** Η καταστολή του όγκου του πνεύμονα μέσω του FTY720 η οποία περιλαμβάνει την κινάση του RIPK1. Το FTY720 δεσμεύεται άμεσα και στοχεύει την ογκοπρωτεΐνη SET, μιμούμενο το κεραμίδιο, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η PP2A η οποία ακολούθως οδηγεί το κύτταρο σε νεκρόπτωση εξαρτώμενη της κινάσης RIPK1 και σε επακόλουθη καταστολή του όγκου στους πνεύμονες [107].

Όλο και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η μετάπτωση του επιθηλίου σε μεσεγγύμα (EMT), η οποία ρυθμίζει την εξέλιξη του καρκίνου και τη μετάσταση, εμπλέκεται στην εμφάνιση αντοχής σε θεραπείες. Είναι μια μοναδική διαδικασία στην οποία τα επιθηλιακά κύτταρα υποβάλλονται σε αξιοσημείωτες μορφολογικές αλλαγές που χαρακτηρίζονται από τη μετάβαση από τον επιθηλιακό φαινότυπο σε ένα μεσεγγυματικό φαινότυπο.

Στη μελέτη του Liu το 2014 [108], αναφορικά με τον καρκίνο του πνεύμονα, μέσω πρωτεομικής ανάλυσης εντοπίστηκε ο παρακάτω σηματοδοτικός καταρράκτης: SET—| PP2A —| c-myc—| NDRG1—| Snail-EMT., ο οποίος εμπλέκεται στην απόκτηση φαινοτύπου EMT σε καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στη σισπλατίνη (αντικαρκινικό φάρμακο). Η SET οδηγεί τα κύτταρα σε EMT μέσω αναστολής της έκφρασης του NDRG1 αλλά η απενεργοποίησή της μέσω του FTY720 (ή επανενεργοποίηση της PP2A) αντέστρεψε το EMT, αποκατέστησε την ευαισθησία στο φάρμακο και ανέστειλε την ικανότητα διήθησης καθώς και την ανάπτυξη μεταμοσχευμένων όγκων του πνεύμονα. Με την ανακάλυψη αυτή βγαίνει το συμπέρασμα ότι η στόχευση της SET/PP2A από το FTY720 μπορεί να καταστήσει δυνατή την ευαισθητοποίηση του όγκου στα χημειοθεραπευτικά μέσω της παρεμπόδισης της σηματοδότησης που σχετίζεται με το EMT. Επιπλέον, προσφέρεται μια κλινική αξιολόγηση αυτού του φαρμάκου ως ρυθμιστή της ανθεκτικότητας σε φάρμακα αλλά και της προόδου του όγκου [108].

## ΣΚΟΠΟΣ

---

Το Sonic Hedgehog είναι ένα σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο δεν είναι ακόμα πλήρως αποκρυπτογραφημένο, ενώ δεν έχει ακόμα μελετηθεί τόσο αναλυτικά σε σχέση με άλλα αναπτυξιακά μονοπάτια. Παρά τις γνώσεις που υπάρχουν όσον αφορά τη βασική δομή του, πολλά είναι τα κενά σχετικά με τη ρύθμισή του. Υπάρχουν δημοσιευμένα άρθρα που συσχετίζουν τη φωσφατάση PP2A με το μονοπάτι αυτό, αλλά καμία αναφορά που να τοποθετεί τη SET, η οποία είναι αναστολέας της PP2A, στη ρύθμιση του μονοπατιού. Τέλος, λαμβάνοντας υπόψη δημοσιευμένα δεδομένα του εργαστηρίου ότι η SET εμπλέκεται κατά την εμβρυογένεση και κατά την ανάπτυξη αισθητήριου συστήματος στα έμβρυα zebrafish και έχοντας επίσης ως δεδομένο την κρισιμότητα του μονοπατιού Hedgehog στο στάδιο της εμβρυογένεσης, ο στόχος της παρούσας διπλωματικής ήταν να απαντήσει τα παρακάτω ερωτήματα:

- Ποιος είναι ο κυτταρικός εντοπισμός της SET και ποια η μορφολογία των κυττάρων παρουσία των φαρμακολογικών αναστολέων της πρωτεΐνης, FTY720 και COG112;
- Πώς επηρεάζονται οι πρωτογενείς κροσσοί, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog, από την αναστολή της δράσης της SET με τους δύο αυτούς αναστολείς;
- Η αναστολή της δράσης της SET, επηρεάζει το μονοπάτι Hedgehog σε πρωτεϊνικό ή/και σε μεταγραφικό επίπεδο;

### **1. Κυτταρική σειρά**

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά NIH3T3. Πρόκειται για κύτταρα εμβρυονικών ινοβλαστών ποντικού τα οποία ξεκίνησαν από μια κυτταρική γραμμή που απομονώθηκε το 1962 στο Τμήμα Παθολογίας του Πανεπιστημίου της Νέας Υόρκης. Το 3T3 αναφέρεται στο πρωτόκολλο μεταφοράς και εμβολιασμού κυττάρων της γραμμής και σημαίνει «μεταφορά σε 3 μέρες, εμβολιασμός  $3 \times 10^5$  κυττάρων». Χρησιμοποιώντας αυτό το πρωτόκολλο, η αθάνατοποιημένη κυτταρική σειρά αρχίζει να αναπτύσσεται και να σταθεροποιείται στην καλλιέργεια μετά από περίπου 20-30 γενεές ανάπτυξης *in vitro*. Οι επιστήμονες που καλλιέργησαν αρχικά αυτή την σειρά ήταν οι George Todaro και Howard Green και έλαβαν τα κύτταρα από ινοβλάστες εμβρυϊκού ελβετικού αλφικού ποντικού. Η κυτταρική γραμμή έχει έκτοτε γίνει μια τυποποιημένη κυτταρική σειρά ινοβλαστών<sup>[109]</sup>.

#### ***1.1 Συνθήκες καλλιέργειας***

Για την καλλιέργεια αυτής της σειράς χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Sigma) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% v/v εμβρυϊκό ορό βοός (FBS), 100 U/ml πενικιλίνη, 100U/ml στρεπτομυκίνη, 1000mg/L γλυκόζη και 4 mM L-γλουταμίνη. Ο ορός απενεργοποιήθηκε πριν τη χρήση του στους 58°C για 45 λεπτά. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων γινόντουσαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (Safeflow 1.2, Bioair Instruments) και η ανάπτυξή τους πραγματοποιούνταν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific CO<sub>2</sub> water Jacketed incubator) που είχε θερμοκρασία 37°C, σταθερή παροχή 5% CO<sub>2</sub> και ατμόσφαιρα κορεσμένη υδρατμών έτσι ώστε να διατηρηθεί σταθερό το pH του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας.

## **1.2 Χειρισμός κυττάρων**

Η καλλιέργεια των κυττάρων γινόταν σε πιάτα κυτταροκαλλιέργειας (10 cm) μέχρι να φτάσουν να καλύπτουν το 80% της επιφάνειας του και ακολουθούσε μεταφορά σε άλλα πιάτα (splitting) με την εξής διαδικασία:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού
2. Πλύσεις (x2) με 2 ml PBS 1X
3. Προσθήκη 2 ml θρυψίνης (trypsin-EDTA solution in PBS) για να αποκολληθούν τα κύτταρα και επώαση για περίπου 2 λεπτά στον επωαστικό κλίβανο (37°C)
4. Προσθήκη 4 ml θρεπτικού μέσου για να απενεργοποιηθεί η θρυψίνη και φυγοκέντρηση του εναιωρήματος για 2 λεπτά στις 1000 στροφές/λεπτό σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Hettich Universal II)
5. Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο
6. Ανάλογα με την επιθυμητή αραίωση, ποσότητα του εναιωρήματος μεταφερόταν σε νέο πιάτο και συμπληρωνόταν με θρεπτικό μέσο μέχρι να φτάσει ο όγκος στα 10 ml

## **1.3 Κρυοσυντήρηση κυττάρων**

Η διατήρηση της κυτταρικής σειράς γινόταν μέσω αποθήκευσης των κυττάρων σε συνθήκες βαθιάς ψύξης. Χρονικά, η αποθήκευση των NIH3T3 γινόταν όταν η καλλιέργεια βρισκόταν στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, μετά από τη θρυψινοποίηση των κυττάρων και τη φυγοκέντρωσή τους, το ίζημα επαναιωρούνταν σε διάλυμα 150μl DMSO και 1350μl FBS. Στη συνέχεια ακολουθούσε μεταφορά του εναιωρήματος σε ειδικό φιαλίδιο ψύξης (cryovial) το οποίο τοποθετούνταν αρχικά στους -80°C και τελικά σε δοχείο υγρού αζώτου στους -192°C.

Για την επαναφορά των κυττάρων, το φιαλίδιο ψύξης μεταφέρονταν σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 37°C και όταν ξεπάγωνε το περιεχόμενο, τα κύτταρα μεταφέρονταν αμέσως σε 5 ml θρεπτικού μέσου και φυγοκεντρώνταν. Μετά τη φυγοκέντρηση, γινόταν αφαίρεση του θρεπτικού μέσου και προσθήκη νέου σε

τελικό όγκο 10 ml, τέλος το εναιώρημα αυτό τοποθετούνταν σε πιάτο κυτταροκαλλιέργειας στις προαναφερθείσες συνθήκες.

## **2. Έκθεση των κυττάρων στα φάρμακα FTY720 και COG112, παρουσία και απουσία του αγωνιστή Purmorphamine**

Η διαδικασία έκθεσης των κυττάρων στους δύο φαρμακολογικούς αναστολείς της SET, FTY720 και COG112 περιελάμβανε την επίστρωση κυττάρων NIH3T3 σε τρυβλία/πιάτα 6 θέσεων με σκοπό τη λήψη κυτταρικών εκχυλισμάτων και περαιτέρω χρήση τους σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης Western ή 24 θέσεων όπου είχαν τοποθετηθεί καλυπτρίδες ώστε τα προσκολλημένα σε αυτές κύτταρα να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Η έκθεση των κυττάρων στις δύο ενώσεις, FTY720 και COG112, ξεκινούσε αφού είχαν συγχρονιστεί στη φάση G0-G1, κατά την οποία το μεγαλύτερο ποσοστό των κυττάρων είχαν σχηματίσει πρωτογενείς κροσσούς. Η διαδικασία συγχρονισμού περιελάμβανε είτε την ανάπτυξη των κυττάρων έως ότου φτάσουν >90% πυκνότητα παρουσία πλήρους θρεπτικού (10% ορός) (control) ή σε συνθήκες στέρησης ορού (θρεπτικό μέσο +0.5% ορό), για 24 ώρες. Στο αντίστοιχο σε κάθε περίπτωση μέσο καλλιέργειας, είχαν προστεθεί διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο ενώσεων όπως αυτές αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα και η έκθεση των κυττάρων σε αυτές διήρκεσε 24 ώρες.

Επιπλέον, προκειμένου να μελετηθεί η δράση των FTY720/COG112 σε σχέση με το μονοπάτι Hedgehog, έπειτα από 1 ώρα έκθεσης των κυττάρων στην κάθε ένωση, στο μέσο καλλιέργειας (0.5% ορός) προστέθηκε ο αγωνιστής Purmorphamine (2  $\mu$ M) με δράση ενεργοποίησης του εν λόγω σηματοδοτικού μονοπατιού και ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η καλλιέργεια κυττάρων παρουσία του διαλύτη DMSO (0,02% v/v) (Πίνακας 1).



**Πίνακας 1.** Ενδεικτική εικόνα πιάτου κατά την έκθεση στα φάρμακα. Να σημειωθεί ότι η προσθήκη Purmorphamine γινόταν 1 ώρα μετά την προσθήκη FTY720 ή COG112.

Conditions Drug	Synchronized cells (G0-G1) ~90% confluency (DMEM+10% FBS)	Synchronized cells (G0-G1) Serum Starvation (DMEM+0.5% FBS)	
		Control	DMSO
FTY720 (μM)	0	0	0
	5	5	5
	7.5	7.5	7.5
	10	10	10
COG112 (μM)	0	0	0
	0.01	0.01	0.01
	0.1	0.1	0.1
	1	1	1
	3	3	3

### 3. Έμμεσος διπλός ανοσοφθορισμός

#### 3.1 Μονιμοποίηση κυττάρων με 100% μεθανόλη

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια του τρυβλίου
2. Πλύσεις (x3) με 500 μl PBS 1X
3. Προσθήκη 300 μl παγωμένης μεθανόλης και επώαση για 5 λεπτά
4. Αφαίρεση μεθανόλης
5. Πλύσεις (x2) με PBS 1X

#### 3.2 Μονιμοποίηση κυττάρων με PFA 4%

1. Αφαίρεση θρεπτικού μέσου από τα πηγαδάκια του τρυβλίου
2. Πλύσεις (x3) με 500 μl PBS 1X
3. Προσθήκη 300 μl 4% PFA για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
4. Αφαίρεση PFA και προσθήκη 50 mM NH<sub>4</sub>Cl (500 μl) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Αφαίρεση NH<sub>4</sub>Cl και 2 πλύσεις με 500 μl PBS 1X

### 3.3 Παρεμπόδιση μη ειδικής δέσμευσης (blocking)

1. Μετακίνηση καλυπτρίδων σε κατάλληλο δοχείο η επιφάνεια του οποίου ήταν καλυμμένη με parafilm και πλύση με 30 μl PBS 1X
2. Επώαση των μονιμοποιημένων κυττάρων με 30 μl 10% FCS (fetal calf serum) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου

### 3.4 Πρωτογενές αντίσωμα

1. Επώαση σε πρωτογενές αντίσωμα αραιωμένο σε 10% FCS για 50 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
2. Πλύσεις (x3) με PBS 1X για 5 λεπτά
3. Μια πλύση με 10% FCS για 5 λεπτά

<b>ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ</b>	<b>ΑΡΑΙΩΣΗ</b>
Dr. Set πολυκλωνικό κουνελιού (Davids Biotechnologie GmbH)	1:40
Acetylated Tubulin μονοκλωνικό ποντικού (6-11B-1 Sigma Aldrich T7451)	1:2000

### 3.5 Δευτερογενές αντίσωμα

1. Επώαση κυττάρων σε δευτερογενές αντίσωμα αραιωμένο σε 10% FCS για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι
2. Πλύσεις (x4) με PBS 1X για 5 λεπτά, σε σκοτάδι

<b>ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ</b>	<b>ΑΡΑΙΩΣΗ</b>
Alexa Fluor-488 (Jackson)	1:400
Alexa Fluor-594 (Jackson)	1:400

### **3.6 Χρώση πυρήνα και τοποθέτηση σε αντικειμενοφόρους πλάκες**

1. Επώαση κυττάρων σε 30 μl χρωστικής RedDot™2 Far-Red Nuclear Stain (Biotium, αραιώση 1:600) αραιωμένης σε PBS 1X, για 25 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε σκοτάδι
2. Πλύσεις (x2) με PBS 1X για 3 λεπτά, σε σκοτάδι
3. Μετακίνηση καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρο πλάκα πάνω σε σταγόνα με Prolong Gold antifade reagent (4 μl) και αναμονή να στεγνώσει στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου
4. Παρατήρηση δειγμάτων σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού

### **3.7 Συνεστιακή μικροσκοπία**

Μετά την τοποθέτηση των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους πλάκες ακολουθούσε παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού Leica TCS-SP5, εξοπλισμένο με πηγή ακτινοβολίας Laser Argon (488 nm)/DPSS (561 nm)/HeNe (633 nm) και λογισμικό Leica TCS. Η επεξεργασία των εικόνων γινόταν με το πρόγραμμα Leica LAS AF ενώ οι καταμετρήσεις των κυττάρων, που έφεραν πρωτογενεία κροσσούς, έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

### **4. Απομόνωση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων**

Για την απομόνωση των εκχυλισμάτων, τα NIH3T3 κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτο 6 θέσεων (6-well plate) και επώαστηκαν με το εκάστοτε φάρμακο για 24 ώρες στον επωαστικό κλίβανο. Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία λήψης του κυτταρικού εκχυλίσματος:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού
2. Πλύσεις (x2) με 500 μl PBS 1X
3. Προσθήκη 500 μl PBS 1X σε κάθε θέση και απόξεση των κυττάρων με ειδικό ξέστρο
4. Συλλογή του εναιωρήματος σε erpendorf και φυγοκέντρηση στα 1000 xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Αφαίρεση υπερκειμένου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με διάλυμα που περιείχε 80 μl Lysis Buffer (20 mM Tris pH=7.4, 150 mM

NaCl, 0.1% Triton X-100) και τους κατάλληλους αναστολείς πρωτεασών με τελική συγκέντρωση 1X

6. Επώαση για 5 λεπτά στον πάγο και φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα (13200 rpm) για 5 λεπτά στους 4°C
7. Συλλογή υπερκλειμένου σε νέο eppendorf και ποσοτικός προσδιορισμός συγκέντρωσης ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

#### **4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπική μέθοδος Bradford. Από κάθε δείγμα ελήφθησαν δύο διαφορετικές ποσότητες εκχυλίσματος (2 μl και 4 μl) στις οποίες προστέθηκε ανάλογη ποσότητα νερού για να φτάσουν σε τελικό όγκο 800μl και τέλος προστέθηκαν 200 μl του αντιδραστηρίου Biorad Protein Assay Dye Reagent (Biorad Laboratories). Τα δείγματα μετά επωάζονταν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα γινόταν η μέτρηση της απορρόφησής τους στα 595 nm στο φωτόμετρο (SHIMADZU UVmini-1240). Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε από τις τιμές απορρόφησης διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστής συγκέντρωσης όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

$\lambda = 595 \text{ nm}$

<b>Προετοιμασία πρότυπης καμπύλης</b>	<b>Blank</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>BSA (1μg/μl)(μl)</b>	-	1	2	4	8	12
<b>Bradford reagent (μl)</b>	200	200	200	200	200	200
<b>ddH<sub>2</sub>O (μl)</b>	800	799	798	796	792	788

<b>Προετοιμασία ποσοτικοποίησης πρωτεΐνης</b>	<b>Blank a</b>	<b>Blank b</b>	<b>1a</b>	<b>1b</b>	<b>2a</b>	<b>2b</b>
<b>Δείγμα (μl)</b>	2μl lysis buffer	4μl lysis buffer	2	4	...	...
<b>Bradford reagent (μl)</b>	200	200	200	200	...	...
<b>ddH<sub>2</sub>O (μl)</b>	798	796	798	796	...	...

## 5. Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών κατά Western

Το ανοσοαποτύπωμα (ή ανοσοστύπωμα) των πρωτεϊνών είναι μία αναλυτική μέθοδος που περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών που έχουν διαχωριστεί ηλεκτροφορητικά από το πήκτωμα σε ένα λεπτό και μεμβρανώδες υλικό στήριξης και την ανίχνευσή τους με μονοκλωνικά ή πολυκλωνικά αντισώματα.

### 5.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή ακρυλαμιδίου παρουσία SDS. Σαν εκκινητής για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου (APS) ενώ η διαδικασία επιταχύνθηκε από την παρουσία N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενο-διαμίνης (TEMED). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ασυνεχές σύστημα, δηλαδή σε 2 διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα επιστοιβάξης (stacking gel) και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή επιστοιβάξης περιείχε 4,5% ακρυλαμίδιο, 0,125 M Tris pH 6.8, 0,1% SDS, 0.1% APS και 0.1% TEMED. Η πηκτή διαχωρισμού περιείχε 12% ακρυλαμίδιο, 0.38 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% APS και 0.05% TEMED.

Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναμίχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα Laemmli 4X (250 mM Tris-HCL, pH 6.8, 9.2% SDS, 40% w/v γλυκερόλη, 0.2% w/v μπλε της βρωμοφαινόλης, 100 mM DTT) σε αναλογία όγκων 3/1. Ακολούθησε θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 5 λεπτά με στόχο την πλήρη αποδιάταξη των

πρωτεϊνών και κατόπιν τοποθετήθηκαν στην πηκτή. Επίσης, τοποθετήθηκαν πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους συνδεδεμένες με χρωστική (BlueStar PLUS Prestained Protein Marker, MWPO4). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS) υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η αρχική ένταση ήταν 16 mA για το διάστημα που οι πρωτεΐνες κινούνταν εντός της πηκτής επιστοιβαζής και 25 mA καθόλη τη διάρκεια κίνησής τους στην πηκτή διαχωρισμού.

### ***5.2 Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης***

Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, τοποθετήθηκε πάνω στην πηκτή μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0.45 μm (GE Healthcare) η οποία είχε προηγουμένως ενεργοποιηθεί σε αποστειρωμένο νερό. Πηκτή και μεμβράνη τοποθετήθηκαν ανάμεσα σε δυο διηθητικά χαρτιά Whatman 3mm εντός κατάλληλου πλαισίου το οποίο μεταφέρθηκε στη συνέχεια στη συσκευή μεταφοράς. Το σύστημα βυθίστηκε στο διάλυμα μεταφοράς (25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, 0.1% SDS, 20% μεθανόλη) και εφαρμόστηκε ηλεκτρικό πεδίο έντασης 200 mA για 70 λεπτά.

### ***5.3 Ανοσοαποτύπωση***

Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη εκπλύθηκε με διάλυμα PBST (PBS-0.1% Tween-20) 3 φορές για 5 λεπτά και επώαστηκε σε διάλυμα μη ειδικής δέσμευσης (blocking buffer) PBST-5% άπαχο γάλα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, τοποθετήθηκε σε διάλυμα PBST-2% ζελατίνη (fish skin gelatin, SIGMA) για 15 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με ειδικό πρωτογενές αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBST-0.5% ζελατίνη σε θερμοκρασία δωματίου για όλη τη νύκτα στους 4°C, υπό ανακίνηση. Στη συνέχεια, η μεμβράνη με τα αντισώματα επώαστηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν 3 πλύσεις με PBST για 10 λεπτά. Ύστερα ακολούθησε επώαση της μεμβράνης σε ειδικό δευτερογενές αντίσωμα κατάλληλα αραιωμένο σε PBST-5% άπαχο γάλα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

#### 5.4 Ανίχνευση πρωτεϊνών με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας

Μετά την επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα, η μεμβράνη εκπλύθηκε 3 φορές για 10 λεπτά με PBST και επώαστηκε με το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (LumiSensor™ Chemiluminescent HRP Substrate, GenScript). Η επώαση έγινε για ένα λεπτό με ποσότητα αρκετή για να καλύψει όλη την επιφάνεια της εκάστοτε μεμβράνης (0.1 ml υποστρώματος/cm<sup>2</sup> μεμβράνης). Στη συνέχεια η μεμβράνη εκτέθηκε σε μηχανήμα εμφάνισης (ChemiDoc™ MP Bio-Rad Imaging System) για διάφορους χρόνους (από δευτερόλεπτα μέχρι λίγα λεπτά). Μετά την έκθεση, οι φωτογραφίες επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad) και με αυτό το πρόγραμμα έγινε και η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ	ΑΠΑΙΩΣΗ	IgG-HRP
Gli1 anti-mouse (L42B10 Cell Signaling)	1:250, 1:1000	HRP a-m 1:3000
I2PP2A anti-mouse (F-9 sc-133138 Santa Cruz)	1:2000	HRP a-m 1:3000
a-Tubulin anti-mouse (B-5-1-2 Sigma Aldrich)	1:4000	HRP a-m 1:3000

#### 6. Απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα NIH/3T3

Προκειμένου να αναλυθούν οι μεταβολές των επιπέδων έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού RNA από κύτταρα NIH3T3 τα οποία αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία φαρμάκου σε θρεπτικό μέσο το οποίο περιείχε DMSO ή Purmorphamine.

Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε τριπλέτες σε πιατάκια 60mm με βάση τις συνθήκες που αναλύθηκαν προηγουμένως και για τη λήψη τους ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Αφαίρεση θρεπτικού υλικού και πλύσεις (x2) με PBS 1X

2. Προσθήκη θρυψίνης (trypsin-EDTA solution in PBS) και αναμονή για 2 λεπτά μέχρι να ξεκολλήσουν τα κύτταρα
3. Απενεργοποίηση της θρυψίνης με θρεπτικό μέσο και μεταφορά των κυττάρων σε φυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκέντρωση του εναιωρήματος για 2 λεπτά στις 1000 στροφές/λεπτό σε επιτραπέζια φυγόκεντρο
4. Αφαίρεση υπερκείμενου όσο καλύτερα
5. Επαναιώρηση με PBS 1X και μεταφορά των κυττάρων σε RNase-free tubes των 1.5 ml

Στη συνέχεια ακολούθησε η διαδικασία απομόνωσης ολικού RNA όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο του RNeasy Mini Kit της Qiagen και έγινε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA με τη χρήση φασματοφωτόμετρου μικρού όγκου Nanodrop. Παράλληλα, με τον αναλυτή Bioanalyzer (Agilent) εκτιμήθηκε η ποιότητα και η ακεραιότητα των δειγμάτων. Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής για τη σύνθεση συμπληρωματικής αλυσίδας DNA.

## **7. Αντίστροφη μεταγραφή (Reverse Transcription)**

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι η σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο mRNA και η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση. Η διαδικασία σύνθεσης του cDNA έγινε με τη βοήθεια του PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) της TaKaRa και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από τον κατασκευαστή.

## **8. Ποσοτική PCR Πραγματικού Χρόνου**

Η ποσοτική PCR αποτελεί πλέον μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα, εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που διαβάζουν τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες ουσίες, οι οποίες ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης και η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή  $C_p$ , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων ξεπερνά το βασικό επίπεδο.



Το μίγμα της αντίδρασης qPCR συστάθηκε με την προσθήκη 5 μl μίγματος 2x Precision SYBR Green MasterMix (Primer Design), 0.25 μl από τον κάθε εκκινητή, 2 μl δείγματος cDNA (προαραιωμένου 1:12) και 2.5 μl νερού ελεύθερου-νουκλεασών. Η διαδικασία της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Biorad CFX96 και περιείχε τα παρακάτω βήματα:

	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	<b>Κύκλοι</b>
<b>Αρχική αποδιάταξη</b>	95°C	3 λεπτά	1 κύκλος
<b>Αποδιάταξη</b>	95°C	3 δευτερόλεπτα	40 κύκλοι
<b>Υβριδισμός εκκινητών</b>	60°C	30 δευτερόλεπτα	
<b>Επιμήκυνση</b>	72°C	15 δευτερόλεπτα	

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του κάθε γονιδίου-στόχου του οργανισμού *Mus Musculus* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων NCBI. Η κανονικοποίηση και ανάλυση των δεδομένων εκτελέστηκε με το πρόγραμμα qBase Plus (Biogazelle) με τη χρήση του *gapdh* ως γονιδίου αναφοράς. Ο προσδιορισμός της στατιστικώς σημαντικής διαφορικής έκφρασης των γονιδίων-στόχων έγινε με έλεγχο των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών των ανεξάρτητων δειγμάτων με ανάλυση διακυμάνσεων One Way ANOVA ακολουθούμενη από *post-hoc* ανάλυση ανά ζεύγη Tukey-kramer με  $p\text{-value} < 0.05$ .

**Πίνακας 2.** Αλληλουχίες πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών των γονιδίων που αναλύθηκαν με PCR πραγματικού χρόνου.

	<b>Oligo Name</b>	<b>Sequence (5'→3')</b>	<b>Εταιρία</b>
1	m-SetFor	CCGACGAGACCTCAGAAAAAGA (22)	Eurofins Genomics
2	m-SetRev	AAAATGGTTGGCGGAGTTTGTT (22)	
3	m-Gli1-For	CCAAGCCAAC TTTATGTCAGGG (22)	
4	m-Gli1-Rev	AGCCCGCTTCTTTGTTAATTTGA (23)	
5	m-GAPDHFor	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG (21)	
6	m-GAPDHRev	GGGGTCGTTGATGGCAACA (19)	

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

---

Σύμφωνα με δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου, η πρωτεΐνη SET είναι απαραίτητη κατά την εμβρυογένεση και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αισθητήριου συστήματος στον οργανισμό *Danio rerio* <sup>[110]</sup>. Από τη συγκεκριμένη μελέτη αναδείχθηκε, ακόμη, η σύνδεση της SET με τα κροσσωτά κύτταρα όπου αυξημένα βρέθηκαν τα επίπεδα έκφρασής της στα οργανίδια των κροσσών <sup>[110]</sup>. Όπως ήδη έχει περιγραφεί εκτενώς στη βιβλιογραφία, άρρηκτα συνδεδεμένο με την ύπαρξη των κροσσών στα κύτταρα, είναι το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog, το οποίο αξιοποιεί τα συγκεκριμένα μεμβρανικά οργανίδια προκειμένου να μεταδώσει πληροφορίες οι οποίες στην περίπτωση της εμβρυϊκής ανάπτυξης απαιτούνται για τη σωστή διαφοροποίηση των κυττάρων. Το μονοπάτι αυτό είναι επίσης βασικό στη ρύθμιση της ανάπτυξης των ζώων και βρίσκεται σε όλα τα αμφιπλευρικά ζώα <sup>[35]</sup>. Παράλληλα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού παίζει η φωσφατάση PP2A για τη δράση της οποίας είναι επίσης γνωστό ότι αναστέλλεται ισχυρά από τη SET. Συνδυαστικά, από τα παραπάνω υποδεικνύεται μια έμμεση σύνδεση της πρωτεΐνης SET με το μονοπάτι Hedgehog.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο πιθανός ρόλος της πρωτεΐνης SET στο συγκεκριμένο μονοπάτι, έγινε μια σειρά πειραμάτων που ως στόχο είχαν την αναστολή της δράσης της SET (χωρίς την αλλαγή των επιπέδων έκφρασής της) και περαιτέρω ανάλυση των επαγόμενων μεταβολών στη σηματοδότηση Hedgehog. Στα πλαίσια αυτά επιλέχθηκαν το φάρμακο FTY720 και το μιμητικό πεπτίδιο apoE-COG112, για την ικανότητά τους να δεσμεύονται στη SET και να αναστέλλουν τη δράση της χωρίς να επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασής της. Αντίστοιχα, για τη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά NIH/3T3 καθώς τα συγκεκριμένα κύτταρα χαρακτηρίζονται μορφολογικά από την ύπαρξη κροσσών γεγονός που τα έχει εδραιώσει ως κατάλληλο σύστημα μελέτης του μονοπατιού Hedgehog.

## 1. Υποκυτταρική κατανομή της SET και της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης σε σχέση με τον κυτταρικό κύκλο

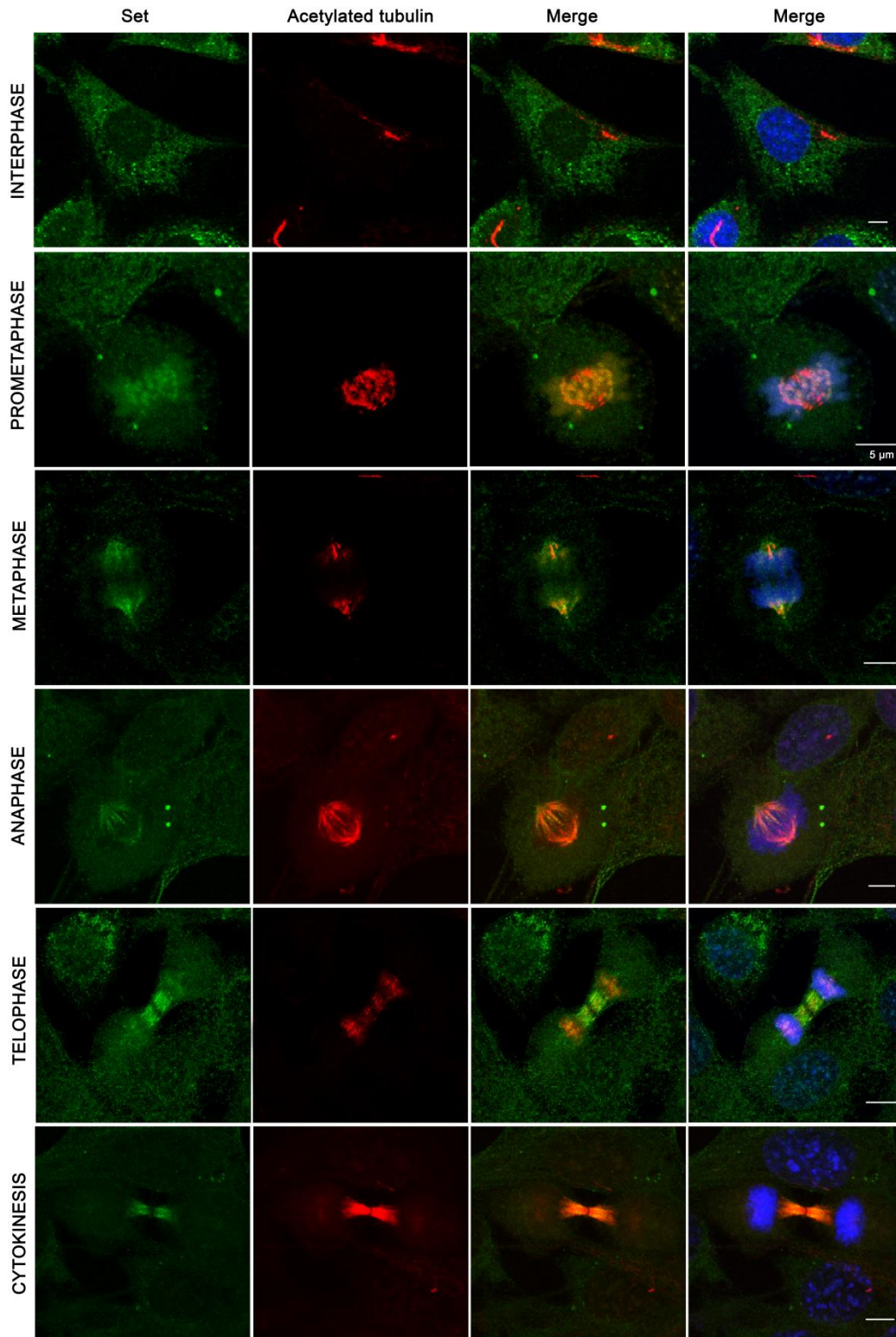
Στη βιβλιογραφία η SET αναφέρεται ως μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη η οποία βρίσκεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τις μεμβράνες. Η έρευνα των Canela και συνεργατών <sup>[111]</sup>, έδειξε ότι η SET αναστέλλει τη δραστηριότητα της κυκλίνης B-CDK1 *in vivo* και *in vitro* και εμπλέκεται έτσι στη ρύθμιση της μετάβασης από τη G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου <sup>[111]</sup>. Το γεγονός ότι η SET εμπλέκεται επίσης στη ρύθμιση της δομής της χρωματίνης μέσω της αναστολής της ακετυλίωσης των ιστονών <sup>[112]</sup> τοποθετεί την πρωτεΐνη αυτή σε σημαντική θέση στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Από τη μια πλευρά, η SET μπορεί να εμπλέκεται στον έλεγχο της κατάστασης φωσφορυλίωσης των πυρηνικών πρωτεϊνών μέσω της ρύθμισης της δραστηριότητας της CDK και PP2A. Από την άλλη πλευρά, μπορεί να ελέγχει τη μεταγραφική δραστηριότητα της χρωματίνης μέσω της ρύθμισης της ακετυλίωσης των ιστονών και της συμπύκνωσης της χρωματίνης <sup>[111]</sup>.

Η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη βρίσκεται κοντά στο κεντροσωμάτιο στη μειωτική και μιτωτική μετάφαση, σε όλη τη μιτωτική άτρακτο κατά την ανάφαση και στη διαζωνική περιοχή (interzonal region) κατά την τελόφαση. Κατά την ενδιάμεση φάση, βρίσκεται μόνο στο μεσοσωμάτιο (midobody) <sup>[113]</sup>. Το ενεργοποιημένο μονοπάτι Hedgehog στα NIH/3T3 κύτταρα προωθεί την ακετυλίωση των μικροσωληνίσκων και συμβάλλει σε διαδικασίες που εξαρτώνται από την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη όπως η πόλωση των κυττάρων, η μετανάστευση και η μεταφορά οργανιδίων <sup>[114]</sup>. Για τους προαναφερθέντες λόγους, η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη χρησιμοποιείται κατά κόρον στον εντοπισμό των κροσσών.

Με βάση αυτά τα στοιχεία, διερευνήθηκε μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού ο υποκυτταρικός εντοπισμός της SET στα κύτταρα NIH/3T3, σε διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Παράλληλα, έγινε ανοσολογική χρώση των κυττάρων έναντι της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης ως δείκτη των πρωτογενών κροσσών.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 17 η ανοσολογική χρώση της SET αποκάλυψε περισσότερο διάχυτη κατανομή της πρωτεΐνης κυρίως στο κυτταρόπλασμα κατά τη μεσόφαση, ενώ κατά τις φάσεις της Μίτωσης αναδεικνύεται ο πυρηνικός της εντοπισμός όπου διαπιστώνεται αυξημένη συνεντόπιση με τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα και τη μιτωτική άτρακτο. Τέλος, αντίστοιχη είναι και η εικόνα κατά

την κυττοκίνηση όπου οι χρώσεις της SET και της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης είναι ιδιαίτερα έντονες.



**Εικόνα 17. Πρότυπο κατανομής της πρωτεΐνης SET κατά τις φάσεις του κυτταρικού κύκλου στα κύτταρα NIH/3T3.** Ανοσολογική αντίχνευση των πρωτεϊνών SET (πράσινο) και Acetylated Tubulin (κόκκινο) σε κύτταρα NIH/3T3 από τη μεσόφαση μέχρι και το τέλος της μίτωσης κατά την κυτοκίνηση (interphase-cytokinesis). Στην πρώτη και δεύτερη στήλη απεικονίζεται η κατανομή κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά ενώ στις δυο τελευταίες στήλες απεικονίζεται η κατανομή και των δυο πρωτεϊνών με ή χωρίς χρώση πυρήνα (μπλε). Γραμμή κλίμακας 5  $\mu\text{m}$ .

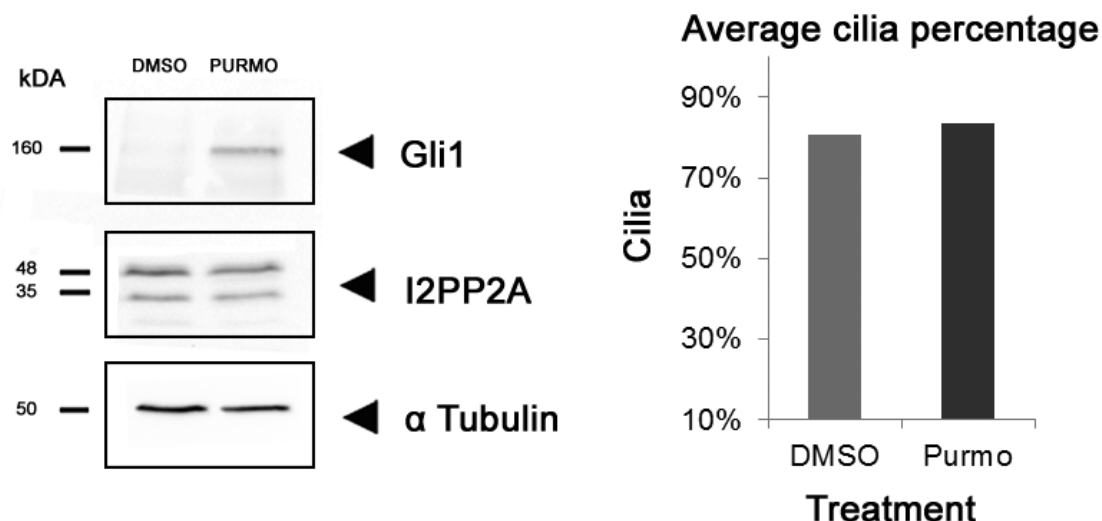
## **2. Επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog με τη χρήση του αγωνιστή Purmorphamine**

Προκειμένου να επιτευχθεί η αποτελεσματική ενεργοποίηση του μονοπατιού στο κυτταρικό σύστημα της παρούσας μελέτης, αρχικά εδραιώθηκαν οι συνθήκες έκθεσης των κυττάρων στον αγωνιστή εστιάζοντας στον χρόνο επώασης και την κατάλληλη συγκέντρωση της ουσίας ώστε να μην επηρεαστεί η μορφολογία ή η βιωσιμότητα των κυττάρων.

Ύστερα από δοκιμές συγκεντρώσεων της Purmorphamine, βρέθηκε ότι η συγκέντρωση 2 $\mu\text{M}$  και η έκθεση για 24 ώρες ήταν επαρκείς για να ενεργοποιηθεί το μονοπάτι και να μην επηρεαστούν αρνητικά τα κύτταρα. Η Purmorphamine βρίσκεται διαλυμένη σε DMSO οπότε ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα που έχουν επωαστεί με DMSO σε ποσότητα ίδια με εκείνη στα κύτταρα που επώαστηκαν με Purmorphamine. Υπενθυμίζεται ότι η έκθεση των κυττάρων στις διάφορες χημικές ενώσεις γινόταν έπειτα από τον συγχρονισμό τους στη φάση G0/G1 σε συνθήκες ανάπτυξης απουσία ορού (0.5% FBS). Το βήμα αυτό ήταν απαραίτητο καθώς εξασφάλιζε τον σχηματισμό των πρωτογενών κροσσών στην πλειονότητα των κυττάρων καθιστώντας έτσι εφικτή την ενεργοποίηση της σηματοδότησης Hedgehog.

Έτσι, συλλέχθηκαν εκχυλίσματα κυττάρων ύστερα από επώαση με την Purmorphamine και με ανοσοαποτύπωση κατά Western, αναλύθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Gli1 και της SET/I2PP2A, με τη χρήση του αντίστοιχου στην κάθε περίπτωση αντισώματος. Η αύξηση της έκφρασης του Gli1 επιβεβαίωσε την αποτελεσματική δράση της Purmorphamine ως προς την ενεργοποίηση του μονοπατιού, ενώ ανεπηρέαστα φάνηκε πως παραμένουν τα επίπεδα της πρωτεΐνης SET (I2PP2A) (Εικόνα 18, αριστερά).

Παράλληλα μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού, έγινε χρώση των συγχρονισμένων κυττάρων με το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης και ακολούθησε καταμέτρηση του ποσοστού των κυττάρων που έφεραν πρωτογενείς κροσσούς σε συνθήκες ενεργοποιημένου ή μη μονοπατιού Hedgehog. Και στις δύο περιπτώσεις που εξετάστηκαν το ποσοστό των κυττάρων με πρωτογενή κροσσό ήταν αρκετά υψηλό, χωρίς ωστόσο να διαπιστώνεται σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών (Εικόνα 18, γράφημα)



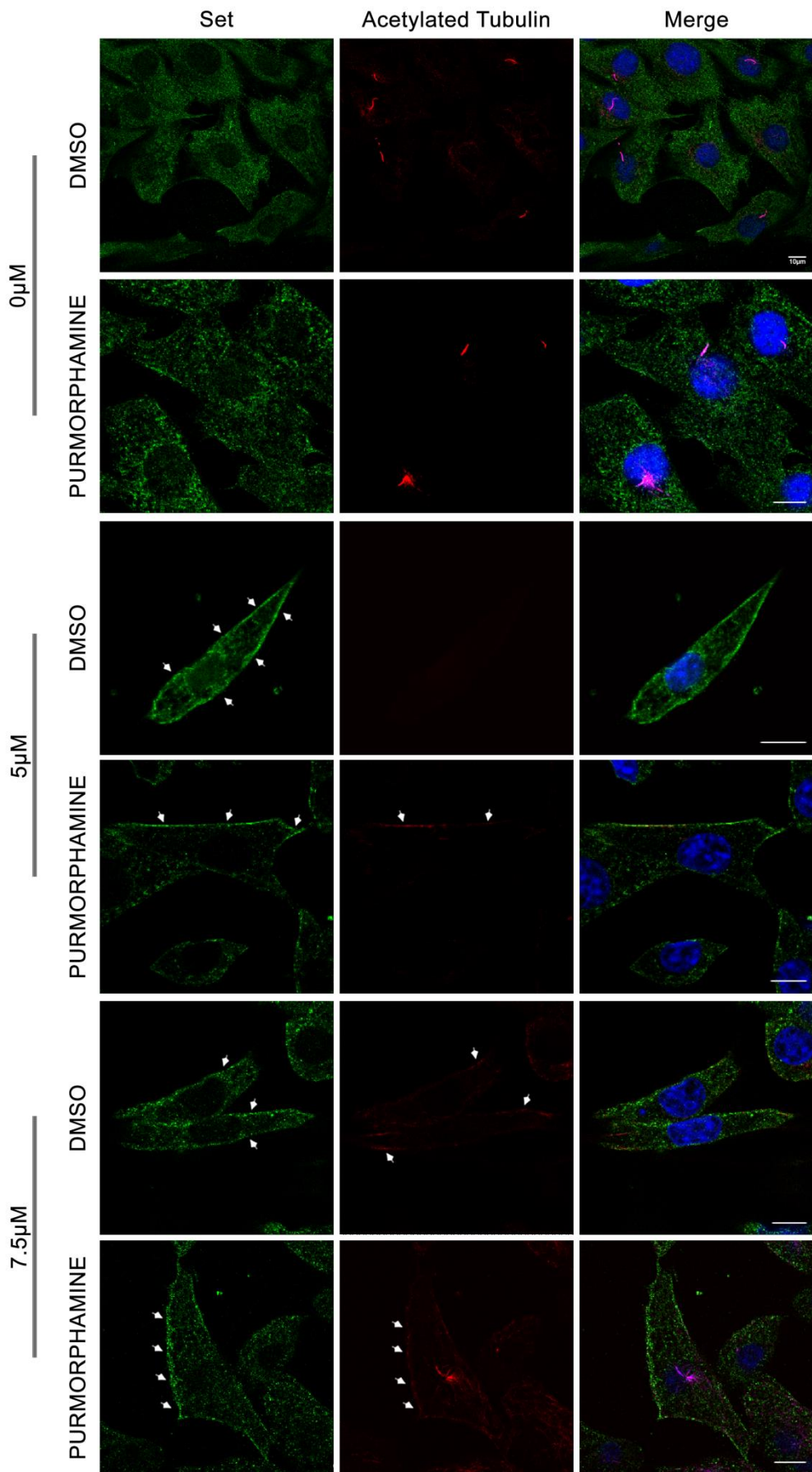
**Εικόνα 18. Η επίδραση της Purmorphamine στα κύτταρα NIH/3T3.** Αριστερά: Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα που είχαν ληφθεί από κύτταρα NIH/3T3 κύτταρα μετά από επώαση με DMSO (πρώτη διαδρομή) ή Purmorphamine (2  $\mu$ M) (δεύτερη διαδρομή) σε θρεπτικό μέσο μειωμένο ορού (0.5%). Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα mouse anti-Gli1 και mouse anti-I2PP2A. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων ελέγχθηκε με το αντίσωμα της  $\alpha$  τουμπουλίνης. Δεξιά: Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των κυττάρων με πρωτογενείς κροσσούς σε συνθήκες καλλιέργειας παρουσία DMSO και Purmorphamine (Purmo). Μέσω ανοσοφθορισμού με αντίσωμα για την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη και με χρώση πυρήνα, καταμετρήθηκαν οι κροσσοί σε σχέση με τους πυρήνες με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

### 3. Επίδραση του φαρμακολογικού ανταγωνιστή της SET, FTY720, στους πρωτογενείς κροσσούς και το μονοπάτι Hedgehog

Όπως προαναφέρθηκε, το FTY720, το οποίο ανήκει στην ευρεία κατηγορία φαρμάκων με δράση ενεργοποίησης της PP2A, αναστέλλει τη δράση της SET μέσω της άμεσης δέσμευσής του στην πρωτεΐνη, ωστόσο η δέσμευση αυτή βρέθηκε πως δεν είναι εφικτή όταν το φάρμακο είναι φωσφορυλιωμένο - για το λόγο αυτό στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μη φωσφορυλιωμένη του μορφή. Έπειτα από 24 ώρες έκθεσης των κυττάρων σε αυτό, ακολούθησε μια σειρά ανοσοφθορισμών για να εξετασθεί (α) αν υπάρχει κάποια αλλαγή στη διαμερισματοποίηση της SET παρουσία φαρμάκου, εφόσον έχει παρατηρηθεί κατά την έκθεση διαφορετικών κυτταρικών συστημάτων στο FTY720, η μετακίνηση της πρωτεΐνης και η συσσώρευσή της στον πυρήνα (κύτταρα HL-60 OMA)<sup>[115]</sup> ή αντίθετα η ταχεία έξοδός της προς το κυτταρόπλασμα (κύτταρα HeLa)<sup>[116]</sup> όπως επίσης και (β) αν επάγεται κάποια μορφολογική διαφορά στα κύτταρα και ειδικότερα στους πρωτογενείς κροσσούς.

Κατά την επώαση με το FTY720 φαίνεται να υπάρχει αλλαγή στη διαμερισματοποίηση της SET προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Φαίνεται πως παρουσία φαρμάκου συγκεντρώσεων 5  $\mu\text{M}$  και 7  $\mu\text{M}$ , αυξάνεται η κατανομή της SET στη μεμβράνη (Εικόνα 19, βέλη). Στις συνθήκες αυτές παρατηρήθηκε και αύξηση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης στην μεμβράνη (Εικόνα 19, βέλη).

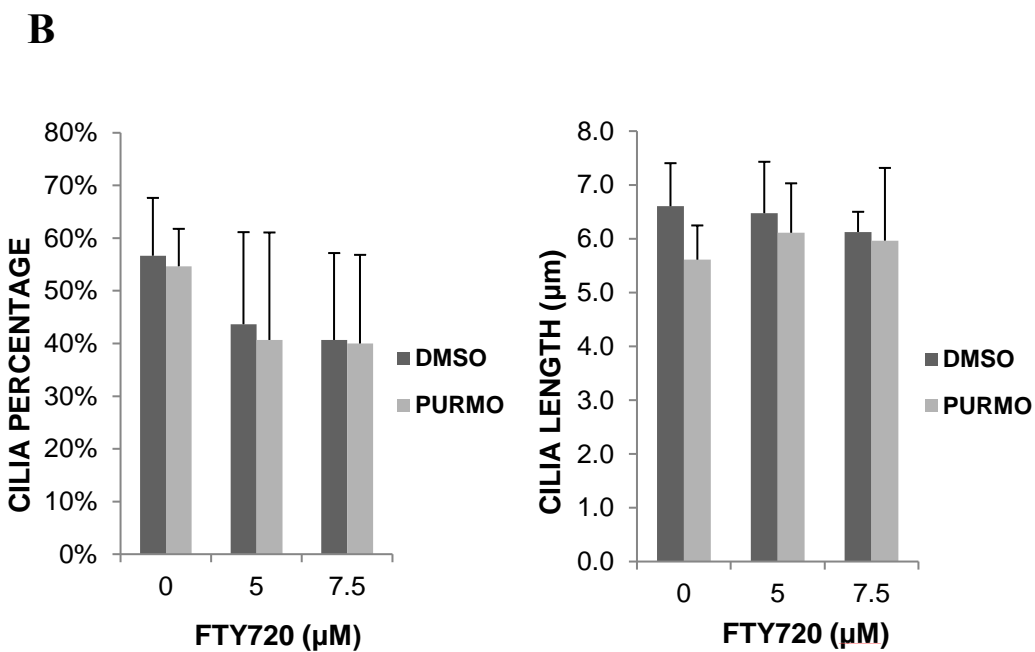
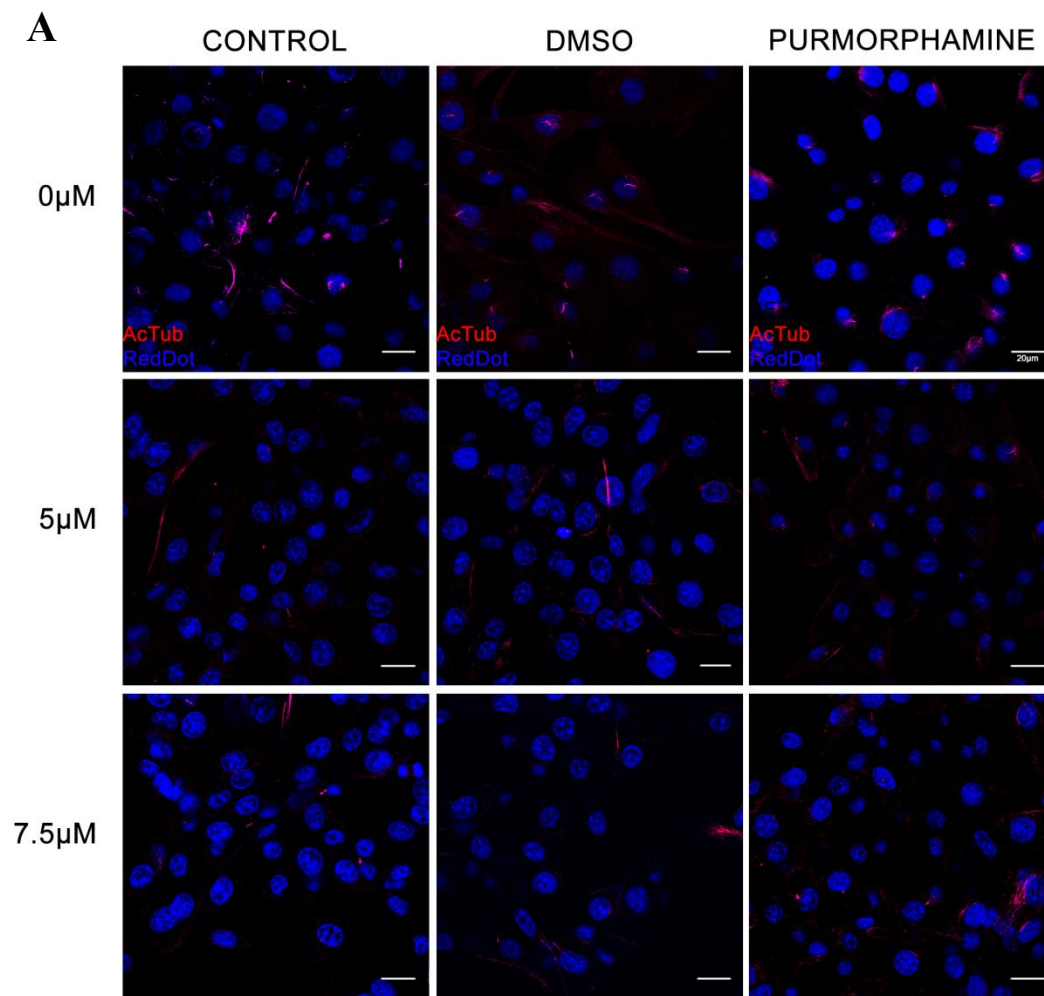
Μέσα από τα συγκεκριμένα πειράματα δεν διαπιστώθηκε συνεντοπισμός της SET με την ακετυλιωμένη τουμπουλίνη στους κροσσούς σε συνθήκες ενεργοποιημένου ή μη μονοπατιού Hedgehog.





**Εικόνα 19. Επίδραση του FTY720 στα κύτταρα NIH/3T3 παρουσία ή όχι Purmorphamine.** Εικόνες μεμονομένων κυττάρων ύστερα από ανοσολογική ανίχνευση των πρωτεϊνών SET (πράσινο) και Acetylated Tubulin (κόκκινο). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις FTY720 (5  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M) παρουσία ή όχι Purmorphamine (2  $\mu$ M) σε περιβάλλον μειωμένου ορού (0.5%). Στην πρώτη και στη δεύτερη στήλη απεικονίζεται η κατανομή της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά, ενώ στην τρίτη στήλη απεικονίζονται μαζί. Ο πυρήνας εμφανίζεται με μπλε χρώση. Γραμμή κλίμακας 10  $\mu$ m.

Παράλληλα, έγιναν καταμετρήσεις των κυττάρων για να φανεί αν με τη χρήση φαρμάκου υπάρχει κάποια διαφορά στο ποσοστό των κυττάρων που είχαν πρωτογενείς κροσσούς αλλά και στο μήκος των καθυτών κροσσών. Λήφθηκαν εικόνες από τουλάχιστον τρία πεδία σε κάθε συνθήκη που είχαν περίπου 100 κύτταρα το καθένα και έγινε η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με βάση τη χρώση πυρήνα και η μέτρηση των κροσσών έγινε με βάση τη χρώση της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (Εικόνα 20A). Παρατηρείται μείωση του αριθμού των κυττάρων που έχουν κροσσούς όταν αυτά επώάζονται με το FTY720 αλλά όχι σημαντική διαφορά στη μείωση του ποσοστού αυτού μεταξύ των συγκεντρώσεων 5  $\mu$ M και 7.5  $\mu$ M (Εικόνα 20B, αριστερό γράφημα). Επίσης, κατά την καταμέτρηση του μήκους των κροσσών δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της αυξανόμενης συγκέντρωσης του FTY720 αλλά και μεταξύ της χρήσης DMSO ή Purmorphamine (Εικόνα 20B, δεξί γράφημα).

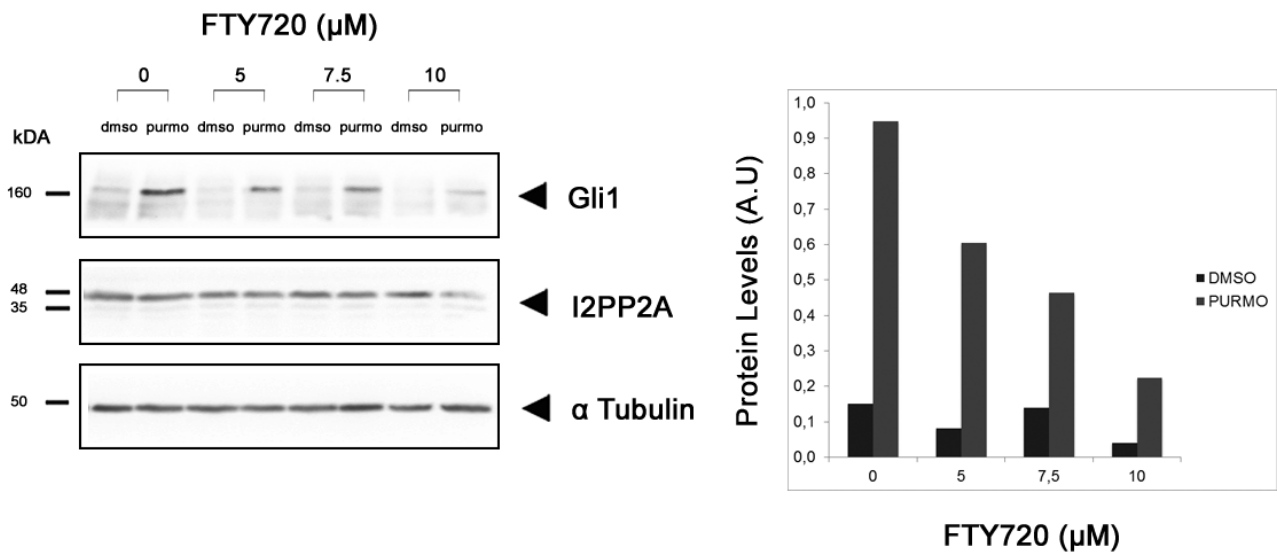


**Εικόνα 20. Επίδραση του FTY720 στο ποσοστό και μήκος των πρωτογενών κροσσών στα κύτταρα NIH/3T3. Α) Εικόνες κυττάρων επωασμένων με 5  $\mu$ M και 7**

μM FTY720. Ως control αναφέρονται τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο πλήρες ορού (10%). Η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη έχει κόκκινο φθορισμό ενώ ο πυρήνας μπλε. Γραμμή κλίμακας 20 μm. **B) Αριστερά:** Διάγραμμα καταμέτρησης ποσοστού κυττάρων που είχαν πρωτογενείς κροσσούς στις διάφορες συγκεντρώσεις FTY720 (5 μM, 7.5 μM) παρουσία ή όχι Purmorphamine (2μM). **Δεξιά:** Διάγραμμα καταμέτρησης του μήκους των πρωτογενών κροσσών στις ίδιες συνθήκες. Η καταμέτρηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

Επιπλέον της επίδρασης του FTY720 στην ανάπτυξη των κροσσών, των βασικών οργανιδίων για τη λειτουργική σηματοδότηση Hedgehog, μελετήθηκε η ύπαρξη τυχόν αλλαγών στα πρωτεϊνικά επίπεδα του βασικού μορίου του μονοπατιού, Gli1. Πραγματοποιήθηκαν επομένως πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες, στα οποία χρησιμοποιήθηκε επιπλέον του αντισώματος έναντι του Gli1 και αυτό που αναγνωρίζει την SET/I2PP2A για να επιβεβαιωθεί ότι το FTY720 δεν επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης.

Από την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων διαπιστώθηκε ότι η αύξηση των συγκεντρώσεων του FTY720 προκαλεί σταδιακή/δοσο-εξαρτώμενη μείωση της έκφρασης του Gli1 ενώ ανεπηρέαστα παραμένουν τα επίπεδα της SET με εξαίρεση την περίπτωση όπου τα κύτταρα εκτέθηκαν στη μεγαλύτερη συγκέντρωση FTY720 (10 μM) παρουσία του αγωνιστή Purmorphamine (Εικόνα 21). Φαίνεται επομένως πως το FTY720 έχει αρνητική επιρροή στο μονοπάτι Hedgehog αφού υπάρχει μειωμένη ποσότητα του Gli1 που είναι ο μεταγραφικός παράγοντας που εκφράζεται σημαντικά έπειτα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να συνδέεται με την παρεμπόδιση της δράσης της SET (ως αναστολέα της PP2A) από το συγκεκριμένο φάρμακο.



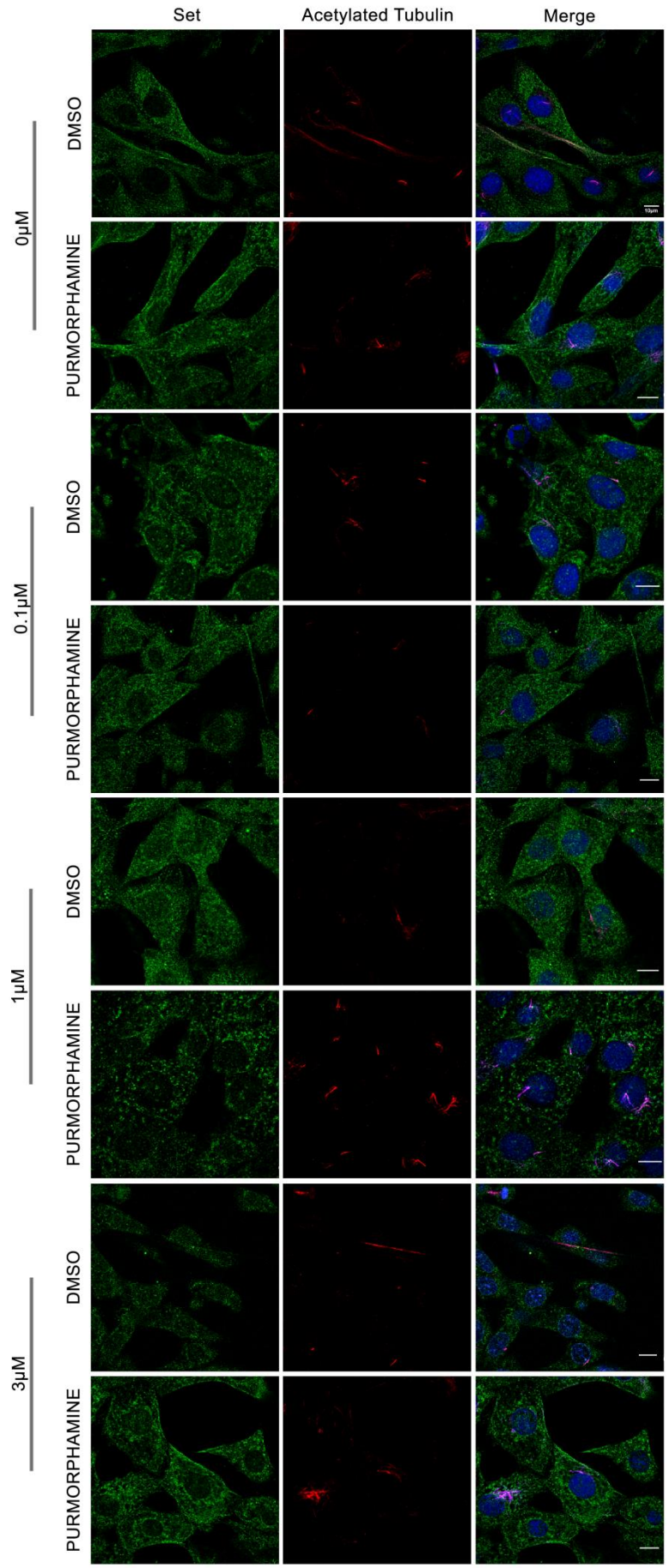
**Εικόνα 21. Η επίδραση του FTY720 στα κύτταρα NIH/3T3 σε επίπεδο πρωτεϊνών.** Αριστερά: Ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα που είχαν ληφθεί από κύτταρα NIH/3T3 κύτταρα μετά από επώαση με DMSO (πρώτη διαδρομή) ή Purmorphamine (2 μM) (δεύτερη διαδρομή) σε διάφορες συγκεντρώσεις FTY720 (5 μM, 7.5 μM, 10 μM) σε θρεπτικό μέσο μειωμένο ορού (0.5%). Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα mouse anti-Gli1, mouse anti-I2PP2A, mouse anti-α Tubulin. Δεξιά: Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Gli1 με βάση την α τουμπουλίνη. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One της Biorad. (A.U=Arbitrary Units)

#### **4. Επίδραση της ανταγωνιστικής αναστολής της SET, μέσω του COG112, στους πρωτογενείς κροσσούς και το μονοπάτι Hedgehog**

Σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το COG112 είναι ένα πεπτίδιο που δεν έχει αναλυθεί εκτενώς, κυρίως σε σχέση με το FTY720 που η δράση του εξετασθεί λεπτομερώς. Είναι γνωστό πως το πεπτίδιο αυτό απενεργοποιεί τη SET χωρίς να αλλάζει τα επίπεδα έκφρασής της. Αντίστοιχα με το FTY720, δεσμεύει τη SET αποτρέποντας έτσι την ανασταλτική της δράση έναντι της PP2A η οποία απελευθερώνεται και είναι πλέον ενεργή να δράσει.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το FTY720 είναι ένα φάρμακο το οποίο είναι πιθανό να επηρεάζει και άλλες λειτουργίες του κυττάρου εκτός από το να απενεργοποιεί τη SET, ελέγχθηκε κατά πόσον τα αποτελέσματα και τα επακόλουθα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα προαναφερθέντα πειράματα, αποδίδονται στην φαρμακολογική αναστολή της SET ή σε άλλη μη ειδική της SET δράση του φαρμάκου. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε το COG112, ως ένα πεπτίδιο με διαφορετικό μηχανισμό δράσης και αξιολογήθηκε αν το συγκεκριμένο μόριο επηρεάζει τη σηματοδότηση όπως το FTY720.

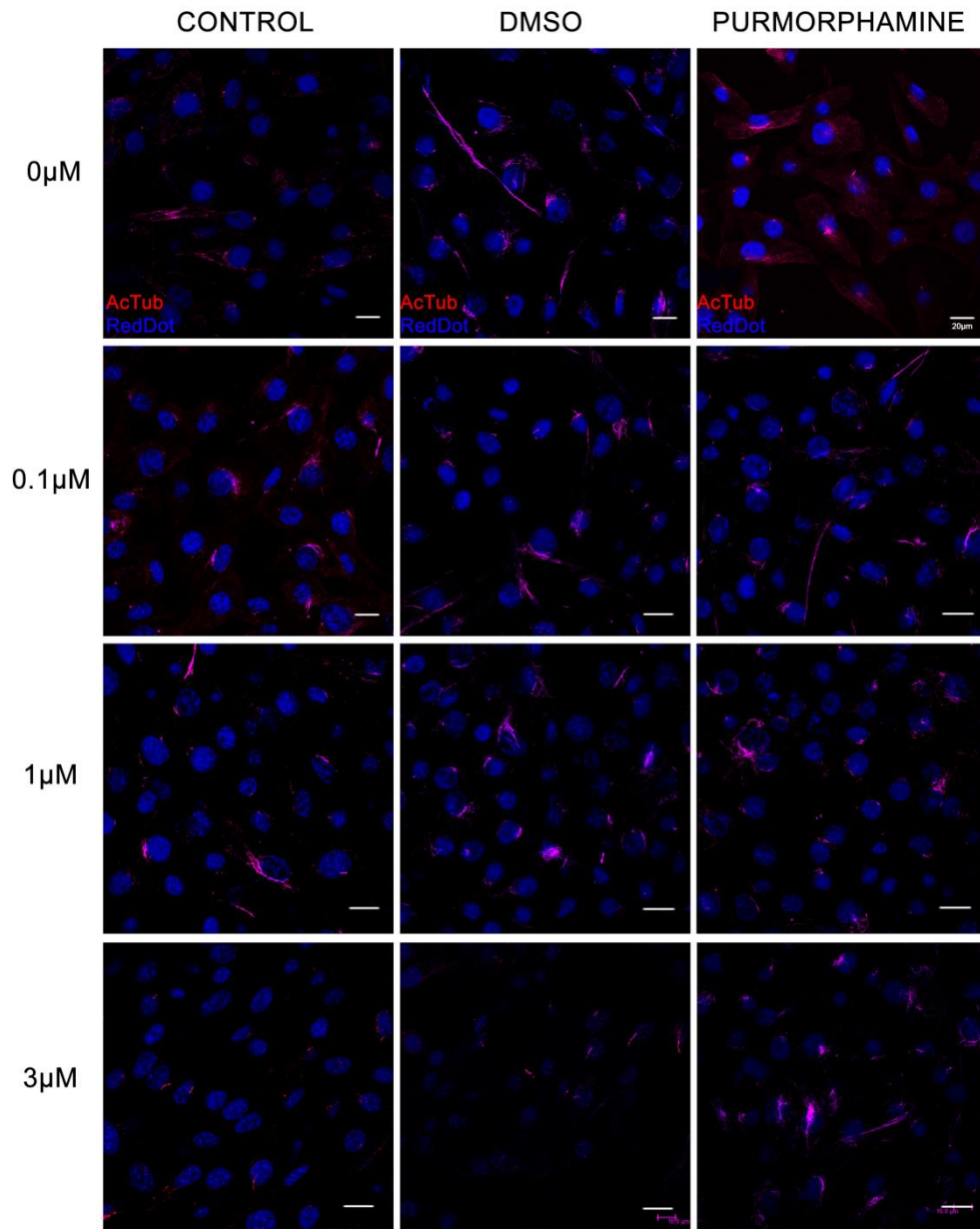
Επομένως, ακολούθησε μια σειρά πειραμάτων ίδιων με εκείνων που έγιναν με το FTY720 έτσι ώστε να συγκριθεί η δράση των δυο αυτών αναστολέων. Αρχικά έγινε μια σειρά ανοσοφθορισμών με τα αντισώματα της SET και της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης για να φανεί εάν υπάρχει κάποια μορφολογική αλλαγή στα κύτταρα και στον εντοπισμό της SET. Γενικά δεν είναι σαφές αν προκύπτουν αλλαγές στον εντοπισμό της SET μετά από επώαση με το πεπτίδιο, όμως φαίνεται ότι στη συγκέντρωση 1  $\mu\text{M}$  του πεπτιδίου, η SET σχηματίζει συσσωματώματα και είναι λιγότερο διάχυτη σε σχέση με τις άλλες συγκεντρώσεις. Παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια διακριτή αλλαγή στον εντοπισμό της SET ή στο πρότυπο της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης. Επίσης, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ ενεργοποίησης του μονοπατιού και μη, διότι δεν αλλάζει το πρότυπο κατανομής ούτε της SET ούτε της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης (Εικόνα 22). Το εύρος των συγκεντρώσεων επιλέχθηκε με βάση τη βιβλιογραφία και από τις συγκεντρώσεις 1  $\mu\text{M}$  και άνω εμφανιζόταν αυξημένη θνησιμότητα των κυττάρων οπότε δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τα 3  $\mu\text{M}$ .



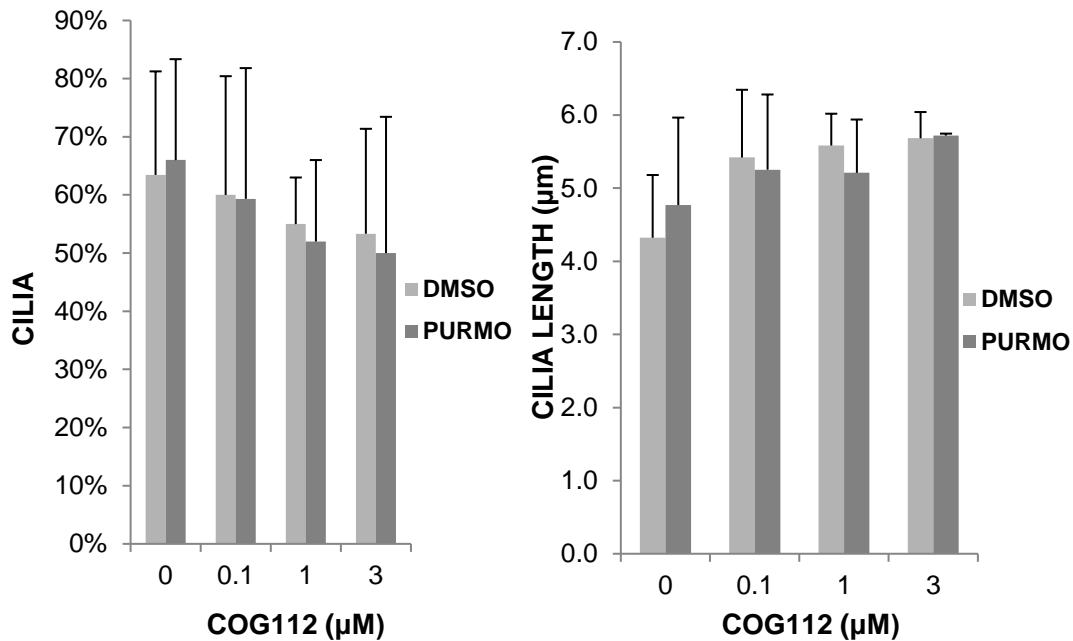
**Εικόνα 22. Επίδραση του COG112 στα κύτταρα NIH/3T3 παρουσία ή όχι Purmorphamine.** Εικόνες μεμονωμένων κυττάρων μετά από ανοσολογική ανίχνευση των πρωτεϊνών SET (πράσινο) και Acetylated Tubulin (κόκκινο). Τα κύτταρα επώαστηκαν για 24 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις COG112 (0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M) παρουσία ή όχι Purmorphamine (2  $\mu$ M) σε περιβάλλον μειωμένου ορού (0.5%). Στην πρώτη και στη δεύτερη στήλη απεικονίζεται η κατανομή της κάθε πρωτεΐνης ξεχωριστά, ενώ στην τρίτη στήλη απεικονίζονται μαζί. Ο πυρήνας εμφανίζεται με μπλε χρώση. Γραμμή κλίμακας 10  $\mu$ m.

Και σε αυτή την περίπτωση έπειτα από χρώση των κυττάρων, σε όλες τις υπό μελέτη συνθήκες, με το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης έγιναν καταμετρήσεις των κυττάρων που έφεραν πρωτογενή κροσσό (Εικόνα 23A) για να φανεί αν υπάρχει κάποια διαφορά στον αριθμό ή/και στο μήκος των κροσσών μετά τη χρήση του πεπτιδίου. Παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του αριθμού των κροσσών στα κύτταρα όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του πεπτιδίου και σχετική αύξηση του μήκους των κροσσών, ωστόσο οι μεταβολές αυτές δεν φάνηκε να είναι στατιστικά σημαντικές (Εικόνα 23B).

**A**





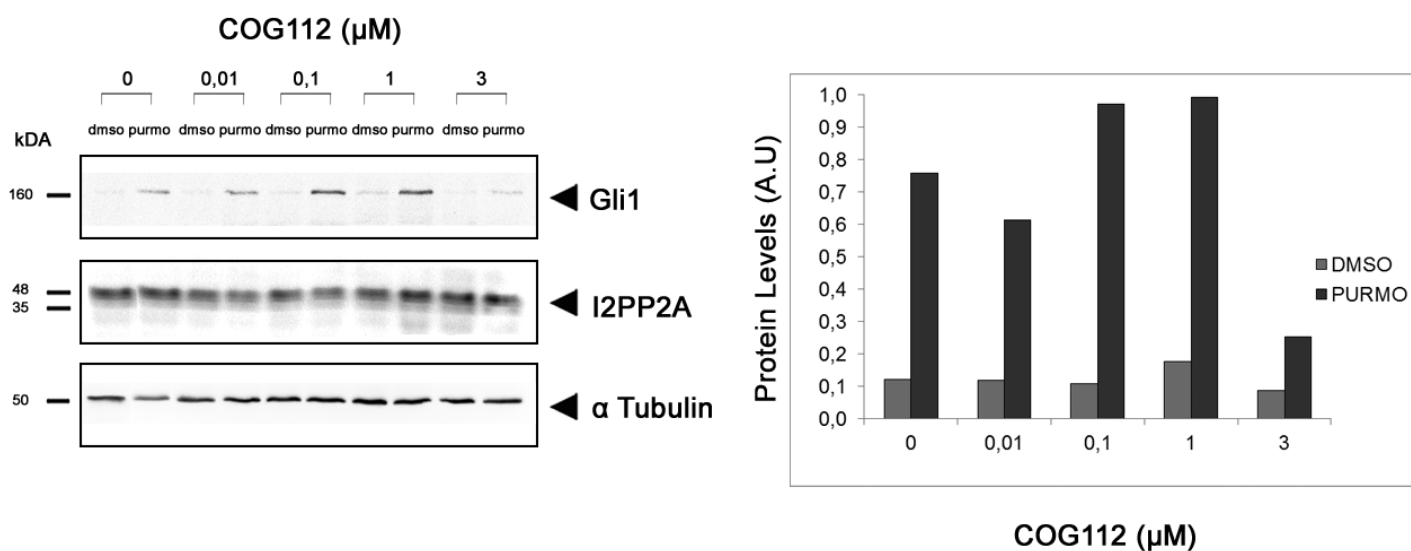
**B**

**Εικόνα 23. Επίδραση του COG112 στο ποσοστό και μήκος των πρωτογενών κροσσών στα κύτταρα NIH/3T3. Α)** Εικόνες κυττάρων σημασμένων με το αντίσωμα της ακετυλιωμένης τουμπουλίνης, έπειτα από επώασή τους για 24 ώρες με διάφορες συγκεντρώσεις COG112 (0.1 μM, 1 μM, 3 μM) παρουσία ή όχι Purmorphamine (2 μM) σε περιβάλλον μειωμένου ορού (0.5%). Ως control αναφέρονται τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο πλήρες ορού (10%). Η ακετυλιωμένη τουμπουλίνη έχει κόκκινο φθορισμό ενώ ο πυρήνας μπλε.. Γραμμή κλίμακας 20 μm. **Β)** Αριστερά: Διάγραμμα καταμέτρησης ποσοστού κυττάρων που είχαν πρωτογενείς κροσσούς στις διάφορες συγκεντρώσεις COG112 (0.1 μM, 1 μM, 3 μM) παρουσία ή όχι Purmorphamine (2 μM). Δεξιά: Διάγραμμα καταμέτρησης του μήκους των πρωτογενών κροσσών στις ίδιες συνθήκες. Η καταμέτρηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ.

Τέλος, ελέγχθηκε και σε αυτήν την περίπτωση η πιθανή επίδραση του COG112 στη σηματοδότηση Hedgehog σε επίπεδο έκφρασης πρωτεΐνης. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε εκχυλίσματα κυττάρων που επώαστηκαν στις προαναφερθείσες συνθήκες, χρησιμοποιώντας το αντίσωμα του Gli1 και αυτό της SET/I2PP2A ώστε να επιβεβαιωθεί πως παρουσία του COG112 δεν μεταβάλλονται τα επίπεδα της πρωτεΐνης.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 24, το COG112 δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SET, ωστόσο παρατηρούνται μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης του Gli1. Ενώ στην περίπτωση του FTY720 υπάρχει σταδιακή μείωση του Gli1

ανάλογη της αύξησης της συγκέντρωσης του φαρμάκου, εδώ φαίνεται να υπάρχει αύξηση του Gli1 στις συγκεντρώσεις 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  ενώ στη συγκέντρωση 3  $\mu\text{M}$  υπάρχει σημαντική πτώση των επιπέδων Gli1 σε σχέση με τον μάρτυρα.

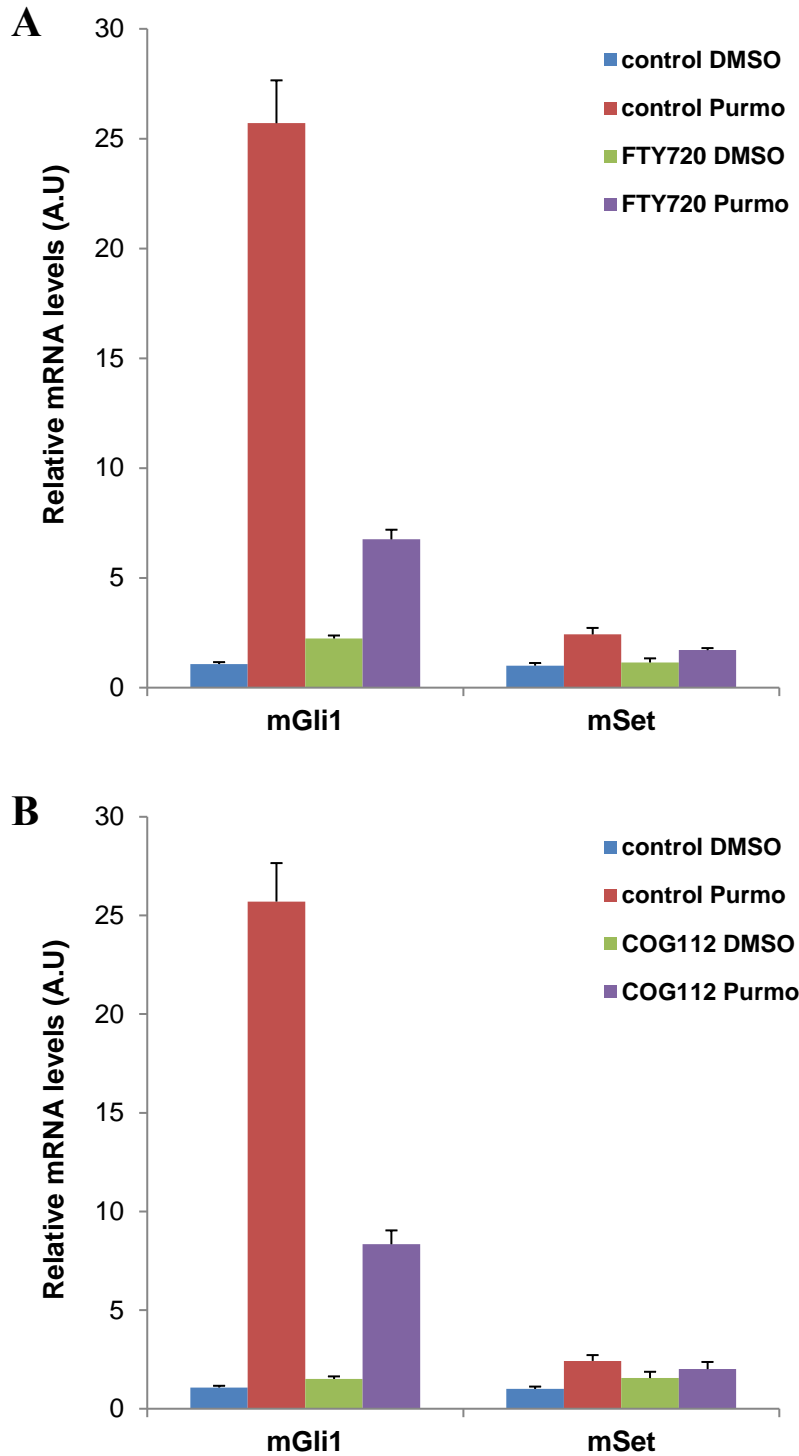


**Εικόνα 24. Η επίδραση του COG112 στα κύτταρα NIH/3T3 σε επίπεδο πρωτεϊνών.** Αριστερά: Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western σε κυτταρικά εκχυλίσματα που είχαν ληφθεί από κύτταρα NIH/3T3 κύτταρα ύστερα από επώαση με DMSO (πρώτη διαδρομή) ή Purmorphamine (2  $\mu\text{M}$ ) (δεύτερη διαδρομή) σε διάφορες συγκεντρώσεις COG112 (0.01  $\mu\text{M}$ , 0.1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ ) σε θρεπτικό μέσω μειωμένο ορού (0.5%). Χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα mouse anti-Gli1, mouse anti-I2PP2A, mouse anti- $\alpha$  Tubulin Δεξιά: Ποσοτικοποίηση των επιπέδων της πρωτεΐνης Gli1 με βάση την  $\alpha$  τουμπουλίνη. Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Quantity One της Biorad. (A.U.=Arbitrary Units)

## **5. Επίδραση της ανταγωνιστικής αναστολής της SET, μέσω του FTY720 και του COG112 στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog ,σε μεταγραφικό επίπεδο**

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ανταγωνιστική αναστολή της SET επηρεάζει τα επίπεδα της πρωτεΐνης Gli1, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα της πρώτης. Για το λόγο αυτό εξετάστηκε πως επηρεάζεται η έκφραση των δύο γονιδίων των πρωτεϊνών αυτών από την επίδραση των αναστολέων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (qPCR). Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ολικού RNA τα οποία παρασκευάστηκαν από κύτταρα NIH/3T3 ύστερα από επώαση με τους αναστολείς σε συγκεντρώσεις 5  $\mu$ M FTY720 και 3  $\mu$ M COG112.

Στην Εικόνα 25 παρουσιάζονται τα σχετικά επίπεδα mRNA που αφορούν το Gli1 και τη SET μετά την επώαση των κυττάρων με τους δύο αναστολείς. Αρχικά φαίνεται ότι στα control δείγματα, η χρήση Purmorphamine δείχνει αύξηση στα επίπεδα του Gli1, επιβεβαιώνοντας έτσι τη δράση της στην επαγωγή του μονοπατιού. Σημαντική είναι επίσης η μειωμένη αύξηση στα επίπεδα του Gli1 ύστερα από τη επώαση των κυττάρων και με τους δυο αναστολείς στην περίπτωση της επαγωγής του μονοπατιού από την Purmorphamine. Παράλληλα, παρατηρείται μια πολύ μικρή αύξηση στα επίπεδα της SET όταν επάγεται το μονοπάτι, ανεξάρτητα αν έχει χρησιμοποιηθεί αναστολέας ή όχι.



**Εικόνα 25. Ποσοτική ανάλυση των επιπέδων mRNA των γονιδίων Gli1, SET.** Η ανάλυση με τη μέθοδο της ποσοτικής qPCR έγινε σε δείγματα που απομονώθηκαν από κύτταρα NIH/3T3 μετά από επώαση με τους αναστολείς **A)** FTY720 και **B)** COG112 αντίστοιχα παρουσία Purmorphamine. Η κανονικοποίηση έγινε με το χρήση του *gapdh* ως γονίδιο αναφοράς. (A.U=Arbitrary Units)

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog είναι ένα εξελικτικά διατηρημένο μονοπάτι και παίζει κεντρικό ρόλο στον καθορισμό της πορείας διαφοροποίησης των κυττάρων, στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και στην ανανέωση των ιστών. Η σηματοδότηση συνδέεται με ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων ασθενειών και συνεπώς η δραστηριότητα του πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια. Είναι γνωστό ότι πολλές από τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι αυτό υφίστανται αντιστρεπές φωσφορυλιώσεις που καταλύονται από πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες, οι οποίες ενεργούν ως ένας αποτελεσματικός «διακόπτης» για τη ρύθμιση της σηματοδότησης.

Σε αντίθεση με τις κινάσες, οι οποίες έχουν μελετηθεί εκτενώς όσον αφορά την διαδικασία φωσφορυλίωσης, οι φωσφατάσες πιστευόνταν ότι δρουν με μη ειδικό τρόπο και δεν αποτελούσαν αντικείμενο έρευνας. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν πολλές ενδείξεις που αφορούν τους ειδικούς ρόλους που παίζουν οι φωσφατάσες στα πλαίσια των σηματοδοτήσεων οποίες εμπλέκονται σε μηχανισμούς που ελέγχουν την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένου και του Hedgehog <sup>[39]</sup>.

Η PP2A είναι μια φωσφατάση με μεγάλη και ευρεία έκφραση στους ευκαρυώτες και εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών <sup>[59]</sup>. Ειδικότερα, η PP2A πιστευόνταν πως δρα ως ογκο-καταστολέας. Το συμπέρασμα αυτό αρχικά προέκυψε από την ανακάλυψη ότι ο αναστολέας της, το οκαδαϊκό οξύ, δρα ως ένας πιθανός υποκινητής όγκων, ενώ αργότερα η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε από την ανακάλυψη ότι η φωσφατάση αλληλεπιδρά με ογκοπρωτεΐνες <sup>[59, 117]</sup>. Μέχρι στιγμής, η PP2A είναι η πιο καλά μελετημένη φωσφατάση σερίνης/θρεονίνης στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog στα σπονδυλωτά. Έχει δειχθεί ότι η PP2A ρυθμίζει τους μεταγραφικούς παράγοντες Gli και αποφωσφορυλιώνει το Kif7, λειτουργώντας έτσι ως ένας θετικός ρυθμιστής της σηματοδότησης <sup>[39]</sup>.

Η ογκοπρωτεΐνη SET/I2PP2A είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη με ένα ευρύ φάσμα δράσεων σε διάφορες περιοχές του κυττάρου. Η δράση της αφορά τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και του κυτταρικού κύκλου, την αναδιοργάνωση της χρωματίνης και την αλληλεπίδρασή της με τις ιστόνες ως μόριο-συνοδός αλλά και στη συμμετοχή της στην κυτταρική μετανάστευση και την απόπτωση. Πέραν αυτών των λειτουργιών, η SET είναι ισχυρός αναστολέας της PP2A και υπάρχουν αρκετές μελέτες που δείχνουν τη δράση της στο νευρικό σύστημα και στο ρόλο της

στη νόσο Alzheimer. Έχοντας μια τέτοια μεγάλη ποικιλία λειτουργιών, η SET αποτελεί αντικείμενο ερευνών που αφορούν την αξιοποίησή της ως φαρμακευτικό στόχο.

Ενώ υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με το λειτουργικό προφίλ της SET, δεν υπάρχει καμία αναφορά ως προς το ρόλο της στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι σε μυελοβλάστωμα που ενεργοποιείται από το μονοπάτι Hedgehog η δραστηριότητα της p53 αναστέλλεται από τη SET χωρίς να εμπλέκεται η αναστολή της PP2A <sup>[118]</sup>. Η δημοσίευση αυτή αν και αφορά έρευνα σε καρκινικά κύτταρα, είναι η μοναδική μέχρι σήμερα που αναφέρει τη SET ως έναν παράγοντα που μπορεί να έχει κάποια σχέση με το μονοπάτι Hedgehog.

Μια αρχική υπόθεση της πιθανής εμπλοκής της στο μονοπάτι αυτό, εκτός από τη σχέση της με την PP2A που εμπλέκεται στο μονοπάτι, προέκυψε από μελέτη στην οποία αναλύθηκε η κατανομή των πρωτεϊνών Seta/b σε έμβρυα και σε προνύμφες zebrafish. Μέσω πειραμάτων ανοσοφθορισμού, εντοπίστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών στους κροσσούς του οσφρητικού επιθηλίου και των ακουστικών ακρολοφίων του έσω ωτός. Αξιοσημείωτη, ήταν επίσης και η κατανομή και των δύο ορθόλογων πρωτεϊνών στους στερεοκροσσούς και στον κινητό κροσσό των νευρομαστών. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε η συσχέτιση της δράσης των Seta/b στην ανάπτυξη των αισθητήριων οργάνων του zebrafish κατά την εμβρυογένεση και ταυτόχρονα υποδεικνύεται η σύνδεσή τους με το σχηματισμό των κροσσών <sup>[110]</sup>.

Από τα παραπάνω προκύπτουν τα εξής δεδομένα:

α) Η SET συσχετίζεται με την εμβρυογένεση, εντοπίζεται στα κροσσωτά κύτταρα και συνδέεται με το σχηματισμό των κροσσών.

β) Η φωσφατάση PP2A, η οποία αναστέλλεται από την πρωτεΐνη SET, έχειδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη ρύθμιση του μονοπατιού Hedgehog.

γ) Το σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog είναι ένα κρίσιμο μονοπάτι κατά την εμβρυογένεση και συνδέεται άρρηκτα με τους πρωτογενείς κροσσούς.

Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα προέκυψε η συγκεκριμένη διπλωματική που προσπάθησε να απαντήσει στο ερώτημα εάν η SET έχει σχέση με αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι. Συγκεκριμένα, το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της αναστολής της δράσης της ογκοπρωτεΐνης SET από τα φάρμακα FTY720, COG112 στο σχηματισμό των πρωτογενών κροσσών και κατ' επέκταση στο μονοπάτι Hedgehog.

## 1. Η κατανομή της SET στα κύτταρα NIH/3T3

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η πρωτεΐνη SET, εντοπίζεται σε πυρήνα, κυτταρόπλασμα και κυτταροπλασματική μεμβράνη. Πειράματα ανοσοφθορισμού σε κύτταρα NIH3T3 έδειξαν ότι η SET εντοπίζεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα ανάλογα με τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Ο εντοπισμός της κατά τη φάση της μίτωσης είναι κυρίως στα χρωμοσώματα, ενώ κατά τη μεσόφαση, φαίνεται να είναι περισσότερο κυτταροπλασματικός. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με την έρευνα των Seo και των συνεργατών του <sup>[119]</sup>, οι οποίοι έδειξαν ότι ύστερα από διαμόλυνση κυττάρων NIH/3T3 με GFP-Set/TAF-1β, η SET εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα <sup>[119]</sup>. Παράλληλα, στην κυτταρική σειρά HEK293T, τόσο το αντίσωμα κατά της SET αλλά και η υπερέκφρασή της επιδεικνύουν το ίδιο πρότυπο εντοπισμού σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα <sup>[120]</sup>. Τέλος, στην έρευνα των Lam και συνεργατών <sup>[121]</sup> αναφέρεται ότι όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε φάση ηρεμίας, η μετακίνηση της SET από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα, είναι μια αυθόρμητη διαδικασία με παροδικό χαρακτήρα <sup>[121]</sup>. Τα πειράματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας, όσον αφορά την κατανομή της SET.

Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με την κυκλίνη B-CDK1 και την αναστέλλει και έχει επίσης δείξει ότι συσχετίζεται με τον αναστολέα της CDK, p21<sup>Cip1</sup> <sup>[122, 123]</sup>. Επίσης, μπορεί να εμπλέκεται στην έλεγχο της φωσφορυλίωσης των πυρηνικών πρωτεϊνών μέσω της ρύθμισης της δράσης της CDK και της PP2A. Με τον τρόπο αυτό φαίνεται να εμπλέκεται στη ρύθμιση της μετάβασης από τη G2 στην M φάση του κυτταρικού κύκλου. Ταυτόχρονα, η σημασία της SET στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου αναδεικνύεται από το γεγονός ότι η πρωτεΐνη αυτή ρυθμίζει τη δομή της χρωματίνης μέσω της αναστολής της ακετυλίωσης των ιστονών <sup>[112]</sup>.

## 2. Η εντόπιση της SET μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog

Η Purmorphamine, είναι ένας συνθετικός αγωνιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού Hedgehog που ανακαλύφθηκε από τον Schultz και τους συνεργάτες του <sup>[124]</sup>. Όταν η κυτταρική σειρά C3H10T1/2 (εμβρυονικοί ινοβλάστες μεσοδέρματος ποντικού), η οποία αποτελείται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, διαφοροποιήθηκε σε οστεοβλάστες ή οστεϊκούς προγόνους, η αλκαλική φωσφατάση η οποία είναι ένας δείκτης του ενεργοποιημένου μονοπατιού Hedgehog, εμφάνιζε αυξορρύθμιση. Η διαφοροποίηση αυτή επαγόταν τελικά από την

Purmorphamine. Μεταγενέστερες μελέτες του προτύπου γονιδιακής έκφρασης έδειξαν ότι η Purmorphamine αυξορρυθμίζει το *Gli1* και *Ptch1*, αλλά όχι το *Shh*, επιβεβαιώνοντας το ρόλο της ως αγωνιστή του μονοπατιού <sup>[45]</sup>. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι το μόριο αυτό ενεργεί με την άμεση αλληλεπίδρασή του με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη Smoothened.

Μετά την επώαση των κυττάρων NIH/3T3 με purmorphamine,, δεν παρατηρήθηκαν μορφολογικές αλλαγές στα κύτταρα και στους πρωτογενείς κροσσούς. Ωστόσο, η αύξηση της έκφρασης του *Gli1*, επιβεβαιώνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού σύμφωνα με την βιβλιογραφία <sup>[35]</sup>. Από βιβλιογραφικές αναφορές δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της SET με την Purmorphamine και όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης και της ποσοτικής PCR, η επαγωγή του μονοπατιού δεν φαίνεται να επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SET, αν και φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα mRNA της σε μικρό βαθμό.

Αναφορικά με τον εντοπισμό της SET ύστερα από την επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog, η SET φαίνεται να είναι κυρίως κυτταροπλασματική και δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια αλλαγή στον εντοπισμό της σε σχέση με τα κύτταρα που δεν είχαν ενεργοποιημένο το μονοπάτι. Ενδιαφέρον προκαλεί όμως η σειρά ερευνών της Riobo και των συνεργατών της <sup>[125-127]</sup>, οι οποίοι βρήκαν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog στα κύτταρα NIH/3T3 και συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του Smoothened, είτε από Purmorphamine είτε από οποιονδήποτε άλλο φυσικό/τεχνητό ενεργοποιητή, οδηγεί στην ενεργοποίηση των GTPases Rac1 και RhoA, ανεξάρτητα από την ενεργοποίηση των παραγόντων *Gli* <sup>[125-127]</sup> και από την ύπαρξη ή όχι των πρωτογενών κροσσών <sup>[128]</sup>. Όπως είναι γνωστό, η ενεργή Rac1 οδηγεί τη πρωτεΐνη SET από τον πυρήνα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη οπότε θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί περαιτέρω εάν η ενεργοποίηση του μονοπατιού Hedgehog οδηγεί στην μετακίνηση της SET έξω από τον πυρήνα μέσω της Rac1.

### **3. Φαρμακολογική αναστολή της SET από το FTY720**

Το FTY720 είναι ένα ανάλογο σφιγγοσίνης το οποίο έχει εγκριθεί για τη θεραπεία ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας. Είναι επίσης ένας πιθανός αναστολέας της ανάπτυξης όγκων και η ικανότητά του αυτή συνδέεται με την ικανότητά του να ενεργοποιεί την PP2A. Μηχανιστικά, το FTY720 εμποδίζει την πρόσδεση της SET στην καταλυτική υπομονάδα της PP2A μέσω της



αλληλεπίδρασής του με μια περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο της SET, αφήνοντας έτσι την PP2A να ενεργοποιηθεί εκ νέου <sup>[129]</sup>.

Σε κύτταρα με ΟΜΛ, στα οποία η SET είναι κυρίως κυτταροπλασματική, η έκθεση στο φάρμακο οδήγησε σε αυξημένη μετατόπισή της στον πυρήνα αλλά ταυτόχρονα και σε αύξηση της κυτταροπλασματικής PP2Ac <sup>[115]</sup>. Αντιθέτως, σε HeLa κύτταρα, το FTY720 οδήγησε σε ταχεία έξοδο της SET προς το κυτταρόπλασμα. Μάλιστα, η έξοδος αυτή είχε ως απαραίτητη προϋπόθεση την ενεργότητα της PP2A και της Rac1 <sup>[130]</sup>.

Στα κύτταρα NIH/3T3 που χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρικό σύστημα στην παρούσα διπλωματική, η SET η οποία είναι κυρίως κυτταροπλασματική, φαίνεται να μετατοπίζεται προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη ύστερα από την έκθεση στο φάρμακο και η μετατόπιση αυτή είναι ανεξάρτητη από την επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog. Πιθανότατα να υπάρχει αντιστοιχία με τα HeLa κύτταρα, στα οποία έχει βρεθεί πως το FTY720 ωθεί τη μετακίνηση της SET στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω της ενεργής Rac1 <sup>[130]</sup>, αλλά θα χρειαστεί όμως να εξετασθεί πιο διεξοδικά αυτή η πιθανότητα. Ταυτόχρονα, βρέθηκε μείωση του αριθμού των πρωτογενών κροσσών εξαρτώμενη από την ποσότητα του φαρμάκου. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αδημοσίευτα αποτελέσματα του εργαστηρίου τα οποία έδειξαν ότι αυξανόμενες συγκεντρώσεις του FTY720 οδηγούσαν σε μείωση του αριθμού των πρωτογενών κροσσών σε κύτταρα NIH/3T3 υπό φυσιολογικές συνθήκες (θρεπτικό μέσο με 10% ορό). Το μήκος των κροσσών παρόλα αυτά, δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τη χρήση του φαρμάκου.

Σημαντικό ήταν επίσης να διερευνηθεί εάν επηρεάζεται παρουσία FTY720 η SET σε πρωτεϊνικό αλλά και μεταγραφικό επίπεδο καθώς και ο μεταγραφικός παράγοντας Gli1. Η παραγωγή και η διατήρηση μια πρωτεΐνης απαιτεί μια σειρά αλληλένδετων διεργασιών, που περιλαμβάνουν τη μεταγραφή, την επεξεργασία και την αποικοδόμηση των mRNAs έως τη μετάφραση, τον εντοπισμό και την μετα-μεταφραστική τροποποίηση της πρωτεΐνης αυτής <sup>[131]</sup>. Ο Schwanhausser και οι συνεργάτες του <sup>[132]</sup>, αναφέρουν ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες, τα γονίδια σηματοδότησης, το γονίδια τροποποίησης της χρωματίνης και τα γονίδια με λειτουργίες που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο, τείνουν να έχουν ασταθή mRNA και ασταθείς πρωτεΐνες. Συνεπώς δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ του mRNA και της αντίστοιχης πρωτεΐνης σε μόρια που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια <sup>[132]</sup>.

Παρατηρήθηκε ότι με τη σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του FTY720 υπήρχε μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων καθώς και των επιπέδων mRNA του μεταγραφικού παράγοντα Gli1, ο οποίος είναι ο στόχος της ενεργοποίησης του μονοπατιού Hedgehog. Αντίθετα, τόσο τα επίπεδα του mRNA όσο και τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SET παρέμειναν σχετικά σταθερά μετά την ενεργοποίηση του μονοπατιού. Άρα υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι η αναστολή της SET από το FTY720, επηρεάζει αρνητικά το μονοπάτι Hedgehog. Με βάση αυτές τις ενδείξεις ακολούθησε η ίδια σειρά πειραμάτων, με την αναστολή της δράσης της SET το COG112, ώστε να διασταυρωθούν τα αποτελέσματα μας και να διερευνηθεί η πιθανότητα ότι τα φάρμακα αυτά επηρεάζουν το μονοπάτι Hh με διαφορετικό μηχανισμό.

#### **4. Φαρμακολογική αναστολή της SET από το COG112**

Το COG112 είναι ένα πεπτιδίο που μπορεί να εισχωρήσει ειδικά σε κύτταρα. Εκτός της ικανότητάς του να αναστέλλει τη φλεγμονώδη απόκριση στην κολίτιδα μέσω της παρεμπόδισης του μονοπατιού NF-κB και της έκφρασης των προφλεγμονώδων κιτοκινών, επίσης προσδέεται με τη SET. Η αλληλεπίδραση αυτή αναστέλλει το σχηματισμό του συμπλόκου SET-PP2A και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αύξηση της δραστηριότητας της PP2A. Και αυτό το πεπτιδίο έχει τη δυνατότητα να παρεμποδίσει το σύμπλοκο της SET με τη Rac1, εμποδίζοντας έτσι την κυτταρική μετανάστευση [78].

Ο εντοπισμός της SET ύστερα από τη χρήση του φαρμάκου αυτού στα κύτταρα NIH/3T3 δεν φαίνεται να επιδεικνύει σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Επίσης δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην εντόπιση της πρωτεΐνης μετά την επαγωγή του μονοπατιού Hedgehog. Η δημιουργία συσσωματωμάτων που φάνηκε να σχηματίζει η SET στη συγκέντρωση 1 μM πεπτιδίου θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω. Η αύξηση της συγκέντρωσης του πεπτιδίου οδηγούσε σε ταυτόχρονη μείωση των αριθμών των πρωτογενών κροσσών και σε σταδιακή αύξηση του μήκους των κροσσών, αλλά οι διαφορές αυτές δεν βρέθηκαν να είναι στατιστικά σημαντικές.

Το πεπτιδίο COG112, όπως και το FTY720 με βάση τη βιβλιογραφία, αναστέλλουν τη δράση της SET χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδά της. Αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη καθώς η χρήση του πεπτιδίου δεν δείχνει να επηρεάζει τα ολικά επίπεδα της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της

ανοσοαποτύπωσης αλλά και της ποσοτικής PCR τείνουν να είναι παρόμοια μεταξύ των δυο φαρμάκων, αναφορικά με τη SET. Παρόλα αυτά, τα πρωτεϊνικά επίπεδα του Gli1 έδειξαν μια σταδιακή μείωσή του ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του FTY720. Στην περίπτωση του COG112, η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσής του μέχρι και τη συγκέντρωση 1μM έδειχνε αύξηση του Gli1, ενώ στη συγκέντρωση 3μM, η πρωτεΐνη άρχισε να μειώνεται. Μια πιθανή εξήγηση είναι πως το COG112, έχει ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων δραστηριότητας και έτσι πρέπει να ελεγχθεί το βέλτιστο εύρος δράσης του. Σε επίπεδο mRNA και εδώ φαίνεται πως το Gli1 έχει μειωμένη έκφραση ύστερα από την επαγωγή του μονοπατιού, συμφωνώντας με τα αποτελέσματα του FTY720.

## 5. Συμπεράσματα-Μελλοντικά σχέδια

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποτελούν μια πρώτη ένδειξη ότι η φαρμακολογική αναστολή της SET επηρεάζει το μονοπάτι Hedgehog σε επίπεδο ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Gli1 αλλά και σε επίπεδο αριθμού των πρωτογενών κροσσών, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την ενεργοποίηση του μονοπατιού.

Σε μια διαφορετική προσέγγιση, για τη διασταύρωση των αποτελεσμάτων αυτών έγινε μια σειρά παροδικών διαμολύνσεων με shRNA της SET στα κύτταρα NIH/3T3. Δυστυχώς η κυτταρική αυτή σειρά δεν εμφανίζει υψηλό ποσοστό διαμολυσμένων κυττάρων και έτσι τα αποτελέσματα δεν ήταν αποδεκτά. Πιθανότατα, η κατασκευή μιας σταθερής κυτταρικής σειράς NIH/3T3 με μειωμένη την έκφραση της SET, θα έδειχνε μια πιο καθαρή εικόνα. Παράλληλα, ο ποσοτικός προσδιορισμός της επαγωγής του σηματοδοτικού μέσω της ανάλυσης Luciferase report assay θα έδινε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της μεθόδου αυτής.

Μια άλλη σειρά μελλοντικών πειραμάτων αφορά τον εντοπισμό του σημείου της σηματοδότησης που μπορεί να επηρεάζεται από τη SET. Θα μπορούσε να ακολουθηθεί η ίδια σειρά πειραμάτων με αυτήν την πτυχιακή εργασία, αλλά για διαφορετικές πρωτεΐνες που βρίσκονται κατά μήκος του σηματοδοτικού καταρράκτη. Η αναζήτηση αυτή θα μπορούσε να ξεκινήσει αρχικά από τις πρωτεΐνες του μονοπατιού που ρυθμίζονται από τη PP2A, όπως π.χ ο Kif7 ο οποίος είναι γνωστό ότι αποφωσφορυλιώνεται από την φωσφατάση <sup>[54]</sup>. Ο παράγοντας αυτός έχει ως κεντρικό ρόλο στο μονοπάτι Hedgehog των θηλαστικών διότι ελέγχει

την αρχιτεκτονική του πρωτογενούς κροσσού και δημιουργεί ένα διαμέρισμα στην κορυφή του κροσσού όπου μπορεί να ρυθμίζεται σωστά η δραστικότητα των Gli-SuFu <sup>[133]</sup>. Οπότε θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί πως η SET επηρεάζει τη δράση του Kif7.

Η PP2A επίσης εμπλέκεται σχεδόν σε κάθε βήμα της ενεργοποίησης των Gli, συμπεριλαμβανομένης της φωσφορυλίωσής τους, της πρωτεολυτικής επεξεργασίας τους, του πυρηνικού εντοπισμού τους, της μεταγραφικής ενεργότητάς τους και της αποικοδόμησής τους είτε με άμεσο είτε με έμμεσο τρόπο <sup>[39]</sup>. Με βάση αυτά τα δεδομένα, σε μια μελλοντική εργασία θα μπορούσε να γίνει μια προσέγγιση ανάλυσης όλων αυτών των παραμέτρων. Τέλος, τα αποτελέσματα αυτής της πτυχιακής εργασίας θα μπορούσαν να διερευνηθούν περαιτέρω αναλύοντας την ενζυμική ενεργότητα της φωσφατάσης PP2A στο σηματοδοτικό μονοπάτι Hedgehog παρουσία των FTY720 και COG112.

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

---

1. Zimmerman, H., *Beitrage zur kenntniss einiger drusen und epithelien*. Arch. Mikr. Anat., 1898. **52**: p. 552-706.
2. Satir, P., L.B. Pedersen, and S.T. Christensen, *The primary cilium at a glance*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 4): p. 499-503.
3. Eggenschwiler, J.T. and K.V. Anderson, *Cilia and developmental signaling*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007. **23**: p. 345-73.
4. Wong, S.Y. and J.F. Reiter, *The primary cilium at the crossroads of mammalian hedgehog signaling*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 225-60.
5. Venkatesh, D., *Primary cilia*. J Oral Maxillofac Pathol, 2017. **21**(1): p. 8-10.
6. Satir, P. and S.T. Christensen, *Overview of structure and function of mammalian cilia*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 377-400.
7. Quarumby, L.M. and J.D. Parker, *Cilia and the cell cycle?* J Cell Biol, 2005. **169**(5): p. 707-10.
8. Salisbury, J.L., *Primary cilia: putting sensors together*. Curr Biol, 2004. **14**(18): p. R765-7.
9. Ainsworth, C., *Cilia: tails of the unexpected*. Nature, 2007. **448**(7154): p. 638-41.
10. Tucker, R.W., A.B. Pardee, and K. Fujiwara, *Centriole ciliation is related to quiescence and DNA synthesis in 3T3 cells*. Cell, 1979. **17**(3): p. 527-35.
11. Tucker, R.W., C.D. Scher, and C.D. Stiles, *Centriole deciliation associated with the early response of 3T3 cells to growth factors but not to SV40*. Cell, 1979. **18**(4): p. 1065-72.
12. Kim, S. and L. Tsiokas, *Cilia and cell cycle re-entry: more than a coincidence*. Cell Cycle, 2011. **10**(16): p. 2683-90.
13. Kobayashi, T. and B.D. Dynlacht, *Regulating the transition from centriole to basal body*. J Cell Biol, 2011. **193**(3): p. 435-44.
14. Sorokin, S.P., *Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs*. J Cell Sci, 1968. **3**(2): p. 207-30.
15. Huber, L.A., et al., *Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane*. J Cell Biol, 1993. **123**(1): p. 35-45.

16. Ishikawa, H. and W.F. Marshall, *Ciliogenesis: building the cell's antenna*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(4): p. 222-34.
17. Pedersen, L.B. and J.L. Rosenbaum, *Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 23-61.
18. Sung, C.H. and M.R. Leroux, *The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(12): p. 1387-97.
19. Pan, J. and W.J. Snell, *Organelle size: a cilium length signal regulates IFT cargo loading*. Curr Biol, 2014. **24**(2): p. R75-8.
20. Kim, S., et al., *Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8087.
21. Yeh, C., et al., *IGF-1 activates a cilium-localized noncanonical Gbetagamma signaling pathway that regulates cell-cycle progression*. Dev Cell, 2013. **26**(4): p. 358-68.
22. Pugacheva, E.N., et al., *HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1351-63.
23. Nigg, E.A. and T. Stearns, *The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(10): p. 1154-60.
24. Izawa, I., et al., *Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle*. Cilia, 2015. **4**: p. 12.
25. Gilula, N.B. and P. Satir, *The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization*. J Cell Biol, 1972. **53**(2): p. 494-509.
26. Vieira, O.V., et al., *FAPP2, cilium formation, and compartmentalization of the apical membrane in polarized Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18556-61.
27. Rosenbaum, J.L. and G.B. Witman, *Intraflagellar transport*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(11): p. 813-25.
28. Brugmann, S.A., D.R. Cordero, and J.A. Helms, *Craniofacial ciliopathies: A new classification for craniofacial disorders*. Am J Med Genet A, 2010. **152A**(12): p. 2995-3006.
29. Fliegauf, M., T. Benzing, and H. Omran, *When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 880-93.

30. Goetz, S.C., P.J. Ocbina, and K.V. Anderson, *The primary cilium as a Hedgehog signal transduction machine*. *Methods Cell Biol*, 2009. **94**: p. 199-222.
31. Ingham, P.W. and M. Placzek, *Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog*. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(11): p. 841-50.
32. Dessaud, E., A.P. McMahon, and J. Briscoe, *Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network*. *Development*, 2008. **135**(15): p. 2489-503.
33. Lee, R.T., Z. Zhao, and P.W. Ingham, *Hedgehog signalling*. *Development*, 2016. **143**(3): p. 367-72.
34. Pan, Y., C. Wang, and B. Wang, *Phosphorylation of Gli2 by protein kinase A is required for Gli2 processing and degradation and the Sonic Hedgehog-regulated mouse development*. *Dev Biol*, 2009. **326**(1): p. 177-89.
35. Ingham, P.W., Y. Nakano, and C. Seger, *Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa*. *Nat Rev Genet*, 2011. **12**(6): p. 393-406.
36. Hui, C.C. and S. Angers, *Gli proteins in development and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 513-37.
37. Aberger, F., et al., *Canonical and noncanonical Hedgehog/GLI signaling in hematological malignancies*. *Vitam Horm*, 2012. **88**: p. 25-54.
38. Stecca, B., et al., *Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLII and the RAS-MEK/AKT pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(14): p. 5895-900.
39. Zhao, L., et al., *The emerging roles of phosphatases in Hedgehog pathway*. *Cell Commun Signal*, 2017. **15**(1): p. 35.
40. Briscoe, J. and P.P. Therond, *The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(7): p. 416-29.
41. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. *Genes Dev*, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
42. Beachy, P.A., S.S. Karhadkar, and D.M. Berman, *Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 324-31.

43. McMahon, A.P., P.W. Ingham, and C.J. Tabin, *Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling*. *Curr Top Dev Biol*, 2003. **53**: p. 1-114.
44. Sinha, S. and J.K. Chen, *Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed*. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(1): p. 29-30.
45. Wu, X., et al., *Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway*. *Chem Biol*, 2004. **11**(9): p. 1229-38.
46. Carney, T.J. and P.W. Ingham, *Drugging Hedgehog: signaling the pathway to translation*. *BMC Biol*, 2013. **11**: p. 37.
47. Krebs, E.G., *The Enzymology of Control by Phosphorylation*. *The Enzymes*, 1986. **17**: p. 3-20.
48. Mumby, M.C. and G. Walter, *Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth*. *Physiol Rev*, 1993. **73**(4): p. 673-99.
49. Oliver, C.J. and S. Shenolikar, *Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors*. *Front Biosci*, 1998. **3**: p. D961-72.
50. Hunter, T., *Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling*. *Cell*, 1995. **80**(2): p. 225-36.
51. Shenolikar, S., *Protein serine/threonine phosphatases--new avenues for cell regulation*. *Annu Rev Cell Biol*, 1994. **10**: p. 55-86.
52. Barford, D., *Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases*. *Trends Biochem Sci*, 1996. **21**(11): p. 407-12.
53. Krishnan, V., et al., *Mediation of Sonic hedgehog-induced expression of COUP-TFII by a protein phosphatase*. *Science*, 1997. **278**(5345): p. 1947-50.
54. Liu, Y.C., et al., *The PPF1A1-PP2A protein complex promotes trafficking of Kif7 to the ciliary tip and Hedgehog signaling*. *Sci Signal*, 2014. **7**(355): p. ra117.
55. Krauss, S., et al., *Protein phosphatase 2A and rapamycin regulate the nuclear localization and activity of the transcription factor GLI3*. *Cancer Res*, 2008. **68**(12): p. 4658-65.
56. Krauss, S., et al., *Point mutations in GLI3 lead to misregulation of its subcellular localization*. *PLoS One*, 2009. **4**(10): p. e7471.



57. Jin, Z., et al., *The antagonistic action of B56-containing protein phosphatase 2As and casein kinase 2 controls the phosphorylation and Gli turnover function of Daz interacting protein 1*. J Biol Chem, 2011. **286**(42): p. 36171-9.
58. Arnold, C.R., et al., *Comparative analysis of genes regulated by Dzip1/iguana and hedgehog in zebrafish*. Dev Dyn, 2015. **244**(2): p. 211-23.
59. Virshup, D.M. and S. Shenolikar, *From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover*. Mol Cell, 2009. **33**(5): p. 537-45.
60. Perrotti, D. and P. Neviani, *Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias*. Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(2): p. 159-68.
61. Sontag, E., *Protein phosphatase 2A: the Trojan Horse of cellular signaling*. Cell Signal, 2001. **13**(1): p. 7-16.
62. Ivaska, J., et al., *Integrin alpha 2 beta 1 promotes activation of protein phosphatase 2A and dephosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 beta*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(5): p. 1352-9.
63. Li, X., et al., *Protein phosphatase 2A and its B56 regulatory subunit inhibit Wnt signaling in Xenopus*. EMBO J, 2001. **20**(15): p. 4122-31.
64. Neviani, P., et al., *The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein*. Cancer Cell, 2005. **8**(5): p. 355-68.
65. Arroyo, J.D. and W.C. Hahn, *Involvement of PP2A in viral and cellular transformation*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7746-55.
66. Ruediger, R., H.T. Pham, and G. Walter, *Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the A beta subunit gene*. Oncogene, 2001. **20**(15): p. 1892-9.
67. von Lindern, M., et al., *Can, a putative oncogene associated with myeloid leukemogenesis, may be activated by fusion of its 3' half to different genes: characterization of the set gene*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(8): p. 3346-55.
68. Adachi, Y., G.N. Pavlakakis, and T.D. Copeland, *Identification of in vivo phosphorylation sites of SET, a nuclear phosphoprotein encoded by the translocation breakpoint in acute undifferentiated leukemia*. FEBS Lett, 1994. **340**(3): p. 231-5.

69. Zhang, P., et al., *Developmental gonadal expression of the transcription factor SET and its target gene, P450c17 (17alpha-hydroxylase/c17,20 lyase)*. DNA Cell Biol, 2001. **20**(10): p. 613-24.
70. Nagata, K., et al., *Replication factor encoded by a putative oncogene, set, associated with myeloid leukemogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4279-83.
71. Nagata, K., et al., *Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types*. Exp Cell Res, 1998. **240**(2): p. 274-81.
72. Kim, D.W., et al., *Negative regulation of neuronal cell differentiation by INHAT subunit SET/TAF-Ibeta*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **400**(3): p. 419-25.
73. Leung, J.W., et al., *SET nuclear oncogene associates with microcephalin/MCPH1 and regulates chromosome condensation*. J Biol Chem, 2011. **286**(24): p. 21393-400.
74. Madeira, A., et al., *SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain*. FASEB J, 2005. **19**(13): p. 1905-7.
75. ten Klooster, J.P., et al., *Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 336-45.
76. Zhang, Q., et al., *Metastasis suppressor function of NM23-H1 requires its 3'-5' exonuclease activity*. Int J Cancer, 2011. **128**(1): p. 40-50.
77. Fan, Z., et al., *Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor*. Cell, 2003. **112**(5): p. 659-72.
78. Bayarkhangai, B., et al., *A comprehensive and perspective view of oncoprotein SET in cancer*. Cancer Med, 2018.
79. Muto, S., et al., *Relationship between the structure of SET/TAF-Ibeta/INHAT and its histone chaperone activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4285-90.
80. Oaks, J. and B. Ogretmen, *Regulation of PP2A by Sphingolipid Metabolism and Signaling*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 388.

81. Li, M., A. Makkinje, and Z. Damuni, *The myeloid leukemia-associated protein SET is a potent inhibitor of protein phosphatase 2A*. J Biol Chem, 1996. **271**(19): p. 11059-62.
82. Furuya, H., Y. Shimizu, and T. Kawamori, *Sphingolipids in cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(3-4): p. 567-76.
83. Saito, S., et al., *Functional domains of template-activating factor-I as a protein phosphatase 2A inhibitor*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **259**(2): p. 471-5.
84. Beresford, P.J., et al., *Recombinant human granzyme A binds to two putative HLA-associated proteins and cleaves one of them*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9285-90.
85. Arnaud, L., et al., *Mechanism of inhibition of PP2A activity and abnormal hyperphosphorylation of tau by I2(PP2A)/SET*. FEBS Lett, 2011. **585**(17): p. 2653-9.
86. Miyaji-Yamaguchi, M., M. Okuwaki, and K. Nagata, *Coiled-coil structure-mediated dimerization of template activating factor-I is critical for its chromatin remodeling activity*. J Mol Biol, 1999. **290**(2): p. 547-57.
87. Huang, Y. and R.W. Mahley, *Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases*. Neurobiol Dis, 2014. **72 Pt A**: p. 3-12.
88. Li, F.Q., et al., *An apolipoprotein E-mimetic stimulates axonal regeneration and remyelination after peripheral nerve injury*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **334**(1): p. 106-15.
89. Li, F.Q., et al., *Apolipoprotein E-derived peptides ameliorate clinical disability and inflammatory infiltrates into the spinal cord in a murine model of multiple sclerosis*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 956-65.
90. Gu, Z., et al., *Apolipoprotein E Mimetic Promotes Functional and Histological Recovery in Lysolecithin-Induced Spinal Cord Demyelination in Mice*. J Neurol Neurophysiol, 2013. **2014**(Suppl 12): p. 10.
91. Singh, K., et al., *The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits NF-kappaB signaling, proinflammatory cytokine expression, and disease activity in murine models of colitis*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3839-50.
92. Singh, K., et al., *The apolipoprotein E-mimetic peptide COG112 inhibits the inflammatory response to Citrobacter rodentium in colonic epithelial cells*

- by preventing *NF-kappaB* activation. *J Biol Chem*, 2008. **283**(24): p. 16752-61.
93. Christensen, D.J., et al., *Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A*. *J Immunol*, 2011. **186**(4): p. 2535-42.
  94. Switzer, C.H., et al., *Targeting SET/I(2)PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy*. *Oncogene*, 2011. **30**(22): p. 2504-13.
  95. Zhang, W., et al., *SET protein overexpression contributes to paclitaxel resistance in MCF-7/S cells through PI3K/Akt pathway*. *J Drug Target*, 2017. **25**(3): p. 255-263.
  96. Adachi K, K.T., Nakao N et al., *Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols: Discovery of a novel immunosuppressant, FTY720*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1995. **5**(8): p. 853-856.
  97. Adachi, K. and K. Chiba, *FTY720 story. Its discovery and the following accelerated development of sphingosine 1-phosphate receptor agonists as immunomodulators based on reverse pharmacology*. *Perspect Medicin Chem*, 2007. **1**: p. 11-23.
  98. Fujita, T., et al., *Potent immunosuppressants, 2-alkyl-2-aminopropane-1,3-diols*. *J Med Chem*, 1996. **39**(22): p. 4451-9.
  99. Chun, J. and H.P. Hartung, *Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis*. *Clin Neuropharmacol*, 2010. **33**(2): p. 91-101.
  100. Chiba, K., *FTY720, a new class of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors*. *Pharmacol Ther*, 2005. **108**(3): p. 308-19.
  101. Zhang, L., et al., *FTY720 for cancer therapy (Review)*. *Oncol Rep*, 2013. **30**(6): p. 2571-8.
  102. Ntranos, A., et al., *FTY720 impairs CD8 T-cell function independently of the sphingosine-1-phosphate pathway*. *J Neuroimmunol*, 2014. **270**(1-2): p. 13-21.

103. Takasaki, T., et al., *More than Just an Immunosuppressant: The Emerging Role of FTY720 as a Novel Inducer of ROS and Apoptosis*. *Oxid Med Cell Longev*, 2018. **2018**: p. 4397159.
104. Matsuoka, Y., et al., *A novel immunosuppressive agent FTY720 induced Akt dephosphorylation in leukemia cells*. *Br J Pharmacol*, 2003. **138**(7): p. 1303-12.
105. Yang, Y., et al., *Reactivating PP2A by FTY720 as a novel therapy for AML with C-KIT tyrosine kinase domain mutation*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(4): p. 1314-22.
106. Oaks, J.J., et al., *Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies*. *Blood*, 2013. **122**(11): p. 1923-34.
107. Saddoughi, S.A., et al., *Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis*. *EMBO Mol Med*, 2013. **5**(1): p. 105-21.
108. Liu, H., et al., *SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell*. *Cell Signal*, 2014. **26**(12): p. 2710-20.
109. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. *J Cell Biol*, 1963. **17**: p. 299-313.
110. Serifi, I., et al., *The zebrafish homologs of SET/I2PP2A oncoprotein: expression patterns and insights into their physiological roles during development*. *Biochem J*, 2016. **473**(24): p. 4609-4627.
111. Canela, N., et al., *The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(2): p. 1158-64.
112. Seo, S.B., et al., *Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein*. *Cell*, 2001. **104**(1): p. 119-30.
113. Schatten, G., et al., *Acetylated alpha-tubulin in microtubules during mouse fertilization and early development*. *Dev Biol*, 1988. **130**(1): p. 74-86.
114. Singh, R., et al., *DYRK1B regulates Hedgehog-induced microtubule acetylation*. *Cell Mol Life Sci*, 2018.

115. Pippa, R., et al., *Effect of FTY720 on the SET-PP2A complex in acute myeloid leukemia; SET binding drugs have antagonistic activity*. *Leukemia*, 2014. **28**(9): p. 1915-8.
116. Lam, B.D., E.C. Anthony, and P.L. Hordijk, *Cytoplasmic targeting of the proto-oncogene SET promotes cell spreading and migration*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(2): p. 111-9.
117. Mumby, M., *PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 21-4.
118. Wei, Y., et al., *p53 Function is Compromised by Inhibitor 2 of Phosphatase 2A in Sonic Hedgehog Medulloblastoma*. *Mol Cancer Res*, 2018.
119. Seo, S.B., et al., *Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 14005-10.
120. Leopoldino, A.M., et al., *Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **363**(1-2): p. 65-74.
121. Lam, B.D., E.C. Anthony, and P.L. Hordijk, *Analysis of nucleo-cytoplasmic shuttling of the proto-oncogene SET/I2PP2A*. *Cytometry A*, 2012. **81**(1): p. 81-9.
122. Estanyol, J.M., et al., *The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(46): p. 33161-5.
123. Kellogg, D.R., et al., *Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins*. *J Cell Biol*, 1995. **130**(3): p. 661-73.
124. Wu, X., et al., *A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(49): p. 14520-1.
125. Polizio, A.H., et al., *Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(22): p. 19589-96.
126. Polizio, A.H., et al., *Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins*. *Sci Signal*, 2011. **4**(200): p. pt7.

127. Riobo, N.A., et al., *Activation of heterotrimeric G proteins by Smoothed.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12607-12.
128. Ho Wei, L., et al., *Activation of the Gi protein-RHOA axis by non-canonical Hedgehog signaling is independent of primary cilia.* PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0203170.
129. Arriazu, E., R. Pippa, and M.D. Odero, *Protein Phosphatase 2A as a Therapeutic Target in Acute Myeloid Leukemia.* Front Oncol, 2016. **6**: p. 78.
130. Lam, B.D.A., E. C. and Hordijk, P. L., *The Immunosuppressant FTY720 (Fingolimod) Induces Nuclear Exit of the Proto-oncogene SET/I2PP2A.* Mol Cell Pharmacol, 2013. **5**: p. 95-107.
131. Vogel, C. and E.M. Marcotte, *Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses.* Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 227-32.
132. Schwanhausser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control.* Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
133. He, M., et al., *The kinesin-4 protein Kif7 regulates mammalian Hedgehog signalling by organizing the cilium tip compartment.* Nat Cell Biol, 2014. **16**(7): p. 663-72.