



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Οι μοριακοί μηχανισμοί της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης κατά τη  
διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων**

**ΔΡΟΥΓΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**  
Βιολόγος, Msc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Οι μοριακοί μηχανισμοί της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης κατά τη  
διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων**

**ΔΡΟΥΓΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ**  
Βιολόγος, Msc

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**



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





Η παρούσα έρευνα έχει χρηματοδοτηθεί από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (Γ.Γ.Ε.Τ) και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) (Κωδικός Υποτροφίας: 919)



Ημερομηνία αίτησης του κ. Δρούγκα Ευάγγελου: 24-09-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 771α/28-11-2014

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων:

Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη:

Murphy Carol, Ερευνήτρια Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)

Χριστοφορίδης Σάββας, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 09-01-2015

«Οι Μοριακοί Μηχανισμοί της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης κατά την διαφοροποίηση των Βλαστικών Κυττάρων»

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 947"/6-10-2020**

1. Φώτσης Θεόδωρος, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
2. Φριλίγγος Ευστάθιος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
3. Χριστοφορίδης Σάββας, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
4. Κωλέττας Ευάγγελος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Κυτταρικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
5. Λεονταρίτης Γεώργιος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
6. Γκόγκας Χρήστος, Ερευνητής Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)
7. Murphy Carol, Ερευνήτρια Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΒΕ-ΙΤΕ)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 19-07-2021

Ιωάννινα 18-11-2021

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Άννα Μπατισιάτου**

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**

**Στην Οικογένειά μου,  
Ιδιαίτερα στην μνήμη του Πατέρα μου (14/05/2021),**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής της σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που εδράζεται στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών ερευνών (ITE-IBE, FORTH-BRI), υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση. Η χρηματοδότηση της διδακτορικής διατριβής έγινε μέσω των ερευνητικών προγραμμάτων «ΘΑΛΗΣ STEM CYCLE (MIS: 380334, Φ.Κ.: D.588)», «Siemens-Biology-Biophotonics», «Προηγμένες Ερευνητικές Δραστηριότητες στη Βιοϊατρική Τεχνολογία και Αγροδιατροφή, ΒΙΤΑΔ» και με υποτροφία από το ΕΛΙΔΕΚ τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (Γ.Γ.Ε.Τ) και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛ.ΙΔ.Ε.Κ.) (Κωδικός Υποτροφίας: 919) μέσω της 1<sup>ης</sup> υποτροφίας για υποψήφιους διδάκτορες.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Θεόδωρο Φώτση, ο οποίος με δέχτηκε στην ομάδα του και μου έκανε την τιμή να πραγματοποιήσω την διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό του. Οι γνώσεις που μου μετέδωσε, ο τρόπος σκέψης και ερμηνείας επιστημονικών δεδομένων καθώς και ο συνεχής ζήλος για την έρευνα και την ανάπτυξη θα συνεχίσουν να αποτελούν πολύτιμα εφόδια σε όλη μου την ζωή. Εξίσου σημαντική η υπήρξε και η συμβολή της συνεπιβλέπουσας της διατριβής, Ερευνήτρια Β' Carol Murphy, η οποία μου έδωσε σημαντική καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της διατριβής, πειραματικές γνώσεις ενώ μου μετέδωσε την ικανότητα να αναγνωρίζω και να επιλύω πειραματικά προβλήματα αλλά και να σχεδιάζω πειραματικά πρωτόκολλα. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω και τον Καθηγητή Σάββα Χριστοφορίδη για όλη την συμβολή του στην πορεία της διατριβής μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο, τον Ερευνητή Β' Χρήστο Γκόγκα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ευάγγελο Κωλέττα και τον Επίκουρο Καθηγητή Γεώργιο Λεονταρίτη οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν τη διατριβή μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών για την αगाστή συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια και για την εξαιρετική ατμόσφαιρα στον χώρο καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη της εργαστηριακής μας ομάδα, τα οποία συνέβαλλαν με τις συμβουλές τους στην πορεία των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα την Δρ. Σοφία Μπέλλου, την Δρ. Ελένη Μπαγκλή και την Δρ. Νικολέτα Κωστοπούλου. Πολύ πιθανόν η πραγματοποίηση της διατριβής δεν θα ήταν ποτέ η ίδια αν δεν υπήρχαν οι φίλοι μου στο εργαστήριο, η Αναστασία Κουγιουμτζή, η Μαρία Μάρκου και η Μαρία

Χατζηαθανασιάδου με τις οποίες ξεπεράσαμε ότι εμπόδια και δυσκολίες εμφανίστηκαν στην πορεία όλων αυτών των χρόνων. Η κάθε μια υπήρξε μια ξεχωριστή πηγή έμπνευσης, γέλιου και γνώσης, τα οποία συνδυάστηκαν ιδανικά και δημιούργησαν ένα εξαιρετικό κλίμα συνεργασίας αλλά και μια πολύ δυνατή φιλία η οποία θα κρατήσει μέσα στα χρόνια η οποία δοκιμάστηκε μέσα από μια πολύ δύσκολη περίοδο.

Τέλος, οι σημαντικότερες και μεγαλύτερες ευχαριστίες, ανήκουν στην οικογένεια μου, στους Γονείς μου, Βασίλη και Εύα οι οποίοι με στήριξαν στην επιλογή να συνεχίσω την ερευνητική μου δραστηριότητα παρά τα εμπόδια, ψυχολογικά, οικονομικά και υγείας και ήταν πάντα παρόντες σεβόμενοι τις επιλογές μου. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ, αξίζει και στην αδερφή μου Αναστασία η οποία έχει επωμιστεί ένα τεράστιο βάρος για να μπορέσω εγώ να φέρω εις πέρας τις προσπάθειες και τους στόχους που θα μου προσφέρουν μια καλύτερη ποιότητα ζωής κάνοντας αυτό που πιστεύω πως μπορώ να κάνω καλά και αγαπώ.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Η κυτταρική διαίρεση .....	1
1.1.1 Ο κυτταρικός κύκλος .....	2
1.1.2. Μεσόφαση ( <i>Interphase</i> ).....	3
1.1.3 Μίτωση.....	4
1.2 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (ΑΚΔ) .....	6
1.2.1 Η ΑΚΔ έχει μελετηθεί εκτενώς στα Βλαστικά κύτταρα αλλά δεν συμβαίνει αποκλειστικά μόνο σ' αυτά.....	8
1.2.2 Εξωγενής/Ενδογενής ΑΚΔ, προσανατολισμός της μιτωτικής απράκτου και Αναπτυξιακή μοίρα των θυγατρικών βλαστικών κυττάρων.....	10
1.3 Οι Rho GTPάσες.....	14
1.3.1 Η Δομική οργάνωση των Rho GTPασών .....	14
1.3.2 Οι βασικές λειτουργίες των Rho GTPασών.....	16
1.4 Η RhoD GTPάση .....	20
1.4.1 Δομικά χαρακτηριστικά-έκφραση της RhoD.....	20
1.4.2 Οι τελεστές της RhoD .....	21
1.4.3 Η κυτταρική δραστικότητα της RhoD .....	22
1.5 Ο ρόλος της ΑΚΔ στη διαφοροποίηση των στιβάδων του δέρματος.....	25
1.5.1 Δομική Οργάνωση .....	25
1.5.2 Η ρύθμιση της ΑΚΔ στην επιδερμίδα.....	26
1.6 Ο ρόλος της ΑΚΔ στον καρκίνο .....	28
1.6.1 Η ΑΚΔ και η κυτταρική ετερογένεια των καρκινικών όγκων.....	28
1.6.2 Νεοπλασματική αγγειογένεση και ΑΚΔ.....	30
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>37</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>38</b>



2.1 Κυτταροκαλλιέργεια .....	38
2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου .....	39
2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA και με SiRNAs .....	39
2.4 Ολική απομόνωση RNA .....	40
2.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) .....	41
2.6 Μέθοδος γονιδιακής αποσιώπησης CRISPR/Cas9.....	42
2.6.1 Η τεχνολογία CRISPR/Cas9.....	42
2.6.2 Πλασμιδιακοί Φορείς, .....	44
2.6.3 Δημιουργία μονόκλωνων εκκινητών και ο υβριδισμός τους σε δίκλιωνα gRNAs (Annealing of Oligos).....	45
2.6.4 Σύνδεση άκρων τμημάτων DNA φορέα και ενθέματος (Ligation).....	46
2.6.5 Βακτηριακός Μετασχηματισμός (Transformation)-Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA..	46
2.6.7 Διαμόλυνση κυττάρων και επιλογή θετικών κλώνων.....	47
2.7 Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-Immunoprecipitation, CoIP) .....	48
2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western .....	49
2.9 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	50
2.10 Παραγωγή λέντι-ιών .....	51
2.10.1 Διαμόλυνση κυττάρων 293T.....	51
2.10.2 Σύλλογή και υπερφυγοκέντρωση ιοσωματίων .....	52
2.11 Δοκιμασία σχηματισμού αγγειακού δικτύου από κύτταρα HUVEC <i>in vitro</i> (Tube formation assay) μετά από αποσιώπηση της RhoD με την τεχνολογία του SiRNA .....	52
2.12 Έλεγχος της μεταναστευτικότητας και διεισδυτικότητας κυττάρων HUVEC μετά από αποσιώπηση της RhoD με τη χρήση του συστήματος Incucyte® .....	53

2.13	Επαγωγή αυλοποίησης και σχηματισμού δικτύου των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC .....	54
2.14	Πρωτόκολλο διαφοροποίησης hESCs προς κερατινοκύτταρα-δημιουργία μοντέλου δέρματος.....	54
2.15	Δοκιμασία ελέγχου ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης κυττάρων MDA-MB-468 με ενσωμάτωση βρωμοδεοξυ-ουριδίνης (BrdU).....	56
2.17	Στατιστική ανάλυση των δεδομένων .....	57
2.17.1	Στατιστική ανάλυση ανοσοαποτυπώσεων κατά Western .....	57
2.17.2	Στατιστική ανάλυση της μεταναστευτικής ικανότητας.....	57
2.17.3	Στατιστική ανάλυση της πιστότητας του αγγειακού δικτύου.....	57
2.17.4	Στατιστική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος <i>motion tracking</i> .....	58
<b>3.</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>59</b>
3.1	Γονιδιακή απάλειψη του <i>RHOD</i> γονιδίου στην κυτταρική σειρά HEK293A με το σύστημα CRISPR-Cas9 .....	59
3.2	Η απάλειψη του <i>RHOD</i> γονιδίου αυξάνει την επαγόμενη από Ακτιβίνη A (Activin A) φωσφορυλίωση των SMAD2 (p-SMAD2) και SMAD3 (p-SMAD3) πρωτεϊνών .....	61
3.3	Η απάλειψη του <i>RHOD</i> γονιδίου δεν επηρεάζει τη BMP2- και BMP4-επαγόμενη φωσφορυλίωση των SMAD1/5/9 (p-SMAD1/5/9).....	62
3.4	Η απάλειψη του <i>RHOD</i> γονιδίου επηρεάζει τον εντοπισμό των ενδοσωματικών πρωτεϊνών Rab5, Rabankyrin και EEA1 .....	63
3.5	Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της RhoD με τις πρωτεΐνες SMAD2 και SMAD4 του μονοπατιού της Ακτιβίνης A. ....	66
3.5.1	Η RhoD δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με τη SMAD2 ενώ η μόνιμα ενεργή ισομορφή της RhoDG26V προσελκύει τη SMAD2 στο κεντρόσωμα. ....	66
3.5.2	Η RhoD δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με τη SMAD4 και εντοπίζονται μόνο στην περιοχή του κεντροσώματος.....	67

3.6 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της RhoD μέσω της τεχνολογίας του SiRNA στην αγγειογενετική ικανότητα κυττάρων HUVEC (EK) .....	71
3.6.1 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου μειώνει την μεταναστευτική ικανότητα (migration) των HUVECs.....	71
3.6.2 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου διαταράσσει τον φυσιολογικό σχηματισμό και τη συντήρηση του αγγειακού δικτύου των HUVECs σε τρισδιάστατες καλλιέργειες Matrigel....	75
3.6.3 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου διαταράσσει την ακεραιότητα του αγγειακού δικτύου μετά από συγκαλλιέργεια με MSCs. ....	78
3.6.4 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου μειώνει τον αριθμό των CD34+ κυττάρων HUVEC, κάτι που σχετίζεται με την ενεργότητα και την ικανότητά τους να προκαλέσουν σωστή αγγειοποίηση σε πειράματα συγκαλλιέργειας με MSCs.....	78
3.7 Κατασκευή μοντέλου τεχνητού δέρματος από κερατινοκύτταρα (K14+) προερχόμενα από διαφοροποίηση ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (HuESCs) .....	80
3.7.1 Η διαφοροποίηση των HuESCs σε κερατινοκύτταρα εγκαθιδρύθηκε με τη χρήση του αυξητικού παράγοντα BMP4 και του ρετινοϊκού οξέος (RA) σε χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο.....	81
3.7.2 Η διαδικασία στρωματοποίησης και παραγωγής του τρισδιάστατου μοντέλου του δέρματος πραγματοποιήθηκε και προέκυψαν δομές που προσομοιώνουν δερματικές στιβάδες. ....	82
3.8 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση και την ανομοιογένεια του πληθυσμού κυττάρων τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού και επάγει τις συμμετρικές διαιρέσεις (MDA-MB-468).....	83
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>88</b>
4.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση .....	88
4.2 Η ΑΚΔ στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και τον καρκίνο .....	89
4.3 Η απάλειψη της RhoD επηρεάζει τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης Α .....	90
4.4 Η απάλειψη της RhoD μεταβάλλει το ενδοκυτταρικό διαμέρισμα .....	94
4.5 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου αναστέλλει σειρά αγγειογενετικών δοκιμασιών.....	95

4.5 Η αποσιώπηση της RhoD GTPάσης εμπλέκεται στη ρύθμιση της ΑΚΔ στα MDA-MB-468 κύτταρα .....	97
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ .....</b>	<b>100</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY) .....</b>	<b>103</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>105</b>

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAV	Adeno Associated Virus
ACD	Asymmetric Cell Division
ACVR1B	Activin Receptor 1B
ACVR2B	Activin Receptor 2B
AML	Acute myeloid leukemia
Ang1	Angiopoietin 1
Ang2	Angiopoietin 2
aPKC	Atypical Protein Kinase
Baz	Bazooka
BCR	Breakpoint Cluster Region protein
BL	Basal Layer
BMP	Bone Morphogenic Protein
BRCA	Breast Cancer gene
CL	Cornified Layer
CML	Chronic myelogenous leukemia
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECM	Extracellular Matrix
EEA1	Early Endosomal Auto-antigen
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FILIP1	Filamin A Interacting Protein
FMNL	Formin Frl
GAP	GTPase Activating Protein
GB	Goniablast
GDI	Guanosine-nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanidine Exchange Factor
GL	Granular Layer
GMC	Gaglion Mother Cell
GMP	Guanosine Monoposphate
GSC	Germline Stem Cells

GTP	Guanosine Triposphate
HDR	Homology directed repair
hESC	Human Embryonic Stem Cells
HIF-2 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor 2 $\alpha$
HUVEC	Human Umbical Vein Endothelial Cells
Insc	Inscuteable
K14	Keratin 14
K18	Keratin 18
K5	Keratin 5
K8	Keratin 8
Kdrl	Kinase insert Domain Receptor-Like
KLF5	Kruppel Like Factor 5
MMP	Matrix Metalloproteinases
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
MTOC	Microtubule-Organizing center
NFIB	Nuclear factor 1 B-type
NHEJ	Non homologous end-joining
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor-1
PAM	Protospacer Adjacent motif
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PHD2	Prolyl Hydroxylase Domain protein 2
Pins	Partner of Inscuteable
PIGF	Placental Growth Factor
qRT-PCR	Quantitive Reverse Transcription PCR
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SCD	Symmetric Cell Division
SL	Suprabasal Layer
TgFb	Transforming Growth Factor beta
TgFbRI	Transforming Growth Factor beta Receptor I
TgFbRII	Transforming Growth Factor beta Receptor II
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNBC	Triple Negative Breast Cancer
Upd	Unpaired
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

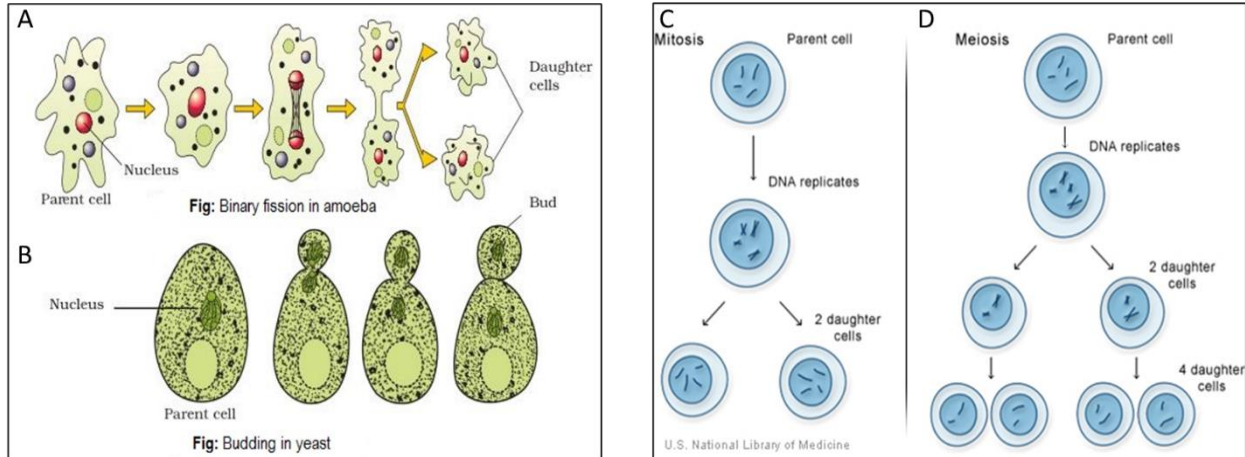
# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η κυτταρική διαίρεση

Η ικανότητα ανάπτυξης και αναπαραγωγής αποτελεί θεμελιώδη ιδιότητα των ζωντανών οργανισμών. Ωστόσο, η ανάπτυξη μεμονωμένων κυττάρων είναι ουσιαστικά περιορισμένη. Καθώς συντίθενται νέες πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες και λιπίδια, η συσσώρευσή τους προκαλεί την αύξηση του όγκου ενός κυττάρου, αναγκάζοντας τη μεμβράνη του πλάσματος να επεκταθεί για να αποτρέψει τη διάρρηξη του κυττάρου. Αλλά τα κύτταρα δεν μπορούν να συνεχίσουν να μεγαθύνονται επ' αόριστο. Καθώς ένα κύτταρο μεγαλώνει, υπάρχει μια συνοδευτική μείωση στο λόγο επιφάνειας/όγκου και ως εκ τούτου στην ικανότητά του για αποτελεσματική ανταλλαγή με το περιβάλλον. Επομένως, η ανάπτυξη κυττάρων συνοδεύεται γενικά από **κυτταρική διαίρεση**, με την οποία ένα κύτταρο δημιουργεί δύο νέα θυγατρικά κύτταρα.

Στους προκαρυωτικούς οργανισμούς καθώς και στα κυτταρικά οργανίδια που προέκυψαν από αυτούς εξελικτικά, τους χλωροπλάστες και τα μιτοχόνδρια, η κυτταρική διαίρεση πραγματοποιείται με διχοτόμηση (binary fission) (Εικόνα 1Α). Αποτελεί έναν αγενή τρόπο αναπαραγωγής όπου το μητρικό κύτταρο διαιρείται σε δύο παρόμοια κύτταρα εφόσον προηγουμένως έχει προηγηθεί ο διπλασιασμός του γενετικού του υλικού. Ένας ακόμα τρόπος αγενούς αναπαραγωγής είναι η εκβλάστηση (budding fission) (Εικόνα 1Β), οποία παρατηρείται σε μύκητες, σπόρια και στις Ύδρες. Με το συγκεκριμένο τρόπο κυτταρικής διαίρεσης, πριν διαιρεθεί ο πυρήνας, δημιουργείται μια προεκβολή στο κύτταρο όπου και εκεί μετακινείται ο ένας από τους δύο θυγατρικούς πυρήνες και στη συνέχεια το εκβλάστημα αποκόπτεται.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς υπάρχουν δύο διακριτοί τύποι κυτταρικής διαίρεσης. Η μίτωση (mitosis) (Εικόνα 1C), η οποία συναντάται στα σωματικά κύτταρα όπου και το γενετικό υλικό, υπό τη μορφή των χρωμοσωμάτων, διπλασιάζεται και στη συνέχεια γίνεται ισομερής διαχωρισμός, τόσο του γενετικού υλικού αλλά και του κυτταροπλασματικού περιεχομένου. Ο δεύτερος τύπος κυτταρικής διαίρεσης στους ευκαρυώτες είναι η μείωση (meiosis) (Εικόνα 1D), η οποία παρατηρείται μόνο στα γενετικά κύτταρα και μετά από ένα στάδιο αντιγραφής του γενετικού υλικού και δύο διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις, προκύπτουν 4 κύτταρα που περιέχουν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Τέλος, στα βλαστοκύτταρα, στα κύτταρα του δέρματος, στα



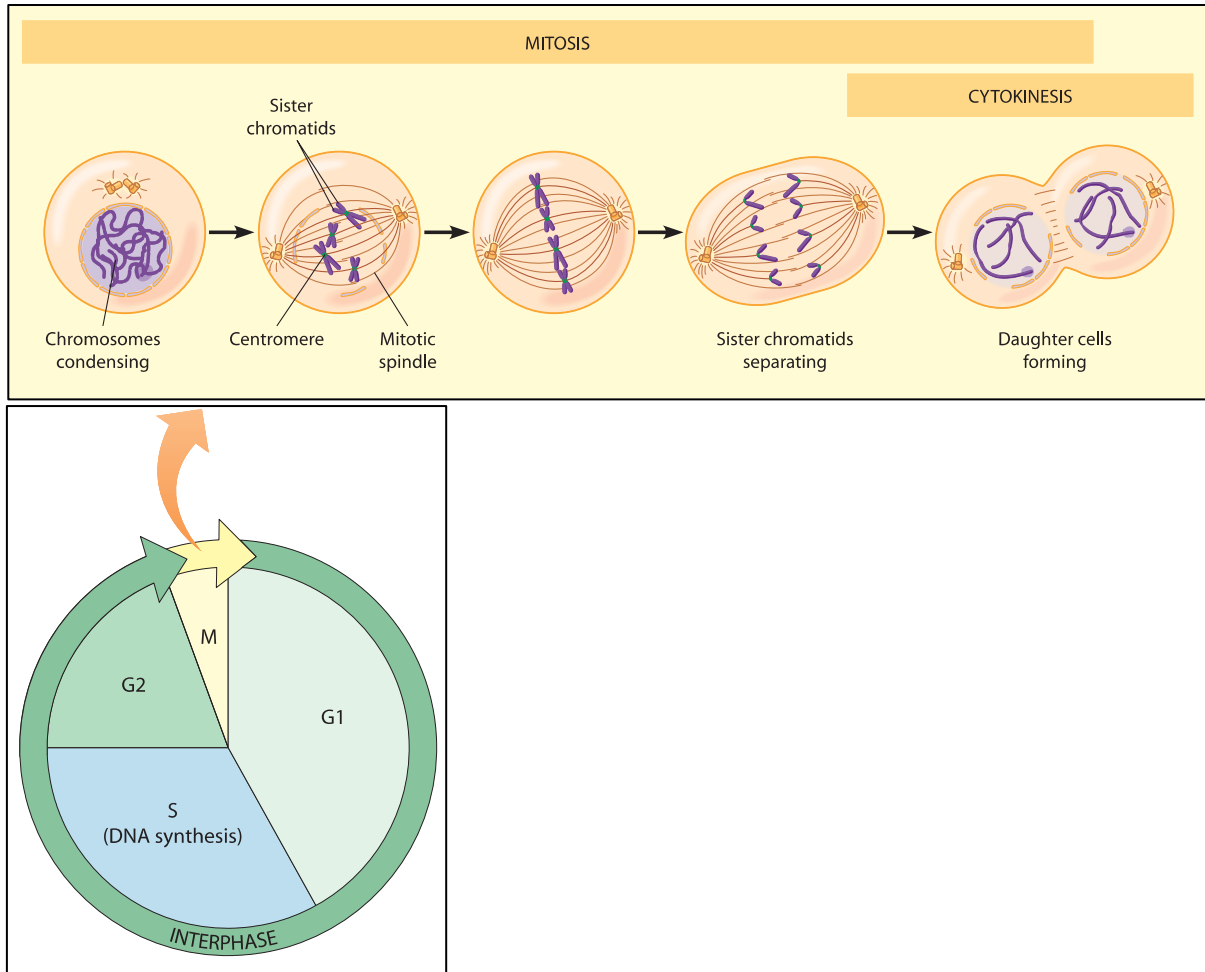
**Εικόνα 1. Τύποι κυτταρικής διαίρεσης.** Στις εικόνες **A** και **B**, παρατηρείται η αγενής κυτταρική διαίρεση ενός βακτηρίου με διχοτόμηση (**A**) και μίας ζύμης με εκβλάστηση (**B**). Στις εικόνες **C** και **D**, παρατηρούνται οι δύο τύποι κυτταρικών διαιρέσεων που λαμβάνουν χώρα στους ευκαρυώτες. Η μίτωση που λαμβάνει χώρα στα σωματικά κύτταρα (**C**) και η μείωση που συμβαίνει στα γενετικά κύτταρα (**D**).

νευρικά κύτταρα και σε διάφορους τύπους καρκίνου, παρατηρείται μια ξεχωριστή κατηγορία κυτταρικής διαίρεσης, η Ασύμμετρη Κυτταρική Διαίρεση, ΑΚΔ (Asymmetric Cell Division, ACD) κατά την οποία το μητρικό κύτταρο διαιρείται σε 2 θυγατρικά κύτταρα όπου το ένα έχει τις ιδιότητες του μητρικού αλλά το δεύτερο, είναι διαφορετικό. Αυτό θα αναλυθεί εκτενώς στο κεφάλαιο 1.2.

### 1.1.1 Ο κυτταρικός κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος ξεκινά όταν δύο νέα κύτταρα σχηματίζονται με τη διαίρεση ενός μόνο γονικού κυττάρου και τελειώνει όταν ένα από αυτά τα κύτταρα χωρίζεται ξανά σε δύο κύτταρα. Αυτή η διαδικασία διαίρεσης, που ονομάζεται **M (Μιτωτική) φάση**, περιλαμβάνει δύο αλληλεπικαλυπτόμενα γεγονότα στα οποία ο πυρήνας διαιρείται πρώτα και το κυτταρόπλασμα δεύτερο. Η πυρηνική διαίρεση ονομάζεται **μίτωση** και η διαίρεση του κυτοπλάσματος για την παραγωγή δύο θυγατρικών κυττάρων ονομάζεται **κυτταροκίνηση** (Εικόνα 2). Στη μίτωση, ο μιτωτικός άξονας διαχωρίζει τα διπλά, συμπυκνωμένα χρωμοσώματα σε δύο θυγατρικούς πυρήνες. Στην κυτταροκίνηση, το κυτταρόπλασμα διαιρείται για να δώσει δύο γενετικά πανομοιότυπα θυγατρικά κύτταρα. Το στάδιο όπου το κύτταρο δεν διαιρείται αλλά, μεγαλώνει και φτιάχνει τα αντίγραφα του γενετικού του υλικού είναι η **μεσόφαση** (Interphase), η οποία αποτελείται από τη **S φάση** (η περίοδος του αναδιπλασιασμού του DNA στον πυρήνα) και δύο «κενές» “gap” φάσεις που ονομάζονται **G1** και **G2** (Εικόνα 2).





Εικόνα 2. Ο ευκαρυωτικός κυτταρικός κύκλος (Becker's World of the Cell, 8<sup>η</sup> έκδοση)

### 1.1.2. Μεσόφαση (Interphase)

Η μεσόφαση είναι το στάδιο στο οποίο βρίσκεται το κύτταρο στο 90% του κυτταρικού κύκλου. Το γενετικό υλικό του κυττάρου βρίσκεται σε μια χαλαρή μορφή και το κύτταρο χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβολική δραστηριότητα. Η μεσόφαση χωρίζεται σε τρεις διακριτές φάσεις, στις G1, S και G2.

**Στη G1 (Gap 1) φάση**, η οποία είναι η φάση μετά την κυτταρική διαίρεση, στο νέο κύτταρο το οποίο προέκυψε, καθορίζεται η περαιτέρω πορεία του. Το κύτταρο μπορεί να ακολουθήσει τις υπόλοιπες φάσεις του κυτταρικού κύκλου και να διαιρεθεί είτε να περάσει στη φάση G0 η οποία είναι μια φάση στην οποία το κύτταρο δεν διαιρείται, είτε μόνιμα, όπως συμβαίνει με τους νευρώνες και τα πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα, είτε για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα επιθηλιακά κύτταρα δεν μπαίνουν ποτέ σε φάση G0 και κάνουν τον κύκλο μεταξύ μεσόφασης και μίτωσης μέχρι το θάνατό τους (απόπτωση). Η ρύθμιση της G1 φάσης, γίνεται από G1/S κυκλίνες

η οποίες είναι υπεύθυνες για τη μετάβαση στη S φάση. Σε αντίθεση με τις S και M φάσεις, το μήκος της G1 φάσης είναι αρκετά μεταβλητό, ανάλογα με τον τύπο των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της G1, λαμβάνεται μια σημαντική «απόφαση» για το εάν και πότε το κύτταρο πρόκειται να διαιρεθεί ξανά. Τα κύτταρα που "συλλαμβάνονται" στη G1, αναμένοντας ένα σήμα που θα προκαλέσει την επανείσοδό τους στον κυτταρικό κύκλο και θα τα δεσμεύσει να διαιρεθούν, λέγεται ότι βρίσκονται στη G0 (G μηδέν). Άλλα κύτταρα εξέρχονται εξ ολοκλήρου από τον κυτταρικό κύκλο και υφίστανται τελική διαφοροποίηση, πράγμα που σημαίνει ότι προορίζονται να μην διαιρεθούν ξανά, όπως συμβαίνει με τα περισσότερα νευρικά κύτταρα στο σώμα μας. Σε ορισμένα κύτταρα, παροδική διακοπή του κυτταρικού κύκλου μπορεί επίσης να συμβεί στο G2.

**Στη φάση S** (Synthesis) το κύτταρο διπλασιάζει το γενετικό του υλικό. Στο τέλος της συγκεκριμένης φάσης, όλα τα χρωμοσώματα έχουν αντιγραφεί και έτσι το κύτταρο περιέχει διπλάσια ποσότητα γενετικού υλικού. Στο στάδιο αυτό, η μεταγραφή και η πρωτεϊνσύνθεση είναι παραμένουν σε χαμηλά επίπεδα εκτός από τις ιστόνες, των οποίων η παραγωγή συμβαίνει κυρίως στη φάση S.

**Η φάση G2** (Gap 2), συμβαίνει μετά τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού και χρονικά είναι η στιγμή όπου το κύτταρο έχει υψηλά επίπεδα πρωτεϊνσύνθεσης αλλά και ταχείας αύξησης του μεγέθους του για να μπει στη φάση της μίτωσης. Σε αυτό το στάδιο οι μικροσωληνίσκοι αναδιοργανώνονται για να σχηματιστεί η άτρακτος, ενώ στη συγκεκριμένη φάση είναι και το δεύτερο σημείο ελέγχου πριν τη μιτωτική διαίρεση όπου τα κύτταρα ελέγχονται για ζημιές στα χρωμοσώματα. Η ρύθμιση και ο έλεγχος γίνεται κυρίως με τη βοήθεια της πρωτεΐνης p53 και η οποία αν εντοπίσει βλάβη σε κάποιο χρωμόσωμα, είτε θα διορθώσει το σφάλμα είτε θα οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση. Αν υπάρχει κάποια δυσλειτουργία στην p53, τότε το σφάλμα δεν επιδιορθώνεται και το κύτταρο περνάει στον κυτταρικό κύκλο και οδηγεί συνήθως σε καρκίνο.

### **1.1.3 Μίτωση**

Η μίτωση είναι το στάδιο που το γενετικό υλικό που αντιγράφηκε θα χωριστεί σε δύο νέους πυρήνες και θα προκύψουν τα δύο θυγατρικά κύτταρα. Η μίτωση έπεται της φάσης G2 και ακολουθείται από την κυτταροκίνηση, όπου γίνεται ο τελικός διαχωρισμός των δύο κυττάρων. Κατά τη μίτωση η σύνθεση του RNA διακόπτεται ενώ η πρωτεϊνσύνθεση μένει σε ένα ελάχιστο επίπεδο. Τα στάδια της μίτωσης χωρίζονται με βάση τις εκάστοτε διεργασίες που επιτελούνται και με βάση τις αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου και είναι η πρόφαση, η προμετάφαση, η μετάφαση, η ανάφαση, η τελόφαση και η κυτταροκίνηση (Εικόνα 3).

Μετά την ολοκλήρωση του αναδιπλασιασμού του DNA (S φάση), προς το τέλος της G2 φάσης, ξεκινάει η **πρόφαση (prophase)** με τη συμπύκνωση των ινιδίων χρωματίνης και το σχηματισμό των μιτωτικών χρωμοσωμάτων, ενώ σχηματίζεται και η μιτωτική άτρακτος. Κάθε χρωμόσωμα αποτελείται από ένα πανομοιότυπο ζευγάρι υπομονάδων που ονομάζονται αδερφές χρωματίδες οι οποίες ενώνονται στο κεντρομερίδιο. Κοντά στον πυρήνα βρίσκονται τα κεντροσώματα, τα οποία αποτελούνται από ένα ζευγάρι κεντριολίων, τα οποία περιβάλλονται από ένα σύνολο πρωτεϊνών. Το κεντροσώμα είναι σημείο της οργάνωσης των μικροσωληνίσκων και διπλασιάζεται λίγο πριν το κύτταρο μπει στη φάση της μίτωσης δίνοντας γένεση σε δύο κεντροσώματα. Στη συνέχεια τα κεντροσώματα πολυμερίζουν την πρωτεΐνη τουμπουλίνη και έτσι δημιουργείται ένα δίκτυο μικροσωληνίσκων.

Η έναρξη της **προμετάφασης (prometaphase)** χαρακτηρίζεται από κατακερματισμό των μεμβρανών του πυρηνικού περιβλήματος. Καθώς τα κεντροσώματα ολοκληρώνουν την κίνησή τους προς τις αντίθετες πλευρές του πυρήνα (Εικόνα 3), η διάσπαση του πυρηνικού περιβλήματος επιτρέπει στους μικροσωληνίσκους του άξονα να εισέλθουν στην πυρηνική περιοχή και να έρθουν σε επαφή με τα χρωμοσώματα, τα οποία εξακολουθούν να αποτελούνται από ζεύγη χρωματίδων. Οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου προορίζονται να προσκολληθούν στις χρωματίδες στο κεντρομερίδιο, μια περιορισμένη περιοχή όπου τα δύο μέλη κάθε ζεύγους χρωματίδων συγκρατούνται μεταξύ τους. Εκτός από τους μικροσωληνίσκους κινητοχώρων (kinetochore), υπάρχουν και άλλα δύο είδη μικροσωληνίσκων στον άξονα. Εκείνοι που αλληλοεπιδρούν με μικροσωληνίσκους από τον αντίθετο πόλο του κυττάρου καλούνται πολικοί μικροσωληνίσκοι. Οι πιο κοντοί που σχηματίζουν τους αστέρες (από την ελληνική λέξη «αστέρι») σε κάθε πόλο ονομάζονται αστρικοί μικροσωληνίσκοι. Μερικοί από τους αστρικούς μικροσωληνίσκους φαίνεται να αλληλοεπιδρούν με πρωτεΐνες που ευθυγραμμίζουν τη μεμβράνη του πλάσματος.

Ένα κύτταρο λέγεται ότι βρίσκεται σε **μετάφαση (metaphase)** όταν όλα τα συμπυκνωμένα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται όλα στην πλάκα μεταφάσεων, το επίπεδο που βρίσκεται σε απόσταση μεταξύ των δύο πόλων του μιτωτικού άξονα. Παράγοντες που παρεμποδίζουν τη λειτουργία του άξονα, όπως το φάρμακο κολχικίνη, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διακοπή των κυττάρων στη μεταφάση. Η μικροσκοπική εξέταση τέτοιων κυττάρων επιτρέπει την ταυτοποίηση και την ταξινόμηση μεμονωμένων χρωμοσωμάτων με βάση τις διαφορές στο μέγεθος και το σχήμα, δημιουργώντας μια ανάλυση γνωστή ως καρύοτυπος. Στη μεταφάση τα χρωμοσώματα φαίνεται να είναι σχετικά στατικά, αλλά αυτή η εμφάνιση είναι παραπλανητική.

Στην πραγματικότητα, οι δύο αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος έχουν ήδη τραβηχτεί ενεργά προς αντίθετους πόλους. Εμφανίζονται ακίνητοι επειδή οι δυνάμεις που ενεργούν πάνω τους είναι ίσες σε μέγεθος και αντίθετες προς την κατεύθυνση.

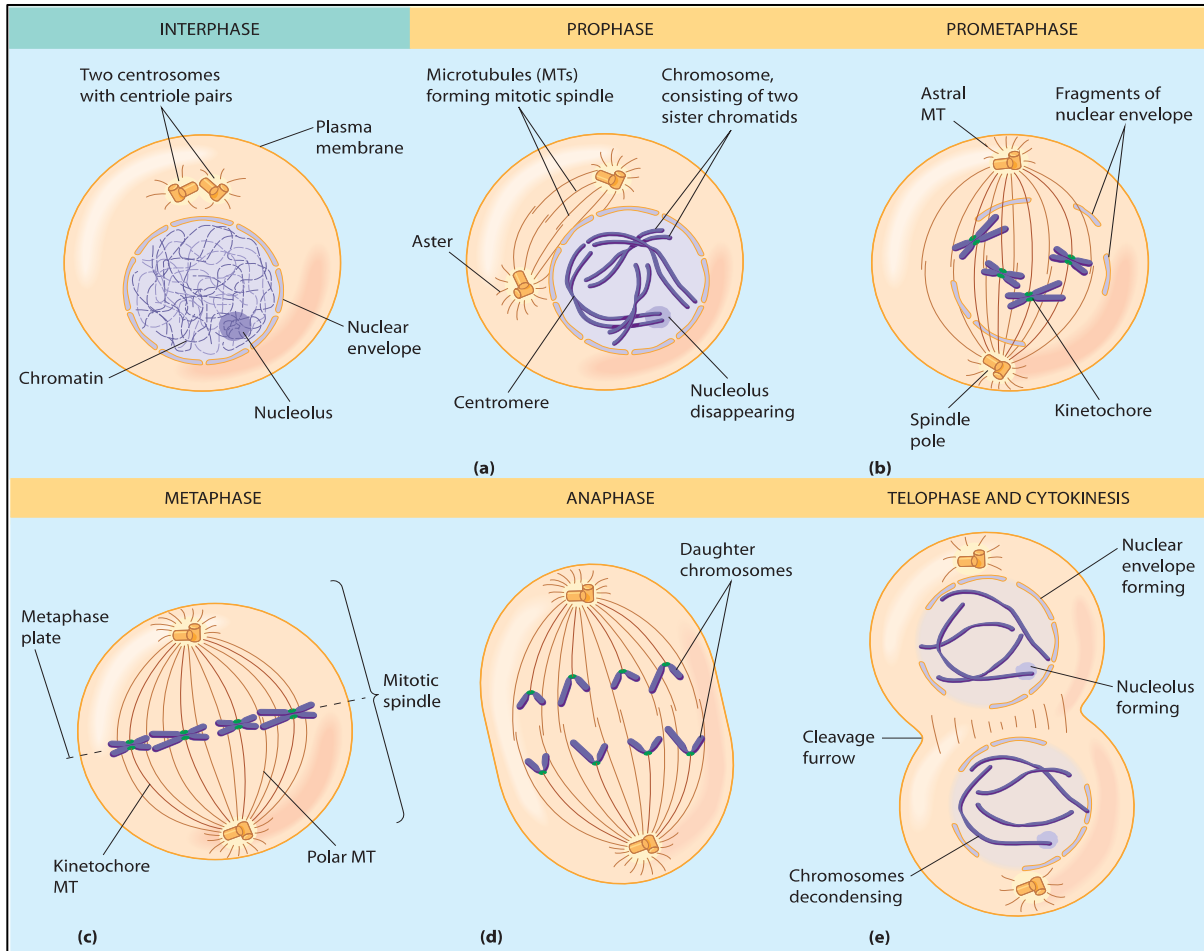
Συνήθως, η συντομότερη φάση της μίτωσης, η **ανάφαση (anaphase)**, διαρκεί συνήθως μόνο λίγα λεπτά. Στην αρχή της ανάφασης, οι δύο αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος διαχωρίζονται απότομα και αρχίζουν να κινούνται προς τους αντίθετους πόλους του άξονα με ρυθμό περίπου 1 mm/min. Η ανάφαση χαρακτηρίζεται από δύο είδη κινήσεων, που ονομάζονται ανάφαση Α και ανάφαση Β. Στην ανάφαση Α, τα χρωμοσώματα τραβιούνται, πρώτα το κεντρομερίδιο, προς τους πόλους του άξονα καθώς οι μικροσωληνίσκοι των κινητοχώρων γίνονται μικρότεροι και κοντότεροι. Στην ανάφαση Β, οι ίδιοι οι πόλοι απομακρύνονται ο ένας από τον άλλο καθώς επιμηκύνονται οι πολικοί μικροσωληνίσκοι. Ανάλογα με τον εμπλεκόμενο τύπο κυττάρου, η ανάφαση Α και Β μπορεί να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα, ή η ανάφαση Β μπορεί να ακολουθεί την ανάφαση Α.

Στην αρχή της **τελόφασης (telophase)**, τα θυγατρικά χρωμοσώματα έφτασαν στους πόλους του άξονα (Εικόνα 3). Στη συνέχεια, τα χρωμοσώματα ξετυλίγονται στις εκτεταμένες ίνες τυπικές της ενδιάμεσης χρωματίνης, αναπτύσσονται πυρήνες στις θέσεις οργάνωσης του πυρηνικού στο DNA, αποσυναρμολογούνται ο άξονας και σχηματίζονται πυρηνικοί φάκελοι γύρω από τις δύο ομάδες θυγατρικών χρωμοσωμάτων.

Το τελικό στάδιο του διαχωρισμού των νέων θυγατρικών κυττάρων είναι η **κυτταροκίνηση (cytokinesis)**. Πρακτικά αποτελεί μια ξεχωριστή διαδικασία από τη μίτωση και ως συμπεριλαμβάνεται ως στάδιο της μίτωσης και είναι απαραίτητο για την ολοκλήρωση της κυτταρικής διαίρεσης. Χάρη στην περίσφιγξη ενός δακτυλίου ακτίνης-μυοσίνης-μικροσωληνίσκων που ονομάζεται δακτύλιος περίσφιγξης (contractile ring), χωρίζεται η κυτταροπλασματική μεμβράνη στη μέση. Το μεγαλύτερο μέρος της μιτωτικής ατράκτου αποδιατάσσεται εκτός από μια ζώνη μικροσωληνίσκων στα όρια του ισημερινού επιπέδου. Στο σημείο εκείνο ολοκληρώνεται και η περίσφιγξη, τα κύτταρα διαχωρίζονται έχοντας πλέον το ίδιο κυτταροπλασματικό υλικό και εισέρχονται στην επόμενη φάση G1.

## 1.2 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (ΑΚΔ)

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (ΑΚΔ) είναι μια εγγενής ιδιότητα κάποιων κυττάρων, με πιο χαρακτηριστικά τα βλαστικά κύτταρα, κατά την οποία, προκύπτουν από ένα μητρικό κύτταρο,



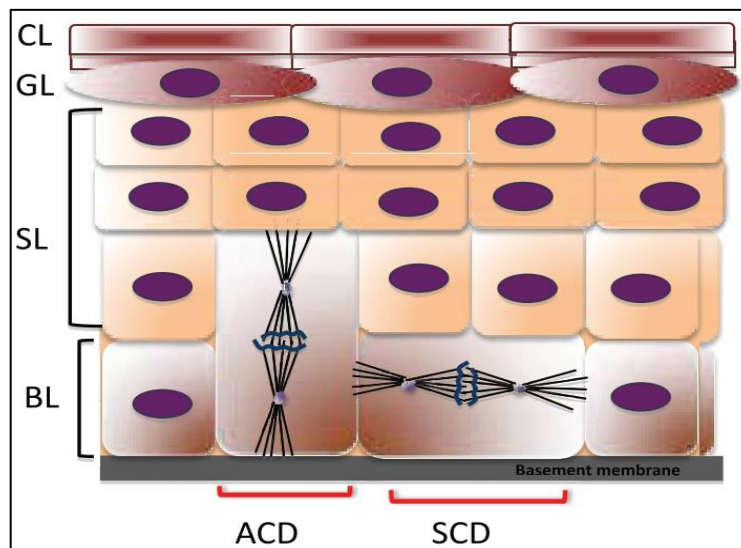
**Εικόνα 3. Η πορεία της μίτωσης.** Κατά την πρόφαση τα κεντροσωμάτια μετακινούνται προς τους πόλους του κυττάρου. Στην προμετάφαση, ολοκληρώνεται η διάσπαση του πυρηνικού φακέλου ενώ στη συνέχεια στη μετάφαση, τα κεντρομερίδια δεσμεύονται στα άκρα των μικροσωληνίσκων της ατράκτου και έτσι αποκτούν θέση στον ισημερινό του κυττάρου στον οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των αδερφών χρωματίδων κατά την ανάφαση και ο οποίος ολοκληρώνεται στην τελόφαση. Το τελικό στάδιο είναι η κυτταροκίνηση όπου γίνεται ο διαχωρισμός του κυτταροπλασματικού υλικού και ο διαχωρισμός των δύο θυγατρικών κυττάρων. (Becker's World of the Cell, 8<sup>η</sup> έκδοση)

δύο θυγατρικά τα οποία ακολουθούν δύο διαφορετικές οδούς. Αυτή της αυτοανανέωσης και αυτή της διαφοροποίησης. Είναι ένας απλός τρόπος για να διατηρηθεί ένας πληθυσμός χωρίς να αυξάνεται αλλά ταυτόχρονα να διατηρείται και η ιστική ομοιότητα και η αποτροπή της δημιουργίας όγκων. Υπάρχουν βλαστικά κύτταρα τα οποία έχουν την δυνατότητα να διαιρεθούν ασύμμετρα ενώ υπάρχουν και κάποιες οικογένειες βλαστικών κυττάρων που διαιρούνται συμμετρικά με την απόφαση σχετικά με τη διατήρηση του πληθυσμού ή της διαφοροποίησης να γίνεται στοχαστικά (1) (Εικόνα 4).

### 1.2.1 Η ΑΚΔ έχει μελετηθεί εκτενώς στα Βλαστικά κύτταρα αλλά δεν συμβαίνει αποκλειστικά μόνο σ' αυτά

Η ΑΚΔ είναι μια διαδικασία η οποία έχει μελετηθεί εκτενώς στο πλαίσιο της αναπτυξιακής βιολογίας και της βιολογίας των βλαστικών κυττάρων, αλλά δεν είναι μια διαδικασία αποκλειστική στα βλαστικά κύτταρα, ή τους μονοκύτταρους οργανισμούς ή ακόμα και τους ευκαρυώτες. Στην πραγματικότητα, βακτηριακά αλλά και κύτταρα μυκήτων έχουν τη δυνατότητα να διαιρεθούν ασύμμετρα ακριβώς όπως και κύτταρα ενός εμβρύου κατά την ανάπτυξη. Το πιο χαρακτηριστικό βακτήριο στο οποίο συμβαίνουν ΑΚΔ είναι το *Caulobacter crescentus*. Το εν λόγω βακτήριο αναπτύσσει έναν βλαστό ο οποίος παραμένει προσκολλημένος σε κάποιο υπόστρωμα όπως η επιφάνεια ενός φυτού πριν την αντιγραφή του DNA. Κατά την κυτταρική διαίρεση το ένα κύτταρο συνεχίζει και διατηρεί τον βλαστό και παραμένει στη θέση του ενώ το άλλο θυγατρικό κύτταρο αναπτύσσει μαστίγια και έτσι μετακινείται μακριά από το σημείο της διαίρεσης (2).

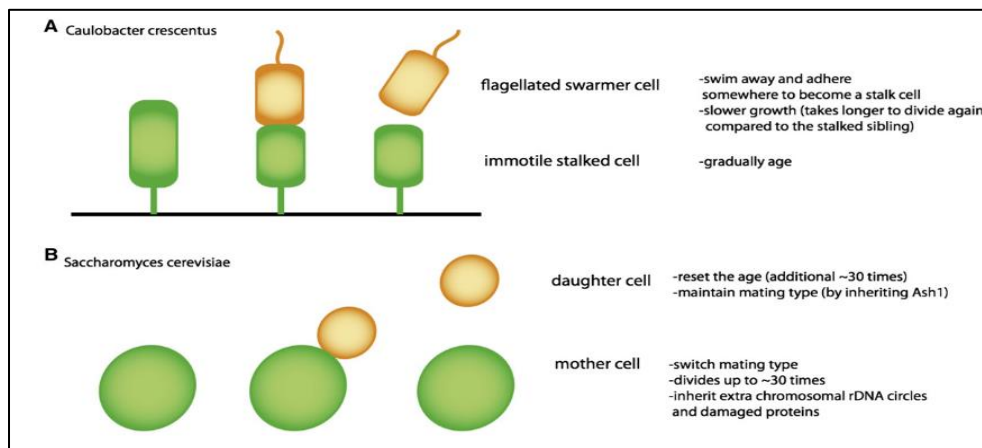
Στην περίπτωση του *Saccharomyces cerevisiae* ο οποίος διαιρείται με εκβλαστήσεις, πρόκειται για έναν ενιαίο οργανισμό ο οποίος διαιρείται ασύμμετρα. Το μητρικό κύτταρο είναι μεγαλύτερο, γηραιότερο και μπορεί να αλλάζει τύπο ζευγαρώματος (mating type), ενώ το



**Εικόνα 4.** Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στην περίπτωση της διαφοροποίησης του δέρματος η οποία προάγει τη στρωματοποίηση. Η επιδερμίδα είναι μια δομή με πολλαπλές στιβάδες όπου η βασική της στιβάδα (BL), περιέχει τον κυτταρικό πληθυσμό ο οποίος έχει τη δυνατότητα να προσανατολίζει την μιτωτική του άτρακτο είτε παράλληλα με την υποκείμενη βασική μεμβράνη (basement membrane) με αποτέλεσμα συμμετρικές κυτταρικές διαιρέσεις (SCD) ή κάθετα στη βασική μεμβράνη με αποτέλεσμα ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις (ACD) οι οποίες δίνουν γένεση στις ανώτερες στιβάδες (SL) και ταυτόχρονα συντηρούν τον πληθυσμό στη βασική στιβάδα (Ray and Lechler, 2011).

θυγατρικό κύτταρο είναι μικρότερο, πιο νεανικό και δεν μπορεί να εναλλάσσει τύπο ζευγαρώματος. Η βασική πρωτεΐνη που συμμετέχει σε αυτό είναι η *Ash1* η οποία κατανέμεται ασύμμετρα μέσω της δράσης ακτίνης-μυοσίνης όπως και στα ανώτερα ευκαρυωτικά κύτταρα (3) (Εικόνα 5).

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς, η σημασία της ΑΚΔ είναι πιο σημαντική. Εάν υπάρξει κάποια αποτυχία στο μηχανισμό της ΑΚΔ στα βακτήρια και στους μύκητες, δεν θα υπάρξει συνέπεια στην επιβίωση του οργανισμού αλλά θα δοθούν απόγονοι οι οποίοι θα είναι λιγότερο προσαρμοσμένοι στο περιβάλλον ανάπτυξης. Στην περίπτωση όμως δυσλειτουργίας στην ΑΚΔ κατά την ανάπτυξη πολυκύτταρων οργανισμών πιθανόν θα υπάρχει επιπλοκή η οποία θα οδηγήσει στον θάνατο του οργανισμού πριν τη γέννησή του. Ο πιο καλά μελετημένος οργανισμός σχετικά με την ΑΚΔ σε μη βλαστικά κύτταρα είναι ο *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) όπου μια ομάδα συντηρημένων γονιδίων, τα γονίδια *Par*, ελέγχουν τις ΑΚΔ με αποτέλεσμα να προκύπτουν όλοι οι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι του οργανισμού (4). Τα εν λόγω γονίδια είναι συντηρημένα σε υψηλό βαθμό σε πολλούς άλλους πολυκύτταρους οργανισμούς οι οποίοι πραγματοποιούν ΑΚΔ καθώς και σε διαδικασίες που ρυθμίζουν την κυτταρική πολικότητα ακόμα και σε περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει ΑΚΔ (5).



**Εικόνα 5. Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στις περιπτώσεις των μονοκύτταρων οργανισμών. Α)** Η ΑΚΔ στο *Caulobacter crescentus*, όπου το κύτταρο με το βλαστό παραμένει προσκολλημένο στην επιφάνεια ενώ το δεύτερο κύτταρο μεταναστεύει μακριά από την επιφάνεια και στη συνέχεια προσκολλάται σε μια νέα για να συνεχιστεί ο κύκλος. **Β)** Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στο *Saccharomyces cerevisiae*, όπου το εκβλάστημα κληρονομεί ασύμμετρα την πρωτεΐνη *Ash1*. Το μητρικό κύτταρο μπορεί να διαιρεθεί απουσία της *Ash1* ως 30 φορές ενώ το θυγατρικό κύτταρο ανανεώνεται και μπορεί και αυτό να διαιρεθεί εκ νέου ως 30 φορές (Inaba και Yamashita, 2012).

### 1.2.2 Εξωγενής/Ενδογενής ΑΚΔ, προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου και Αναπτυξιακή μοίρα των θυγατρικών βλαστικών κυττάρων

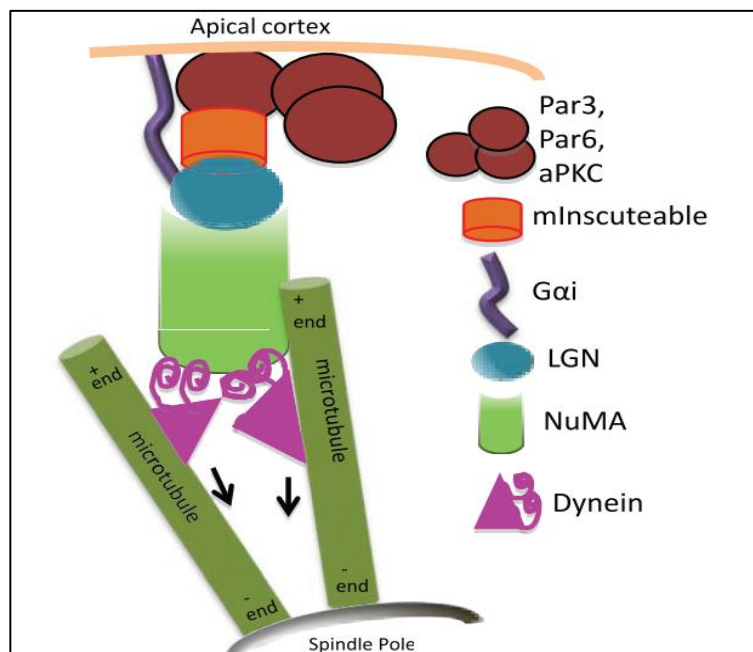
Η κυτταρική ποικιλότητα επιτυγχάνεται μέσω των κυτταρικών διαιρέσεων. Η ΑΚΔ χαρακτηρίζεται από δύο διαφορετικούς τρόπους με τους οποίους προάγεται. Η ύπαρξη του ενός δεν αποκλείει τον άλλον. Αν η ασυμμετρία προκαλείται από εξωτερικά σήματα του μικροπεριβάλλοντος τα οποία λαμβάνουν τα θυγατρικά κύτταρα, τότε η ΑΚΔ ορίζεται ως εξωτερική (extrinsic). Αν όμως η ασυμμετρία είναι παρούσα κατά τη μίτωση στο υπό διαίρεση κύτταρο, τότε έχουμε ΑΚΔ με εσωτερική ρύθμιση (intrinsic)

Η αναδιοργάνωση της μιτωτικής ατράκτου έχει μελετηθεί εκτενώς σε μοντέλα ασπόνδυλων και είναι πλήρως κατανοητή στη *Drosophila* και πιο συγκεκριμένα στην ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (6),(7),(8). Μηχανιστικές μελέτες για την διαδικασία σχηματισμού των νευροβλαστών έδειξαν πως υπάρχει στενή σύνδεση μεταξύ του συμπλέγματος πολικότητας και ρυθμιστών των μικροσωληνίσκων στη ρύθμιση της κορύφο-βασικής (apical-basal) πολικότητας της ατράκτου. Στους νευροβλάστες η εν λόγω πολικότητα ρυθμίζεται από την ασύμμετρη κατανομή του συμπλόκου Par (9),(10). Το κατανεμημένο στην κορυφή σύμπλοκο Par, το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες Par3-Par6-aPKC (atypical protein kinase) δρα σαν δείκτης στον κυτταρικό φλοιό για τον κορύφο-βασικό προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου στα συγκεκριμένα κύτταρα. Η Par3, δεσμεύει και στρατολογεί τις πρωτεΐνες Inscuteable και Pins (partner of Inscuteable) στην περιοχή της κορυφής του κυττάρου (9), (10). Η στρατολόγηση της Pins στην κορυφή του κυττάρου διευκολύνεται από την αλληλοεπίδραση της με την υπομονάδα Gai του ετεροτριμερούς συμπλέγματος G πρωτεϊνών μέσω του GoLoco μοτίβου (11),(12). Ακολούθως η Pins στρατολογεί το ανάλογο της NuMA στα θηλαστικά που ονομάζεται MUD (13), (14), (15). Λόγω της ομολογίας της με τη NuMA αλλά και τη LIN-5 (*C. elegans*) είναι πιθανόν η MUD να αλληλοεπιδρά με τους μικροσωληνίσκους και την αρνητική πλευρά της κινητήριας πρωτεΐνης Dynein. Με αυτόν τον τρόπο, η δεσμευμένη στη κορυφή NuMA/MUD, δρα σαν άγκυρα για την Dynein και τους μικροσωληνίσκους και ασκεί μια ελκτική δύναμη στους περιφερειακούς μικροσωληνίσκους η οποία οδηγεί στον κορύφο-βασικό προσανατολισμό (8),(16). Παρόμοια με τους νευροβλάστες, τα προγονικά κύτταρα της επιδερμίδας δείχνουν έναν αντίστοιχο μηχανισμό δράσης για τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου για να οδηγήσουν το κύτταρο σε ΑΚΔ (Εικόνα 6) (17). Πειράματα αποσιώπησης της LGN και της NuMA σε προγονικά κύτταρα της επιδερμίδας έδειξαν μια συντηρημένη λειτουργία του μηχανισμού, καθώς



έλλειψη των ανωτέρω πρωτεϊνών έδειξε περιορισμένη διαφοροποίηση των δερματικών στιβάδων και λάθη στην αρχιτεκτονική δομή της επιδερμίδας (7).

Το σύμπλεγμα Par, και πιο συγκεκριμένα η πρωτεΐνη Par6 φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT). Έχειδειχτεί πως υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ του συμπλόκου Par και των υποδοχέων του TGFβ, τύπου I και τύπου II. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύμπλεγμα μεταξύ TGFβRI και της Par6, και στη συνέχεια το σύμπλεγμα αλληλοεπιδρά με τον TGFβRII κάτι που οδηγεί στη φωσφορυλίωση της Par6 με αποτέλεσμα τη δέσμευσή της στη Smurf1, την ουβικιτίνωση της RhoA και την αποσύνδεση των στεγανών συνδέσμων (tight junctions) κατά την EMT (18). Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και πιο συγκεκριμένα ο σχηματισμός των ινιδίων ακτίνης του φλοιού (cortical) είναι κρίσιμη για τον κορύφο-βασικό προσανατολισμό των επιθηλιακών κυττάρων. Η συγκεντρωτική δράση Rho GTPασών, οι οποίες όπως έχει αναφερθεί είναι βασικοί ρυθμιστές του κυτταροσκελετού, συντονίζει τα παραπάνω γεγονότα (19). Η RhoA φαίνεται πως είναι μια από τις Rho GTPάσες η οποία λειτουργεί για να διατηρήσει την κορύφο-βασική πολικότητα και τις κυτταρικές συνδέσεις σε επιθήλια του εντέρου και κερατινοκύτταρα (20),(21).

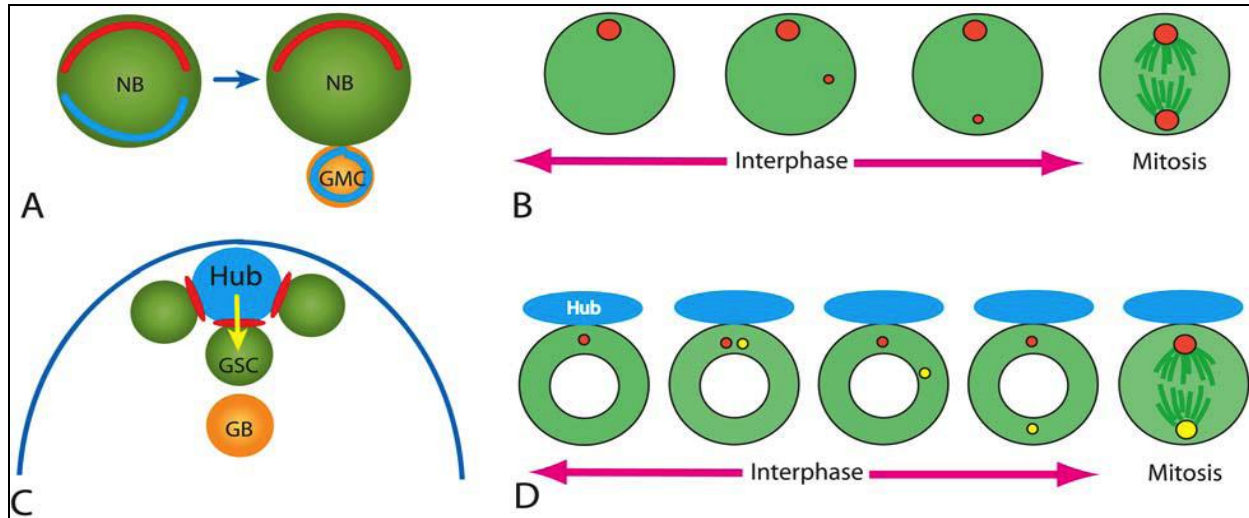


*Εικόνα 6. Το σύμπλεγμα Par. Το ετεροτριμερές σύμπλεγμα Par3/Par6/aPKC λειτουργεί για τη στρατολόγηση της Inscuteable στον κορύφο-βασικό άξονα με αποτέλεσμα την άσκηση δυνάμεων που οδηγούν στον κορύφο-βασικό προσανατολισμό των μικροσωληνίσκων με αποτέλεσμα να οδηγείται το κύτταρο προς ΑΚΔ. (Ray and Lechler, 2011)*

Εκτός από το σύμπλεγμα Par, μια άλλη μελέτη έδειξε πως οι κυτταρικές διαιρέσεις στη βασική στιβάδα είναι και ασύμμετρες αλλά και συμμετρικές. Σε αυτήν την περίπτωση μόνο το 30% περίπου έγινε σε μια γωνία μεγαλύτερη των 20° σε σχέση με τη βασική μεμβράνη. Από τα αποτελέσματα αυτά προτάθηκε πως οι ΑΚΔ μπορεί να αφήνουν και τα δύο θυγατρικά κύτταρα προσκολλημένα στο χόριο αλλά το θυγατρικό κύτταρο το οποίο θα βρεθεί στα ανώτερα στρώματα έχει ασύμμετρα κληρονομηθείσα σηματοδότηση Notch (22). Το συγκεκριμένο μονοπάτι έχει δείξει πως προσδιορίζει πολύ ισχυρά την κυτταρική μοίρα της ακανθωτής στιβάδας (23),(24),(25),(26),(27). Σε αυτό το μοντέλο το θυγατρικό κύτταρο το οποίο κληρονομεί την αυξημένη σηματοδότηση μέσω του Notch, θα αποκολληθεί από το χόριο και θα μετακινηθεί στο υπερβασικό ακανθωτό στρώμα ενώ αυτό που δεν έχει τη σηματοδότηση μέσω του Notch θα παραμείνει σε επαφή με το χόριο (22).

Τυπικό παράδειγμα ενδογενούς ΑΚΔ είναι αυτή η οποία συμβαίνει στις νευροβλάστες της Δροσόφιλας, κατά την οποία διαχωρίζονται ασύμμετρα καθοριστικοί παράγοντες αναπτυξιακής μοίρας (fate determinants) (Εικόνα 7Α). Ο κορυφαίος μηνίσκος (κόκκινο χρώμα στην *Εικόνα 7*), ο οποίος περιέχει τα σύμπλοκα aPKC/Baz, (Par3)/Par6 και Pins/Mud/Gai, κατευθύνει το σχηματισμό του βασικού μηνίσκου και προσανατολίζει τη μιτωτική άτρακτο. Ο βασικός μηνίσκος (μπλε) περιέχει τις Numb, Pon, Miranda και Prospero, οι οποίες είτε προάγουν είτε επιτρέπουν τη διαφοροποίηση (Εικόνα 7Α). Η μιτωτική άτρακτος της προνυμφικής νευροβλάστης προσανατολίζεται κατά μήκος του άξονα κορυφής-βάσης του κυττάρου διαμέσου της κατάλληλης τοποθέτησης των κεντροσωμάτων. Πράγματι, το μεγαλύτερο κεντρόσωμα με τη υψηλότερη ΜΤΟC δραστηριότητα ακινητοποιείται στην κορυφαία πλευρά, ενώ το μικρότερο κεντρόσωμα μεταναστεύει προς την αντίθετη πλευρά της νευροβλάστης (Εικόνα 7Β). Έτσι, η επερχόμενη διαίρεση δημιουργεί δύο θυγατρικά κύτταρα, όπου στο ένα κατανέμεται η κορυφαία πλευρά (παραμένει νευροβλάστη) και στο άλλο η βασική (διαφοροποιείται προς γαγγλιακό μητρικό κύτταρο, ganglion mother cell, GMC) (Εικόνα 7Α) (28),(7).

Στις ΑΚΔ που προκύπτουν εξαιτίας εξωκυτταρικών σημάτων, επειδή η πηγή των σημάτων αυτών είναι ο περιβαλλοντικός θώκος (niche) και η διάταξη των 2 θυγατρικών κυττάρων είναι τέτοια ώστε να εκτίθεται ασύμμετρα στα σήματα του θώκου, τότε το ένα από αυτά θα ακολουθήσει διαφορετική αναπτυξιακή μοίρα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι τα βλαστικά κύτταρα της γαμετικής σειράς (germline stem cells, GSC) της αρσενικής Δροσόφιλας διαιρούνται ασύμμετρα κάτω από την επίδραση του ειδικού μικροπεριβάλλοντος (hub), το οποίο απαρτίζεται



Εικόνα 7. Ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις στις νευροβλάστες και στα αρσενικά βλαστικά κύτταρα της γαμετικής σειράς της Δροσόφιλας (λεπτομέρειες στο κείμενο) (Yamashita and Fuller, 2008)

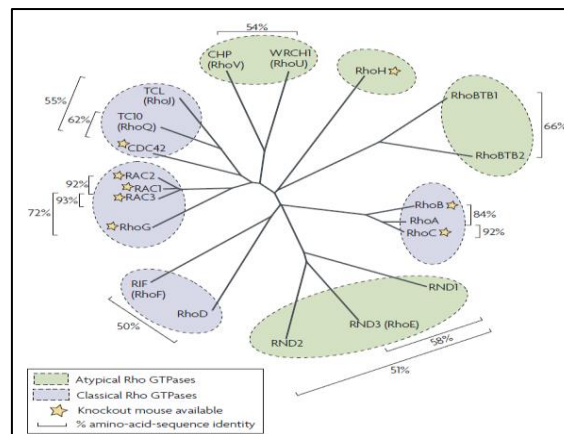
από σωματικά κύτταρα (somatic hub cells). Τα GSC κύτταρα συνδέονται με το μικροπεριβάλλον (hub) διαμέσου συνδέσμων προσκόλλησης (κόκκινο) υποδεχόμενα τον προσδέτη Upd (Unpaired) από το μικροπεριβάλλον (hub) (κίτρινο βέλος) και υφιστάμενα ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK-STAT (Εικόνα 7C), το οποίο διατηρεί τα κύτταρα σε πολυδύναμη κατάσταση. Το μητρικό κεντρόσωμα (κόκκινη κουκίδα) πάντα παραμένει δίπλα στο μικροπεριβάλλον, ενώ το θυγατρικό (κίτρινη κουκίδα) μεταναστεύει στην αντίθετη πλευρά (Εικόνα 7D). Με το τρόπο αυτό η μιτωτική άτρακτος έχει κάθετη φορά προς το μικροπεριβάλλον, έτσι ώστε το ένα θυγατρικό κύτταρο να βρίσκεται χωροταξικά μακριά από το μικροπεριβάλλον (hub) με αποτέλεσμα να μη υφίσταται τη δράση του προσδέματος Upd και να διαφοροποιείται προς πρόδρομη γαμετική βλάστη (gonialblast, GB) (Εικόνα 7C) (28),(29). Το σημαντικότερο στοιχείο και στην περίπτωση της εσωτερικής και της εξωτερικής ρύθμισης της ΑΚΔ είναι ο προσανατολισμός της μιτωτικής ατράκτου. Η άτρακτος πρέπει να προσανατολιστεί κατάλληλα έτσι ώστε μόνο το ένα θυγατρικό κύτταρο κατά την εσωτερική ΑΚΔ θα κληρονομήσει παράγοντες διαφοροποίησης ή κατά την εξωτερική ΑΚΔ θα εκτεθεί ασύμμετρα στα διαφοροποιητικά σήματα του θώκου και θα ακολουθήσει διαφορετική αναπτυξιακή μοίρα.

### 1.3 Οι Rho GTPάσες

#### 1.3.1 Η Δομική οργάνωση των Rho GTPασών

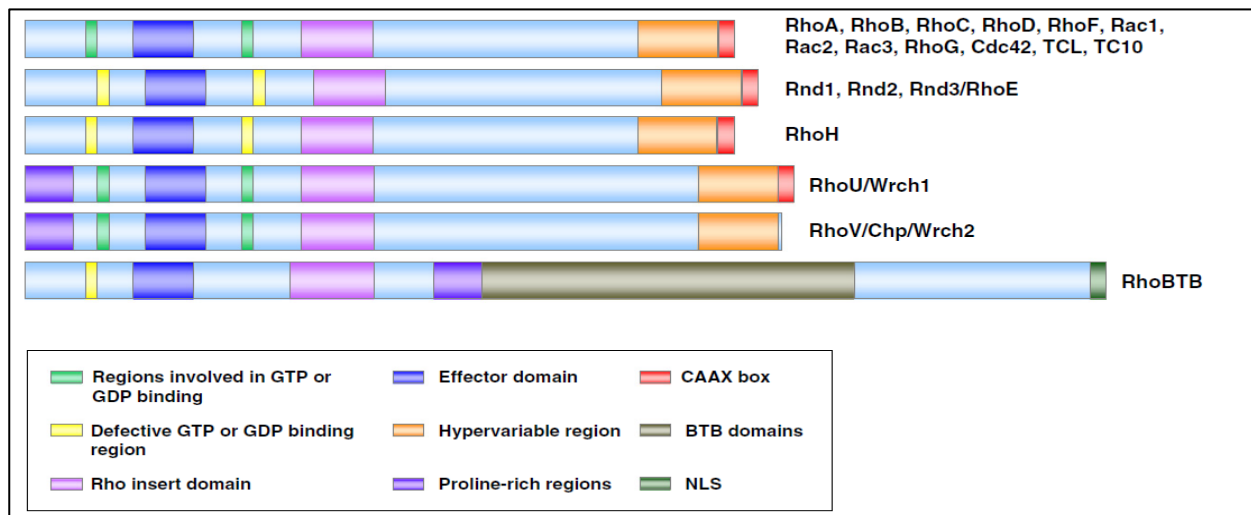
Οι Rho GTPάσες είναι ένα σύνολο πρωτεϊνών οι οποίες ανήκουν στην υπεροικογένεια των Ras πρωτεϊνών και βρίσκονται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (30). Πρόκειται για πρωτεΐνες μικρού μοριακού βάρους που κυμαίνεται ανάμεσα στα 20 και 30kDa και είναι υπεύθυνες για διεργασίες που ρυθμίζουν την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σκελετού. Τα μέλη της εμφανίζουν ένα συντηρημένο δομικό σκελετό που αποτελείται από 5 G-περιοχές (G-boxes), η οποία σχετίζεται με την πρόσδεση και την υδρόλυση του νουκλεοτιδίου GTP (31). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί συνολικά 8 υποκατηγορίες των πρωτεϊνών Rho, με συνολικά 20 μέλη. Αυτά είναι τα Cdc42 (Cdc42, RhoQ/TC10 και RhoJ/TCL), Rac (Rac 1-3 και RhoG), Rho (RhoA, RhoB και RhoC), Rnd (Rnd1, Rnd2 και Rnd3/RhoE), RhoD (RhoF/Rif και RhoD), RhoH, RhoBTB (RhoBTB1 και RhoBTB2) και μια άτυπη υποκατηγορία η RhoUV (RhoU και RhoV) (32) (Εικόνα 8)

Τα μέλη της οικογένειας στο αμινοτελικό τους άκρο περιέχουν τουλάχιστον μια θέση πρόσδεσης του GTP, ενώ στο καρβοξυτελικό τους άκρο τα περισσότερα μέλη της οικογένειας περιέχουν μια περιοχή μετά-μεταφραστικής λιπιδιακής τροποποίησης. Το καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών είναι σημαντικό για τη σωστή υποκυττάρια μεταφορά τους αλλά και την



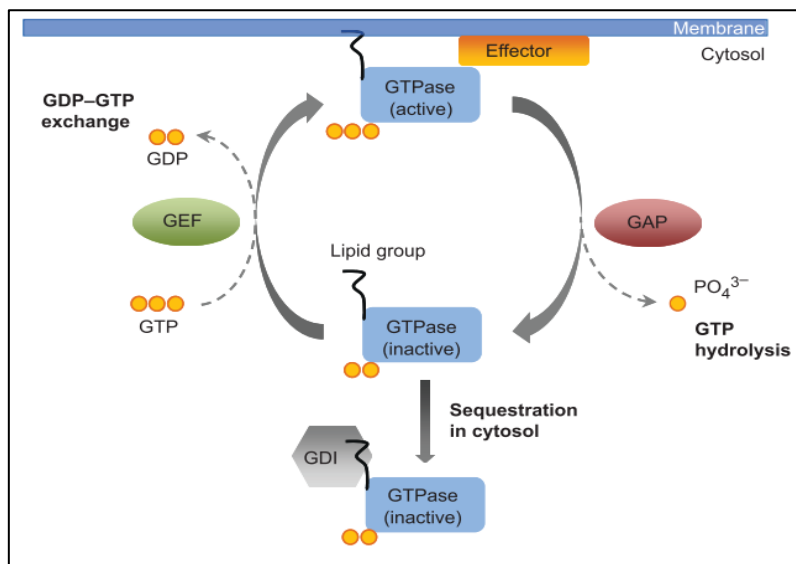
**Εικόνα 8.** Φυλογενετικό δέντρο των Rho πρωτεϊνών και η ομολογία μεταξύ των μελών της. Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στις «κλασικές» Rho GTPάσες είναι αυτές των οικογενειών Cdc42, Rac, Rho και RhoD χαρακτηρίζονται έτσι καθώς η ρύθμισή τους γίνεται μέσω της ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GTP/GDP. Οι υποκατηγορίες RhoBTB, Rnd, RhoUV και RhoH, χαρακτηρίζονται ως άτυπες καθώς παραμένουν συνεχώς στην GTP μορφή τους και η ρύθμισή τους γίνεται από άλλους μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων και της φωσφορυλίωσης ή τον έλεγχο των επιπέδων της εκάστοτε πρωτεΐνης (Heasman and Ridley, 2008).

αγκυροβόλησή τους. Για να επιτευχθεί αυτό, γίνεται πρενυλίωση της 4<sup>ης</sup> από το τέλος συντηρημένης κυστεΐνης, ακολουθούμενη από μεθυλίωση και αφαίρεση των τριών τελικών αμινοξέων με πρωτεόλυση (33). Οι τροποποιήσεις γίνονται με τη προσθήκη δύο πρενυλικών ομάδων, της φαρνεσυλομάδας (15 άνθρακες) η οποία αποτελεί την κύρια τροποποίηση των Rho (RhoA), και της γερανύλ-γερανυλομάδας (20 άνθρακες), η οποία εμφανίζεται σε πιο συγκεκριμένες περιπτώσεις (RhoB) και φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τον ορθό προσανατολισμό της πρωτεΐνης σε κυστίδια. Με αυτόν τον τρόπο η εκάστοτε GTPάση αγκυροβολείται σε αντίστοιχη μεμβράνη όπου επιτελεί τη λειτουργική της δράση. Επίσης, η εν λόγω μετα-μεταφραστική τροποποίηση φαίνεται να παίζει ρόλο και στη σταθερότητα των πρωτεϊνών καθώς σε πειράματα όπου υπήρξε αναστολή των ενζύμων που συνθέτουν τις πρενυλικές ομάδες, οι RhoA και RhoB εμφάνισαν μειωμένη λειτουργικότητα αλλά και ασταθή δομή (34),(35). Επίσης, η ένθετη θηλειά (insert loop) μεταξύ των περιοχών G4 και G5 είναι μια ακόμα δομική θέση στην οργάνωση των Rho πρωτεϊνών. Σε αυτήν την περιοχή δεν έχουν βρεθεί συγκεκριμένες πρωτεΐνες που να αλληλοεπιδρούν, αλλά φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο καθώς η αφαίρεση της περιοχής οδήγησε τη RhoA σε πρωτεϊνική αστάθεια και ελάττωση της ικανότητάς της για μετασχηματισμό κυττάρων (36) (Εικόνα 9).



**Εικόνα 9. Δομική οργάνωση των Rho GTPασών.** Οι κλασικές GTPάσες, RhoA, RhoB, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, RhoD, RhoF, Cdc42, TCL και TC10 έχουν μια κοινή βασική πρωτεϊνική δομή. Αντίθετα οι άτυπες GTPάσες Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE και RhoH φέρουν τροποποιήσεις στην περιοχή δέσμευσης GTP/GDP που τις καθιστούν ανενεργές ως προς την ικανότητά τους να υδrolύουν το GTP. Οι Wrch1 και Wrch2 χαρακτηρίζονται από την παρουσία μιας περιοχής πλούσιας σε προλίνες στο αμινοτελικό τους άκρο. Οι RhoBTB1 και RhoBTB2 έχουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση στη δομή τους σε σχέση με τις υπόλοιπες καθώς περιέχουν μια περιοχή BTB (υπευθύνες για μεταγραφική ρύθμιση) και μια περιοχή NLS (υπεύθυνη για την είσοδο στον πυρήνα) (Vega, 2008).

Όπως αναφέρθηκε όλες οι GTPάσες περιέχουν τουλάχιστον μια περιοχή πρόσδεσης του GTP στο αμινοτελικό τους άκρο. Η λειτουργικότητά τους βασίζεται σε αυτήν την περιοχή δέσμευσης καθώς λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες που ενεργοποιούνται όταν προσδέουν GTP ενώ απενεργοποιούνται όταν το GTP υδρολύεται σε GDP. Η ρύθμισή τους οφείλεται σε 3 διακριτούς παράγοντες. Στους παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GEF (Guanidine exchange factor), οι οποίοι καταλύουν την ανταλλαγή του GDP σε GTP, στους παράγοντες GAP (GTPase activating proteins) οι οποίοι αυξάνουν το ρυθμό της υδρόλυσης του GTP σε GDP και στους παράγοντες GDI (Guanosine-nucleotide dissociation inhibitors) οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την αποτροπή της ανταλλαγής του GDP σε GTP με αποτέλεσμα να συντηρείται ένας πληθυσμός GTPασών σε ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα (37) (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10. Η ανταλλαγή GTP/GDP στον κύκλο των Rho GTPασών.** Η εναλλαγή μεταξύ των δύο μορφών GTP/GDP γίνεται με τη ρύθμιση μέσω των παραγόντων GEF, GAP και GDI. Η λιπιδιακή μετα-μεταφραστική τροποποίηση στο καρβοξυτελικό άκρο είναι κρίσιμη για την δέσμευση στις μεμβράνες και για την ρύθμιση καθοδικών ρυθμιστών με τους οποίους αλληλοεπιδρούν οι GTPάσες (Rubinsztein et al., 2013).

### 1.3.2 Οι βασικές λειτουργίες των Rho GTPασών

Μετά από λειτουργική ανάλυση των Rho GTPασών προέκυψαν 3 σημαντικά χαρακτηριστικά που αποδίδονται στη συγκεκριμένη οικογένεια. Το πρώτο είναι η μεγάλη ποικιλία των μεμβρανικών υποδοχέων αλλά και των ανοδικών ρυθμιστών που είναι υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση των εν λόγω GTPασών. Επίσης, είναι χαρακτηριστικός ο μεγάλος αριθμός των μοριακών στόχων οι οποίοι μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με κάθε ξεχωριστή Rho GTPάση και τέλος, η εκτενής αλληλοεπικάλυψη αλλά και συνεργασία η οποία υπάρχει μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών

που ρυθμίζονται από τις Rho GTPάσες (38). Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό το εύρος των λειτουργιών των Rho GTPασών, οι βασικότερες των οποίων αναλύονται παρακάτω.

### 1.3.2.α Μετανάστευση

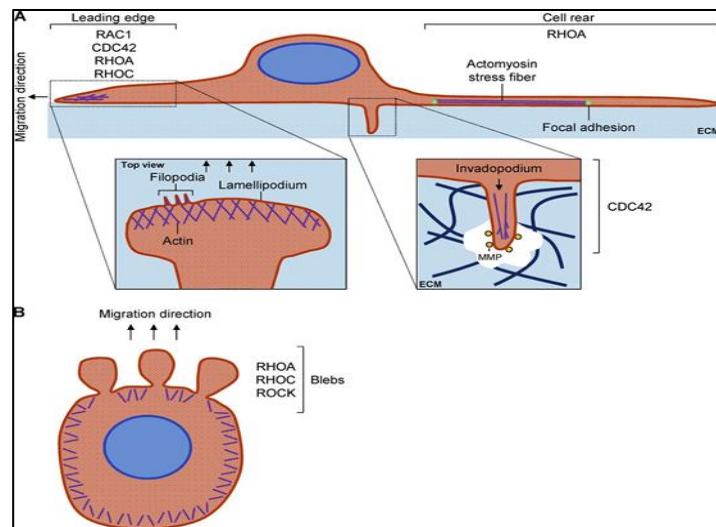
Η κυτταρική μετανάστευση αποτελεί μια βασική διεργασία σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό καθώς είναι απαραίτητη και κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης αλλά συντελείται και σε περιπτώσεις κατά την υπόλοιπη ζωή του κυττάρου, όπως σε καταστάσεις επιδιόρθωσης τραύματος ή κατά την εποπτεία του ανοσοποιητικού συστήματος (39). Τα κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν *in vivo* ή *in vitro*, είτε ατομικά, είτε σαν ομάδες ή σαν στρώματα, ένα φαινόμενο που ονομάζεται συλλογική μετανάστευση (11), (12). Η κυτταρική μετανάστευση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τον δυναμικό σχηματισμό και αποσχηματισμό δομών βασισμένων στα ινίδια ακτίνης συμπεριλαμβανομένων των πτυχωτών προεκτάσεων (lamellipodia), τριχοειδών προεκτάσεων (filopodia), προεκτάσεων εισβολής (invadopodia), μεμβρανικών κυστιδίων και προσφύσεων κυττάρου με κύτταρο ή προσφύσεων κυττάρου-εξωκυττάριας ουσίας (42). Στο πρόσθιο άκρο των υπό μετανάστευση κυττάρων, εκτείνονται οι προεκτάσεις (πτυχωτές, τριχοειδής και εισβολής), οι οποίες οδηγούνται από τον πολυμερισμό της ακτίνης (43). Επίσης και στο πρόσθιο αλλά και στο οπίσθιο άκρο του κυττάρου απαιτείται τοπική συσταλτικότητα της ακτινομυοσίνης (actomyosin). Αυτός ο δυναμικός σχηματισμός και αποσχηματισμός όλων των παραπάνω δομών δίνει στο κύτταρο την δυνατότητα να συντονίσει την κατεύθυνση της μετανάστευσής του ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα. Επιπρόσθετα, οι προσφύσεις μεταξύ κυττάρων αλλά και κυττάρων-εξωκυττάριας ουσίας αλλάζουν επιτρέποντας την κυτταρική κίνηση διαμέσου των ιστών (Εικόνα 11).

Εναλλακτικά, είτε μονήρη κύτταρα ή κύτταρα στις άκρες ιστών, μπορούν να μεταναστεύσουν χρησιμοποιώντας πρόσθιες κυστιδιακές προεκβολές (bleb-based protrusions) όπου η κυτταρική μεμβράνη αποσυνδέεται από το δίκτυο της ακτίνης και οι προεκβολές σταθεροποιούνται με εκ νέου πολυμερισμό της (44). Η κυστιδίωση είναι συσχετισμένη με υψηλά επίπεδα συσταλτικότητας της ακτινομυοσίνης στα κύτταρα η οποία πρέπει να ρυθμιστεί δυναμικά με σκοπό τη μετακίνηση του κυττάρου και προς τις δύο κατευθύνσεις. Η κυστιδιακή μετανάστευση έχει παρατηρηθεί σε κυτταρικούς τύπους κατά την ανάπτυξη αλλά και σε καρκινικές κυτταρικές σειρές *in vitro* και *in vivo*.

Για τη μετανάστευση μέσω ιστών *in vivo*, τα κύτταρα συχνά αποδιατάσσουν την εξωκυττάρια ουσία και αυτό περιλαμβάνει ειδικές δομές που ονομάζονται προεκτάσεις εισβολής

(invadopodia) και προεκτασώματα (podosomes) (45). Είναι προεκβολές πλούσιες σε ακτίνη και εξαρτώνται από ένα πλήθος ρυθμιστών της ακτίνης για τη κατασκευή τους. Επίσης, διαμεμβρανικές μεταλλοπρωτεάσες ειδικά μετακινούνται στις προεκτάσεις εισβολής (invadopodia), οι οποίες αποδιατάσσουν την εξωκυττάρια ουσία και έτσι συμμετέχουν στην αποτελεσματικότερη κυτταρική μετανάστευση.

Η αποτελεσματική μετανάστευση απαιτεί τον συγχρονισμό όλων των παραπάνω δομών που αναφέρθηκαν με αποτέλεσμα οι δομές αυτές να ρυθμίζονται από πολλαπλούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών έχουν δείξει να συμμετέχουν σε όλες τις παραπάνω διεργασίες δρώντας σε συγκεκριμένα σημεία και στιγμές (Εικόνα 11) (46). Προς το παρόν έχουν εντοπιστεί τρεις Rho GTPάσες που φαίνεται να είναι κρίσιμες για την κυτταρική μετανάστευση, η Cdc42, η Rac1 και η RhoA. Φαίνεται να εμφανίζεται μια βαθμίδωση συγκέντρωσης των παραπάνω πρωτεϊνών με τη Cdc42 και τη Rac1 να έχουν υψηλότερη συγκέντρωση στο πρόσθιο μέρος του κυττάρου και να είναι υπεύθυνες η μεν Cdc42 για τον σχηματισμό των τριχοειδών προεκτάσεων ενώ η Rac1 για τον πολυμερισμό της ακτίνης και τον σχηματισμό των πτυχωτών προεκτάσεων. Η RhoA αντίθετα είναι πιο ενεργή στο οπίσθιο μέρος του κυττάρου όπου και είναι υπεύθυνη για τον σχηματισμό των ινιδίων καταπόνησης (stress



**Εικόνα 11. Μετανάστευση μονήρους κυττάρου οδηγούμενο από Rho GTPάσες. Α)** Μονήρη κύτταρα μπορούν να μεταναστεύσουν με βάση τα λαμελλιπόδια, με τον πολυμερισμό της ακτίνης (φαίνεται με το μωβ χρώμα) να οδηγεί το σχηματισμό των λαμελλιποδίων και των φιλοποδίων στο πρόσθιο μέρος του κυττάρου και με συστολή της ακτινομυοσίνης για την αποκόλληση του οπίσθιου μέρους του κυττάρου. Επίσης κύτταρα που μεταναστεύουν μέσω ιστών αποδιατάσσουν την εξωκυττάρια ύλη με τη δράση μεταλλοπρωτεασών. **Β)** Μετανάστευση μέσω κυστιδίων η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλά επίπεδα Rho/ROCK δραστηριότητας και συστολής της ακτινομυοσίνης. (Lawson και Ridley, 2018)



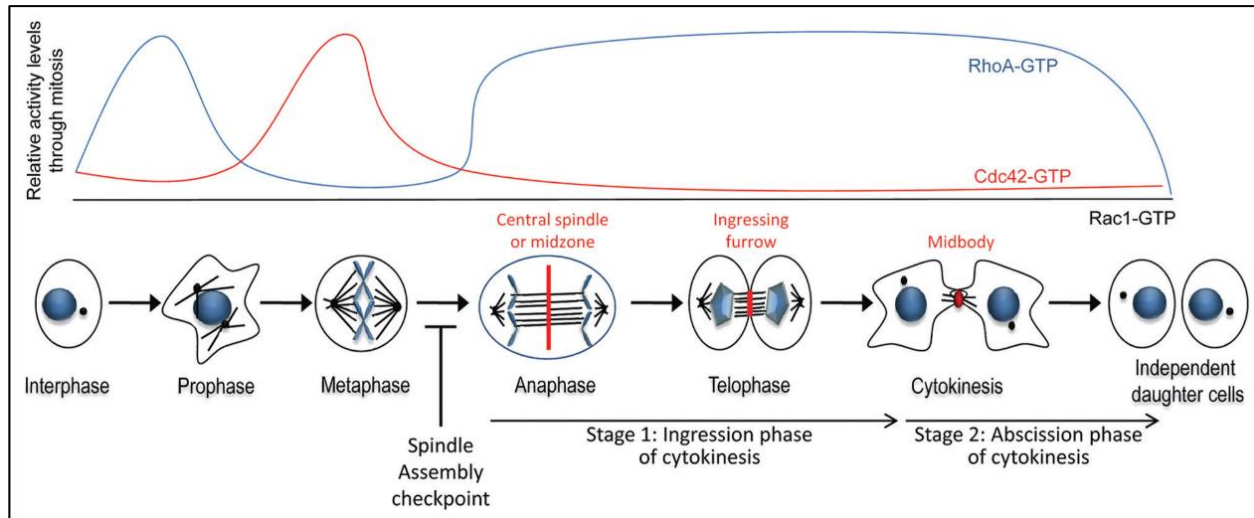
fibers) αλλά και την αποκόλληση της ουράς του κυττάρου μέσω της συστολής της μυοσίνης II. Επίσης έχει εντοπιστεί σε μετανάστευση ινοβλαστών πως η RhoA είναι ισχυρά ενεργή και στο πρόσθιο μέρος του κυττάρου όπου είναι υπεύθυνη για τον πολυμερισμό της ακτίνης αλλά και στον έλεγχο της συγκρότησης εστιακών προσφύσεων (focal adhesions) (47).

### 1.3.2.β Κυτταρική διαίρεση

Η μίτωση, κατά την οποία προκύπτουν δύο ανεξάρτητα θυγατρικά κύτταρα, αποτελείται στην τελική φάση του κυτταρικού κύκλου από έξι στάδια όπως έχει ήδη αναφερθεί: την πρόφαση, την προμετάφαση, την μετάφαση, την ανάφαση, την τελόφαση και την κυτταροκίνηση. Η μιτωτική διαδικασία είναι πολύ αποτελεσματικά ρυθμισμένη και χρονικά και χωρικά και περιλαμβάνει τη δυναμική διαμόρφωση του σχήματος και της μορφολογίας του κυττάρου, κυρίως μέσω της αναδιαμόρφωσης της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων. Οι Rho GTPάσες με την ιδιότητα τους να ρυθμίζουν ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών μέσω της αλλαγής στη δυναμική των μικροσωληνίσκων και του κυτταροσκελετού, στοιχείων κρίσιμων στη μιτωτική διαίρεση, παίζουν σημαντικό ρόλο στον κυτταρικό κύκλο. Αυτό επιτυγχάνεται μέσα από ένα φάσμα διαφορετικών κυτταρικών διεργασιών και χάρη στην ιδιότητά τους να εξάγουν μια συγκεκριμένη κυτταρική απόκριση μέσω της ενεργοποίησης μιας μεγάλης βιβλιοθήκης πρωτεϊνών τελεστών (48).

Ο ρόλος των Rho GTPασών στον κυτταρικό κύκλο αρχικά πιθανολογούνταν πως περιορίζεται στην κυτταροκίνηση αλλά τελικά δείχτηκε με νεότερα δεδομένα πως εκτείνεται σε όλα τα μιτωτικά στάδια. Έχει δειχτεί πως έχουν δράση κατά την εκκίνηση της μίτωσης για την κυκλοποίηση του κυττάρου (cell rounding), καθώς και κατά τη μετάφαση για τον προσανατολισμό της ατράκτου και τη δημιουργία των χρωμοσωμάτων. Σε κύτταρα HeLa, μιτωτικά κυτταρικά εκχυλίσματα για τις GTP μορφές των RhoA, Cdc42 και Rac1, έδειξαν πως η δραστηριότητα της GTP-Cdc42 αυξάνεται στην ανάφαση και φτάνει το μέγιστό της κατά την τελόφαση (κυτταροκίνηση) (49). Τα επίπεδα της GTP-Rac1 δεν μεταβάλλονται κατά τη μίτωση. Η Cdc42 φαίνεται να είναι ο κύριος ρυθμιστής της σηματοδότησης κατά την μετάφαση (50) ενώ αρκετά μονοπάτια της Cdc42 φαίνεται να εμπλέκονται και στην κυτταροκίνηση (51) (Εικόνα 12).

Οι Cdc42 και RhoA είναι από τις βασικότερες Rho GTPάσες που φαίνεται να ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Υπάρχουν και κάποιες δευτερεύουσες Rho GTPάσες που φαίνεται να επηρεάζουν τον κυτταρικό κύκλο. Η RhoB βρέθηκε σε κύτταρα HeLa να εμφανίζει το μέγιστο ποσό έκφρασης της στη φάση  $G_2$  (52), ενώ η συνεχώς ενεργή μορφή της, δημιουργεί πολλαπλούς πυρήνες. Επίσης, έχει παρατηρηθεί πως στην περίπτωση της άτυπης GTPάσης RhoBTB2, η



**Εικόνα 12.** Οι φάσεις της μίτωσης και τα σχετικά επίπεδα δραστηριότητας των *Rho* GTPασών κατά τη διάρκεια της μίτωσης. Προφίλ της σχετικής δραστηριότητας (επάνω πλαίσιο) των GTP-*RhoA* (μπλε), GTP-*Cdc42* (κόκκινο) και GTP-*Rac1* (μαύρο) συσχετισμένα με τα αντίστοιχα στάδια της μίτωσης (κάτω πλαίσιο) (Chircop, 2014).

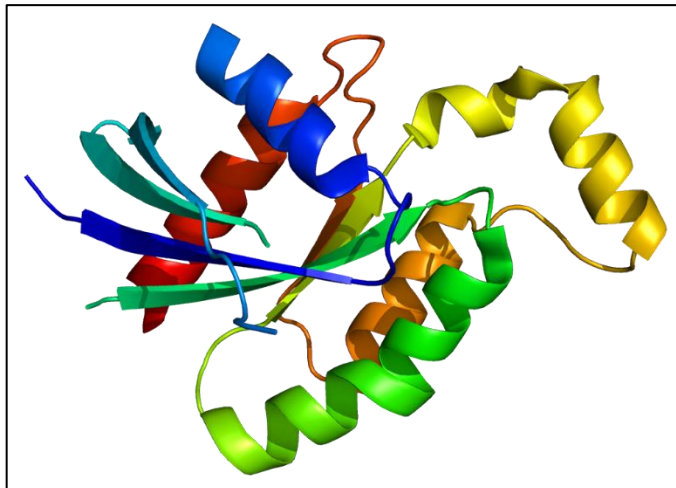
έκφραση του mRNA της επάγεται στη φάση S, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωσή τους στις φάσεις G<sub>2</sub>/M (53).

## 1.4 Η *RhoD* GTPάση

### 1.4.1 Δομικά χαρακτηριστικά-έκφραση της *RhoD*

Η *RhoD*, ανακαλύφθηκε πριν από περισσότερο από 20 χρόνια από δύο ανεξάρτητες ομάδες και απομονώθηκε με βάση τη μέθοδο της PCR, χρησιμοποιώντας νεφρό ποντικού (54) ή ανθρώπινου πλακούντα (55). Κωδικοποιείται από το γονίδιο της θέσης 11q14.3 και περιλαμβάνει 5 εξόνια και 5 ιντρόνια. Το αποτέλεσμα της έκφρασης του γονιδίου είναι ένα τελικό προϊόν αποτελούμενο από 210 αμινοξέα και ένα μοριακό βάρος της τελικής μορφής της πρωτεΐνης της τάξης των 23.4kDa. Η κρυσταλλική της δομή έχει δημοσιευθεί (Εικόνα 13) (56) και παρότι χαρακτηρίζεται από δομικές και λειτουργικές περιοχές των πρωτεϊνών *Rho*, παρουσιάζει ιδιαιτερότητες όπως η προσθήκη 14 αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο της και ένα διαφορετικό καρβοξυτελικό άκρο. Στην αρχή είχε χαρακτηριστεί πως ανήκει στις κλασικές *Rho* GTPάσες, αλλά βρέθηκε αργότερα πως περιλαμβάνει μια ενδογενή αυξημένη λειτουργικότητα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων και έτσι πλέον κατατάσσεται στις άτυπες *Rho* GTPάσες (57).

Ένα επιπλέον χαρακτηριστικό της *RhoD*, είναι πως παρουσιάζει διαφορετική ευαισθησία σε μια σειρά τοξινών που απενεργοποιούν άλλες *Rho* GTPάσες, εξαιτίας διαφορετικών αμινοξέων

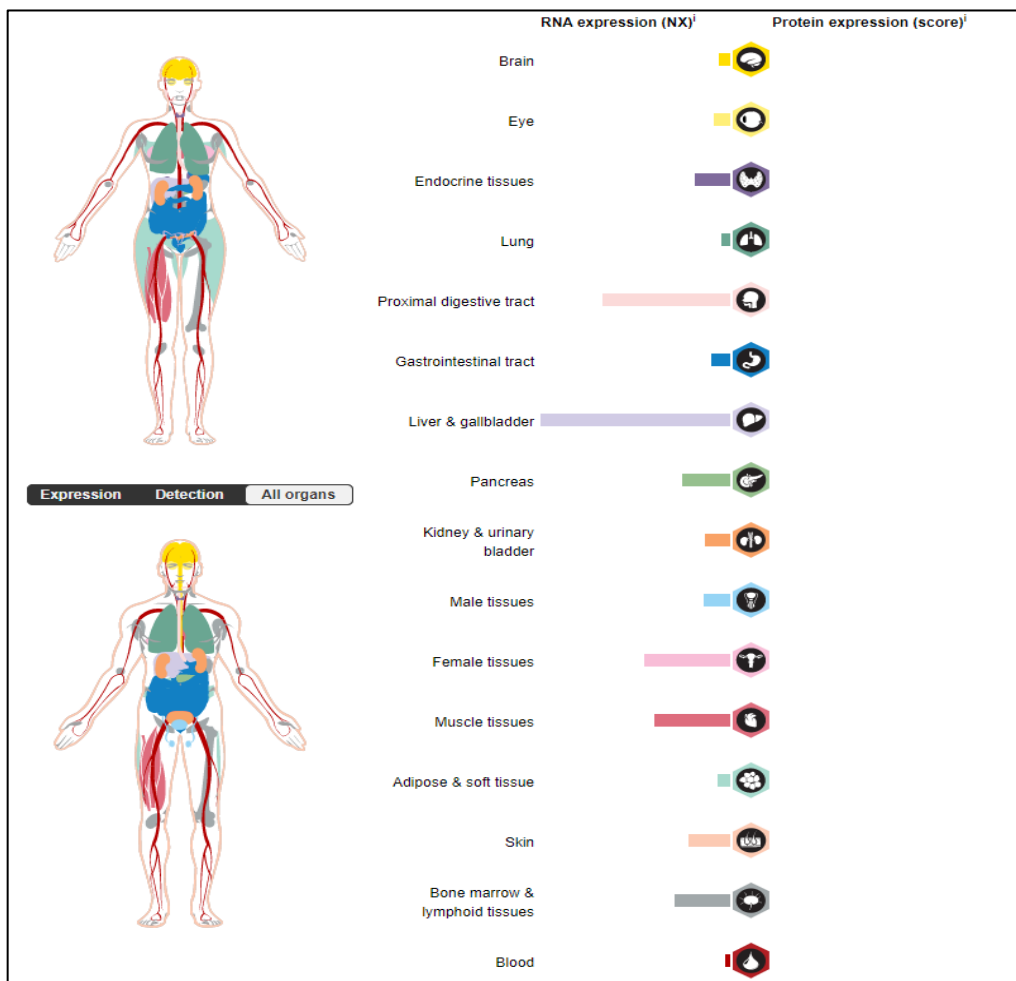


Εικόνα 13. Η κρυσταλλική δομή της RhoD όπως λήθηκε από τους Pike et al. 2006. Στην εικόνα παρατηρούνται οι α-έλικες και οι β-πτυχωτές επιφάνειες.

σε συντηρημένες περιοχές. Έτσι πιο συγκεκριμένα, δεν αναγνωρίζεται από την ADP-ριβοσυλτρανσφεράση της τοξίνης C1 και D του *Clostridium botulinum* η αργινίνη στη θέση 41, όπου στις RhoA, RhoB και RhoC, βρίσκεται μια ασπαραγίνη. Επίσης, εξαιτίας των διαφορών των αμινοξέων υπάρχει αλλαγή στην εξειδικευμένη δράση της τοξίνης B του *Clostridium difficile* για την RhoA (S73) και της θανατηφόρας τοξίνης (lethal toxin, LT) του *Clostridium sordelii* για τη RhoD (F85) (58). Η έκφραση της RhoD είναι σε πολλούς ιστούς με το RNA της να εκφράζεται υψηλότερα στο συκώτι και στη χοληδόχο κύστη (Εικόνα 14).

#### 1.4.2 Οι τελεστές της RhoD

Η RhoD εντοπίζεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη και στα πρώιμα ενδοσώματα (54). Μέχρι πρόσφατα είχε εντοπιστεί μόνο ένας τελεστής της RhoD, η hDia2C, όπου η GTP μορφή της RhoD, στρατολογεί την hDia2C στα ενδοσώματα και ακολούθως ενεργοποιείται η Src κινάση με αποτέλεσμα την αλλαγή της κινητικότητας των ενδοσωμάτων (59). Στη συνέχεια εντοπίστηκαν και άλλοι τελεστές της RhoD όπως η Diaph1 (diaphanous) η οποία συμμετέχει στην εξέλιξη της φάσης S και στη μιτωτική διαίρεση (60), (61), (62), (63). Η Diaph1, στρατολογείται στα πρώιμα ενδοσώματα και από εκεί δρα ως διαμεσολαβητής για τη μειωμένη κυτταρική διαίρεση που προκαλεί η υπερέκφραση της RhoD-wt, ενώ η απουσία της αναστέλλει τις μιτωτικές αλλοιώσεις που προκαλεί το συνεχές ενεργό μετάλλαγμα της RhoD, RhoDG26V (64). Ένας ακόμα τελεστής της RhoD είναι η πρωτεΐνη Rabankyrin-5 η οποία φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της GTP ή GDP μορφής της RhoD με την δέσμευση της στη RhoD άμεσα ενώ η RhoD μοιράζεται ένα κέντρο



*Εικόνα 14. Η έκφραση της RhoD στα διάφορα όργανα του ανθρώπου. Παρατηρείται η έκφραση του RNA της RhoD στους ιστούς του ανθρώπου μέσω της βάσης δεδομένων The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org>).*

δέσμευσης στην Rabankyrin-5 με τη Rab5 (65). Περαιτέρω, έχει αναγνωριστεί ένας ακόμα τελεστής της RhoD, η FILIP1 (Filamin A interacting protein) μέσω της οποίας γίνεται ρύθμιση της δυναμικής της ακτίνης, της κυτταρικής προσκόλλησης και μετανάστευσης (66). Τέλος, ο πιο πρόσφατος ρυθμιστής της RhoD φαίνεται να είναι η PAK6, η οποία ρυθμίζει τη κυτταρική συστολή και έχει βρεθεί να αλληλοεπιδρά με τη RhoD η οποία αναστέλλει την εξαρτώμενη από το σύμπλεγμα RhoC-PAK6 κυτταρική συστολή δείχνοντας μια περαιτέρω αλληλοεπίδραση μεταξύ των διαφόρων Rho πρωτεϊνών (67).

### **1.4.3 Η κυτταρική δραστηριότητα της RhoD**

Η πιο χαρακτηριστική ιδιότητα της ενεργοποιημένης RhoD είναι η αναστολή της **κινητικής των ενδοσωμάτων** (54). Ενδεχομένως η RhoD προκαλεί την αποκόλληση των ενδοσωμάτων από τους

μικροσωληνίσκους και τα κατευθύνει προς τα ινίδια ακτίνης με αποτέλεσμα τη μειωμένη κινητική τους (59), (68). Η μετακίνηση αυτή επιτυγχάνεται με την αλληλοεπίδραση RhoD-hDia2C στα ενδοσώματα και την ακολουθούσα δέσμευση της κινάσης Src στο σύμπλεγμα. Εναλλακτικά, η RhoD δεν εμπλέκεται στη λειτουργία των ενδοσωμάτων, αλλά αναστέλλει την κυστιδιακή μεταφορά κατά την κυτταροκίνηση, κάτι που αποτελεί και σημείο δραστηριότητας των DRF πρωτεϊνών, όπως η hDia2C κατά τον κυτταρικό κύκλο (69).

Η επίδραση της RhoD επίσης, εκτείνεται και στον **κυτταροσκελετό**. Η ενεργοποίηση της RhoD, σχετίζεται με την αποσυναρμολόγηση των ινιδίων πίεσης αλλά και των εστιών πρόσφυσης. Σε αυτήν την περίπτωση έχει δείχτει πως το συνεχές ενεργό μετάλλαγμα της RhoD, προκαλεί διασπορά των πρωτεϊνών paxillin και vinculin, οι οποίες υπό κανονικές συνθήκες βρίσκονται στις εστίες πρόσφυσης (54). Επίσης σχετιζόμενο με τα παραπάνω είναι και το γεγονός πως η μόνιμα ενεργή μορφή της RhoD, μειώνει την έκφραση σε πολλά στοιχεία του κυτταροσκελετού όπως οι πτυχωτές προεκτάσεις, η φλοιώδης ακτίνη και οι ακραίες πτυχώσεις (edge ruffles) (70). Αντίθετα η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου οδήγησε στο αντίθετο αποτέλεσμα, δηλαδή στην αύξηση της φλοιώδους ακτίνης και των πτυχωτών προεκτάσεων (66).

Δεδομένης της επίδρασης της RhoD στον κυτταροσκελετό, είναι λογικό πως επηρεάζεται και η **κυτταρική μετανάστευση**. Στη μελέτη της σύνδεσης της δυναμικής των ενδοσωμάτων με την κινητικότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, έγινε γνωστό πως το μόνιμα ενεργό μετάλλαγμα της RhoD σε ενδοθηλιακά κύτταρα, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω οδηγεί στην αναστολή της κινητικότητας των ενδοσωμάτων αλλά και τη διάσπαση των εστιών πρόσφυσης, είχε ως γενικότερο αποτέλεσμα τα κύτταρα να παρουσιάσουν περιορισμένη μεταναστευτική ικανότητα (71). Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και σε ινοβλάστες, δείχνοντας πως η RhoD έχει ευρύτερη συμμετοχή στη μεταναστευτική ικανότητα του κυττάρου (72). Επίσης, στην περίπτωση της αποσιώπησης της RhoD σε ινοβλάστες υπήρξε μειωμένη κινητικότητα των κυττάρων στην περίπτωση που τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση βαθμίδωσης PDGF-BB (65).

Σε σύνδεση με την επίδραση της στην κυτταρική μετανάστευση φαίνεται να είναι και η ρύθμιση μέσω της RhoD της **νεοπλασματικής μετάστασης**. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αλληλοεπίδρασης με τον παράγοντα PAR-1. Ο PAR-1 είναι ένας ελικοειδής (serpentine) διαμεμβρανικός υποδοχέας ο οποίος αλληλοεπιδρά με τη θρομβίνη και έτσι ρυθμίζεται ο πολλαπλασιασμός και αύξηση των καρκινικών όγκων. Ο PAR-1 είναι συνδεδεμένος με αρκετές Gα-πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων των Gα<sub>0/i</sub>, Gα<sub>12/13</sub> και Gα<sub>q</sub> (73). Η PAR-1 όταν

αλληλοεπιδρά με τις  $G_{\alpha_i}$  ρυθμίζει αρνητικά την κυτταρική μετανάστευση ενώ όταν αλληλοεπιδρά με τις  $G_{\alpha_{12/13}}$  και  $G_{\alpha_q}$  υπάρχει επαγωγή της κυτταρικής διήθησης και μετάστασης (74). Οι ετεροτριμερής πρωτεΐνες  $G_{\alpha_{12/13}}$  ρυθμίζουν την κυτταρική μετανάστευση μέσω ενεργοποίησης της RhoA η οποία με τη σειρά της επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης και την εμφάνιση νέων εστιακών προσφύσεων (74). Επίσης, η αποσιώπηση της RhoA, οδηγεί την PAR-1 προς αλληλοεπίδραση με τις  $G_{\alpha_i}$  και άρα στην ελάττωση των μεταστάσεων. Αυτό έγινε με χημικούς αναστολείς αλλά και με έκφραση του ενεργού μεταλλάγματος της RhoD και το οποίο έδρασε ανταγωνιστικά με τη RhoA, απενεργοποιώντας την και έτσι υπήρξε αναστολή της κυτταρικής διήθησης (74).

Η RhoD έχει δείχτει πως σχετίζεται με τη σταθεροποίηση του **κώνου των νευρικών κυττάρων**, μέσω της αλληλοεπίδρασης της με τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς της οικογένειας των Plexins. Η εν λόγω οικογένεια υποδοχέων είναι η μόνη που αλληλοεπιδρά άμεσα με GTPάσες (75), (76). Στη μελέτη σχετικά με την αλληλοεπίδραση της Plexin-A1 με μέλη της οικογένειας των Rho GTPασών βρέθηκε πως μόνο η RhoD και η Rnd1 συνδέονται με τον συγκεκριμένο υποδοχέα με GTP-εξαρτώμενο τρόπο. Για τη δράση της Plexin-A1 απαιτείται το πρόσδεμα Semaphorin 3A. Απουσία του προσδέματος η Plexin-A1 παραμένει ανενεργή. Παρουσία του προσδέματος, η Rnd1 δεσμεύεται στην κυτταροπλασματική πλευρά του υποδοχέα και τον ενεργοποιεί οδηγώντας τον νευρικό κώνο σε κατάρρευση. Υπό συγκεκριμένες όμως συνθήκες που μάλλον σχετίζονται με τη συγκέντρωση του cGMP, η RhoD δεσμεύεται ανταγωνιστικά στη θέση πρόσδεσης του Rnd με αποτέλεσμα τη διατήρηση του νευρικού κώνου (75). Με τον ίδιο τρόπο δρα η RhoD στην περίπτωση του υποδοχέα Plexin-B1 ο οποίος βρίσκεται σε συνεχή σύνδεση με την Rnd1 αλλά και πάλι με ανταγωνιστικό τρόπο συνδέεται η RhoD και σταθεροποιεί τον νευρικό κώνο (76).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως, παρουσιάζει η επίδραση που έχει η RhoD στην **κυτταρική διαίρεση**. Η πρώτη αναφορά στη δράση της RhoD στην κυτταρική διαίρεση έγινε σε μελέτη εμβρύων *Xenopus laevis*. Σε έμβρυα στο στάδιο των δύο κυττάρων, έγινε μικροένεση με το πλασμίδιο που εκφράζει το μόνιμα ενεργό μετάλλαγμα της RhoD, στο ένα βλαστομερίδιο και στο βλαστομερίδιο ελέγχου έγινε έγχυση μόνο ρυθμιστικού διαλύματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το βλαστομερίδιο ελέγχου προχώρησε κανονικά στις κυτταρικές διαιρέσεις, αλλά στο βλαστομερίδιο στο οποίο είχε γίνει η έγχυση με το ενεργό μετάλλαγμα, μετά από 6-7 κυτταρικές διαιρέσεις, εντοπίστηκαν ως 32 πυρήνες (72). Αργότερα στα πλαίσια μελέτης της επίδρασης της

RhoD *in vivo*, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία εκφράζουν το συνεχές ενεργό μετάλλαγμα της RhoD στην επιδερμίδα τους. Χρησιμοποιήθηκε ο υποκινητής της κερατίνης 14, καθότι κατευθύνει την έκφραση των διαγονιδίων στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας (77). Τα θετικά ζώα στο συνεχές ενεργό μετάλλαγμα της RhoD, παρουσίασαν αποχρωματισμό, πρήξιμο και τελική απώλεια της ουράς και του αυτιού, αποφολιδωμένο δέρμα στα πέλματα και τα δάχτυλα και απώλεια των τριχών με ταυτόχρονη εμφάνιση ανοιχτών πληγών κατά την ανάπτυξη. Στη συνέχεια, οι ιστολογικές αναλύσεις που έγιναν στα ποντίκια κατέδειξαν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού στην επιδερμίδα της ουράς κάτι που έγινε προφανές με την ύπαρξη πολλαπλών δερματικών στιβάδων σε σχέση με τα ζώα ελέγχου αλλά και σε υπερπλασία. Η υπερπλασία παρατηρήθηκε σε περιοχές χωρίς φλεγμονή κάτι που δείχνει πως δεν υπάρχει η εμπλοκή κυτταροκινών, ενώ παρά το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν δυσπλασίες, δεν εμφανίστηκαν κακοήθειες. Το πιο χαρακτηριστικό γεγονός όμως, ήταν πως εμφανίστηκε ελαττωματική διαφοροποίηση στην επιδερμίδα με τον δείκτη της κερατίνης 14, ο οποίος εμφανίζεται μόνο στη βασική στιβάδα των ορθά διαφοροποιημένων κερατινοκυττάρων προς επιδερμίδα, εμφανίστηκε και στις υπερβασικές στιβάδες στα διαγονιδιακά ζώα (64).

## 1.5 Ο ρόλος της ΑΚΔ στη διαφοροποίηση των στιβάδων του δέρματος

### **1.5.1 Δομική Οργάνωση**

Η επιδερμίδα είναι το μεγαλύτερο όργανο του οργανισμού και ταυτόχρονα αποτελείται από πολλές στιβάδες επιθηλιακών κυττάρων το ένα πάνω από το άλλο. Η ανάπτυξη της επιδερμίδας από προγονικά κύτταρα ονομάζεται στρωματοποίηση. Τα προγονικά κύτταρα στην αναπτυσσόμενη επιδερμίδα πολλαπλασιάζονται συμμετρικά και ασύμμετρα για να επιτύχουν την ισορροπία ανάμεσα στην κάλυψη της επιφάνειας με κύτταρα και τη δημιουργία διαφοροποιημένων κυτταρικών στρωμάτων (78). Υπάρχει πλήθος αναφορών σχετικά με την ύπαρξη βλαστικών κυττάρων στο δέρμα των θηλαστικών (79), (80), (81), (82). Η επιδερμίδα των θηλαστικών είναι ένα πολύ ξεχωριστό παράδειγμα για τη μελέτη επιθηλιακών κυττάρων τα οποία είναι στρωματοποιημένα.

Το πρώτο στρώμα της επιδερμίδας είναι η βασική μεμβράνη (basal layer) και αποτελείται από μια μονοστιβάδα κυττάρων που βρίσκεται σε επαφή με την υποκείμενη στιβάδα κυττάρων που ονομάζεται χόριο (βασική μεμβράνη, basement membrane) η οποία είναι πλούσια σε εξωκυττάρια ουσία και αυξητικούς παράγοντες. Τα κύτταρα της βασικής μεμβράνης εκφράζουν

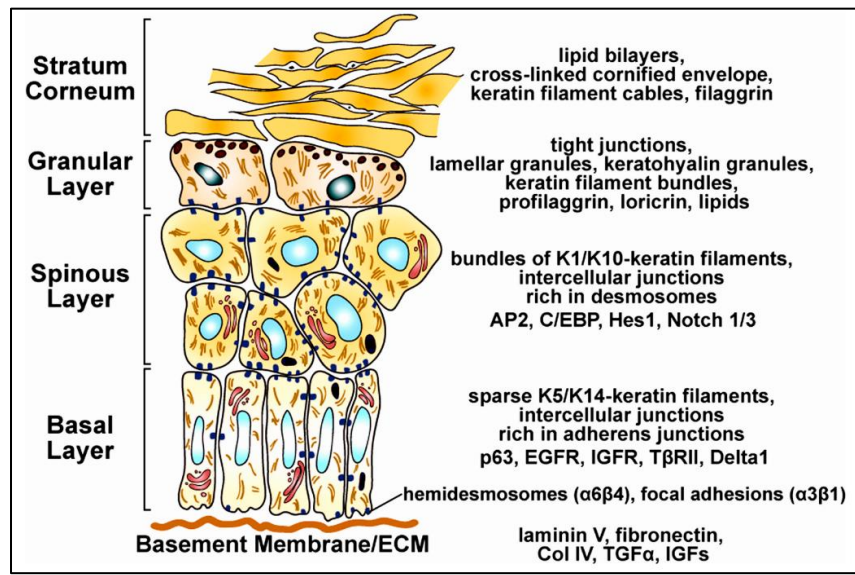
κάποιους πρωτεϊνικούς δείκτες όπως η Κερατίνη 14 (K14). Κάποια από τα κύτταρα διαφοροποιούνται από τα κύτταρα της βασικής μεμβράνης, μετακινούμενα προς τα ανώτερα στρώματα της επιδερμίδας και έτσι δημιουργούν τις ανώτερες κυτταρικές στιβάδες. Με αυτόν τον τρόπο προκύπτει ένας φραγμός ο οποίος αποτρέπει τους επιβλαβείς μικροοργανισμούς να εισέλθουν στο σώμα αλλά και τα σημαντικά θρεπτικά συστατικά να εξέλθουν (83).

Τα κερατινοκύτταρα της βασικής μεμβράνης, εφόσον δεχτούν τα κατάλληλα σήματα για την τελική τους διαφοροποίηση, περνούν από τα τρία διακριτά στάδια διαφοροποίησης του δέρματος με τις αντίστοιχες στιβάδες του δέρματος που προκύπτουν να τα καθορίζουν. Οι στιβάδες αυτές είναι η ακανθωτή (spinous layer), η κοκκώδης (granular layer) και η κεράτινη στιβάδα (stratum corneum). Σημαντικές αλλαγές, στο επίπεδο της μεταγραφής, της μορφολογίας των κυττάρων αλλά και τις λειτουργίας που επιτελούν, λαμβάνουν χώρα στις μεταβάσεις από τη βασική στην ακανθωτή στιβάδα και εκ νέου στη μετάβαση από την κοκκώδη στην κεράτινη στιβάδα. Με αυτό τον τρόπο τα διαφοροποιημένα κύτταρα φτάνουν στην επιφάνεια του δέρματος ως απύρνηνοι κυτταρικοί σκελετοί που είναι πλούσιοι σε ινίδια κερατίνης κλεισμένα σε έναν πρωτεϊνικό φάκελο πλούσιο σε γ-γλουταμυλ-ε-λυσίνη. Ένα τελευταίο στάδιο είναι η δημιουργία μιας λιπιδιακής διπλοστιβάδας για να καλύψει όλη την επιφάνεια του δέρματος (84), (85). Η διεργασίες που αναφέρθηκαν είναι μια δυναμική διαδικασία που συμβαίνει συνεχώς. Στην ανθρώπινη επιδερμίδα η αυτοανανεωτική ικανότητα των βλαστικών κυττάρων του δέρματος είναι τέτοια που εντός 4 εβδομάδων όλη η βασική στιβάδα έχει διαφοροποιηθεί και έχει μετακινηθεί στην επιφάνεια και νέα κύτταρα έχουν προκύψει εκεί (Εικόνα 15).

### **1.5.2 Η ρύθμιση της ΑΚΔ στην επιδερμίδα**

Αρχικά και βασισμένοι μόνο σε *in vitro* παρατηρήσεις υπήρχε η γενική παραδοχή πως τα κύτταρα της βασικής στιβάδας διαιρούνταν συμμετρικά και έδιναν όμοια θυγατρικά κύτταρα. Σε αυτό το σενάριο τα κύτταρα τα οποία προέκυπταν, έχαναν την επαφή τους με το υποκείμενο χόριο, έχαναν την δράση λαμίνης και έτσι οδηγούνταν στην τελική τους διαφοροποίηση (86), (87). Μελέτες που έγιναν στη συνέχεια έδειξαν πως ένα διαφορετικό μοντέλο για την κυτταρική διαίρεση στα βλαστικά κύτταρα της επιδερμίδας είναι η ΑΚΔ (22), (17) και χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί και η πρώτη εκδοχή καθώς απαιτεί παρακολούθηση συνεχόμενων κυτταρικών διαιρέσεων σε έμβρυα υπό ανάπτυξη, κάτι που δεν έχει γίνει ακόμα εφικτό. Αντίθετα, έχουν γίνει μελέτες που αναλύουν κύτταρα σε βάθος δύο κυτταρικών διαιρέσεων όπου τα αποτελέσματα δείχνουν πως υπάρχει δυνατότητα στα κύτταρα να διαιρεθούν και συμμετρικά και ασύμμετρα (88).





**Εικόνα 15. Η οργάνωση και η διαφοροποίηση της επιδερμίδας.** Ο τρόπος με τον οποίο οργανώνεται η επιδερμίδα ξεκινώντας από το χόριο (βασική μεμβράνη, *basement membrane*) το οποίο είναι πλούσιο σε κολλαγόνο, λαμινίνες, φιβρονεκτίνη και αυξητικούς παράγοντες, τη βασική στιβάδα (*basal layer*) τα κύτταρα της οποίας χαρακτηρίζονται από την έκφραση της κερατίνης 14, την ακανθωτή στιβάδα (*spinous layer*) η οποία έχει κύτταρα θετικά στις κερατίνες 1 και 10, την κοκκώδη στιβάδα (*granular layer*) η οποία χαρακτηρίζεται από πρωτεΐνες όπως η προφιλαγκρίνη και η φιλαγκρίνη και τέλος την κεράτινη στιβάδα (*stratum corneum*) η οποία χαρακτηρίζεται από απύρρηνα κύτταρα τα οποία είναι πλούσια σε ινίδια κερατίνης και φιλαγκρίνη (Fuchs, 2008).

Η πρώτη μελέτη σχετικά με την ΑΚΔ στην επιδερμίδα, έδειξε πως εμβρυικά βασικά κύτταρα επιδερμίδας ποντικού, αλλάζουν την πολικότητα της μιτωτικής ατράκτου από οριζόντια σε κάθετη για να διαιρεθούν ασύμμετρα. Περίπου το 70% των κυττάρων στην περίπτωση αυτή διαιρέθηκε ασύμμετρα ενώ μόνο το 30% διατήρησε τις συμμετρικές διαιρέσεις. Με την ΑΚΔ παρέχεται ένας φυσικός τρόπος για να διατηρηθεί στη βασική μεμβράνη ένα θυγατρικό κύτταρο το οποίο είναι πλούσιο σε αυξητικούς παράγοντες τυροσίνης-κινάσης και ιντρεγκρίνες ενώ το υπερβασικό θυγατρικό κύτταρο έχει μειωμένη έκφραση των ανωτέρω παραγόντων. Επίσης, στην περίπτωση αποσιώπησης των αβ1 ιντεγκρινών και της α-κατένινης (*a-catenin*) η οποία αποτελεί βασικό μέλος των συνδέσεων μεταξύ κυττάρων, δείχτηκε πως είναι απαραίτητη η παρουσία τους για την σωστή πολικότητα της μιτωτικής ατράκτου (17).

## 1.6 Ο ρόλος της ΑΚΔ στον καρκίνο

### **1.6.1 Η ΑΚΔ και η κυτταρική ετερογένεια των καρκινικών όγκων**

Οι περισσότεροι τύποι καρκίνου χαρακτηρίζονται από ετερογένεια στους κυτταρικούς τους πληθυσμούς και έχουν μηχανισμούς αυτοανανέωσης αλλά και διαφοροποίησης μέσω της οποίας αυξάνουν αυτήν την καρκινική ετερογένεια (89). Η ΑΚΔ στον καρκίνο μπορεί να δημιουργήσει ποικιλομορφία στον κυτταρικό πληθυσμό ενώ ταυτόχρονα συντηρεί τον βασικό κυτταρικό πληθυσμό σταθερό. Με αυτόν τον τρόπο εναλλαγές μεταξύ ασύμμετρης και συμμετρικής κυτταρικής διαίρεσης μπορούν να οδηγήσουν είτε στη συντήρηση του πληθυσμού ή στην διάδοση των καρκινικών κυττάρων (90). Η λειτουργία της ΑΚΔ όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω έχει μελετηθεί εκτενώς στην *Drosophila* και στους νευροβλάστες και οι μεταλλάξεις σε γονίδια που εμπλέκονται στην ΑΚΔ μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη όγκων (91), ενώ η αποσιώπηση των γονιδίων Prospero και Numb οδηγούν επίσης σε μεταλλάξεις που προσομοιώνουν αυτές του γονιδίου Brat το οποίο φυσιολογικά λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικό (92), (93).

Στους υγρούς όγκους των θηλαστικών και πιο συγκεκριμένα στη μυελώδη λευχαιμία, ελέγχθηκε η συσχέτιση της αναλογίας των συμμετρικών και των ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων και των ογκογονιδίων BCR-BL και NUP98-HOXA9. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως οι αλλαγές στην έκφραση του BCR-ABL που είναι υπεύθυνο για τη χρόνια μυελογόνο λευχαιμία (CML) δεν αλλάζει την ισορροπία μεταξύ ασύμμετρων και συμμετρικών κυτταρικών διαιρέσεων. Αντίθετα, οι αλλαγές στην έκφραση του NUP98-HOXA9, που σχετίζεται με βλαστική κρίση της χρόνιας μυελογενούς λευχαιμίας (CML) και την οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), αλλάζει την ισορροπία των κυτταρικών διαιρέσεων από ασύμμετρες προς συμμετρικές οδηγώντας στην διατήρηση του καρκινικού πληθυσμού (94).

Στους στερεούς όγκους οι περισσότερες μελέτες έχουν γίνει πάνω σε κυτταρικές σειρές και σε *in vitro* καταστάσεις. Αυτό κάνει δυσκολότερη τη μελέτη σχετικά με τις επιπτώσεις του τύπου της κυτταρικής διαίρεσης σε σχέση με την ενδεχόμενη δράση της στους μηχανισμούς μετάστασης των καρκινικών κυττάρων και επικεντρώνονται στην επίδραση των ΑΚΔ στον πολλαπλασιασμό και στη συντήρηση ενός όγκου. Παρά τις τεχνικές δυσκολίες σχετικά με τη μελέτη των στερεών όγκων έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στις έκφραση πολλών γονιδίων που ελέγχουν την ΑΚΔ στα υγιή βλαστικά κύτταρα όπως το LGN, aPKC και SCRIB1 (95). Οι πιο μελετημένοι μηχανισμοί σε *in vitro* καταστάσεις είναι στις περιπτώσεις κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού ή του παχέος εντέρου.

Συγκεκριμένα για τον καρκίνο του στήθους υπάρχουν δύο μελέτες οι οποίες σχετίζουν μηχανισμούς της ΑΚΔ με τη μεταστατική ικανότητα (96), (97). Στην πρώτη φαίνεται πως το σύμπλεγμα TGFβ-Par6 επάγει την ικανότητα μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων σε κυτταρικές σειρές EMT-6 και MDA-MB-231 στην περίπτωση που είναι εξαρτώμενη από τον τελεστή της Par6, Smurf1. Αναφέρεται ο ρυθμιστικός ρόλος του TGFβ-Par6 μονοπατιού πολικότητας στην επιβίωση των κυττάρων του μαστού. Δεδομένου ότι η ενεργοποίηση του Par6 μονοπατιού προκαλεί απώλεια της πολικότητας, ενώ η απενεργοποίηση του συντηρεί την πολικότητα, φαίνεται πως η απουσία πολικότητας είναι προαπαιτούμενο για την ενεργοποίηση του εξαρτώμενου από τον TGFβ προ-αποπτωτικού καταρράκτη αντιδράσεων. Επίσης, φαίνεται πως υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ του μονοπατιού της Par6 και των κερατινοκυττάρων σε βασικού τύπου όγκους, αρνητικούς στο BRCA1. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται το μονοπάτι να εμπλέκεται με τα επιθετικά και μεταστατικά χαρακτηριστικά των όγκων BRCA1(-). Είναι πιθανόν η έκφραση του TGFβ και κατά συνέπεια η ενεργοποίηση του Par6 μονοπατιού να είναι ένα μοριακό γεγονός που σχετίζεται με την απώλεια του BRCA1 και έτσι τα καρκινικά κύτταρα να δεσμεύονται σε μια πιο επιθετική κυτταρική μοίρα (96).

Οι βασικού τύπου όγκοι (luminal-like), έχουν υψηλή πλαστικότητα, κάτι που τους επιτρέπει να μεταβαίνουν ανάμεσα στην προγονική, τη βασική και την προγονική και την θυλακοειδή. Ένα χαρακτηριστικό αυτών των τριπλών αρνητικών καρκίνων του μαστού (TNBCs), είναι πως περιέχουν κύτταρα τα οποία εκφράζουν βασικά στοιχεία, όπως η κερατίνες 14 και 5, αλλά και θυλακοειδή στοιχεία όπως οι κερατίνη 18 (98), (99). Επίσης στους συγκεκριμένους όγκους είναι παρόντα κύτταρα τα οποία φαίνεται να έχουν περάσει από μερική επιθηλιακή-μεσεγχυματική τροποποίηση (100). Όλα τα παραπάνω δείχνουν την υψηλή πλαστικότητα και ετερογένεια αυτών των όγκων και είναι ο λόγος που πρόκειται για μια ιδιαίτερη επιθετική κατηγορία. Τα κύτταρα τα οποία είναι θετικά στην κερατίνη 14 δείχνουν μια πιο ισχυρή ογκογενετική ικανότητα σχετιζόμενη με μια θηλακοειδή-προγονική κατάσταση σε αντίθεση με τα αρνητικά σε κερατίνη 14 τα οποία συνδέονται με μια πιο ώριμη θηλακοειδή κατάσταση. Τα θετικά σε κερατίνη 14 κύτταρα βρίσκονται σε μεταστάσεις και σε κύτταρα τα οποία εισβάλλουν στους ιστούς (invasiveness). Στου κυτταρικούς υποπληθυσμούς του βασικού τύπου (basal-like) κυττάρων γίνονται ΑΚΔ από τις οποίες προκύπτει ένα κύτταρο θετικό στην κερατίνη 14 και ένα αρνητικό, ενώ η παρουσία των ΑΚΔ και σε αλλομοσχεύματα δείχνει πως αυτό συμβαίνει και στους όγκους μέσα, εκτός των σταθερών κυτταρικών σειρών που χρησιμοποιήθηκαν. Στην περίπτωση αυτή προτάθηκε πως

γονίδια όπως το E2F2, Notch, KLF5 και NFIB δρουν για την αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων θετικών στην κερατίνη 14, ενώ η αποσιώπηση τους οδηγεί σε μια διαφορετική ισορροπία δείχνοντας πως εκτός από το σύμπλοκο Par, που αναφέρθηκε προηγουμένως, σημαντικό ρόλο στην ισορροπία και στη ρύθμιση των ΑΚΔ και στα καρκινικά κύτταρα μπορεί να παίζει και το μονοπάτι του Notch (97), (101).

### **1.6.2 Νεοπλασματική αγγειογένεση και ΑΚΔ**

#### **1.6.2α. Η Αγγειογένεση**

Τα αιμοφόρα αγγεία, εμφανίστηκαν στην εξέλιξη για να επιτρέψουν στα αιμοποιητικά κύτταρα να ελέγχουν τον οργανισμό σχετικά με πιθανές εστίες ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, να παρέχουν οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά αλλά και να αποβάλλουν στοιχεία που δεν χρειάζεται ο οργανισμός (102). Κατά την εμβρυογένεση, ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν στα νεοσυσταθέντα όργανα και επάγουν την οργανογένεση χωρίς την κυκλοφορία αίματος. Αυτό υποδηλώνει πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα όχι μόνο δημιουργούν «παθητικά» δίκτυα για την μετακίνηση του οξυγόνου, αλλά δημιουργούν και οργανοειδικές αγγειακές εστίες από τις οποίες επάγεται η οργανογένεση από την παραγωγή αγγειοκρινών παραγόντων (103).

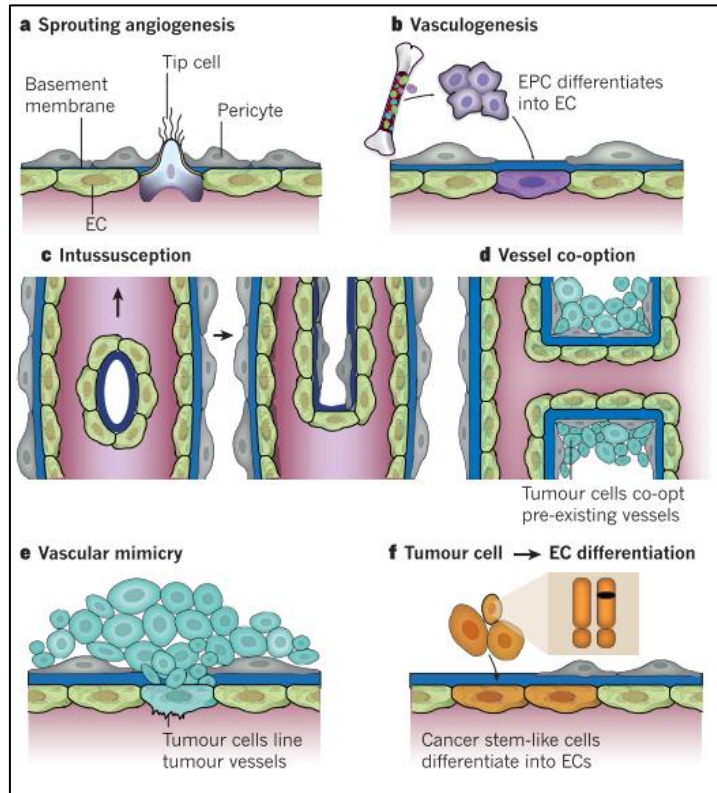
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, επίσης, εμφανίζουν σημαντική ετερογένεια σε διαφορετικά όργανα. Αυτά τα συγκεκριμένα ενδοθηλιακά κύτταρα για κάθε όργανο, μπορούν να απελευθερώσουν σήματα για την παγκρεατική διαφοροποίηση, την ανασύσταση των αιματοποιητικών βλαστικών κυττάρων και την επέκταση των νευρικών πρόδρομων κυττάρων, καθώς και να δώσουν γένεση στα αιματοποιητικά προγονικά κύτταρα μέσω της μετάβασης από το ενδοθήλιο στην αιματοποίηση (endothelial-to-hematopoietic transition). Τα εξωτερικά στρώματα των αγγείων επίσης φιλοξενούν τοπικά βλαστικά και προγονικά κύτταρα ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν και αποδείξεις πως η δράση των ενδοθηλιακών κυττάρων τοπικά χωρίς την κυκλοφορία του αίματος, μπορεί να επάγει και την δημιουργία όγκων (103).

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, τα αγγεία εκτός από την ευεργετική δράση σχετικά με το σχηματισμό οργάνων και την αναγέννηση, μπορούν να προκαλέσουν και φλεγμονώδης και κακοήθεις παθήσεις ενώ χρησιμοποιούνται από μηχανισμούς των καρκινικών κυττάρων για τη μετάσταση. Επειδή τα αγγεία βρίσκονται σχεδόν σε κάθε όργανο, παρεκκλίσεις από την κανονική αγγειακή ανάπτυξη συμβάλλουν σε πολλές παθήσεις, όπως το εγκεφαλικό, η απόφραξη του μυοκαρδίου, τον καρκίνο, φλεγμονικές διαταραχές και άλλες παθήσεις (104), (105).

Αρκετοί τρόποι με τους οποίους γίνεται η δημιουργία των αγγείων έχουν ταυτοποιηθεί. Στα υπό ανάπτυξη έμβρυα των θηλαστικών, οι αγγειοβλάστες διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία με τη σειρά τους σχηματίζουν τον αγγειακό λαβύρινθο, μια διαδικασία που είναι γνωστή και ως αγγειοποίηση (vasculogenesis) (Εικόνα 16b). Συγκεκριμένα σήματα είναι αυτά που καθορίζουν την φλεβική ή αρτηριακή διαφοροποίηση (106). Στη συνέχεια συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγούν στην εκβλάστηση (sprouting) μια διαδικασία που είναι γνωστή ως αγγειογένεση (Εικόνα 16a). Στη συνέχεια υπάρχει το στάδιο της αρτηριογένεσης, κατά την οποία το κανάλι των ενδοθηλιακών κυττάρων που έχει δημιουργηθεί καλύπτεται από περικύτταρα ή λεία μυϊκά κύτταρα (smooth muscle cells) και έτσι παρέχεται σταθερότητα στα νέα αγγεία. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα να δημιουργηθούν δύο νέα αγγεία από ένα που προϋπήρχε με μια διαδικασία που ονομάζεται αγγειακή μυογένεση (Εικόνα 16c). Στην περίπτωση του καρκίνου, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να καταλάβουν το αγγειακό σύστημα ή να μιμηθούν ενδοθηλιακά κύτταρα (vascular mimicry) ενώ καρκινικά βλαστικά κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν ενδοθήλιο με πηγή τα καρκινικά κύτταρα (Εικόνα 16d – f) (107).

**1.6.2β. Η μοριακή βάση της δημιουργίας, της ωρίμανσης και η ολοκλήρωση του αγγειακού αυλού**  
 Στα υγιή κύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν τα αγγεία έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και προστατεύονται από την αυτοκρινή δράση με την δράση σημάτων συντήρησης όπως του VEGF, του NOTCH, της αγγειοποιητίνης-1 (ANG-1) και των FGF. Επειδή τα αγγεία παρέχουν οξυγόνο, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εξοπλισμένα με αισθητήρες οξυγόνου και παράγοντες που επάγονται από την υποξία (PHD2, HIF-2α), οι οποίοι επιτρέπουν στα αγγεία να επαναπροσδιορίζουν το μέγεθός τους για να βελτιστοποιήσουν την ροή του αίματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε ηρεμία, σε ένα αγγείο, δημιουργούν μία μονοστιβάδα κυττάρων, ενωμένα με παράγοντες σύνδεσης όπως η VE-cadherin και οι claudins. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα βρίσκονται περιστοιχισμένα από περικύτταρα τα οποία εμποδίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και εκκρίνουν σηματοδοτικούς παράγοντες επιβίωσης όπως ο VEGF και η ANG-1(102).

Όταν ένα αγγείο σε αδράνεια, εντοπίζει ένα αγγειογενετικό σήμα, όπως ο VEGF, ο VEGF-C, η ANG-2, οι FGFs ή χημειοκίνες, το οποίο ελευθερώνεται από ένα περιβάλλον υποξίας, φλεγμονής, ή καρκινικών κυττάρων, πρώτα τα περικύτταρα αποκολλώνται από τα τοιχώματα του αγγείου (απόκριση στην ANG-2) και ελευθερώνονται από τη βασική μεμβράνη με πρωτεολυτική αποδιάταξη η οποία μεσολαβείται από τη δράση μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Τα ενδοθηλιακά



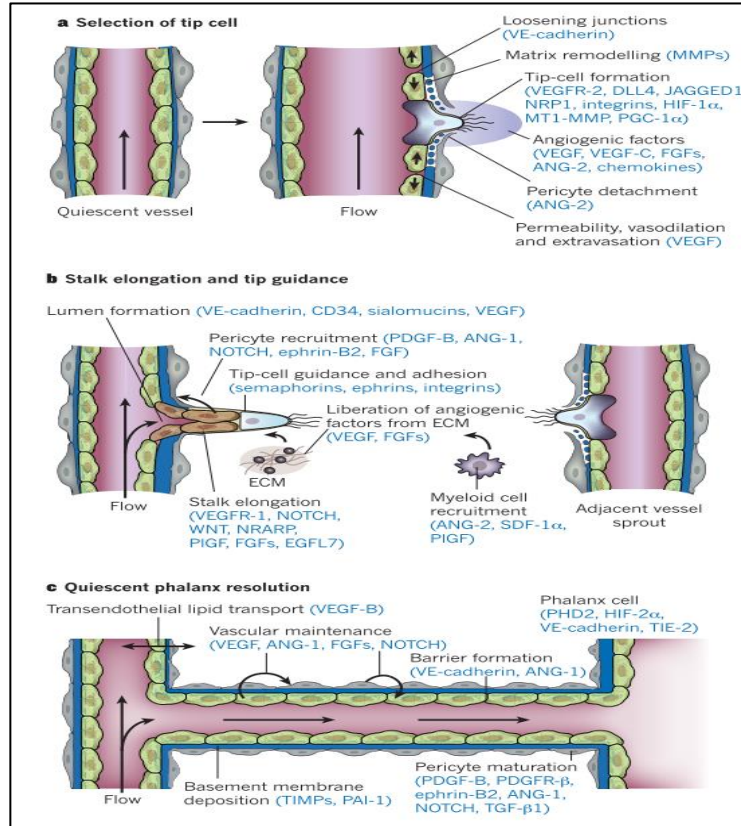
**Εικόνα 16. Οι διαφορετικές μορφές σχηματισμού αγγείων.** Υπάρχουν διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους μπορούν τα αγγεία να σχηματιστούν σε κανονικούς και καρκινικούς ιστούς. **a.** Ο σχηματισμός αγγείων μπορεί να γίνει μέσω της αγγειογένεσης με εκβλάστηση (sprouting). **b.** Με τη χρήση προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά κύτταρα. **c.** Μέσω της διαδικασίας που καλείται αγγειακή μυογένεση. **d.** Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκμεταλλευτούν ήδη προϋπάρχοντα αγγεία. **e.** Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν αγγεία από ήδη υπάρχοντα καρκινικά κύτταρα (αγγειακή μίμηση). **f.** Τα καρκινικά αγγεία μπορεί να προκύψουν και από ενδοθηλιακά κύτταρα με κυτταρογενετικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματά τους, προερχόμενα από καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Σε αντίθεση με τα υγιή κύτταρα τα οποία μπορούν να χρησιμοποιήσουν τους τρεις πρώτους τρόπους για την αγγειογένεση, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιήσουν και τους έξι τρόπους για το σχηματισμό αγγείων (Carmeliet και Jain, 2011).

κύτταρα χαλαρώνουν τους δεσμούς τους και το νέο αγγείο διαστέλλεται. Ο VEGF, αυξάνει τη διαπερατότητα του στρώματος των ενδοθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες του πλάσματος να δημιουργήσουν εξωκυττάρια ουσία (ECM) ως ικρίωμα. Στη συνέχεια, ως απάντηση στη δράση ιντεγκρινών, ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν στην επιφάνεια της ECM. Πρωτεάσες, ελευθερώνουν από την ECM αγγειογενετικούς παράγοντες όπως ο VEGF και ο FGF

και έτσι δημιουργείται ένα μικροπεριβάλλον ικανό για αγγειογένεση. Για τη δημιουργία του αυλού και την αποφυγή της κατάρρευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων προς το αγγειογενετικό σήμα, ένα ενδοθηλιακό κύτταρο που ονομάζεται ακροκύτταρο (tip cell), επιλέγεται να οδηγήσει το σχηματισμό του αυλού με την παρουσία υποδοχέων του VEGF, neuropilins (NRPs) και των προσδετών του NOTCH, DLL4 και JAGGED1 (Εικόνα 17a). Τα γειτονικά κύτταρα στα ακροκύτταρα, αποκτούν επικουρικό ρόλο ως στελεχιαία και διαιρούνται για να επιμηκύνουν (με τη δράση του NOTCH, των WNTs, του PlGF και του FGF) και να σχηματίσουν τον αυλό (lumen), ο οποίος ελέγχεται από τη VE-cadherin, τον CD34, τις sialomucins, τον VEGF και το hedgehog (Εικόνα 17b). Τα κύτταρα κορυφής, διαθέτουν φιλοπόδια, τα οποία εντοπίζουν ερεθίσματα από το περιβάλλον όπως οι ephrins και οι semaphorins ενώ τα στελεχιαία κύτταρα (stalk cells) απελευθερώνουν μόρια όπως η EGFL7 στην ECM για να αποκτήσουν πληροφορίες σχετικά με τις θέσεις των γειτόνων μορίων και να επιμηκυνθεί ο κορμός. Μυελώδη κύτταρα βοηθούν την ένωση και το σχηματισμό του αυλού με ένα άλλο αγγειακό κλαδί και έτσι επιτρέπεται η ροή του αίματος. Για να είναι ένα αγγείο λειτουργικό θα πρέπει να ακολουθηθεί και η διαδικασία ωρίμανσης (Εικόνα 17c). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανακτούν τη αρχική αδρανή μορφή τους και σηματοδοτούν μέσω του PDGF-B, της ANG-1, του TGF- $\beta$ , της ephrin-B2 και του NOTCH προκαλούν την επικάλυψη των ενδοθηλιακών κυττάρων με περικύτταρα. Τέλος, αναστολείς πρωτεασών (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs και plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), προκαλούν την εναπόθεση της βασικής μεμβράνης, την επαναδημιουργία των δεσμών μεταξύ των κυττάρων με αποτέλεσμα την ιδανική ροή αίματος.

#### 1.6.2.γ. Ο ρόλος της Ασύμμετρης Κυτταρικής Διαίρεσης στην αγγειογένεση

Σε πρόσφατες *in vivo* μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο πειραματικό μοντέλο των zebrafish φαίνεται πως η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση παίζει ρόλο κατά την αγγειογένεση (108). Κατά την επέκταση του αγγειακού αυλού και καθώς τα κύτταρα του αυλού διαιρούνται, υπάρχει διαφορετικός μετά-μιτωτικός καθορισμός των κυτταρικών χαρακτηριστικών όπου από τα θυγατρικά κύτταρα τα οποία προκύπτουν αυτό που είναι σε επαφή με τον κορμό διατηρεί τις ιδιότητες των στελεχιαίων κυττάρων ενώ το θυγατρικό κύτταρο το οποίο είναι μακρύτερα στον αυλό αποκτά ιδιότητες ακροκυττάρου. Αυτό φαίνεται να είναι μια ενδογενής ιδιότητα των ενδοθηλιακών κυτταρικών διαίρεσεων καθώς η αποσιώπηση της πρωτεΐνης *dll4* της σηματοδότησης του NOTCH δεν επηρέασε τον τρόπο που διαιρούνται τα κύτταρα αλλά την



**Εικόνα 17. Η μοριακή βάση για το σχηματισμό του αυλού.** Τα στάδια για την δημιουργία του αγγειακού αυλού παρουσιάζονται μαζί με τους μοριακούς παράγοντες που συμμετέχουν στη διαδικασία. **a.** Μετά την επαγωγή με αγγειογενετικούς παράγοντες, το αδρανές αγγείο διαστέλλεται και ένα ακροκύτταρο επιλέγεται για οδηγήσει το σχηματισμό του αυλού. **b.** Το ακροκύτταρο κινείται ως απόκριση σε σήματα καθοδήγησης προς την εξωκυττάρια ύλη και μεταναστεύει, ενώ τα στελεχειαία κύτταρα πίσω από αυτό πολλαπλασιάζονται, επιμηκύνονται και σχηματίζουν τον αυλό ενώ οι εκβλαστήσεις από τα αγγεία ενώνονται για να σχηματίσουν το νέο άωρο αγγείο. **c.** Μετά το σχηματισμό του άωρου αγγείου, ακολουθεί η ωρίμανσή του όπου επανασηματίζονται οι δεσμοί μεταξύ των κυττάρων, η εναπόθεση της βασικής μεμβράνης, η κάλυψη με περικύτταρα και η παραγωγή σημάτων συντήρησης του αγγείου.

κινητικότητα τους με τα κύτταρα όπου είχε αποσιωπηθεί η dll4 να έχουν υψηλότερη κινητικότητα και συνεπώς σε κάποιες περιπτώσεις να αντικαθιστούν τα στελεχειαία κύτταρα.

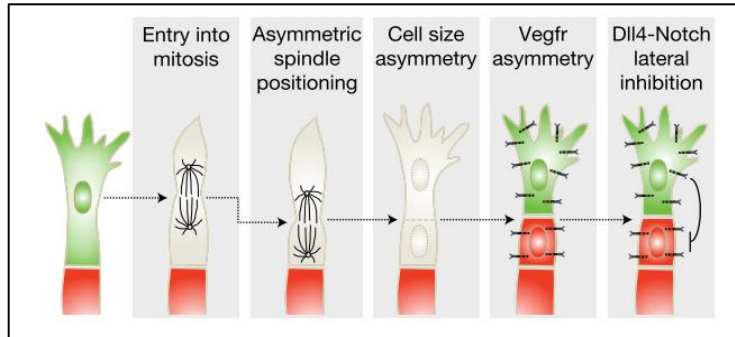
Η ασύμμετρη τοποθέτηση της μιτωτικής ατράκτου είναι γνωστό ότι οδηγεί την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (9), (110). Στην περίπτωση των ακροκυττάρων και ενώ στην αρχή η μιτωτική άτρακτος λαμβάνει κεντρική θέση, κατά τη μετάφαση γίνεται μετακίνηση της μιτωτικής ατράκτου προς την εγγύτατη πλευρά του προς διαίρεση ακροκυττάρου. Κατά συνέπεια το πεδίο της



κυτταρικής διαίρεσης του κυττάρου κορυφής ήταν μετατοπισμένο και έδωσε θυγατρικά κύτταρα διαφορετικού μεγέθους. Σε συνέπεια με την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση στα βλαστοκύτταρα και στα προγονικά κύτταρα, η πολικότητα στην τοποθέτηση της μιτωτικής ατράκτου δίνει ασύμμετρα θυγατρικά κύτταρα κατά τη διαίρεση των ακροκυττάρων (108).

Περαιτέρω μελέτη με τη χρήση υπολογιστικού μοντέλου έδειξε πως εκτός από την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση που έχει ως συνέπεια θυγατρικά κύτταρα διαφορετικού μεγέθους, κατά τη διαίρεση των κυττάρων, αυτά τα οποία αποκτούν την ιδιότητα ως κύτταρα κορμού έχουν διαφορετική έκφραση του VEGFR σε σχέση με αυτά τα οποία διατηρούν την ιδιότητα τους ως ακροκύτταρα. Πειραματικά, με τη χρήση του ομολόγου του VEGFR στο zebrafish (kinase insert domain receptor-like, kdrl), επιβεβαιώθηκε η πρόβλεψη του υπολογιστικού μοντέλου καθώς η έκφραση του kdrl ήταν διαφορετική στα στελεχιαία κύτταρα σε σχέση με τα ακροκύτταρα. Τα ακροκύτταρα παρουσιάζουν υψηλότερη έκφραση του kdrl ενώ τα στελεχιαία χαμηλότερη. Όταν έγινε αποσιώπηση του kdrl, παρότι οι κυτταρικές διαιρέσεις συνέχισαν να δίνουν κύτταρα με διαφορετικό μέγεθος, τα ακροκύτταρα που προέκυπταν είχαν την κινητική παρόμοια με τα στελεχιαία, δηλώνοντας πως η ασύμμετρη έκφραση του kdrl μετά την μίτωση είναι υπεύθυνη για να επανακαθορίσει το ρόλο του ακροκυττάρου μετά την κυτταρική διαίρεση έτσι ώστε να συνεχιστεί η κυτταρική μετανάστευση και η ορθή δημιουργία του αγγειακού δικτύου (108).

Στο ραχιαίο αγγείο στα zebrafish επίσης, παρατηρείται ασύμμετρη κυτταροκίνηση με σκοπό τη δημιουργία του αγγείου. Κατά την επέκταση του αυλού, η ακτίνη και τα δαχτυλίδια της ακτινομυοσίνης, τοποθετούνται στο κύτταρο ασύμμετρα, με τη θέση του να είναι πιο κοντά στις διακυτταρικές ενώσεις με αποτέλεσμα μια ασύμμετρη κυτταροκίνηση (110). Περαιτέρω ενδείξεις σχετικά με την ύπαρξη ασυμμετρίας κατά την αγγειογένεση υπάρχουν και στο πειραματικό μοντέλο της *Drosophila melanogaster*. Αγγεία από την τραχεία έχει δείχτεί να έχουν επίσης ασύμμετρη κυτταροκίνηση (111). Στην περίπτωση αυτή όπως και στο zebrafish, το δαχτυλίδι της ακτινομυοσίνης προκάλεσε μια τοπική δυσμορφία του αγγειακού βρόγχου και ακολουθήθηκε από μια μεμβρανική προεκβολή η οποία επεκτεινόταν μέχρι να συναντηθεί με έναν άλλον βρόγχο όπου και έγινε τελικά η ένωση (Εικόνα 18).



**Εικόνα 18.** Το μοντέλο της δράσης της ασύμετρης κυτταρικής διαίρεσης κατά την αγγειογένεση. Το ακροκύτταρο όταν εισέλθει στη μίτωση, τοποθετεί τη μιτωτική άτρακτο κοντά στα στελεχιαία κύτταρα και δίνει γένεση σε θυγατρικά κύτταρα διαφορετικού μεγέθους. Τα κύτταρα αυτά μετά τη μίτωση διαφοροποιούν την έκφραση του VEGFR (*kdrl*) έτσι αποκτούν τον ρόλο του στελεχιαίου κυττάρου και του ακροκυττάρου. Με την αναστολή της δράσης της *dll4* του σηματοδοτικού μονοπατιού του NOTCH μειώνεται η κινητικότητα του στελεχιαίου κυττάρου και οριστικοποιείται ο ρόλος τους στην δημιουργία του αγγείου (Costa et al., 2016)

## ΣΚΟΠΟΣ

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση ενός μητρικού κυττάρου παράγει θυγατρικά κύτταρα εγγενώς προγραμματισμένα να ακολουθήσουν διαφορετικές αναπτυξιακές πορείες. Στην περίπτωση αυτή, συγκεκριμένες πρωτεΐνες, RNA και άλλα μακρομόρια κατανέμονται ασύμμετρα στην μία πλευρά του υπό διαίρεση κυττάρου με διάφορες διαδικασίες. Έτσι, το θυγατρικό κύτταρο που έχει τους προαναφερθέντες παράγοντες θα ακολουθήσει διαφορετική αναπτυξιακή πορεία από το άλλο δίνοντας στα βλαστικά κύτταρα την μοναδική τους ικανότητα να αυτοανανεώνονται, ενώ παράλληλα διατηρούν το πλήρες αναπτυξιακό δυναμικό τους. Εν τούτοις, οι παράγοντες και οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν την σύνθετη αυτή διεργασία στα θηλαστικά παραμένουν άγνωστοι. Το ίδιο ισχύει εκτός από τα βλαστικά κύτταρα και στους μηχανισμούς της δημιουργίας του δέρματος, της αγγειογένεσης αλλά και στον καρκίνο.

Η RhoD είναι μια GTPάση, η οποία εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη και στα πρώιμα ενδοσώματα. Φαίνεται πως αλλάζει το μεμβρανικό δυναμικό στο ενδοκυτταρικό μονοπάτι ενώ μελέτη του εργαστηρίου έδειξε πως η μόνιμα ενεργή μορφή (RhoDG26V) προκαλεί αύξηση του πολλαπλασιασμού και διατάραξη της διαφοροποίησης του υπερβασικού στρώματος της επιδερμίδας κάτι που είναι συμβατό με αλλαγή του μοτίβου της κυτταρικής διαίρεσης από ασύμμετρη σε συμμετρική. Με βάση τις παραπάνω ενδείξεις, οι **στόχοι** της διατριβής ήταν:

- Η γονιδιακή αποσιώπηση του **RHOD** γονιδίου, με τη χρήση της τεχνολογίας CRISPR/Cas9 για τη χρήση της σε δοκιμές κυτταρικής διαίρεσης και διαφοροποίησης στα βλαστικά κύτταρα
- Ο έλεγχος της επίδρασης **της απάλειψης** της RhoD στην αγγειογένεση και η ενδεχόμενη συσχέτισή της με τις ΑΚΔ που συμβαίνουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα
- Η δημιουργία ενός μοντέλου τεχνητού δέρματος για τη μελέτη της συσχέτισης **της απάλειψης** της RhoD κατά την κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση στις ανώτερες στιβάδες του δέρματος
- Η συσχέτιση της γονιδιακής αποσιώπησης του **RHOD** γονιδίου **με την πολλαπλασιαστική και μεταναστευτική** ικανότητα των καρκινικών κυττάρων και τη **συμμετρία της διαίρεσης**.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Κυτταροκαλλιέργεια

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές κυτταρικές σειρές, ανάλογα με τις πειραματικές διατάξεις που απαιτήθηκαν. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν εμβρυϊκά κύτταρα από νεφρό ανθρώπου (Human Embryonic Kidney cells) HEK293 (HEK 293A, HEK 293T, HEK 293F), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM High Glucose, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, Thermofisher Scientific) θερμικά απενεργοποιημένο, 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραιώση 1 προς 4, περίπου κάθε 3 ημέρες.

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 10cm στα οποία είχε προηγηθεί επώαση με κολλαγόνο αρουραίου, τύπου I (Corning) για 30 λεπτά. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199, εμπλουτισμένο με 20% FBS, 0.5 mg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 0.15 units/ml ηπαρίνης (H-3149, Sigma-Aldrich), 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα μεικτού πληθυσμού (τουλάχιστον 5 δότριες ανά απομόνωση) από γενιά 1 ως 3 και η διασπορά γινόταν σε αραιώση 1 προς 3, περίπου κάθε 2 ημέρες.

Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα του μαστού (MDA-MB 468), καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM High Glucose, εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, Thermofisher Scientific) θερμικά απενεργοποιημένο, 100 units/ml πενικιλίνη και 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου καλλιέργειας, γινόταν διασπορά των κυττάρων σε αραιώση 1 προς 4, περίπου κάθε 3 ημέρες.

Η καλλιέργεια των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Human Embryonic Stem Cells, hESCs) γίνεται στο θρεπτικό υλικό mTeSRTM1 (Stem Cell Technologies). Πρόκειται για ένα πλήρως χημικώς καθορισμένο μέσο, απαλλαγμένο από ξενοβιοτικούς παράγοντες και ορό ζώων. Τα μεσεγχυματικά κύτταρα που απομονώθηκαν από λιπώδη ιστό, (Mesenchymal Stem

Cells, MSCs) καλλιιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό ADSC (Lonza). Τα κερατινοκύτταρα τα οποία διαφοροποιήθηκαν από hESCs (K-hESCs) καλλιιεργήθηκαν σε χημικά καθορισμένο μέσο DKSFM (Gibco, Thermofisher Scientific).

Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες ήταν ελεύθερα ενδοτοξινών. Τα κύτταρα ελέγχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα για μυκόπλασμα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα ελέγχονταν επιπλέον για την παρουσία ενδοθηλιακών δεικτών. Ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37°C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα τύπου HUVEC, απομονώθηκαν από τη φλέβα ομφάλιων λώρων νεογνών σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τους Jaffe και τους συνεργάτες του (112). Μέχρι την επεξεργασία τους οι ομφάλιοι λώροι διατηρήθηκαν σε διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) και στον πάγο. Εντοπίστηκε η φλέβα με ψηλάφηση και πλύθηκε το εσωτερικό της φλέβας με PBS. Στη συνέχεια τα άκρα του λώρου κρατήθηκαν κλειστά με τη βοήθεια βαλβίδων τριών σημείων (three way stop cocks, πεταλούδες), οι οποίες δέθηκαν με τη χρήση χειρουργικού νήματος. Στη συνέχεια οι λώροι πλύθηκαν εκ νέου με PBS μέχρι να απομακρυνθεί όλο το αίμα από τη φλέβα. Με τη βοήθεια σύριγγας η φλέβα διαποτίστηκε με τον μέγιστο δυνατό όγκο με 0,1% διάλυμα κολλαγενάσης σε PBS (Collagenase Type I, Sigma) και στη συνέχεια οι λώροι επώαστηκαν στους 37°C για 12 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν από το εσωτερικό της φλέβας με τη χρήση θρεπτικού μέσου M199 εμπλουτισμένο με 5% FBS και φυγοκεντρήθηκαν στα 1100g για 5 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας M199 σε τρυβλίο 10cm στο οποίο είχε γίνει επώαση με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I για 30 λεπτά.

### 2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA και με SiRNAs

Για την εκπόνηση της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές κυτταρικές σειρές για την κάθε πειραματική διαδικασία. Για τη διαμόλυνση των κυτταρικών σειρών χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές μέθοδοι. Για τη διαμόλυνση των κυττάρων HEK293F και HEK293T σε δοκιμές ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η Lipofectamine® 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific)

με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε στις εν λόγω κυτταρικές σειρές για τις δοκιμές ανοσοκατακρήμνισης αλλά και για την παραγωγή των επιθυμητών λέντι-ιών, διαμόλυνση με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου ( $\text{CaCl}_2$ ). Συγκεκριμένες ποσότητες DNA, ανάλογα με τη πειραματική διάταξη, αναμείχθηκαν με διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  2M με τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 0.5M. Στη συνέχεια ίσος όγκος διαλύματος HBS 2X (50mM HEPES, 1.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 280mM NaCl, pH 7.05) προστέθηκε στο μείγμα DNA/ $\text{CaCl}_2$  και επώαστηκε για 15 λεπτά πριν γίνει προσθήκη του στα κύτταρα στάγδην. Για τη διαμόλυνση κυττάρων HUVEC χρησιμοποιήθηκε το λιπόσωμα Metafectene Pro (Biontex) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή σε θρεπτικό μέσο M199 εμπλουτισμένου με 5% FBS, ενώ μετά από 3,5 ώρες επώασης του μείγματος DNA/λιποσώματος έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου σε πλήρες μέσο καλλιέργειας.

Για την διαμόλυνση των κυττάρων HUVEC με μικρά παρεμβαλόμενα RNAs (SiRNAs) χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο Lipofectamine® RNAiMax (Thermo Fisher Scientific) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η αραίωση των αντιδραστηρίων έγινε σε θρεπτικό μέσο χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό OptiMEM I (Thermo Fisher Scientific). Η τελική συγκέντρωση των SiRNA που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20nM ενώ χρησιμοποιήθηκε και SiRNA ελέγχου (scrambled) σε κάθε δοκιμή. Τα κύτταρα στο τρυβλίο καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο OptiMEM I και μετά από 5 ώρες γινόταν αλλαγή θρεπτικού μέσου σε πλήρες μέσο καλλιέργειας M199. Τα κύτταρα επωάζονταν σε κλίβανο (37°C και 5%  $\text{CO}_2$ ), από 24 ως 72 ώρες πριν τη χρήση τους για τις εκάστοτε πειραματικές διεργασίες.

### 2.4 Ολική απομόνωση RNA

Για τον έλεγχο της πιστότητας των διαδικασιών SiRNA καθώς και για τον έλεγχο της πορείας των διαφοροποιήσεων της παρούσας διατριβής το συνολικό RNA των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν απομονώθηκε με τη χρήση εμπορικού προϊόντος NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) και με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα μετρήθηκε με τη χρήση του μηχανήματος NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Με τη χρήση του παραπάνω μηχανήματος ήταν εφικτή και ελέγχθηκε η ποιότητα του RNA που απομονώθηκε μέσω του λόγου απορρόφησης των δειγμάτων στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280nm. Τα δείγματα των οποίων ο λόγος μετρήθηκε μεταξύ 1.8-2.0 θεωρήθηκαν υψηλής καθαρότητας.

### 2.5 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR)

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR) επιτυγχάνει τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Στο αρχικό της βήμα, με την παρουσία ενός μίγματος αντίστροφων μεταγραφασών (Omniscript και Sensiscript) επιτυγχάνεται η παραγωγή του συμπληρωματικού DNA (cDNA) από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA). Εν συνεχεία, πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός του υπό μελέτη τμήματος DNA με τη χρήση των ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών για το γονίδιο του ενδιαφέροντος και της HotStarTaq DNA πολυμεράσης, η οποία έχει την ιδιότητα να μην είναι ενεργή σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενώ η ενεργοποίησή της γίνεται στη θερμοκρασία των 95°C. Επιπλέον, στην αντίδραση είναι παρούσα και η χρωστική SYBR Green I, η οποία συνδέεται στο δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορίζον σήμα το οποίο ανιχνεύεται από τον θερμοκυκλοποιητή. Ο κύκλος στην αντίδραση στον οποίο παρατηρείται φθορισμός μεγαλύτερος του βασικού φθορισμού (Threshold Cycle, Ct) είναι εξαρτώμενος, με αντιστρόφως ανάλογη σχέση, από την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου.

Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος QuantiTest SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen), single step και με τη χρήση του μηχανήματος Roche LightCycler 2.0. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μείγμα που περιείχε 50ng RNA, αραιωμένου σε συγκέντρωση 25ng/μl, 1X SYBR Green διαλύματος (5X), 0.1μl RT mix ένζυμο και H<sub>2</sub>O μέχρι τον τελικό όγκο των 10μl. Το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν ελεύθερο νουκλεασών (DNase, RNase free ddH<sub>2</sub>O). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών (ανοδικών και καθοδικών) τα οποία σχεδιάστηκαν ειδικά για τα γονίδια του ενδιαφέροντος και η αγορά τους έγινε από τη Eurofins Genomics με τη μέθοδο καθαρισμού HSPF. Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και το πρωτόκολλο της αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1 και στον Πίνακα 2

*Πίνακας 1. Συνθήκες αντίδρασης qRT - PCR*

<b>Βήμα της Αντίδρασης</b>	<b>Θερμοκρασία</b>	<b>Χρόνος</b>	<b>Κύκλοι</b>
Αντίστροφη Μεταγραφή	50°C	20'	1
Ενεργοποίηση DNA πολυμεράσης	95°C	15'	1
Άνοιγμα της διπλής έλικας (Denaturation)	95°C	15''	45
Πρόσδεση των εκκινητών (Annealing)	55 – 60°C	20''	
Επιμήκυνση του προϊόντος (Extension)	72°C	30''	

Πίνακας 2. Λίστα εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα Γονιδίου	Αλληλουχία εκκινητών			
	Forward	5'		3'
RhoD	Forward	5'	GAGCGGTACATGGTCAACCT	3'
	Reverse	5'	CTTCTGGGTACCACCGGTTA	3'
Keratin 5 (K5)	Forward	5'	ATCTCTGAGATGAACCGGATGATC	3'
	Reverse	5'	CAGATTGGCGCACTGTTTCTT	3'
Keratin 8 (K8)	Forward	5'	GATCGCCACCTACAGGAAGCT	3'
	Reverse	5'	ACTCATGTTCTGCATCCCAGACT	3'
Keratin 14 (K14)	Forward	5'	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTAC	3'
	Reverse	5'	CACTGTGGCTGTGAGAATCTTGTT	3'
Keratin 18 (K18)	Forward	5'	GAGTATGAGGCCCTGCTGAACATCA	3'
	Reverse	5'	GCGGGTGGTGGTCTTTTGGAT	3'
GAPDH	Forward	5'	GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA	3'
	Reverse	5'	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	3'

## 2.6 Μέθοδος γονιδιακής αποσιώπησης CRISPR/Cas9

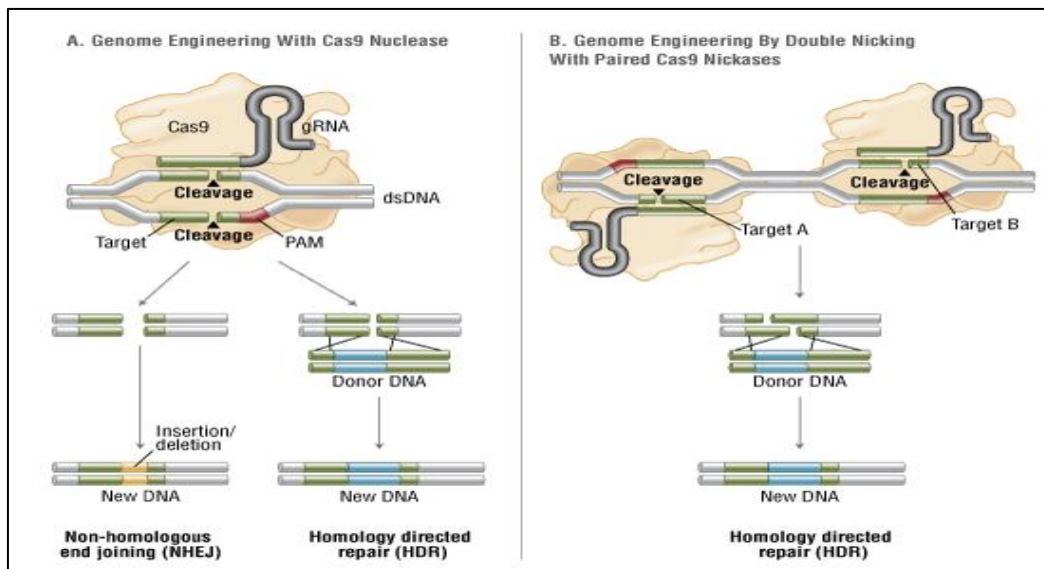
### 2.6.1 Η τεχνολογία CRISPR/Cas9

Η τεχνολογία του CRISPR/Cas9 βασίζεται στο μηχανισμό επίκτητης ανοσίας που αναπτύσσουν ορισμένα βακτήρια και αρχαία και ο οποίος τους επιτρέπει να εξαλείψουν ξένο γενετικό υλικό προερχόμενο από ιούς ή πλασμίδια (113), (114). Το σύστημα του CRISPR χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο μικροβιακό γονιδίωμα, αλλά και αλληλουχίες (spacers) παρόμοιου μήκους, οι οποίες έχουν προέλθει από την ένθεση ξένων γενετικών στοιχείων και οι οποίες παρεμβάλλονται ανάμεσα στις πρώτες. Υπάρχουν 3 διαφορετικοί τύποι του μηχανισμού CRISPR/Cas9 με τον τύπο II να είναι ο περισσότερο μελετημένος (115).

Με τη χρήση του μηχανισμού CRISPR τύπου II, έχει επιτευχθεί γονιδιωματική τροποποίηση τόσο σε *in vitro* αλλά και *in vivo* περιπτώσεις (116), (117), (118). Στις περιπτώσεις στόχευσης ανθρώπινων κυττάρων, χρησιμοποιείται ένα συνθετικό μόριο guide RNA (gRNA) το οποίο συνδυάζει τις φυσικές ιδιότητες των φυσικών μορίων crRNA και tracrRNA, αποτελούμενο από περίπου 20 νουκλεοτίδια, συμπληρωματικά της αλληλουχίας στόχου, και η ενδονουκλεάση Cas9 η οποία καθοδηγούμενη από τα gRNA προκαλεί ρήξη στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA (Double Strand Break, DSB) (119), (120). Οι ρήξεις αυτές επιδιορθώνονται από 2 μηχανισμούς, είτε μέσω της επιδιόρθωσης με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (Non homologous end-joining, NHEJ), είτε με επιδιόρθωση μέσω ομολογίας (Homology directed repair, HDR). Η αλληλουχία στόχος,



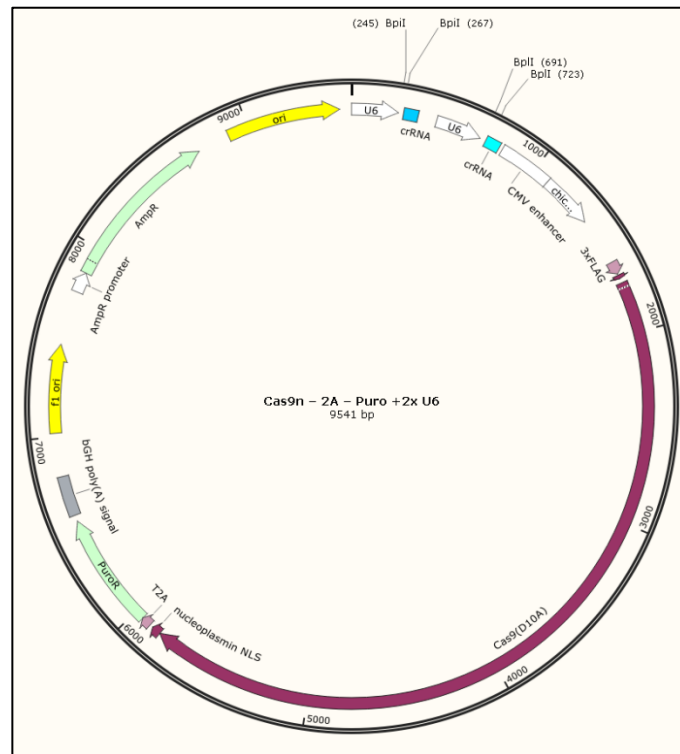
ακολουθείται από το μοτίβο PAM (Protospacer Adjacent motif) (116), (121) το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη στόχευση των αλληλουχιών από την ενδονουκλεάση Cas9. Εκτός από τη φυσικού τύπου Cas9 (Εικόνα 19A) χρησιμοποιούνται και μεταλλαγμένες μορφές. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη ενδονουκλεάση Cas9D10A η οποία έχει την ικανότητα να δρα δημιουργώντας ρήξεις στη μία αλυσίδα του DNA (122). Με τη χρήση της συγκεκριμένης ενδονουκλεάσης δεν ενεργοποιείται ο μηχανισμός επιδιόρθωσης με μη ομόλογη σύνδεση, αλλά η επιδιόρθωση γίνεται μέσω της ομόλογης σύνδεσης (123). Η Cas9D10A είναι ακόμα πιο αποτελεσματική, όταν η στόχευση πραγματοποιείται από ζεύγος συμπλόκων Cas9-gRNA τα οποία έχουν σχεδιαστεί για να δημιουργούν γειτονικές ρήξεις στο DNA (124) (Εικόνα 19B) και το σύστημα αυτό ονομάζεται CRISPR-Cas9 διπλής σχάσης (double nick or dual nickase CRISPR system). Λόγω συμπληρωματικότητας τα gRNAs συνδέονται στην αλληλουχία στόχο ακριβώς δίπλα από το μοτίβο PAM και η σχάση πραγματοποιείται περίπου 3 ζεύγη βάσεων (bps) ανοδικά του μοτίβου PAM.



**Εικόνα 19.** Γονιδιοματική στόχευση μέσω του CRISPR/Cas9. **A.** Η στόχευση του μορίου στόχου γίνεται μέσω ενός συμπλόκου του gRNA και της ενδονουκλεάσης Cas9 φυσικού τύπου και δημιουργεί ρήξεις σε ένα σημείο στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA και οι οποίες επιδιορθώνονται είτε με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (HDR) είτε με μη ομόλογη σύνδεση άκρων (NHEJ). **B.** Η στόχευση του μορίου στόχου γίνεται μέσω ενός ζεύγους gRNAs και μεταλλαγμένων Cas9 (Cas9D10A) τα οποία προκαλούν γειτονικές ρήξεις στη μια αλυσίδα του DNA και η επιδιόρθωση γίνεται μέσω ομόλογης σύνδεσης άκρων (HDR). (<https://international.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>)

### 2.6.2 Πλασμιδιακοί Φορείς,

Για να επιτευχθεί η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας Cas9n-2A-Puro/2x U6-gRNA (Εικόνα 20) ο οποίος κατασκευάστηκε στο εργαστήριο μας και είναι ένας υβριδικός πλασμιδιακός φορέας προερχόμενος από 2 διαφορετικούς εμπορικά διαθέσιμους πλασμιδιακούς φορείς, τους pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) (#48141) (125) και pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin (#51133) (126) της εταιρείας Addgene (Εικόνα 21A και Εικόνα 21B). Ο φορέας που παράχθηκε περιέχει 2 θέσεις κλωνοποίησης για τη δέσμευση των

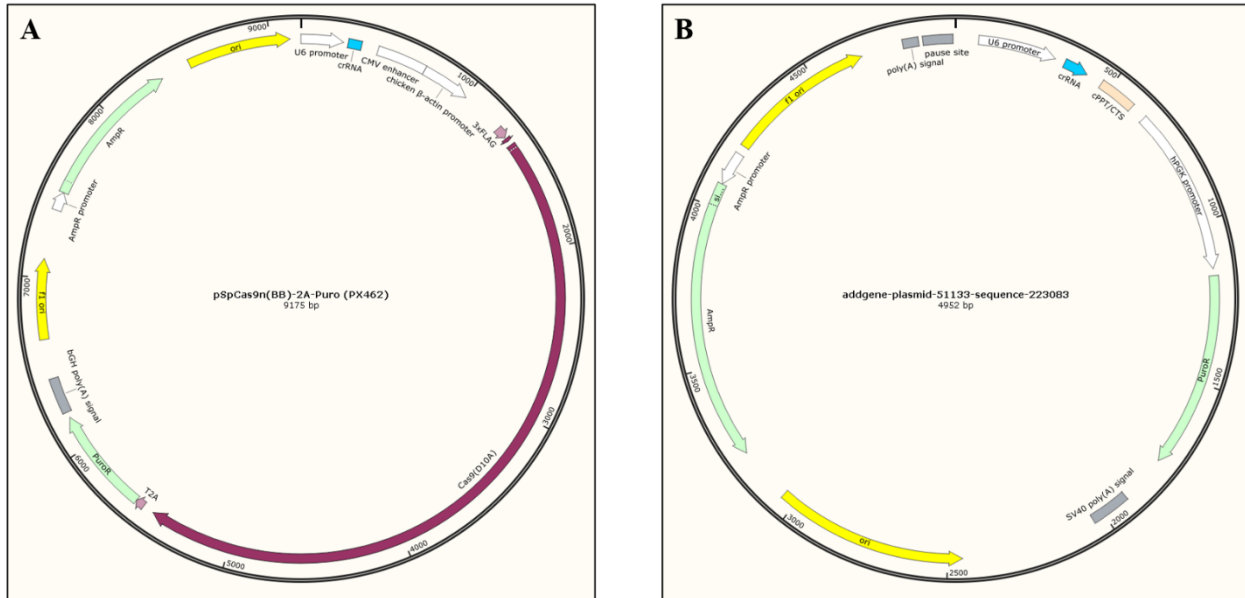


**Εικόνα 20.** Χάρτης του υβριδικού πλασμιδιακού φορέα Cas9n-2A-Puro/2x U6. Στο χάρτη σημειώνονται οι θέσεις κοπής των ενζύμων BpI I και BpI I μεταξύ των έγινε η εισαγωγή των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στα 2 gRNAs. Τα δύο gRNAs σχεδιάστηκαν ειδικά για να περιλαμβάνουν ελεύθερα άκρα για τα παραπάνω ένζυμα.

gRNAs που θα δημιουργήσουν τη διπλή σχάση σε 2 διαφορετικούς υποκινητές U6. Οι δύο αυτές θέσεις περιλαμβάνουν σημεία κοπής με τα περιοριστικά ένζυμα BpI I και BpI I. Επίσης, ο φορέας φέρει το γονίδιο έκφρασης της μεταλλαγμένης Cas9D10A προερχόμενη από τον οργανισμό *S. pyogenes* καθώς και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό πουρομυκίνη (Puromycin). Πιο συγκεκριμένα από τον πλασμιδιακό φορέα της Εικόνα 21B το τμήμα που ελέγχει την έκφραση του υποκινητή U6 είναι αυτό που κλωνοποιήθηκε πρώτα στον φορέα PCR-Blunt με το εμπορικό προϊόν Zero Blunt™ PCR Cloning Kit (ThermoFisher Scientific) και στη συνέχεια με τη χρήση

του περιοριστικού ενζύμου XbaI, στον px462 (Εικόνα 21A) με αποτέλεσμα να προκύψει ο φορέας της Εικόνα 20.

### 2.6.3 Δημιουργία μονόκλωνων εκκινητών και ο υβριδισμός τους σε δίκλιωνα gRNAs (Annealing of Oligos)



**Εικόνα 21.** Χάρτες των 2 αρχικών πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του τελικού υβριδικού φορέα Cas9n-2A-Puro/2x U6. **A.** Ο πλασμιδιακός φορέας -px462 (<https://www.addgene.org/48141/>) **B.** Ο πλασμιδιακός φορέας pGL3-U6-sgRNA-PGK-puromycin (<https://www.addgene.org/51133/>)

Για να δημιουργηθούν τα gRNAs τα οποία εν συνεχεία θα στόχευαν το γονίδιο της RhoD, σχεδιάστηκαν 2 ζεύγη εκκινητών (oligos) 32 (gRNA1) και 24 (gRNA2) νουκλεοτιδικών βάσεων αντίστοιχα με τη χρήση του διαδικτυακού εργαλείου σχεδιασμού gRNAs ATUM-CRISPR design tool (<https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input>). Οι εκκινητές αγοράστηκαν από την εταιρεία Eurofin Genomics (Γερμανία) και δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο καθαρισμού HPSF. Στον σχεδιασμό (Πίνακας 3) του gRNA1 τοποθετήθηκαν αλληλουχίες συμπληρωματικές των ελευθέρων άκρων που προκύπτουν μετά την κοπή του φορέα με το περιοριστικό ένζυμο BpiI (σημειωμένα με κόκκινο) ενώ στο σχεδιασμό του gRNA2 τοποθετήθηκαν συμπληρωματικές αλληλουχίες για τα ελεύθερα άκρα που προκύπτουν μετά την κοπή του φορέα με το περιοριστικό ένζυμο BpII (σημειωμένα με μπλε).

**Πίνακας 3. Τα gRNAs τα οποία σχεδιάστηκαν για την αποσιώπηση του γονιδίου της RhoD.**

Όνομα Γονιδίου	Αλληλουχία εκκινήτων			
	gRNA1 RhoD	Forward	5'	CACCGGCCTGGGCCGCGTCATCC
Reverse		5'	AAACGGATGACGGCGGCCAAGGCC	3'
gRNA2 RhoD	Forward	5'	AGGAGGCGCCACCAGGCGTGTTTtagagcta	3'
	Reverse	5'	CTAAAACCACGCCTGGTGGCGCCTCCTACCGG	3'

Η διαδικασία υβριδοποίησης των μονόκλωνων νουκλεοτιδίων σε δίκλινα μόρια gRNA πραγματοποιήθηκε σε σωληνάρια κατάλληλα για PCR όπου προστέθηκαν 3 μg από το κάθε ζεύγος νουκλεοτιδίων, 5μl Annealing buffer (100mM Tris-HCl, pH 7.5, 1M NaCl, 10mM EDTA) και προστέθηκε ddH<sub>2</sub>O ως τον τελικό όγκο των 50μl. Στη συνέχεια με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή πραγματοποιήθηκε η αντίδραση στις παρακάτω θερμοκρασίες: 90°C για 4', 70°C για 10', 37°C για 20' και 10°C για 10'.

#### 2.6.4 Σύνδεση άκρων τμημάτων DNA φορέα και ενθέματος (Ligation)

Η ένωση του πλασμιδιακού φορέα Cas9n-2A-Puro/2x U6-gRNA με τα gRNA1 και gRNA2 πραγματοποιήθηκε σε 2 στάδια. Για την ένωση με το gRNA1 πραγματοποιήθηκε πέψη του φορέα με το ένζυμο BpI (Buffer G) σε τελικό όγκο 10 μl (500ng DNA, 1μl 10X buffer, 1μl ένζυμο και νερό ως τα 10μl) για 1 ώρα στους 37°C και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αντίδραση δεσμοποίησης με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (Thermo Fisher Scientific) η οποία δημιουργεί φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ τμημάτων DNA. Οι συνθήκες που πραγματοποιήθηκε η αντίδραση περιλάμβαναν τη δημιουργία μίγματος που περιείχε 1μl (50ng) του πλασμιδιακού φορέα μετά την πέψη με το περιοριστικό ένζυμο, 7μl του ενθέματος gRNA1, 1μl T4 DNA ligase (5U/ul), 1μl 10x Buffer T4 DNA ligase και συνολικό όγκο 10μl. Σαν δείγμα ελέγχου προετοιμάστηκε μια ίδια αντίδραση αλλά χωρίς τη χρήση ενθέματος. Στη συνέχεια η αντίδραση τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 16°C και ακολούθησε ολονύχτια επώαση. Ακολούθως στο μίγμα έγινε εκ νέου πέψη με το ένζυμο BpI (Buffer G) και δεσμοποίηση με το gRNA2 με την ίδια πειραματική ακολουθία όπως και με το gRNA1.

#### 2.6.5 Βακτηριακός Μετασχηματισμός (Transformation)-Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA

Μετά τη σύνδεση των τμημάτων του DNA φορέα και ενθέματος έγινε βακτηριακός μετασχηματισμός των εν λόγω πλασμιδίων σε βακτηριακά στελέχη DH10B. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάμιξη 100μl δεκτικών βακτηρίων DH10B με συνολική ποσότητα 5-10ng

πλασμιδιακού DNA και το μίγμα επώαστηκε για 20 λεπτά στον πάγο. Ακολούθησε θερμικό σοκ για 4 λεπτά στους 42°C. Στο μίγμα προστέθηκε 1ml θρεπτικού υλικού LB (10 g/L Τρυπτόνη, 5 g/L εκχύλισμα ζύμης, 5 g/L NaCl). Το ίδιο έγινε και σε βακτήρια στα οποία δεν προστέθηκε DNA σαν κύτταρα ελέγχου. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια επιστρώθηκαν 100μl από τη βακτηριακή καλλιέργεια σε τρυβλία με LB, παρουσία του κατάλληλου αντιβιοτικού ανάλογα με τον κάθε πλασμιδιακό φορέα, με τη χρήση καυτηριασμένου μικροβιολογικού κρίκου. Την επόμενη ημέρα έγινε επιλογή των αποικιών που αναπτύχθηκαν με τη χρήση αποστειρωμένου tip. Οι αποικίες που επιλέχθηκαν τοποθετήθηκαν σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου LB με αντιβιοτικό ανάλογα με τη διαδικασία απομόνωσης που θα ακολουθούσε. Στην περίπτωση απομόνωσης DNA από μικρής κλίμακας καλλιέργεια (miniprep) χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) ενώ στην περίπτωση απομόνωσης του DNA από καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας (maxiprep) χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό kit NucleoBond® Xtra Midi/Maxi (MACHEREY-NAGEL).

### ***2.6.7 Διαμόλυνση κυττάρων και επιλογή θετικών κλώνων***

Για τη διαμόλυνση με το πλασμίδιο Cas9n-2A-Puro/2x U6 + 2 RhoD guides, κύτταρα HEK293A επιστρώθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 6 φρεατίων σε συνολικό αριθμό 100.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα ακολούθησε διαμόλυνση με τη χρήση του αντιδραστηρίου Lipofectamine® 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) με βάση το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Ως δείγμα ελέγχου ήταν τα κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση με κάποιο πλασμίδιο. Μετά από 24 ώρες επώασης, προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό το αντιβιοτικό puromycin σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για 72 ώρες γινόταν ανανέωση του αντιβιοτικού και η επιλογή των θετικών κλώνων έγινε όταν όλα τα κύτταρα στο δείγμα ελέγχου ήταν νεκρά. Στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το πιάτο και αραιώθηκαν σε θρεπτικό μέσο σε τελική συγκέντρωση 1 κύτταρο/100μl και στρώθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 96 φρεατίων με σκοπό την ανάπτυξη θετικών αποικιών προερχόμενα από ένα κύτταρο. Η πιστότητα της απενεργοποίησης της πρωτεΐνης RhoD στους θετικούς κλώνους ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά western και οι κλώνοι επιλέχθηκαν και κατασκευάστηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές.

### 2.7 Συν-ανοσοκατακρήμνιση (Co-Immunoprecipitation, CoIP)

Για τον έλεγχο της άμεσης αλληλοεπίδρασης της RhoD με τις πρωτεΐνες SMAD2 και SMAD4, έγινε η δοκιμασία της συν-ανοσοκατακρήμνισης (CoIP). Για την εν λόγω δοκιμασία κύτταρα HEK293A, στρώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 60mm μέχρις πληρότητας περίπου 60% και στη συνέχεια διαμολύνθηκαν με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου ( $\text{CaCl}_2$ ). Κατά τη διαδικασία παρασκευάζεται ένα μίγμα το οποίο περιέχει 12μg των DNA του ενδιαφέροντος σε αναλογίες που εγγυώνται την σχετικά όμοια έκφραση τους στα κύτταρα. Επίσης, προστέθηκαν 25μl  $\text{CaCl}_2$  και συμπληρώθηκε όγκος νερού εγκεκριμένου για κυτταροκαλλιέργεια μέχρι τον όγκο των 200μl. Στο μίγμα προστέθηκε στάγδην ίσος όγκος 2X HBS pH 7.1 (10mM D-Glucose, 40mM HEPES, 10mM KCl, 270mM NaCl, 1.5mM  $\text{H}_2\text{HPO}_4$  σε νερό) και ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά. Το μίγμα προστέθηκε στα κύτταρα τα οποία και επώαστηκαν για 48 ώρες.

Μετά την πάροδο της επώασης τα κύτταρα εκπλύθηκαν με PBS και στη συνέχεια ακολούθησε η λύση τους με διάλυμα λύσης το οποίο περιείχε δις απεσταγμένο νερό, 50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Igepal X (Sigma-Aldrich), 10% γλυκερόλη και ταμπλέτα αναστολέα πρωτεασών (Roche). Η λύση των κυττάρων έγινε με ήπια χρήση σύριγγας ινσουλίνης 2 ml. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση στον πάγο για 20 λεπτά και φυγοκέντρωση στις 13200rpm για 20 λεπτά. Στη συνέχεια 5μl χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του κυτταρικού εκχυλίσματος, ενώ το υπόλοιπο δείγμα προστέθηκε σε Sepharose G-Beads (GE Healthcare) για την αφαίρεση παραγόντων που μπορεί να προκαλούσαν μη ειδική δέσμευση και επώαστηκε για 1 ώρα στους 4°C. Μετά το πέρας της επώασης, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1200rpm για 2 λεπτά και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Το μίγμα χωρίστηκε ισόποσα σε μέρη με συγκέντρωση 400μg ανά δείγμα και το ένα μέρος επώαστηκε με ειδικό πρώτο αντίσωμα για τον επίτοπο της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντος ενώ το δεύτερο επώαστηκε με ολική IgG ως δείγμα ελέγχου η οποία παράχθηκε στο ίδιο είδος με το πρώτο αντίσωμα. Στη συνέχεια, το μίγμα επώαστηκε ολονυχτίως στους 4°C με σκοπό την πρόσδεση του ενδεχόμενου συμπλόκου στο αντίσωμα. Την επόμενη ημέρα τα 2 μίγματα επώαστηκαν για 4 ώρες στους 4°C με σφαιρίδια Sepharose G-Beads για να δεσμευτεί το σύμπλοκο στα σφαιρίδια λόγω ισχυρής συγγένειας με το αντίσωμα επώασης. Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 1200rpm για 1 λεπτό και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Έγιναν συνολικά 5 πλύσεις με το διάλυμα λύσης (3 πλύσεις υπό ανάδευση και 2 στιγμιαίες) και στη συνέχεια τα σφαιρίδια επαναιωρήθηκαν σε μίγμα SDS-Laemlli και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και έλεγχος της

ύπαρξης αλληλοεπίδρασης των υπό μελέτη πρωτεϊνών με ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα ανάλογα με τους επιτόπους που χρησιμοποιήθηκαν.

### 2.8 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα κατά της δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή απομονώθηκαν σε διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε 1% απορρυπαντικό SDS και 100μM αναστολέα πρωτεασών PMSF. Τα δείγματα στη συνέχεια υπέστησαν επεξεργασία με υπερήχους (Branson Digital Sonifier) σε τρεις παλμούς των 10 δευτερολέπτων σε ένταση 13% της συνολικής έντασης του μηχανήματος με ενδιάμεση επώαση στον πάγο για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια επώαστηκαν στους 100°C για 10 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέα σωληνάρια erpendorf. Η συνολική ποσότητα της πρωτεΐνης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid) με το εμπορικό προϊόν Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Για την ποσοτικοποίηση απαιτείται επίσης πρότυπη καμπύλη η οποία σχεδιάστηκε με διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA (2 μg/μl) και η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στα 562nm μετά από 30 λεπτά επώαση στους 37°C.

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή SDS-πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) 12% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Amersham™ Protran™ 0.45 μM NC (GE Healthcare) σύμφωνα με τις διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A laboratory Manual (127). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης στη μεμβράνη οι πρωτεΐνες χρωματίστηκαν με Ponceau S (0.1% Ponceau S, 1% CH<sub>3</sub>COOH) για 5 λεπτά και στη συνέχεια ξεβάφτηκαν με διάλυμα Western (1M Tris pH 7.2, 0.1% Tween 20, 150mM NaCl). Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σκόνη διαλυμένο σε διάλυμα Western για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια οι μεμβράνες επώαστηκαν ολονυχτίως με τα πρώτα αντισώματα σε 5% άπαχο γάλα ή σε 2% ζελατίνη (Gelatin from cold water fish skin) διαλυμένη σε διάλυμα Western. Μετά το τέλος της επώασης οι μεμβράνες ακολούθησαν τρεις δεκάλεπτες πλύσεις υπό ανάδευση με διάλυμα Western. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν για 1 ώρα με δευτερογενή αντισώματα (anti-mouse, anti-rabbit, anti-rat) από την εταιρεία Jackson Immunoresearch Europe Ltd. Τα δευτερογενή αντισώματα ήταν συζευγμένα με την ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Radish Peroxidase, HRP). Η επώαση ακολούθησε από

τρεις δεκάλεπτες πλύσεις όπως προηγουμένως ενώ η εμφάνιση του σήματος έγινε με εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρείας Amersham (GE Healthcare). Τα πρωτογενή αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των δοκιμών της ανοσοαποτύπωσης κατά Western παρουσιάζονται στον Πίνακα 4

*Πίνακας 4. Συγκεντρωτικός πίνακας των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν*

<b>Αντίσωμα</b>	<b>Εταιρεία</b>	<b>Αραίωση</b>
anti-RhoD	OriGene (TA312722)	1:500
anti-Actin clone C4	Merck Millipore (MAB1501)	1:10.000
anti-phospho-Akt (Ser 473)	Cell Signaling (9271)	1:1000
anti-phospho-Akt (Thr308)	Cell Signaling (4056)	1:1000
anti-phospho-ERK 1/2	Cell Signaling (9101S)	1:3000
anti-phospho-SMAD2	Cell Signaling (3101S)	1:2000
anti-phospho-SMAD3	Rockland (600-401-919)	1:2000
anti-phospho-SMAD1/5/9	Cell Signaling (9511S)	1:2000
anti-Total SMAD2/3	Cell Signaling (3102)	1:3000
anti-HA	Roche (11867423001)	1:2000
anti-FLAG M2	Sigma (F3165)	1:2000
anti-Myc (9E10)	Homemade	1:2000

## 2.9 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Για τις δοκιμές εντοπισμού των πρωτεϊνών των ενδοκυτταρικών διαμερισμάτων και τον έλεγχο της επίδρασης στην ασύμμετρη κυτταρική πριν και μετά την αποσιώπηση της RhoD, των δοκιμών συνεντοπισμού της RhoD με τις πρωτεΐνες SMAD2 και SMAD4 καθώς και των δοκιμών ανοσοιστοχημείας χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και μετά την όποια πειραματική διαδικασία έγινε πλύση των κυττάρων με PBS 1X και μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεϋδης (PFA 3.7%) για 15 λεπτά. Στη συνέχεια για τη μείωση του αυτοφθορισμού και των κυττάρων και την απενεργοποίηση της PFA, ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά με διάλυμα 50mM NH<sub>4</sub>Cl διαλυμένο σε PBS. Ακολούθως οι διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών αυξήθηκε με επώαση 4 λεπτά σε Triton-X 0.1% διαλυμένο σε PBS. Στη συνέχεια έγινε επώαση με ορό FCS 10% (Gibco) για 20 λεπτά με σκοπό την κάλυψη των μη αντιγονικών θέσεων κάλυψης και ακολούθησε επώαση με το πρωτογενές αντίσωμα (Πίνακας 4) διαλυμένο σε 10% FCS για 1 ώρα. Ακολούθως έγιναν 3 πλύσεις με PBS για 5 λεπτά η κάθε μία και στη συνέχεια έγινε επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα διαλυμένο σε 10% FCS για 1 ώρα. Μετά το τέλος της



επώασης στα κύτταρα έγιναν 3 πλύσεις με PBS για 5 λεπτά και στην περίπτωση που δεν απαιτείται πυρηνική χρώση τα κύτταρα φορτώθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με διάλυμα παρακολούθησης Mowiol-DAPCO (0.1%). Στην περίπτωση που χρειάστηκε να γίνει πυρηνική χρώση έγινε επώαση των κυττάρων για 30 λεπτά με RNase A (Sigma-Aldrich) και εφαρμόστηκε η πυρηνική χρώση (Propidium Iodide, YOYO) πριν τη φόρτωση των καλυπτικών στις αντικειμενοφόρους πλάκες.

Οι παρατηρήσεις των δειγμάτων έγιναν με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου Leica SP5 (Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, ΙΤΕ-ΙΒΕ, Ιωάννινα) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS – 561/HeNe και το λογισμικό LasAF Lite. Η ανάλυση των εικόνων σχετικά με τα ποσοστά συνεντοπισμού, αλλά και η συνολική έκφραση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν έγινε με το πρόγραμμα MotionTracking (<http://www.kalaimoscope.com/>) (Kalaidzidis Y, MPI-CBG, Dresden, Germany), ενώ η μέτρηση των κυττάρων και οι στατιστικές στις δοκιμές της ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης έγινε με τη χρήση του προγράμματος Fiji-ImageJ.

### 2.10 Παραγωγή λέντι-ιών

#### **2.10.1 Διαμόλυνση κυττάρων 293T**

Για την Παραγωγή των λέντι-ιών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, κύτταρα HEK293T ( $5 \times 10^6$ ) επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας με επιφάνεια  $148 \text{cm}^2$ . Την επόμενη ημέρα και 2 ώρες πριν τη διαμόλυνση το πλήρες θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε με DMEM απουσία πενικιλίνης/στρεπτομυκίνης. Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με μίγμα το οποίο περιείχε:

- ☒ 15μg psPAX2 (#12260, AddGene) (Trono Lab Packaging and Envelope Plasmids). Το παρόν πλασμίδιο φέρει τα γονίδια pol και gag και είναι υπεύθυνα για το πακετάρισμα των ιοσωματίων μέσω της παραγωγής ιϊκών ενζύμων και πρωτεϊνών του καψιδίου.
- ☒ 5μg pMD2.G (VSV-G) (#12259 AddGene) (Trono Lab Packaging and Envelope Plasmids). Το παρόν πλασμίδιο φέρει το γονίδιο *ENV* το οποίο εκφράζει έναν ιϊκό φάκελο με ικανότητα πρόσδεσης σε κύτταρα ξενιστές.
- ☒ 25μg των πλασμιδίων ενδιαφέροντος.
- ☒ 186μl  $\text{CaCl}_2$  2M.

- ☞ H<sub>2</sub>O ελεύθερο νουκλεασών εγκεκριμένο για κυτταροκαλλιέργειες ως τον συνολικό όγκο του 1.5ml.

Στη συνέχεια το μίγμα με τα DNA προστέθηκε στάγδην και υπό ανάδευση σε διάλυμα 2X HBS pH 7.1 (10mM D-Glucose, 40mM HEPES, 10mM KCl, 270mM NaCl, 1.5mM H<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> σε νερό) συνολικού όγκου 1.5ml και επώαστηκε για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε πιάτο καλλιέργειας 148cm<sup>2</sup> που διαμολύνθηκε, προετοιμάστηκε ένα μίγμα όπως περιεγράφηκε. Στη συνέχεια, το μίγμα προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα HEK293T και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Στη συνέχεια το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας αλλάχθηκε σε πλήρες DMEM High Glucose και η συλλογή του υπερκειμένου έγινε μετά από 72 ώρες από τη διαμόλυνση.

### **2.10.2 Συλλογή και υπερφυγοκέντρωση ιοσωματίων**

Η υπερφυγοκέντρωση των υπερκειμένων έγινε με δημιουργία βαθμίδωσης σουκρόζης (sucrose gradient). Μετά το πέρας των 72 ωρών το υπερκείμενο από τα κύτταρα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στις 2000rpm για 15 λεπτά. Ακολούθησε φιλτράρισμα με φίλτρο 0.2μm (Sarstedt). Σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου (#331372 BECKMAN COULTER), ειδικά για την κεφαλή SW41 Ti Swinging-Bucket Rotor (BECKMAN COULTER) της υπερφυγοκέντρου BECKMAN COULTER Optima L-90K Ultracentrifuge, προστέθηκαν 2ml φιλτραρισμένου σε 0.45μm φίλτρο (Sarstedt), διαλύματος 20% σουκρόζης διαλυμένης σε PBS. Στη συνέχεια προστέθηκαν στάγδην χωρίς να διαταραχθεί η φάση της σουκρόζης 8ml από τα υπερκείμενα. Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στην κεφαλή και ακολούθησε φυγοκέντρωση στα 25000g για 2 ώρες στους 4°C. Μετά το τέλος της υπερφυγοκέντρωσης, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε αποστειρωμένο PBS. Ο ιός διατηρήθηκε σε eppendorfs σε κλάσματα των 10μl στους -80°C και για κάθε επιμόλυνση χρησιμοποιήθηκε νέο κλάσμα.

### 2.11 Δοκιμασία σχηματισμού αγγειακού δικτύου από κύτταρα HUVEC *in vitro* (Tube formation assay) μετά από αποσιώπηση της RhoD με την τεχνολογία του SiRNA

Για τη δοκιμασία tube formation assay, κύτταρα HUVEC απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (κεφ. 2.2). 10<sup>5</sup> κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 12 θέσεων και την επόμενη ημέρα διαμολύνθηκαν χρησιμοποιώντας το λιπίδιο Lipofectamine®

RNAiMax (ThermoFisher Scientific) (κεφ. 2.3), με το SiRNA υπεύθυνο για τη σίγαση της RhoD (#AM16708A, Ambion) καθώς και με το scrambled SiRNA (#AM4642, Ambion) ως αρνητικό δείγμα ελέγχου. Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από το πιάτο καλλιέργειας και  $10^4$  κύτταρα στρώθηκαν εκ νέου στα ειδικά πλακίδια  $\mu$ -Slide angiogenesis ibiTreat (#81506, Ibidi). Τα πλακίδια είχαν προηγουμένως επωαστεί με 10 $\mu$ l Matrigel (#354277, Corning) στους 37°C για 1 ώρα ώστε να πολυμεριστεί και να σχηματιστεί γέλη. Το μέσο καλλιέργειας στο οποίο παρατηρήθηκε ο αγγειακός σχηματισμός ήταν EGM-2 (Lonza) συμπληρωμένο με 2% FBS και με τους αυξητικούς παράγοντες που παρέχει η εταιρεία παραγωγής. Ο σχηματισμός του αγγειακού δικτύου παρακολούθηθηκε για 12 ώρες με λήψη φωτογραφιών ανά 2 ώρες σε μικροσκόπιο TIRF (Total Internal Reflection Fluorescent microscope). Για την επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας του SiRNA πραγματοποιήθηκε qRT-PCR. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων και την ποσοτικοποίηση των παρατηρούμενων δικτύων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνων Fiji-ImageJ και το πρόσθετο του αντίστοιχου προγράμματος Angiogenesis Analyzer (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en&artpage=6-6>)

### 2.12 Έλεγχος της μεταναστευτικότητας και διεισδυτικότητας κυττάρων HUVEC μετά από αποσιώπηση της RhoD με τη χρήση του συστήματος Incucyte®

Το Incucyte® (Essen Bioscience) είναι ένα σύστημα απεικόνισης πραγματικού χρόνου και χρησιμοποιείται για πληθώρα τεχνικών καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη παρακολούθηση των κυττάρων σε πραγματικό χρόνο, ενώ αυτά βρίσκονται σε επωαστικό κλίβανο αλλά και την ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη παραμέτρων μέσω του ενσωματωμένου λογισμικού που προσφέρει. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος της μεταναστευτικής και διεισδυτικής ικανότητας κυττάρων HUVEC στα οποία η πρωτεΐνη RhoD είχε αποσιωπηθεί με τη μέθοδο του SiRNA. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος επούλωσης τραύματος (wound healing assay). Για το σκοπό αυτό  $3 \times 10^4$  κύτταρα HUVEC επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 θέσεων (#3997 Corning Costar) σε τρεις επαναλήψεις για την κάθε συνθήκη που ελέγχθηκε. Προηγουμένως είχε ακολουθηθεί η διαδικασία για την αποσιώπηση της RhoD με τη χρήση SiRNA όπως έχει ήδη περιγραφεί (κεφ. 2.9). Την επόμενη ημέρα και εφόσον τα κύτταρα είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια του φρεατίου σχηματίζοντας μια ενιαία κυτταρική στιβάδα, με χρήση ρύγχους πιπέτας 20-200 $\mu$ l, πραγματοποιήθηκε τραύμα σε όλα

τα υπό μελέτη φρεάτια. Στη συνέχεια ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS με σκοπό να απομακρυνθούν τα αποκολλημένα κύτταρα. Ακολούθησε προσθήκη θρεπτικού μέσου M199 στα κύτταρα σε συνθήκες στέρησης ορού (5%) το οποίο περιείχε και τους αυξητικούς παράγοντες που μελετήθηκαν. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι αυξητικοί παράγοντες VEGF (10ng/ml) (Immunotools), bFGF (25ng/ml) (homemade) καθώς και το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων EGM-2 (Lonza) πλήρως συμπληρωμένο με όλους τους αυξητικούς παράγοντες σύμφωνα με τον κατασκευαστή.

### 2.13 Επαγωγή αυλοποίησης και σχηματισμού δικτύου των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC

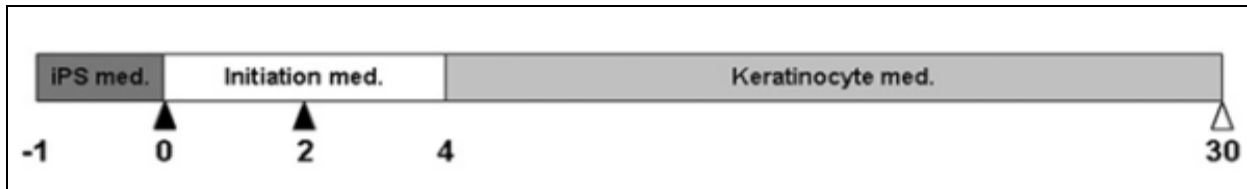
Για την κατασκευή μιας πιο σταθερής αγγειακής δομής εκτός από την πειραματική διάταξη με τη χρήση της εξωκυττάριας ουσίας Matrigel, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs) (128). Έτσι, MSCs, επιστρώθηκαν σε τρυβλία καλλιέργειας και μικροσκοπίας (Ibidi), στα οποία έχει προηγηθεί επώαση με ζελατίνη 0.1%. Όταν τα κύτταρα καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, 40.000 κύτταρα HUVE, προστίθενται πάνω από τα MSCs και καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο EGM-2. Μετά από 2 ημέρες στη περίπτωση που στα κύτταρα HUVEC, έχει γίνει διαμόλυνση με SiRNA, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με τη χρήση PFA 3.7% και ακολουθεί έμμεσος ανοσοφθορισμός. Για τα HUVEC, χρησιμοποιείται, είτε ο ενδοθηλιακός δείκτης CD31, ή ο KDR (VEGFR), ενώ για τη χρώση των MSCs, χρησιμοποιείται αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SM22. Ακολουθεί παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP5.

### 2.14 Πρωτόκολλο διαφοροποίησης hESCs προς κερατινοκύτταρα-δημιουργία μοντέλου δέρματος

Για να ελεγχθεί η πιθανή επίδραση της RhoD στην ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (ΑΚΔ), η πρώτη προσέγγιση στην παρούσα διατριβή ήταν η κατασκευή ενός τρισδιάστατου μοντέλου δέρματος το οποίο προέρχεται από τη διαφοροποίηση hESCs προς τα κύτταρα που αποτελούν τη βασική στιβάδα του δέρματος, τα κερατινοκύτταρα τα οποία είναι θετικά για την έκφραση της πρωτεΐνης κερατίνης 14 (K14). hESC κύτταρα καλλιεργήθηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 2.1 και στη συνέχεια αποικίες των κυττάρων αυτών επανακαλλιεργήθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 6 φρεατίων. Τα κύτταρα στη συνέχεια διαφοροποιήθηκαν προς εξώδερμα με τη χρήση 10ng/ml

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

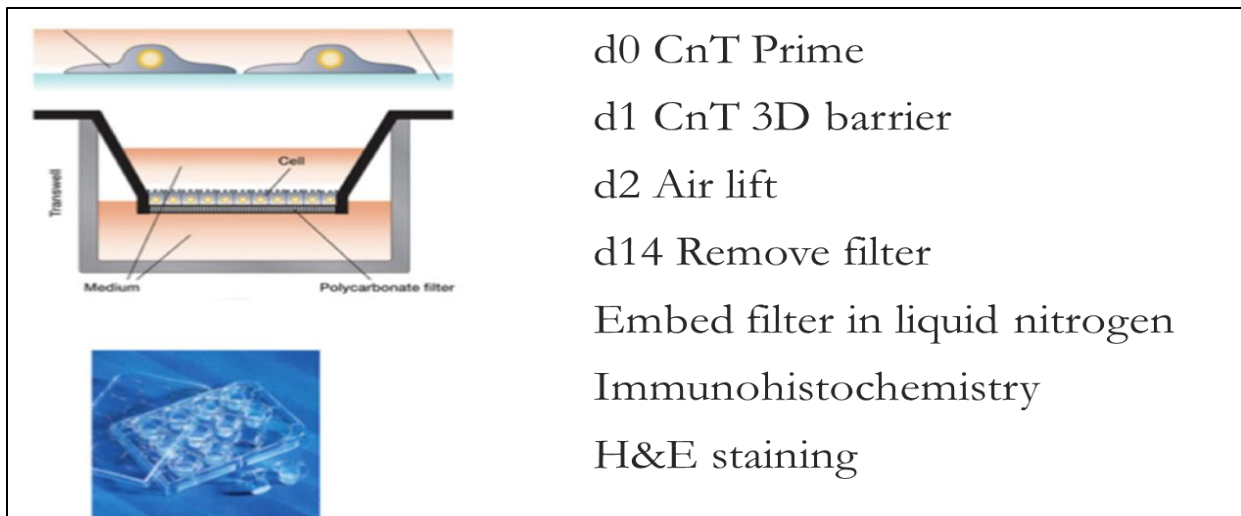
του αυξητικού παράγοντα BMP4 (Gibco) και 1μM ρετινοϊκού οξέος (Sigma) σε θρεπτικό μέσο Defined Keratinocyte Serum Free medium (DKSFM, Gibco) (Ημέρα 0 της διαφοροποίησης). Την ημέρα 2 ανανεώθηκε στο θρεπτικό μέσο ο BMP4 και το ρετινοϊκό οξύ ενώ μετά την ημέρα 4 της διαφοροποίησης αφαιρέθηκαν οι παράγοντες της διαφοροποίησης και η διαφοροποίηση συνεχίστηκε για ένα συνολικό χρόνο 30 ημερών (Εικόνα 22) (129). Ανά 10 ημέρες, από φρεάτια ελέγχου, λαμβανόταν RNA με σκοπό τον έλεγχο της πορείας της διαφοροποίησης με qRT-PCR. Μετά το τέλος των 30 ημερών, ο κυτταρικός πληθυσμός που προέκυψε ελέγχθηκε για την παρουσία της K14 με την τεχνική του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Ο πληθυσμός των θετικών κυττάρων εμπλουτίστηκε με τη μέθοδο της επιλεκτικής τρυψινοποίησης όπου τα κύτταρα τα οποία



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση του πρωτοκόλλου διαφοροποίησης προς κερατινοκύτταρα

δεν έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως αποκολλώνται από το πιάτο καλλιέργειας γρηγορότερα από τα κύτταρα θετικά στην K14 τα οποία δεσμεύονται ισχυρά στο πιάτο.

Για τον σχηματισμό του τεχνητού μοντέλου δέρματος,  $5 \times 10^5$  κύτταρα επιστρώθηκαν σε φίλτρα πολυανθρακίτη με πόρους  $0.4 \mu\text{m}$  (Corning Costar) (Εικόνα 23) δημιουργώντας μια ενιαία στιβάδα κυττάρων στην επιφάνεια του φίλτρου. Στα κύτταρα προστέθηκαν 500μl θρεπτικό μέσο CnT Prime (CellNTec Advanced solutions) και αντίστοιχα 1ml θρεπτικό μέσο προστέθηκε στο



Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου δημιουργίας του μοντέλου του τεχνητού δέρματος

φρεάτιο στο οποίο ήταν τοποθετημένο το φίλτρο (Ημέρα 0). Την επόμενη ημέρα το θρεπτικό μέσο και στις 2 επιφάνειες αλλάχθηκε σε CnT 3D Barrier (CellNTec Advanced Solutions). Τη δεύτερη ημέρα το θρεπτικό μέσο το οποίο βρισκόταν μέσα στο φίλτρο αφαιρέθηκε με τα κύτταρα να βρίσκονται στον αέρα (air lift) και με την τροφοδότηση των κυττάρων με τα απαραίτητα θρεπτικά μέσα να γίνεται μόνο μέσω της επαφής τους με το θρεπτικό μέσο που βρισκόταν στο φρεάτιο καλλιέργειας το οποίο ανανεωνόταν κάθε μέρα για 14 ημέρες καθώς τα κύτταρα βρίσκονταν σε κλίβανο με θερμοκρασία 37°C. Μετά το πέρας των 14 ημερών η επιφάνεια του φίλτρου αφαιρέθηκε και εγκλείστηκε σε μπλοκ υγρού αζώτου για να γίνει η χρήση του σε τεχνικές ανοσοϊστοχημείας. Το μπλοκ το οποίο δημιουργήθηκε κόπηκε με τη χρήση κρυοτόμου σε τομές πάχους 5μm και χρησιμοποιήθηκε σε δοκιμές ανοσοϊστοχημείας με δείκτες χαρακτηριστικούς για τις στιβάδες του δέρματος.

### 2.15 Δοκιμασία ελέγχου ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης κυττάρων MDA-MB-468 με ενσωμάτωση βρωμοδεοξυ-ουριδίνης (BrdU)

Για τη μελέτη της επίδρασης της RhoD στην ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα βασισμένο στην κυτταρική σειρά MDA-MB-468 η οποία είναι κυτταρική σειρά τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού (Triple Negative Breast Cancer). Στην συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει δειχθεί η ύπαρξη υψηλής ανομοιογένειας του πληθυσμού των κυττάρων σχετικά με την έκφραση της πρωτεΐνης κερατίνης 14 (K14) (97). Η έκφραση της κερατίνης 14 έχει δειχθεί να αλλάζει στην παρουσία του μεταλλάγματος της RhoD, RhoDG26V που είναι η ενεργή μορφή της RhoD (64). Γι' αυτόν το λόγο κύτταρα MDA-MB-468 επιμολύνθηκαν με λέντι-ιούς που εκφράζουν το shRNA για την αποσιώπηση της RhoD και έναν ιό ελέγχου ο οποίος δεν δεσμεύεται πουθενά στο RNA (sh Scrambled). Μετά από 24 ώρες από την επιμόλυνση, τα κύτταρα επώαστηκαν 4 ώρες με τον παράγοντα BrdU σε συγκέντρωση 50μM. Μετά την επώαση το θρεπτικό μέσο αλλάχθηκε σε πλήρες μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα επώαστηκαν σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 24 ώρες. Μετά το τέλος της επώασης για την ανίχνευση της κερατίνης 14 ακολουθήθηκε η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού όπως έχει ήδη περιγραφεί στο κεφάλαιο 2.8. Μετά το τέλος της επώασης του δεύτερου αντισώματος η διαδικασία συνεχίστηκε και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν εκ νέου σε διάλυμα PFA 3.7% για 15 λεπτά και επώαστηκαν με διάλυμα 50mM NH<sub>4</sub>Cl. Ακολούθησε επώαση με διάλυμα 1.5M HCl με σκοπό την αποδιάταξη του DNA σε μονόκλωνες έλικες για να δεσμευτεί το αντίσωμα έναντι του

BrdU. Στη συνέχεια μετά από 3 πλύσεις των 10 λεπτών έλαβε χώρα η διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού με τη χρήση ως πρώτου αντισώματος το αντίσωμα έναντι του BrdU (Abcam)

## 2.17 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

### **2.17.1 Στατιστική ανάλυση ανοσοαποτύπων κατά Western**

Η ανάλυση των δεδομένων για την ανοσοαποτύπωση κατά Western, έγινε με το πρόγραμμα quantity one της biorad. Η κανονικοποίηση των τιμών έγινε με βάση την ολική πρωτεΐνη στις περιπτώσεις που υπήρχε ο έλεγχος της φωσφορυλιωμένης εκδοχής και στη συνέχεια ακολούθησε περαιτέρω κανονικοποίηση με την ακτίνη. Τέθηκε ως η πρωτεΐνη ελέγχου σαν ανώτερη τιμή (100%) και οι υπόλοιπες εντάσεις εκφράστηκαν σε σύνδεση με αυτή. Οι αναλύσεις έγιναν στο πρόγραμμα GraphPad PRISM και η στατιστική σημαντικότητα ελέγχθηκε με t-test αμφίπλευρου ελέγχου.

### **2.17.2 Στατιστική ανάλυση της μεταναστευτικής ικανότητας**

Η στατιστική ανάλυση της μεταναστευτικής ικανότητας έγινε με τη χρήση του προγράμματος Fiji-ImageJ και ελέγχθηκε το ποσοστό της κάλυψης της επιφάνειας. Ορίστηκε ως 100% η αρχική επιφάνεια και στη συνέχεια υπολογίστηκε η κάλυψη της στο τελικό χρονικό σημείο. Στην περίπτωση που σε κάποια επανάληψη δεν υπήρχε συνέπεια στο συνολικό μέγεθος των pixel του τραύματος τότε ακολούθησε η αναγκαία κανονικοποίηση. Η αναλύσεις γίνανε στο πρόγραμμα GraphPad PRISM και η στατιστική σημαντικότητα ελέγχθηκε με t-test αμφίπλευρου ελέγχου.

### **2.17.3 Στατιστική ανάλυση της πιστότητας του αγγειακού δικτύου**

Η ανάλυση της πιστότητας του αγγειακού δικτύου έγινε μέσω του προγράμματος του Fiji-ImageJ και ακολουθώντας τις οδηγίες που αναφέρονται στη σελίδα του κατασκευαστή του προσθέτου Angiogenesis Analyser (<http://image.bio.methods.free.fr/ImageJ/?Angiogenesis-Analyzer-for-ImageJ&lang=en&artpage=6-6>). Στη συνέχεια και μέσω του GraphPad PRISM έγιναν τα γραφήματα και ελέγχθηκε η στατιστική σημαντικότητα με t-test αμφίπλευρου ελέγχου.

### ***2.17.4 Στατιστική ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος motion tracking***

Η ανάλυση σχετικά με τη πιθανή αλληλοεπίδραση των πρωτεϊνών με δεδομένα συνεστιακής μικροσκοπίας έγιναν με το πρόγραμμα Motion Tracking στο οποίο οι ρυθμίσεις έγιναν με υπολογισμό παραγόντων για μια σχετική αλληλοεπίδραση μεταξύ των υπό διερεύνηση πρωτεϊνών. Στις ρυθμίσεις του προγράμματος χαμηλή τιμή για την αλληλοεπίδραση θεωρείται μια τιμή στο 0.1 και μια υψηλή αλληλοεπίδραση και αλληλοεπικάλυψη είναι περίπου στο 0.9. Η τιμή που επιλέχθηκε ήταν το 0.4.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Γονιδιακή απάλειψη του *RHOD* γονιδίου στην κυτταρική σειρά HEK293A με το σύστημα CRISPR-Cas9

Με σκοπό τη δημιουργία σταθερής κυτταρικής σειράς στην οποία έχει πραγματοποιηθεί γονιδιακή απάλειψη της *RhoD*, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα CRISPR-Cas9 διπλής σχάσης/εγκοπής (dual Nickase CRISPR system) στο οποίο δύο ενδονουκλεάσες Cas9/10A κατευθύνονται από ειδικά σχεδιασμένα gRNAs και στοχεύουν τη μία από τις δύο συμπληρωματικές αλυσίδες DNA με σκοπό τη δημιουργία σχάσεων οι οποίες στη συνέχεια επιδιορθώνονται από τα κύτταρα μέσω ομόλογης σύνδεσης άκρων (Κεφάλαιο 2.6.1)

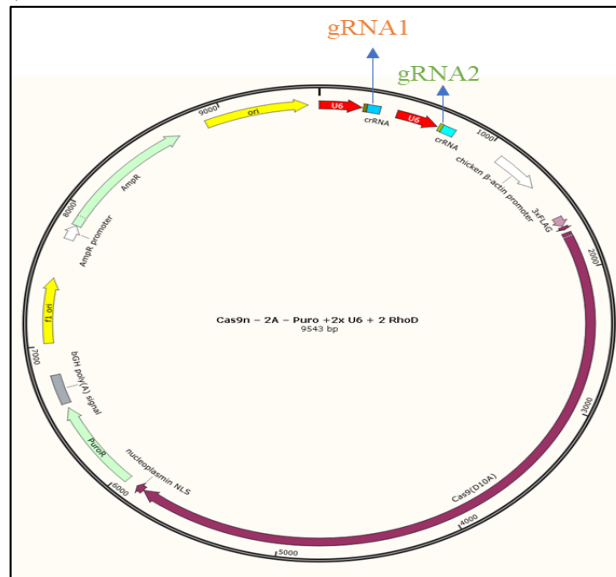
Το αρχικό βήμα στη μέθοδο ήταν ο σχεδιασμός των gRNAs, τα οποία είναι μικρά συνθετικά RNA που αποτελούνται από μια αλληλουχία ή οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση της νουκλεάσης Cas (scaffold sequence), καθώς και από μια αλληλουχία περίπου 20 νουκλεοτιδίων (spacer), η οποία και είναι υπεύθυνη για τον εντοπισμό του γονιδιωματικού στόχου που θα τροποποιηθεί. Για το σχεδιασμό των gRNAs για την απάλειψη του *RHOD* γονιδίου χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο ATUM και η επιλογή έγινε βάσει του μεγαλύτερου βαθμού (score) τον οποίο υπολογίζει το εργαλείο (Εικόνα 24). Ο συγκεκριμένος βαθμός

Position	gRNA	Distance between gRNA	Score ?	Overlapping Genes	Splice variants targeted ?
66,824,429	CGGCCAGGCCGCGGGTGAGGAGGCCACCCAGGCGTGC GGTC CGTCAAGGTGGTCC	5	100		2/2
66,824,390	GCCGGTCCGGCGCCACTCCTCCCGGTGGTCCGCACGCCAGGCAGTTCCACCAGG				

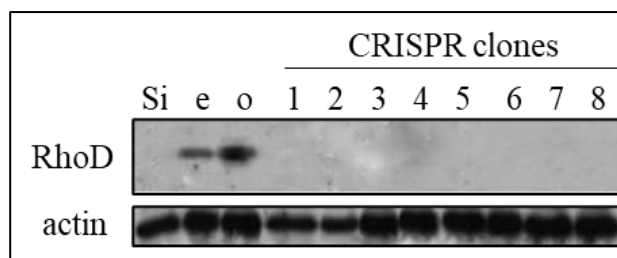
**Εικόνα 24. Η επιλογή των gRNAs μέσω του διαδικτυακού εργαλείου ATUM.** Παρατηρείται η θέση των προτεινόμενων gRNAs ενώ με το βελάκι φαίνεται το σημείο σχάσης το οποίο πραγματοποιείται από την Cas9. Στη *RhoD* φαίνεται πως υπάρχει σημείο σχάσης ακριβώς μετά το ATG κάτι που καθιστά την απάλειψη ολοκληρωτική.

αντιπροσωπεύει μεγαλύτερη ειδικότητα των gRNAs σε σχέση με την αλυσίδα στόχο και συνεπώς αποτελεσματικότερη σχάση. Έτσι κατασκευάστηκαν gRNAs από αλληλουχίες που εντοπίζονταν στο εξώνιο 1 της *RhoD*. Ακολούθησε υβριδοποίηση των μονόκλωνων νουκλεοτιδίων για τα gRNA1 και gRNA2 σε δίκλινα μόρια και η εισαγωγή τους στον πλασμιδιακό φορέα Cas9n-2A-

Puro/2x U6-gRNA. Ο φορέας φέρει το γονίδιο της Cas9/10A, 2 θέσεις υποκινητή U6 οι οποίοι ακολουθούνται από 2 θέσεις πρόσδεσης για gRNAs και το γονίδιο ανθεκτικότητας σε πουργομυκίνη (puromycin) για την επιλογή των κυττάρων θετικών στο φορέα. Με την τμηματική υβριδοποίηση του φορέα, πρώτα με το gRNA1 και στη συνέχεια με το gRNA2 προέκυψε ο τελικός φορέας που χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση των κυττάρων ο Cas9n-2A-Puro/2x U6+2 RhoD guides (Εικόνα 25)



**Εικόνα 25.** Ο πλασμιδιακός φορέας Cas9n – 2A – Puro/2x U6 + 2 RhoD guides. Ο τελικός φορέας που προέκυψε μετά την εισαγωγή των 2 gRNAs. Διακρίνονται χαρακτηριστικά οι θέσεις U6 οι οποίες οδηγούν τη μεταγραφή των gRNAs, (gRNA1 και gRNA2), το cDNA για την Cas9 και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό puromycin

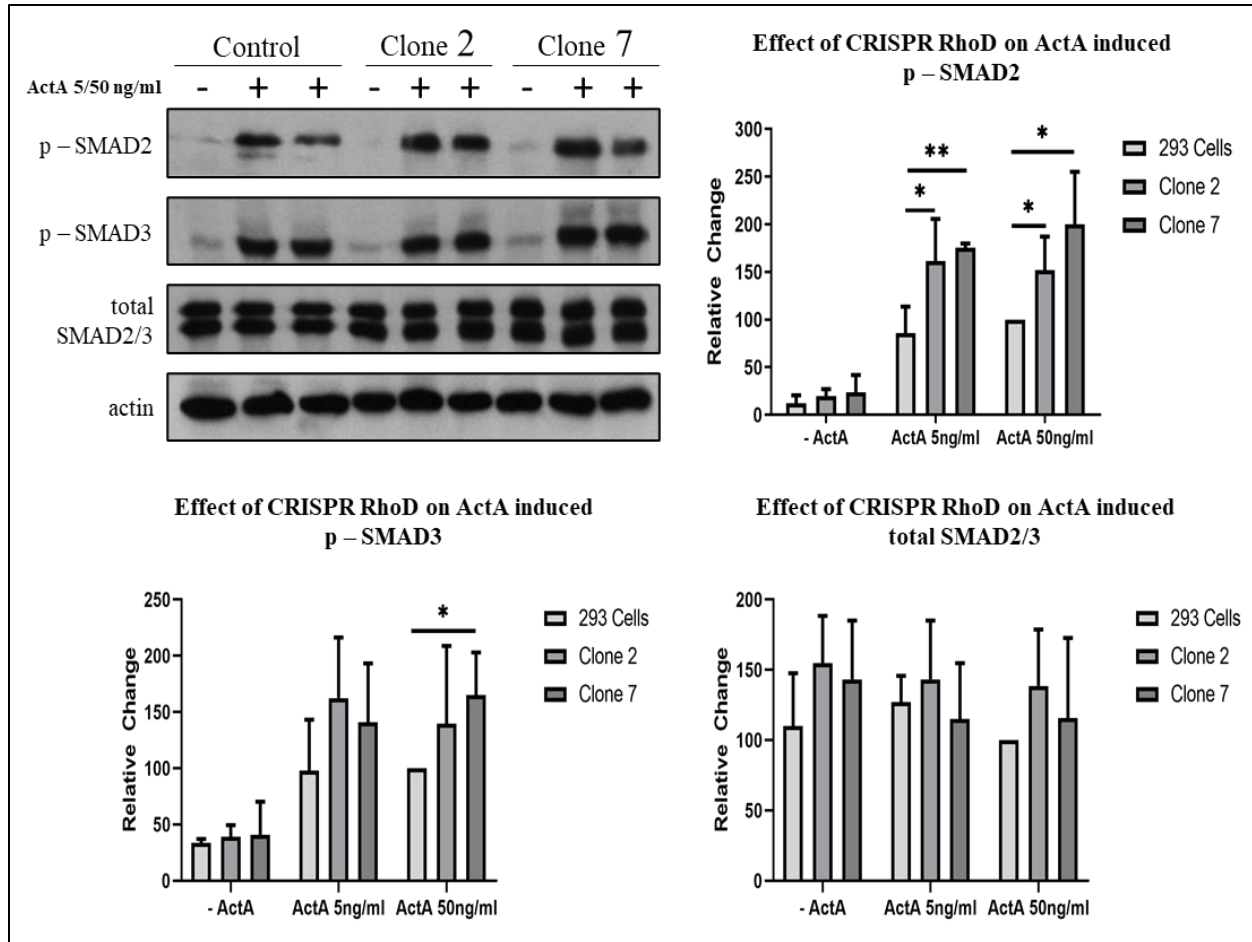


**Εικόνα 26.** Μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων HEK293A με τον φορέα CRISPR-Cas9, στις κυτταρικές σειρές που απομονώθηκαν υπήρξε ολική απάλειψη του RHO D γονιδίου. Οι κυτταρικοί κλώνοι επιλέχθηκαν υπό την παρουσία του αντιβιοτικού puromycin (1μg/ml). Μετά τη λήψη των κυτταρικών εκχυλισμάτων και την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης που απομονώθηκε έγινε ανοσοαποτύπωση κατά Western με μάρτυρα ισοφόρτωσης την πρωτεΐνη Ακτίνη. Si. Δείγμα ελέγχου για την αποσίωση της RhoD με τη χρήση τεχνολογίας SiRNA, e. Ενδογενής έκφραση της RhoD, o. Έκφραση του μεταλλάγματος RhoDG26V (constitutively active) μετά από διαμόλυνση με το αντίστοιχο πλασμίδιο σε κύτταρα HEK293A.

Το επόμενο βήμα μετά το σχεδιασμό του πλασμιδίου ήταν η διαμόλυνση κυττάρων HEK293A με σκοπό την επιβεβαίωση της γονιδιακής απάλειψης της RhoD και την εκτίμηση της σε κυτταρικούς μηχανισμούς σηματοδότησης και εντοπισμού. Μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων με το πλασμίδιο Cas9n-2A-Puro/2x U6+2 RhoD guides έγινε επιλογή των θετικών κλώνων με τη χρήση του αντιβιοτικού puromycin σε συγκέντρωση 1μg/ml και καλλιέργεια μονών κυττάρων με αποτέλεσμα την απόκτηση 8 ανθεκτικών κλώνων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 26 η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου έγινε με επιτυχία σε όλους τους κλώνους και λόγω του γεγονότος πως τα gRNAs και τα PAMs βρίσκονταν ακριβώς πριν το κωδικόνιο έναρξης για την πρωτεϊνοσύνθεση της RhoD. Για τις δοκιμές οι οποίες πραγματοποιήθηκαν επιλέχθηκε ο κλώνος 2 και ο κλώνος 7.

### 3.2 Η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου αυξάνει την επαγόμενη από Ακτιβίνη A (Activin A) φωσφορυλίωση των SMAD2 (p-SMAD2) και SMAD3 (p-SMAD3) πρωτεϊνών

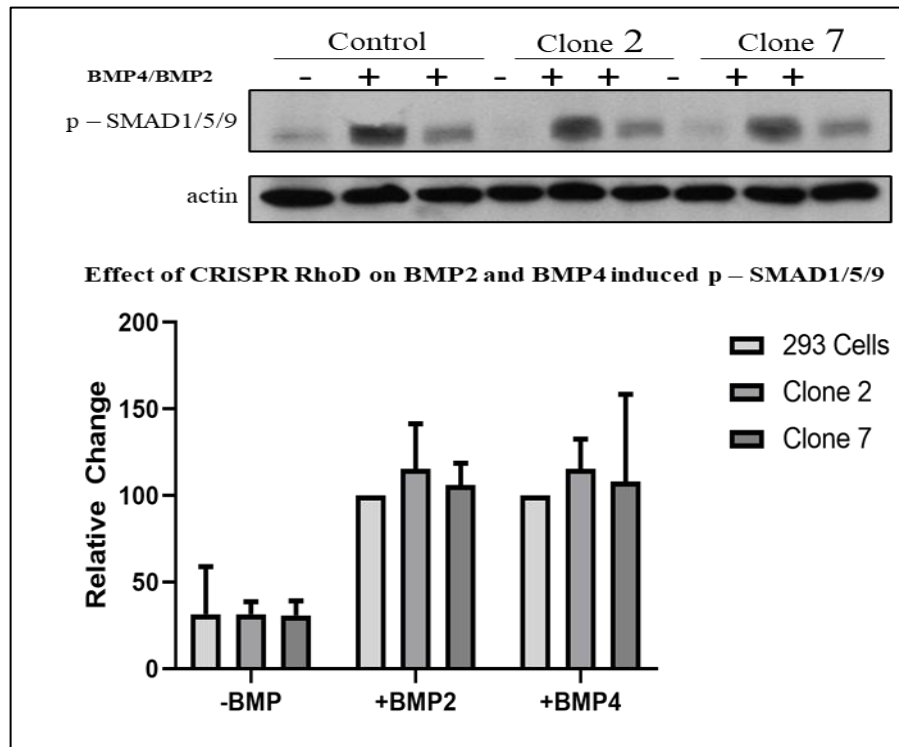
Η RhoD είναι μια πρωτεΐνη η οποία επηρεάζει την ενδοκυτταρική διακίνηση μεμβρανών, η οποία με τη σειρά της μπορεί να επηρεάζει τη σηματοδότηση αυξητικών παραγόντων ή κυτταροκινών καθώς οι μεμβράνες φέρουν τα συμπλέγματα αυτών με τους υποδοχείς τους. Για να ελεγχθεί κατά πόσο υπάρχει κάποια σύνδεση μεταξύ της RhoD-εξαρτώμενης ενδοκυτταρικής διακίνησης μεμβρανών και της σηματοδότησης μέσω του μονοπατιού της Ακτιβίνης A έγινε επαγωγή με Ακτιβίνη A (5ng/ml και 50ng/ml για 30 λεπτά) των CRISPR κλώνων με απάλειψη της RhoD. Μετά από απομόνωση του κυτταρικού εκχυλίσματος και ανοσοαποτύπωση κατά Western, ελέγχθηκε το επίπεδο των φωσφορυλιωμένων μορφών της SMAD2 και SMAD3 (p-SMAD2 και p-SMAD3) και των συνολικών SMAD2 και SMAD3 πρωτεϊνών (total SMAD2/3). Αυτό που παρατηρήθηκε ήταν η στατιστικά σημαντική αύξηση της p-SMAD2 και στους 2 κλώνους και στις 2 συγκεντρώσεις ActA που επιλέχθηκαν ενώ επίσης φαίνεται να αλλάζει και το επίπεδο της p-SMAD3. Αντίθετα παρατηρείται πως η σχετική συνολική έκφραση των SMAD2/3 δεν αλλάζει ανάμεσα στους 2 κλώνους. (Εικόνα 27).



**Εικόνα 27.** Η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου αυξάνει τη φωσφορυλίωση των *SMAD2* και *SMAD3* πρωτεϊνών μετά από επαγωγή με Ακτιβίνη *A* αλλά όχι των ολικών *SMAD2/3*. Σε κύτταρα *HEK293A* καθώς και στους 2 επιλεγμένους *CRISPR* κλώνους (2 και 7) έγινε επαγωγή με Ακτιβίνη *A* για 30 λεπτά μετά από στέρηση ορού για 2 ώρες. (*ActA* 5 ή 50ng/ml). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά *Western* με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών μορφών των *p-SMAD2*, *p-SMAD3*, *total SMAD2/3* και της ακτίνης (δείκτης ισοφόρτωσης) ( $n = 4$ ). \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0.05$

### 3.3 Η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου δεν επηρεάζει τη *BMP2*- και *BMP4*-επαγόμενη φωσφορυλίωση των *SMAD1/5/9* (*p-SMAD1/5/9*)

Οι μορφογενετικοί παράγοντες *BMP2* και *BMP4* χρησιμοποιούνται ευρέως για τη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων και προς τις τρεις βλαστικές στιβάδες (ενδόδερμα, εξώδερμα, μεσόδερμα). Για να ελεγχθεί η επίδραση της απάλειψης της *RhoD* στη σηματοδότηση μέσω των *SMAD1/5/9* πρωτεϊνών, κύτταρα *HEK293A*, καθώς και οι *CRISPR RhoD* κλώνοι 2 και 7 καλλιεργήθηκαν και έγινε επαγωγή με τους μορφογενετικούς παράγοντες *BMP2* και *BMP4* για 30 λεπτά και σε συγκέντρωση 5ng/ml. Στη συνέχεια έγινε η ανοσοαποτύπωση κατά *western* για το αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής των *SMAD1/5/9* (*p-SMAD1/5/9*) και παρατηρήθηκε πως

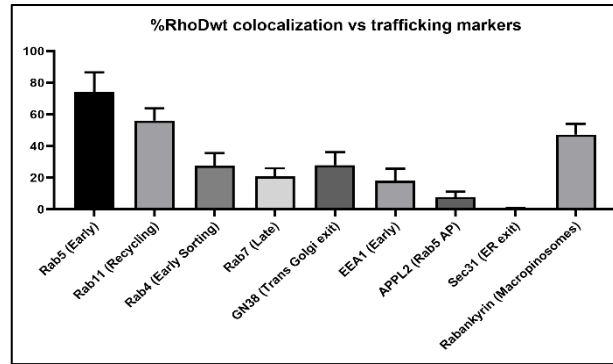


**Εικόνα 28.** Η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των *SMAD1/5/9* μετά από επαγωγή με *BMP2* ή *BMP4*. Σε κύτταρα *HEK293A* και στους δύο επιλεγμένους κλώνους *CRISPR* (2 και 7) έγινε επαγωγή με τους αυξητικούς παράγοντες *BMP2* και *BMP4* για 30 λεπτά μετά από στέρηση ορού για 2 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά *Western* με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των ενδογενών *p-SMAD1/5/9* και της ακτίνης (δείκτης ισοφόρτωσης).  $n = 3$ .

δεν υπάρχει κάποια επίδραση του *CRISPR RhoD* στη σηματοδότηση μέσω των *BMP2* και *BMP4* (Εικόνα 28)

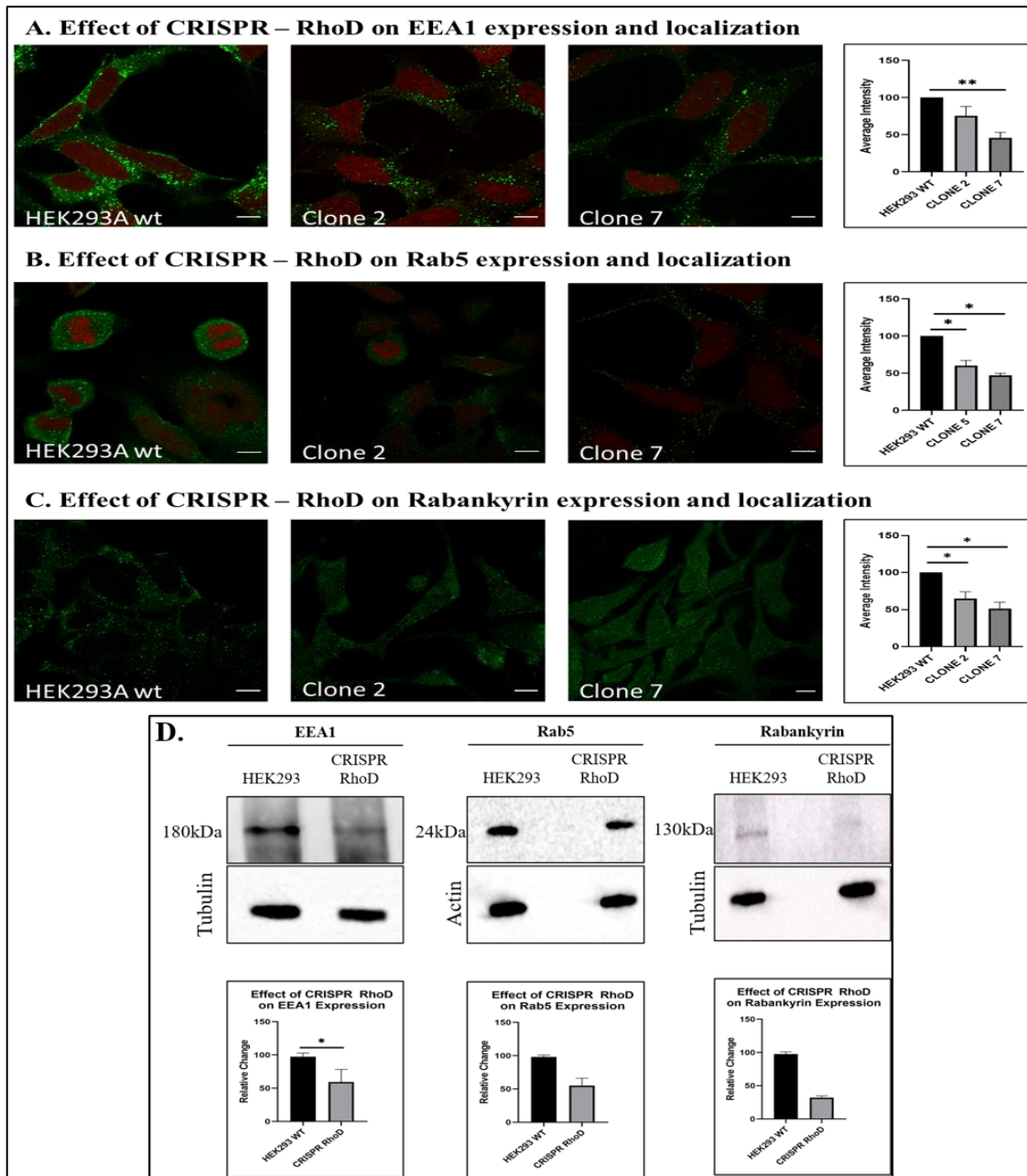
### 3.4 Η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου επηρεάζει τον εντοπισμό των ενδοσωματικών πρωτεϊνών *Rab5*, *Rabankyrin* και *EEA1*

Όπως αναφέρθηκε ήδη η *RhoD*, επηρεάζει την ενδοκυτταρική διακίνηση μεμβρανών. Πράγματι, το ενεργό μετάλλαγμα *RhoDG26V* εμποδίζει την κινητικότητα των ενδοσωμάτων και οι *Rho* πρωτεΐνες έχει δειχθεί πως αλλάζουν τον εντοπισμό και ενδεχομένως τη δραστηριότητα διαφόρων δεικτών ενδοσωμάτων. Είναι επίσης γνωστό από παλαιότερα πειράματα πως η *RhoD* αλληλοεπιδρά με ενδοσωματικές πρωτεΐνες (Εικόνα 29). Για να ελεγχθεί κατά πόσο η γονιδιακή απάλειψη του *RHOD* γονιδίου επηρεάζει την έκφραση ή τον εντοπισμό ενδοσωματικών, κύτταρα *HEK293* και κύτταρα από τους κλώνους 2 και 7 του *CRISPR RhoD* επιστρώθηκαν σε γυάλινες καλυπτρίδες και στη συνέχεια έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τις ενδοσωμικές πρωτεΐνες, της *EEA1* που εντοπίζεται όπως και η *RhoD* στα πρώιμα ενδοσώματα, της *Rabankyrin* που βρίσκεται στα ενδοσώματα και στα μακροπινοςώματα και του ρυθμιστή της *Rabankyrin*, της *Rab5*. Επίσης



*Εικόνα 29. Παλαιότερα αποτελέσματα πειραμάτων που δείχνουν τον συνεντοπισμό της RhoD με πρωτεΐνες του κυτταρικού διαμερίσματος*

έγινε και ανοσοαποτύπωση κατά western για να ελεγχθεί κατά πόσο αλλάζει η έκφραση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων μετά από ανάλυση με τη χρήση του προγράμματος Motion Tracking, έδειξαν σημαντικά μειωμένη ένταση του σήματος των υπό μελέτη πρωτεϊνών και στους 2 κλώνους του CRISPR RhoD (Εικόνα 30), ενώ στην περίπτωση της Rabankyrin φαίνεται πως αλλάζει και ο εντοπισμός της καθώς εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 30C). Επίσης τα αποτελέσματα μετά την ανοσοαποτύπωση κατά western έδειξαν μειωμένη έκφραση και των τριών υπό μελέτη πρωτεϊνών (Εικόνα 30D).



**Εικόνα 30.** Η απάλειψη του *RHO* γονιδίου μειώνει την έκφραση των δεικτών *EEA1*, *Rab5* και *Rabankyrin*. **A–C.** Κύτταρα HEK293A και οι κλώνοι CRISPR 2 και 7 καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες που προηγουμένως επωάστηκαν με πολύ-*L*-λυσίνη (*poly-L-lysine*) για 5 λεπτά για να αυξηθεί η δέσμευση των κυττάρων στις καλυπτρίδες και μετά από 24 ώρες ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών *EEA1*, *Rab5*, *Rabankyrin* και *Propidium Iodide* (*PI*) για τη χρώση του πυρήνα. **D)** Επίσης πραγματοποιήθηκε και ανοσοαποτύπωση κατά Western όπου 30mg πρωτεϊνικού εκχυλίσματος στα οποία έγινε ανίχνευση των πρωτεϊνών *EEA1*, *Rab5* και *Rabankyrin* με τα αντίστοιχα αντισώματα. Ο Έλεγχος της ισοφόρτωσης έγινε με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ακτίνης και τουμπουλίνης. Οι εικόνες λήφθηκαν με συνεστιακό μικροσκόπιο SP5 και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό *Motion Tracking Software* και η μέση ένταση των πρωτεϊνών – δεικτών φαίνεται στα γραφήματα. Ράβδος κλίμακας 10μm. ( $n = 3$ , κύτταρα ανά πείραμα ~100). Για τα western blot,  $n=3$  για την *EEA1* και  $n=2$  για τις *Rab5* και *Rabankyrin* \*\*\*:  $p<0.001$ , \*\*:  $p<0.01$ , \*:  $p<0.05$

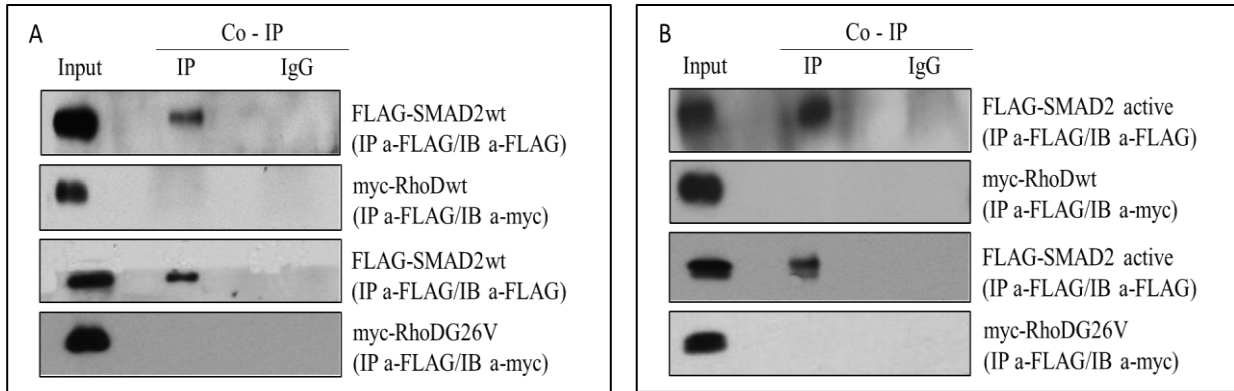
### 3.5 Έλεγχος της αλληλεπίδρασης της RhoD με τις πρωτεΐνες SMAD2 και SMAD4 του μονοπατιού της Ακτιβίνης A.

#### **3.5.1 Η RhoD δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με τη SMAD2 ενώ η μόνιμα ενεργή ισομορφή της RhoDG26V προσελκύει τη SMAD2 στο κεντρόσωμα.**

Για να ελεγχθεί η πιθανή αλληλοεπίδραση της SMAD2 με τη RhoD χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμές συν-ανοσοκατακρήμνισης, η RhoD φυσικού τύπου σημασμένο με τον επίτοπο myc (RhoDwt), το ενεργό μετάλλαγμα G26V (RhoDG26V) σημασμένο με τον επίτοπο myc, ενώ για τη SMAD2 χρησιμοποιήθηκε η SMAD2 φυσικού τύπου (SMAD2wt) σημασμένη με τον επίτοπο FLAG καθώς και η φωσφορυλιωμένη μορφή της SMAD2 (SMAD2 active) σημασμένη με τον επίτοπο FLAG. Τα αποτελέσματα της συν-ανοσοκατακρήμνισης, έδειξαν πως παρά το γεγονός πως η έκφραση των πρωτεϊνών ήταν υψηλή στα κυτταρικά εκχυλίσματα που απομονώθηκαν καθώς και η δέσμευση στα σφαιρίδια των πρωτεϊνών SMAD2wt και SMAD2 active ήταν υψηλή, δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια ισχυρή αλληλοεπίδραση της RhoD (είτε της RhoDwt ή της RhoDG26V) με κάποια μορφή της SMAD2 (SMAD2wt ή SMAD2 active) (Εικόνα 31).

Ταυτόχρονα έγινε και έλεγχος για τον συνεντοπισμό της RhoD με διαφορετικές μορφές της SMAD2 μέσω της διαδικασίας του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η επιλογή της κυτταρικής σειράς για τις δοκιμές του ανοσοφθορισμού ήταν τα κύτταρα HUVEC λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, της αποτελεσματικότερης προσκόλλησης τους στις καλυπτρίδες για τα πειράματα της συνεστιακής μικροσκοπίας αλλά και της μικρότερης ενεργότητας των σηματοδοτικών μονοπατιών σε σχέση με τα κύτταρα HEK293A. Έτσι διαμολύνθηκαν τα κύτταρα HUVEC με τη RhoDG26V με τον επίτοπο myc ή με τη RhoDwt με τον επίτοπο myc σε συνδυασμό με τη SMAD2 που περιείχε τον επίτοπο GFP. Για να γίνει ο έλεγχος σχετικά με τη μορφή της SMAD2 η οποία μπορεί να συνεντοπίζεται με τη RhoD, έγινε και στέρηση ορού και επαγωγή με Ακτιβίνη A, με σκοπό την φωσφορυλίωση της SMAD2. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ των μη επαγόμενων και των επαγόμενων από την Ακτιβίνη A, κυττάρων σχετικά με τον εντοπισμό και τον συνεντοπισμό των δύο πρωτεϊνών. Επίσης μετά από ανάλυση των εικόνων με το πρόγραμμα Motion Tracking, δεν εντοπίστηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των εμπλεκόμενων πρωτεϊνών αλλά φαίνεται να υπάρχει προσέλκυση της SMAD2 στην περιοχή του κεντροσώματος στην περίπτωση της διαμόλυνσης με τη RhoDG26V, ενώ στην περίπτωση της RhoDwt η προσέλκυση είναι μικρότερη και στα κύτταρα ελέγχου τα οποία έχουν διαμολυνθεί μόνο με τη SMAD2, φαίνεται να υπάρχει ελάχιστος εντοπισμός της στο κεντρόσωμα. Αντίστοιχα κύτταρα τα οποία έχουν



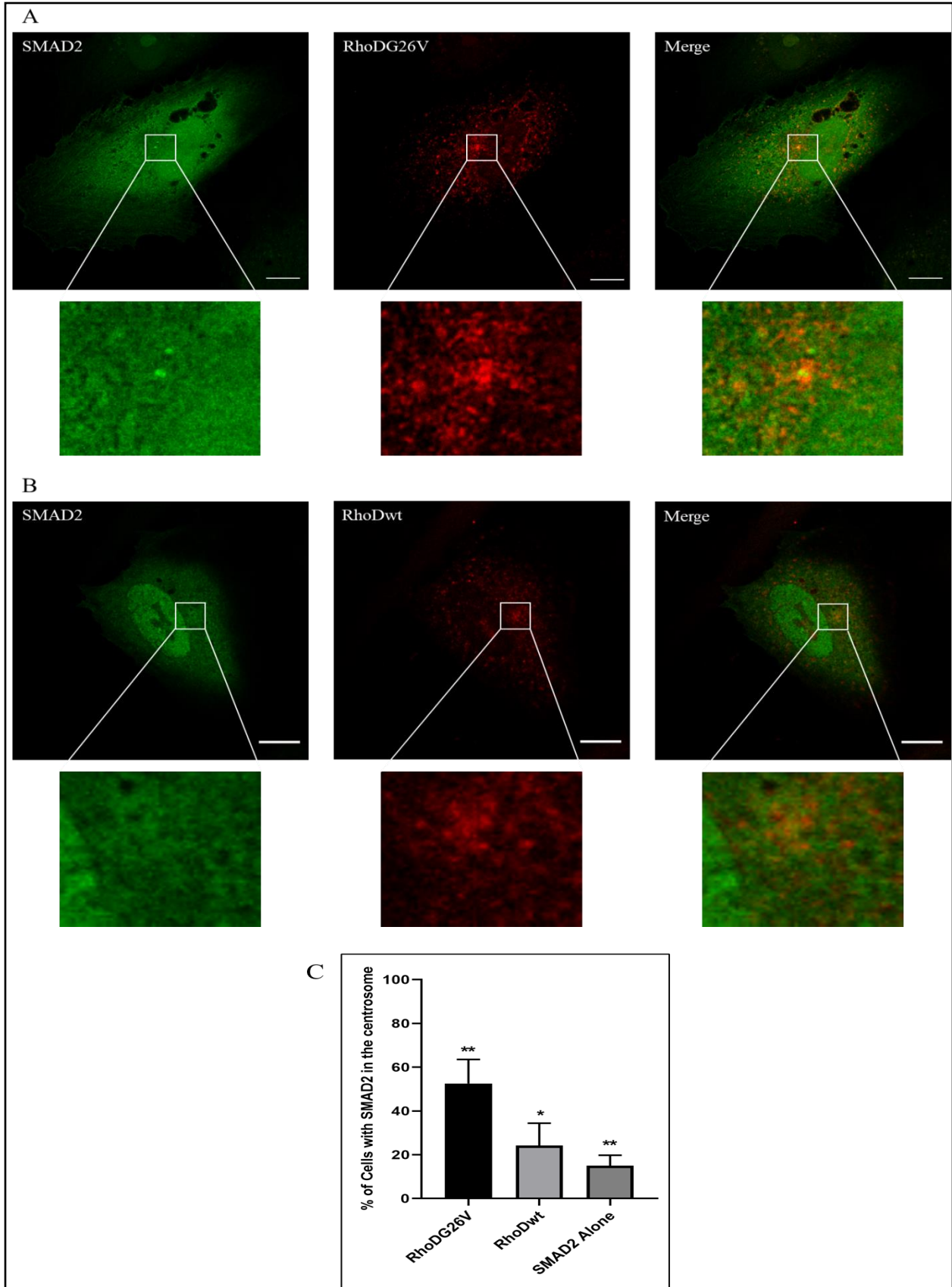


**Εικόνα 31. Η RhoD δεν συν – ανοσοκατακρημνίζεται με τη SMAD2 είτε στη φυσικού τύπου μορφή της (A) είτε στη φωσφορυλιωμένη μορφή της (B).** Κύτταρα HEK293A διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακές κατασκευές της RhoD (RhoDwt ή RhoDG26V) και με πλασμιδιακές κατασκευές της SMAD2 (SMAD2wt ή SMAD2 active). Οι πρωτεΐνες SMAD2wt και SMAD2 active είχαν τον επίτοπο FLAG, ενώ οι πρωτεΐνες RhoDwt και RhoDG26V τον επίτοπο myc. Στα σφαιρίδια G (g-beads) δεσμεύτηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG και το οποίο δέσμευσε με επιτυχία τις μορφές της SMAD2 και το σήμα το βλέπουμε στις ανοσοαποτυπώσεις περίπου στα 70kDa όπως αναμενόταν, και στο εκχύλισμα (input), αλλά και στα σφαιρίδια. Εάν η RhoDwt ή η RhoDG26V εμφάνιζε ισχυρή αλληλοεπίδραση με τις μορφές των SMAD2 πρωτεϊνών θα έπρεπε να εμφανίζεται στις ανοσοαποτυπώσεις κατά western μετά από επώαση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου Myc, περίπου στα 25kDa. Αντίθετα, αυτό είναι μόνο ορατό στην περίπτωση του κυτταρικού εκχυλίσματος (input) και στις 2 περιπτώσεις. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε ολική IgG και όπως φαίνεται δεν έχει δώσει κάποιο σήμα σε καμία από τις ανοσοαποτυπώσεις κατά Western.

διαμολυνθεί μόνο με τη RhoDG26V έχουν την ήδη γνωστή συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο κεντρόσωμα (64) (Εικόνα 32).

### 3.5.2 Η RhoD δεν αλληλοεπιδρά άμεσα με τη SMAD4 και εντοπίζονται μόνο στην περιοχή του κεντροσώματος

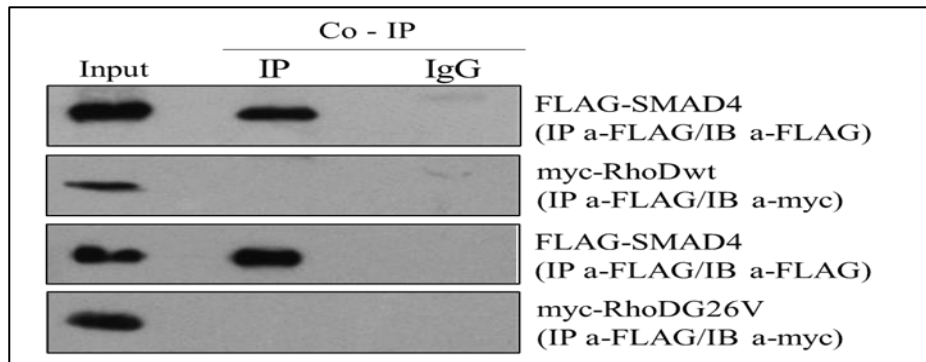
Στις δοκιμές συν-ανοσοκατακρήμνισης, για τον έλεγχο της πιθανής αλληλοεπίδρασης της SMAD4 με τη RhoD, η RhoD φυσικού τύπου (RhoDwt) και η μόνιμα ενεργή RhoD (RhoDG26V) ήταν σημασμένες με τον επίτοπο myc, ενώ η SMAD4 φυσικού τύπου (SMAD2wt) ήταν σημασμένη με τον επίτοπο FLAG. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν κάποια άμεση αλληλοεπίδραση



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

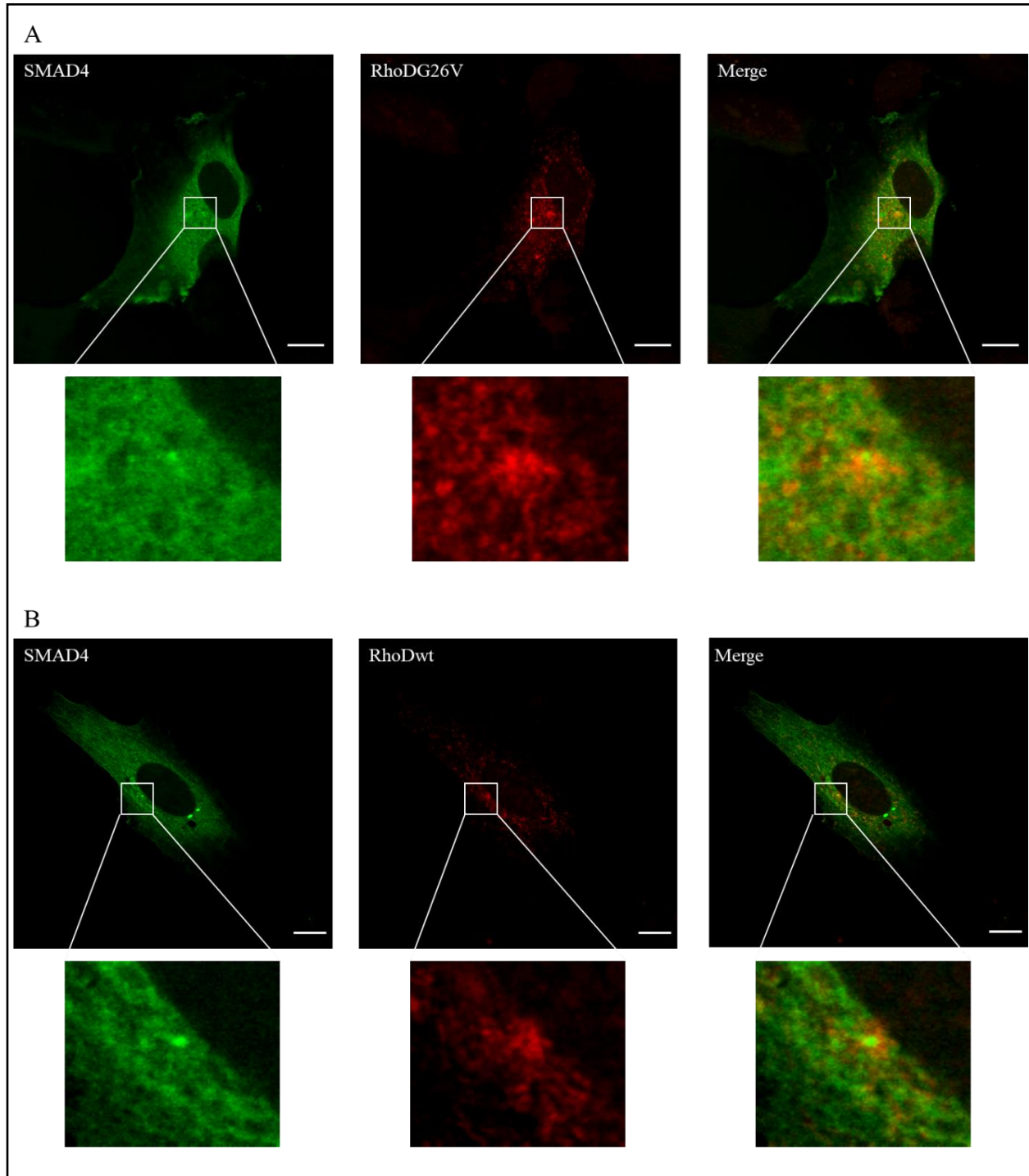
**Εικόνα 32.** Η SMAD2 φαίνεται να προσελκύεται στο κεντρόσωμα μέσω μιας αλληλοεπίδρασης με τη RhoDG26V (A) και σε μικρότερο ποσοστό από τη RhoDwt (B). Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν με τη χρήση του λιπιδίου Metafectene® Pro και στη συνέχεια έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον έλεγχο του συνεντοπισμού μεταξύ της GFP-SMAD2 και της myc-RhoDG26V (A) της myc-RhoDwt (B). Στις εικόνες παρατηρείται σε μεγέθυνση η περιοχή του κεντροσώματος όπου η RhoD έχει αυξημένη συγκέντρωση και όπου η SMAD2 φαίνεται να προσελκύεται μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων. Στο γράφημα (C) φαίνεται το ποσοστό των κυττάρων που εμφάνισαν τη στρατολόγηση της SMAD2 στο κεντρόσωμα σε κύτταρα HUVEC που διαμολύνθηκαν με την RhoDG26V, με κύτταρα HUVEC που διαμολύνθηκαν με την RhoDwt και με κύτταρα HUVEC τα οποία διαμολύνθηκαν μόνο με τη SMAD2. Υπήρξαν 4 ανεξάρτητα πειράματα στα οποία καταμετρήθηκαν από 50 θετικά διαμολυνθέντα κύτταρα. Ράβδος κλίμακας 10μm. (n = 4). \*\*: p<0.01, \*: p<0.05

μεταξύ των υπό μελέτη πρωτεϊνών παρά το υψηλό ποσοστό έκφρασης των 2 πρωτεϊνών μετά από τη διαμόλυνση τους σε κύτταρα HEK293A και την ικανοποιητική δέσμευση της FLAG-SMAD4 στα G-beads (Εικόνα 33).



**Εικόνα 33.** Η RhoD δεν συν-ανοσοκατακρημνίζεται με τη SMAD4. Κύτταρα HEK293A διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακές κατασκευές που εκφράζουν τις πρωτεΐνες της RhoDG26V ή RhoDwt σημασμένες με τον επίτοπο myc και με πλασμιδιακή κατασκευή που εκφράζει την πρωτεΐνη SMAD4 σημασμένη με τον επίτοπο FLAG. Στα G-beads δεσμεύτηκε αντίσωμα έναντι του επιτόπου FLAG το οποίο δέσμευσε με επιτυχία την πρωτεΐνη SMAD4. Αντίθετα οι πρωτεΐνες RhoDG26V και RhoDwt δεν κατακρημνίστηκαν

Για τον έλεγχο ενδεχόμενου συν-εντοπισμού της πρωτεΐνης SMAD4 με τις RhoDG26V και RhoDwt διαμολύνθηκαν κύτταρα HUVEC με τις RhoDG26V ή RhoDwt συζευγμένες με τον επίτοπο myc σε συνδυασμό με τη SMAD4 που περιείχε τον επίτοπο GFP. Η SMAD4 έχει δειχτεί πως εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στο κεντρόσωμα ενώ απουσία προσδέτη δεν εντοπίζεται στον πυρήνα (130). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του MotionTracking δεν έδειξε κάποιο ποσοστό συν-εντοπισμού των δύο μορφών της RhoD με τη SMAD4 στο σύνολο του κυττάρου, ενώ το μοναδικό σημείο συν-εντοπισμού τους ήταν το κεντρόσωμα σε κάθε κύτταρο το οποίο ελέγχθηκε, χωρίς όμως κάποια συσχέτιση σχετικά με την παρουσία της μίας στο κεντρόσωμα εξαρτήσει της άλλης (Εικόνα 34).



**Εικόνα 34.** Η SMAD4 δεν συνεντοπίζεται και δεν προσελκύεται από τη RhoDG26V (A) και τη RhoDwt (B). Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν με τη χρήση του λιπιδίου Metafectene® Pro και στη συνέχεια έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον έλεγχο του συνεντοπισμού μεταξύ της GFP-SMAD4 και της myc-RhoDG26V (A) της myc-RhoDwt (B). Στις εικόνες παρατηρείται σε μεγέθυνση η περιοχή του κεντροσώματος όπου η RhoD έχει αυξημένη συγκέντρωση και στο οποίο εντοπίζεται και η SMAD4 χωρίς όμως να υπάρχει κάποια σύνδεση για την προσέλκυση μεταξύ τους. Υπήρξαν 4 διαφορετικά πειράματα και μετρήθηκαν 50 θετικά κύτταρα ανά πείραμα. Ράβδος κλίμακας 10μm.

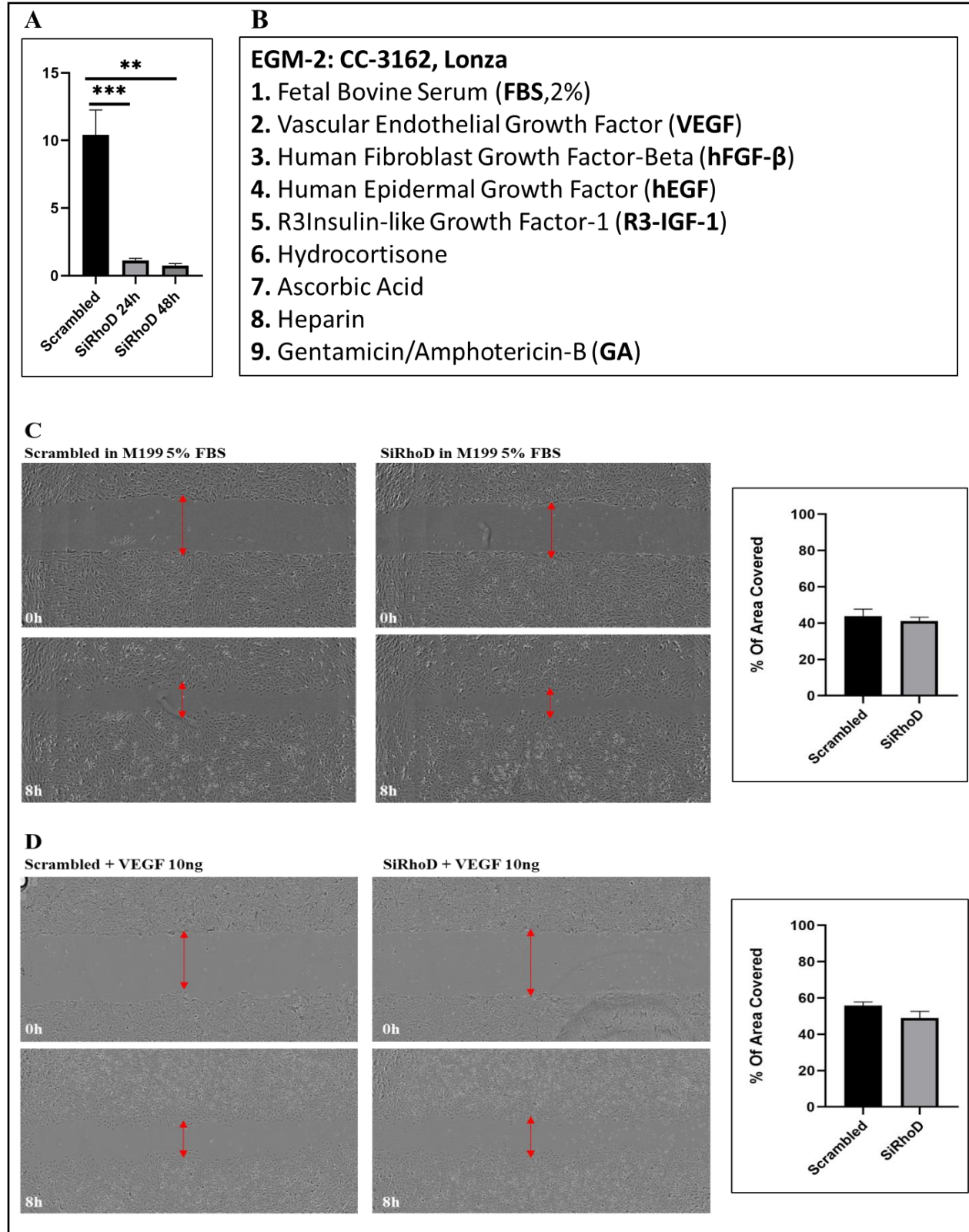
### 3.6 Μελέτη της επίδρασης της αποσιώπησης της RhoD μέσω της τεχνολογίας του SiRNA στην αγγειογενετική ικανότητα κυττάρων HUVEC (EK)

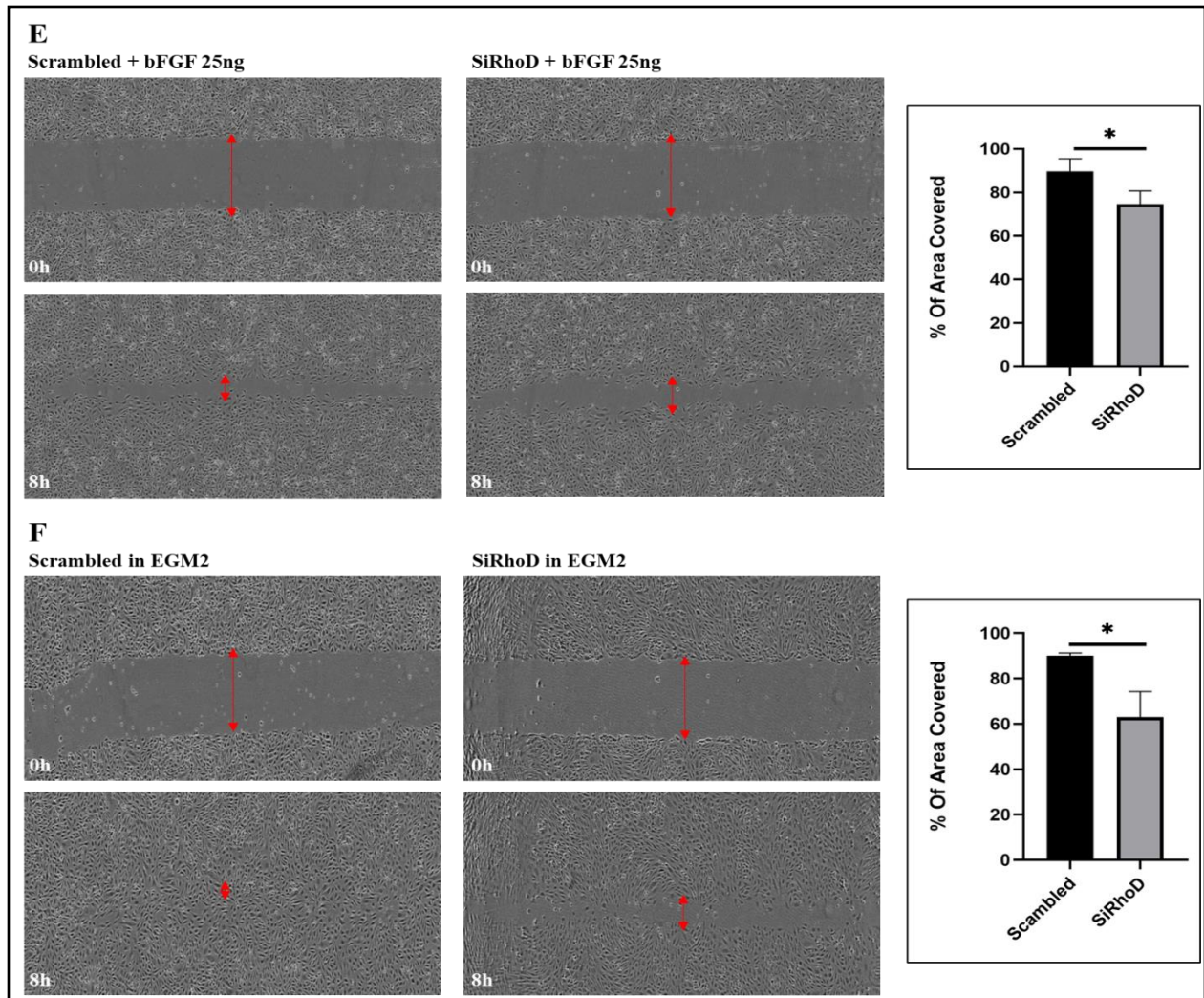
Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση δεν είναι μια διαδικασία η οποία είναι αποκλειστική στα βλαστικά κύτταρα. Κατά την αγγειογένεση και τον σχηματισμό νέων αγγείων έχει παρατηρηθεί σε πειραματικές διατάξεις zebrafish ότι στα ακροκύτταρα (tip cells) συντελούνται ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις μέχρι να σχηματιστεί ολόκληρο το αγγειακό δίκτυο (108). Επίσης, έχει δειχθεί πως τα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης, κατανέμουν ασύμμετρα τα στοιχεία του κυτταροπλάσματός με σκοπό την επιμήκυνση του κυττάρου και τη δημιουργία ακροκυττάρων της κορυφής. Μια πρωτεΐνη ρυθμιστής, η FMNL3 ελέγχει την τοποθέτηση των μικροσωληνίσκων κατά την επιμήκυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πειράματα με το σύστημα των δύο υβριδίων (yeast two hybrid) έδειξαν ότι η RhoD αλληλοεπιδρά ισχυρά με την πρωτεΐνη FMNL3 (131). Με βάση τα παραπάνω έγιναν πειράματα σε κύτταρα HUVEC σχετικά με την επίδραση της RhoD στην αγγειογένεση *in vitro*.

#### **3.6.1 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου μειώνει την μεταναστευτική ικανότητα (migration) των HUVECs**

Μια πρώτη εκτίμηση της επίδρασης της αποσιώπησης της RhoD στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι να ελεγχθεί η επίπτωσή της στη μεταναστευτική ικανότητα των HUVEC με τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay). Κατά τη δοκιμασία αυτή, μονοστιβάδα EK τραυματίζεται και στη συνέχεια παρακολουθείται και ποσοτικοποιείται η ικανότητα των κυττάρων από τις παρυφές του τραύματος να καλύψουν το δημιουργηθέν κενό. Η παρακολούθηση έγινε με το σύστημα κυτταρικής απεικόνισης πραγματικού χρόνου Incucyte® για 8 ώρες. Μακρύτερα χρονικά διαστήματα ενέχουν τον κίνδυνο η κάλυψη του κενού να είναι αποτέλεσμα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και όχι μετανάστευσης. Αρχικά κύτταρα HUVEC καλλιεργήθηκαν και διαμολύνθηκαν με το SiRNA της RhoD. Μετά από 24 και 48 ώρες λήφθηκαν κύτταρα για απομόνωση του RNA και έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποσιώπησης (Εικόνα 35A). Σε πιάτα καλλιέργειας 96 φρεατίων επιστρώθηκαν 30.000 κύτταρα από το Si ελέγχου (scrambled) και από τα κύτταρα στα οποία έγινε η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου. Η καλλιέργεια έγινε σε πλήρες θρεπτικό μέσο M199 και την επόμενη ημέρα δημιουργήθηκε το τραύμα. Μετά την πραγματοποίηση του τραύματος η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό μέσο M199 με παρουσία 5% ορό, ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι αυξητικοί παράγοντες FGF-2 και VEGF οι οποίοι

είναι γνωστό πως επάγουν την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων κατά την αγγειοποίηση (144), (145). Επίσης, το θρεπτικό μέσο EGM2 που χρησιμοποιήθηκε είναι ένα χημικά καθορισμένο, εμπορικά διαθέσιμο μέσο το οποίο περιέχει πληθώρα αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 35B). Στη συνέχεια έγινε εξαγωγή των εικόνων και η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσα από το πρόγραμμα Fiji-ImageJ. Από τα αποτελέσματα φαίνεται, όπως είναι αναμενόμενο, ότι τα κύτταρα χωρίς κάποιον αυξητικό παράγοντα και με χαμηλό ποσοστό ορού, εμφανίζουν ένα μικρό ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας του τραύματος μετά από 8 ώρες, ενώ δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των κυττάρων ελέγχου και των κυττάρων όπου έχει γίνει η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου (Εικόνα 35C). Στην περίπτωση της επαγωγής με 10ng/ml VEGF παρατηρείται αύξηση στην επιφάνεια κάλυψης σε σχέση με το θρεπτικό μέσο όπως αναμένεται. Στις εν λόγω συνθήκες, η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου μειώνει το ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου κατά περίπου 10% με μη στατιστικά σημαντικό τρόπο σε σχέση με τα κύτταρα τα οποία έχουν διαμολυνθεί με το SiRNA ελέγχου (Εικόνα 35D). Στην περίπτωση της επαγωγής της μεταναστευτικότητας με τον FGF-2 σε συγκέντρωση 25ng/ml παρατηρείται σημαντική αύξηση στο ποσοστό κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου μετά από 8 ώρες ενώ στη σύγκριση μεταξύ των κυττάρων ελέγχου και των κυττάρων όπου έχει γίνει αποσιώπηση της RhoD, εμφανίζεται μια στατιστικά σημαντική μείωση της μεταναστευτικής ικανότητας στην περίπτωση του SiRhoD της τάξης του 20% (Εικόνα 35E). Τέλος, στην περίπτωση του πλήρους θρεπτικού μέσου EGM2 το οποίο είναι και το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε και για τις δοκιμές σχηματισμού του αγγειακού δικτύου που θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο, η αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων, έφτασε σε παρόμοια επίπεδα στα κύτταρα ελέγχου με την περίπτωση της επαγωγής με FGF-2, αλλά η μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων στα οποία έγινε η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου, ήταν εμφανώς μειωμένη και έφτασε σε ένα ποσοστό της τάξεως του 30% με στατιστικά σημαντικό τρόπο (Εικόνα 35F).



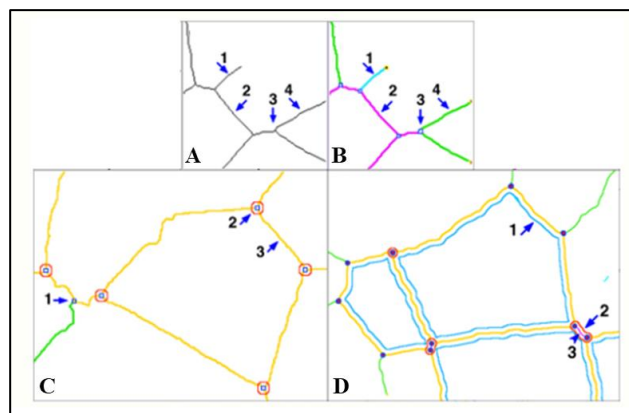


**Εικόνα 35.** Η αποσιώπηση του *RHO*D γονιδίου μειώνει τη μεταναστευτική ικανότητα κυττάρων *HUVEC* παρουσία αυξητικών παραγόντων *bFGF*, *VEGF* και του θρεπτικού μέσου *EGM2*. Κύτταρα επιστρώθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας 96 φρεατίων, την επόμενη ημέρα δημιουργήθηκε τραύμα και προστέθηκαν οι αυξητικοί παράγοντες *VEGF* (10ng/ml), *bFGF* (25ng/ml) σε μέσο *M199*, 5% *FBS*. Σε άλλα φρεάτια έγινε αλλαγή θρεπτικού μέσου σε πλήρες θρεπτικό μέσο *EGM2*. Ελήφθησαν εικόνες σε φακό 10X, για 8 ώρες, ενώ για τη μέτρηση της κάλυψης του τραύματος χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *Fiji-ImageJ*. **A) Αποτελεσματικότητα του *SiRhoD*.** Σε κάθε δοκιμή *RNA* απομονώθηκε από κύτταρα στις 24 και τις 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση και ελέγχθηκε η επιτυχής αποσιώπηση της *RhoD* με τη μέθοδο της *qRT – PCR*. **B) Σύσταση του θρεπτικού μέσου *EGM2*.** **D – F. Μείωση στο ποσοστό κάλυψης επιφάνειας του τραύματος μετά από αποσιώπηση της *RhoD*.** Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές εικόνες και η στατιστική ανάλυση, σχετικά με την επιφάνεια του τραύματος που καλύφθηκε μετά από 8 ώρες στα κύτταρα ελέγχου © και στις συνθήκες παρουσία *VEGF* (**D**), *bFGF* (**E**) και *EGM2 full* (**F**). Κύτταρα ελέγχου ήταν *HUVEC* σε *M199* 5% διαμολυσμένα με το *Scrambled SiRNA*. (n = 4). \*\*\*: p < 0.001, \*\*: p < 0.01, \*: p < 0.05



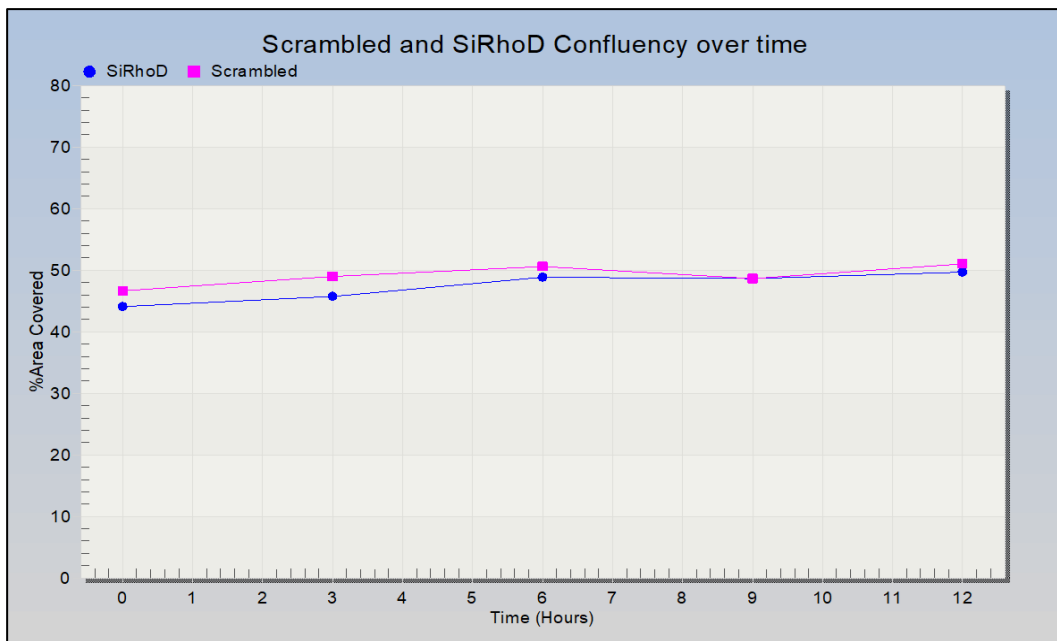
### 3.6.2 Η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου διαταράσσει τον φυσιολογικό σχηματισμό και τη συντήρηση του αγγειακού δικτύου των *HUVECs* σε τριδιάστατες καλλιέργειες *Matrigel*.

Εφόσον η αποσιώπηση του *RhoD* γονιδίου επηρεάζει τη μεταναστευτική ικανότητα των *HUVECs*, επόμενος στόχος ήταν ο έλεγχος της επίδρασης της αποσιώπησης της *RhoD* στο σχηματισμό αγγειακών δομών των ΕΚ. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία ελέγχου της αγγειογένεσης *in vitro* (tube formation assay), κατά την οποία τα ΕΚ προσκολλώνται, μεταναστεύουν και σχηματίζουν τριχοειδείς αυλούς σε υπόστρωμα *Matrigel*. Τα *HUVECs* στα οποία είχε προηγηθεί αποσιώπηση της *RhoD* για 24 ώρες τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα *Matrigel* και επώαστηκαν σε πλήρες θρεπτικό μέσο EGM2. Η παρατήρηση των δομών και η φωτογράφησή τους έγινε με τη χρήση μικροσκοπίου TIRF, για μια χρονική διάρκεια 14 ωρών με φωτογραφίες ανά 2 ώρες. Η παραπάνω χρονική διάρκεια της παρατήρησης ορίστηκε έτσι ώστε να περιλαμβάνει την κορύφωση του σχηματισμού του αγγειακού δικτύου που συμβαίνει στις 6 με 8 ώρες (ώριμο δίκτυο) καθώς και τη σταδιακή του αποικοδόμηση μετά το πέρασμα 10 ωρών. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του πρόσθετου *Angiogenesis Analyzer* μέσω του *Fiji-ImageJ*. Βάσει της συγκεκριμένης εφαρμογής, ποσοτικοποιήθηκαν δομές που αποτελούν τις βασικές παραμέτρους σχηματισμού του αγγειακού δικτύου και η αξιολόγηση του, έγινε με βάση τους κόμβους (nodes) (Εικόνα 36A3) που είναι τα σημεία από όπου ξεκινούν οι διασταυρώσεις, οι κλειστοί βρόγχοι (meshes) (Εικόνα 36D1), οι διακλαδώσεις (branches) (Εικόνα 36A4) και τα τμήματα του αγγειακού δικτύου τα οποία οριοθετούνται από δύο διασταυρώσεις (master segments) (Εικόνα 36C3) (134).

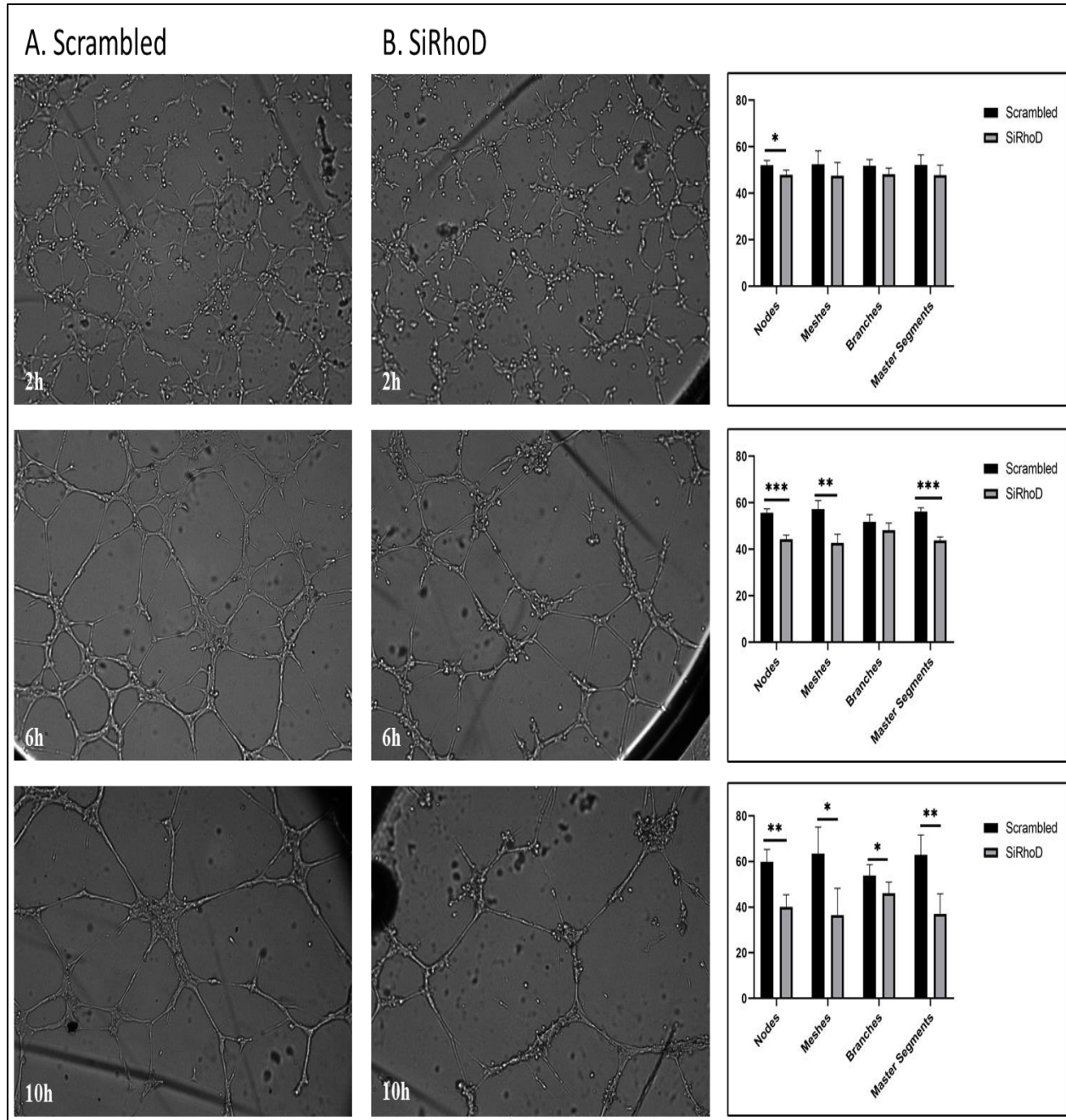


**Εικόνα 36.** Σχηματική αναπαράσταση του αγγειακού δικτύου όπως αναλύεται από το πρόσθετο *angiogenesis analyzer* του *ImageJ*. **A και B)** 1. Εμφανίζονται τα ελεύθερα άκρα, 2. Ορίζονται ως τα απλά τμήματα του δικτύου, 3. Παρατηρούνται οι κόμβοι. **C)** 1. Οροθετείται ένας κόμβος 2. Παρατηρείται μια διασταύρωση, 3. Ένα κύριο τμήμα του δικτύου ορίζεται από 2 διασταυρώσεις που οδηγούν σε ένα κλειστό βρόγχο όπως φαίνεται στο **D1**.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που έγιναν, έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων ελέγχου (scrambled) σε σχέση με αυτά που έχει γίνει η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου, 24 ώρες μετά τη διαμόλυνση με το SiRhoD. Το αγγειακό δίκτυο ξεκινάει στις 2 ώρες να είναι παρόμοιο στα κύτταρα ελέγχου και στα SiRhoD κύτταρα, ενώ στη συνέχεια η πρόοδος του σχηματισμού του δικτύου και η ωριμότητα του είναι αισθητά μειωμένη. Αυτό φαίνεται στις 6 και στις 8 ώρες όπου το αγγειακό δίκτυο στα κύτταρα ελέγχου είναι πιο ολοκληρωμένο σε σχέση με τα κύτταρα του SiRhoD. Επίσης, παρατηρείται μια σημαντικά ταχύτερη αποδόμηση του δικτύου η οποία δεν επηρεάζεται από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 37) καθώς στην περίπτωση του SiRhoD αρχίζει και αποικοδομείται από τις 10 ώρες και μετά με πολύ ταχύτερο ρυθμό, ενώ στην περίπτωση του scrambled δικτύου η αποδόμηση αρχίζει πιο σταδιακά. Συνεπώς παρατηρείται αδυναμία της ορθής δημιουργίας αλλά και διατήρησης του αγγειακού δικτύου στην περίπτωση του SiRhoD κάτι που μπορεί να υποδηλώσει πως τα κύτταρα HUVEC είναι λιγότερο ενεργά (Εικόνα 38). Παρόμοια αποτελέσματα εμφανίστηκαν και στην περίπτωση της αποσιώπησης της RhoD, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση με το SiRhoD.



**Εικόνα 37.** Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός HUVE κυττάρων δεν επηρεάζεται στις πρώτες 12 ώρες μετά τη διαμόλυνση με το SiRhoD. Με τη χρήση του Incucyte®, έγινε μέτρηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVE στα οποία έχει γίνει διαμόλυνση με το SiRhoD και ελέγχθηκε η πολλαπλασιαστική ικανότητα των κυττάρων σε βάθος 12 ωρών.



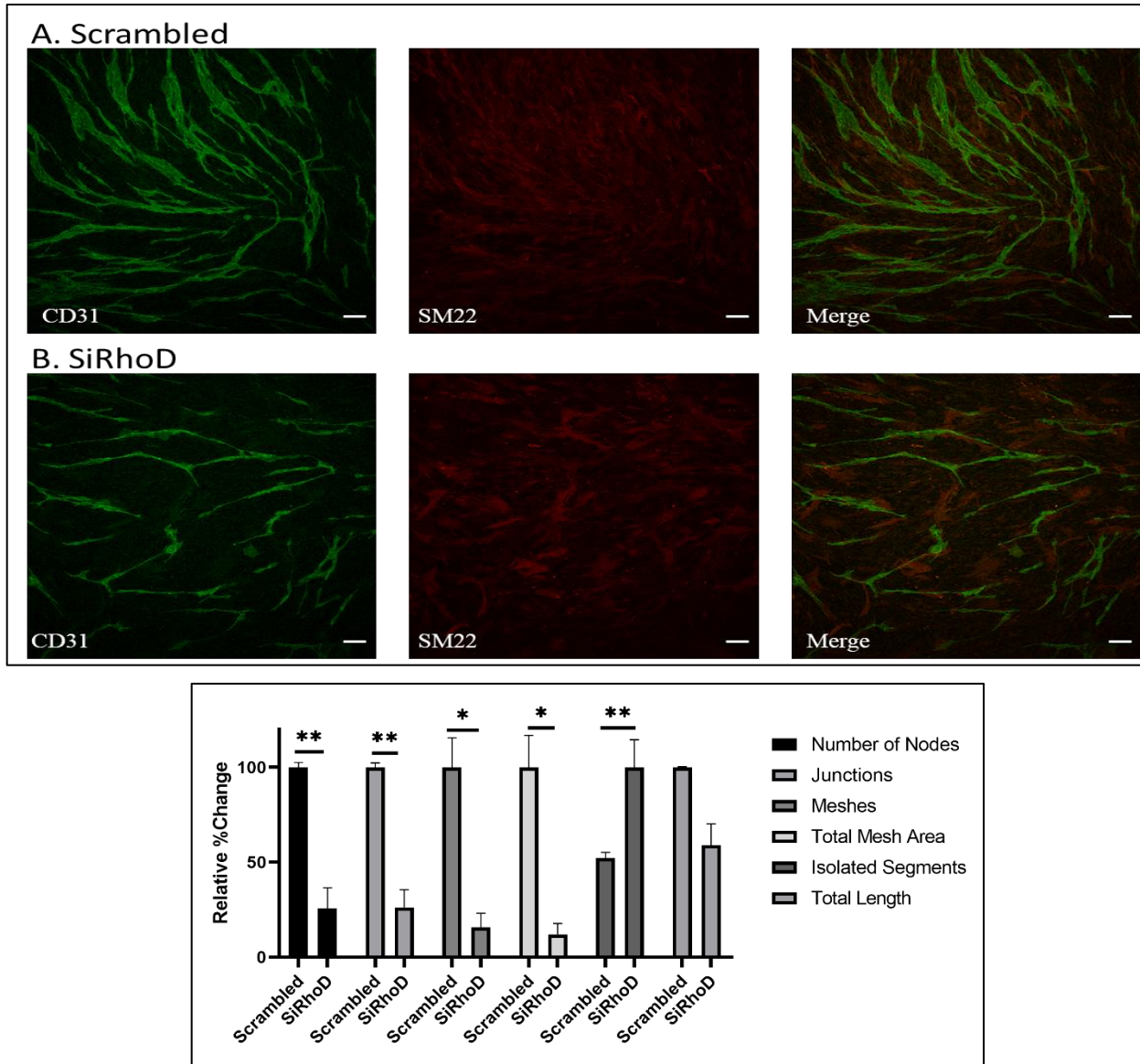
**Εικόνα 38.** Η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου διαταράσσει το σχηματισμό αγγειακού δικτύου κυττάρων *HUVE* σε τρισδιάστατη καλλιέργεια *Matrigel*. Υπόστρωμα *Matrigel* τοποθετήθηκε σε ειδικά πλακίδια μελέτης αγγειογένεσης (*μ-slide Angiogenesis, Ibidi*), και επωάστηκε στους 37°C μέχρι να στερεοποιηθεί. 10.000 κύτταρα *HUVE* επιστρώθηκαν στο *Matrigel* σε θρεπτικό μέσο *EGM2* πλήρως συμπληρωμένο και η παρατήρηση τους έγινε για 14 ώρες. Ελήφθησαν φωτογραφίες για να παραληφθεί όλο το πεδίο από το φρεάτιο και σε κάθε πείραμα υπήρχαν 3 εσωτερικές επαναλήψεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις 2 ώρες που είναι το αρχικό στάδιο του σχηματισμού του αγγειακού δικτύου, στις 6 ώρες που είναι η ωρίμανση και στις 10 ώρες που ξεκινάει η αποδόμηση του αγγειακού δικτύου. Η ανάλυση έγινε με τη χρήση του πρόσθετου εργαλείου του *Fiji – ImageJ*, *Angiogenesis analyzer*.  $n = 4$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ . \*:  $p < 0.05$

### ***3.6.3 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου διαταράσσει την ακεραιότητα του αγγειακού δικτύου μετά από συγκαλλιέργεια με MSCs.***

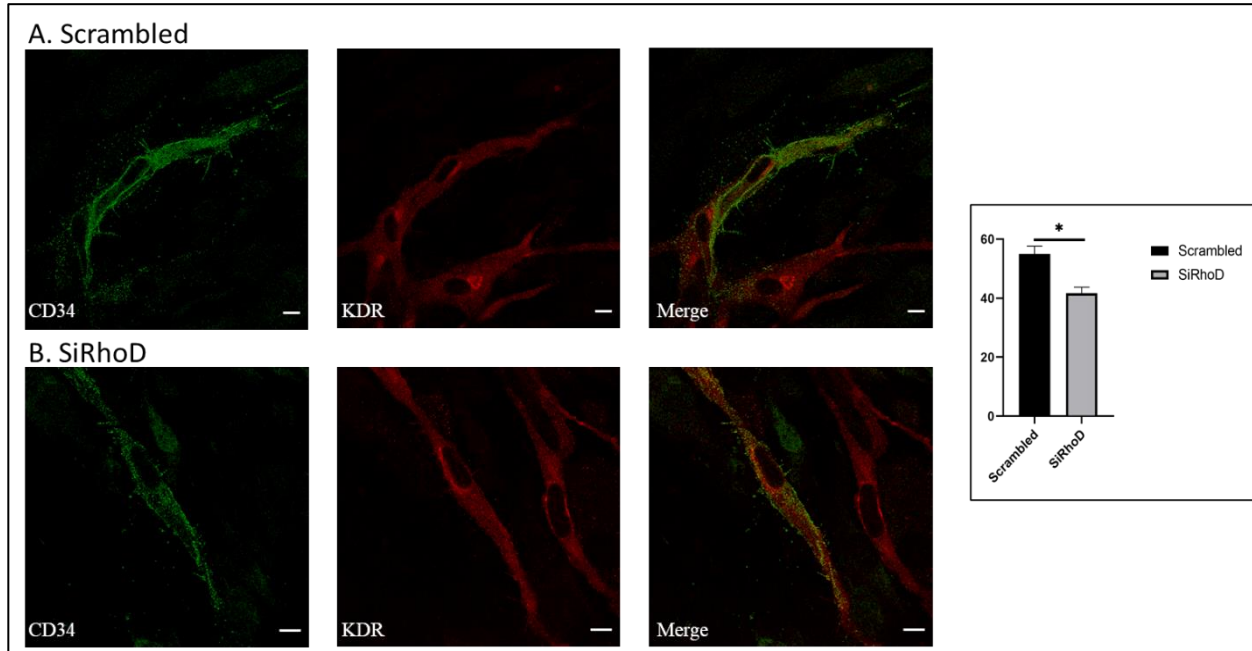
Ένα επόμενο επίπεδο ελέγχου της αποσιώπησης της RhoD στην ορθή και ακέραια κατασκευή αγγειακού δικτύου είναι με τη χρήση MSCs σαν βάση για την στερεοποίηση των HUVECs. Είναι μια δομή που προσομοιώνει καλύτερα το περιβάλλον των EK στον οργανισμό από ότι η εξωκυττάρια ουσία Matrigel. Για το λόγο αυτό 40.000 κύτταρα HUVE στα οποία είχε γίνει η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου με τη χρήση της τεχνολογίας του SiRNA, αλλά και 40.000 κύτταρα HUVEC όπου έχει γίνει διαμόλυνση με το SiRNA ελέγχου (scrambled) επιστρώθηκαν σε πλήρως καλυμμένο από MSCs φρεάτιο. Μετά από 48 ώρες τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του δικτύου αγγειοποίησης Matrigel, έδειξαν ένα πολύ πιο αδύναμο δίκτυο κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Πιο συγκεκριμένα, μετά την ανάλυση με το πρόσθετο angiogenesis analyser του Fiji-ImageJ παρατηρήθηκε μείωση σε όλους του παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν το δίκτυο της συγκαλλιέργειας όπως ο αριθμός των κόμβων, των διασταυρώσεων, της συνολικής επιφάνειας του δικτύου της συνολικής επιφάνειας των πλεγμάτων που δημιουργεί το αγγειακό δίκτυο και των ελεύθερων άκρων (Εικόνα 39).

### ***3.6.4 Η αποσιώπηση του RHOD γονιδίου μειώνει τον αριθμό των CD34+ κυττάρων HUVEC, κάτι που σχετίζεται με την ενεργότητα και την ικανότητά τους να προκαλέσουν σωστή αγγειοποίηση σε πειράματα συγκαλλιέργειας με MSCs***

Ο δείκτης CD34 είναι μια πρωτεΐνη η οποία αυξάνεται κατά τη διάρκεια της αγγειοποίησης και είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη των ακραίων EK τα οποία θεωρούνται και τα πιο ενεργά κατά τη διαδικασία της αγγειοποίησης (135), (136). Χρησιμοποιώντας το ήδη εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο συγκαλλιέργειας με MSCs που χρησιμοποιήθηκε στο [κεφάλαιο 3.6.3](#) Η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου διαταράσσει την ακεραιότητα του αγγειακού δικτύου μετά από συγκαλλιέργεια με MSCs., Χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών KDR/VEGFR2 και CD34, για τη σήμανση των EK είδαμε ότι η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου οδηγεί σε μείωση κατά 20% των EK που εκφράζουν το δείκτη CD34 σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου (scrambled) (Εικόνα 40).



**Εικόνα 39.** Η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου διαταράσσει το αγγειακό δίκτυο σε συγκαλλιέργεια κυττάρων *HUVEC – MSCs*. 40.000 ενδοθηλιακά κύτταρα *HUVE* επιστρώθηκαν και καλλιεργήθηκαν πάνω στην επιφάνεια κυττάρων *MSCs* για 48 ώρες, εφόσον είχε προηγηθεί αποσιώπηση της *RhoD* με τη χρήση *SiRNA* (**B**) για 24 ώρες, και σύγκριση του αγγειακού δικτύου που δημιουργήθηκε με τα κύτταρα ελέγχου *Scrambled* (**A**). Ως δείκτης των κυττάρων *HUVE* χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη *CD31* και ως δείκτης για τα *MSCs* χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη *SM22*. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με βάση το πρόσθετο *angiogenesis analyser* του *Fiji-ImageJ* και συγκρίθηκε η ποσοστιαία αλλαγή στον αριθμό των κόμβων, των διασταυρώσεων, του πλέγματος, και της συνολικής του επιφάνειας, των ελεύθερων άκρων και το συνολικό μήκος του δικτύου.  $n=3$ , ράβδος κλίμακας 100 $\mu\text{m}$ . \*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$



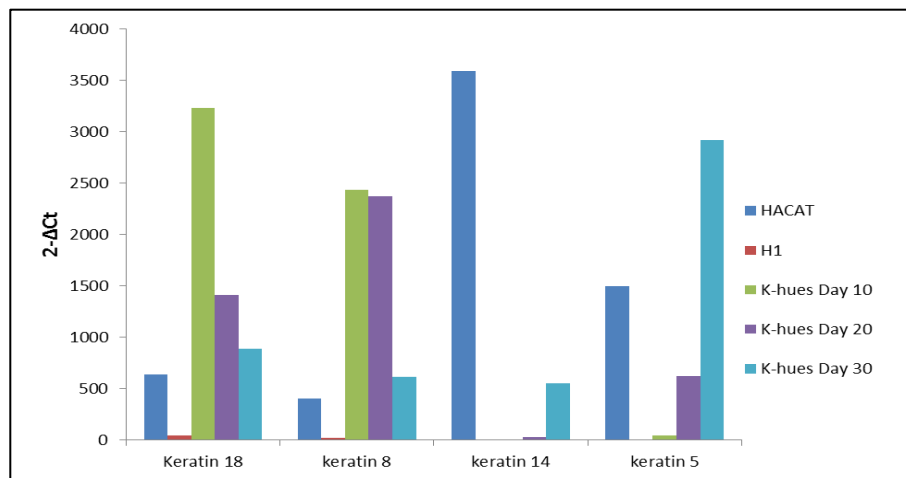
*Εικόνα 40. Η αποσιώπηση του RHO D γονιδίου μειώνει τον αριθμό των CD34+ κυττάρων HUVEC σε συνκαλλιέργεια με MSCs. Scrambled Si(A), SiRhoD(B). Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν με το Si Scrambled και το SiRhoD και 40.000 επιστρώθηκαν σε τρυβλία που ήδη είχαν καλυφθεί με MSCs. Μετά από έμμεσο ανοσοφθορισμό και χρώση με τις πρωτεΐνες KDR για τη χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων και της πρωτεΐνης CD34 για τη χρώση των ενδοθηλιακών κυττάρων κορυφής έγινε μέτρηση των θετικών σε CD34 κυττάρων. Μετρήθηκαν 50 κύτταρα θετικά στον KDR σε κάθε συνθήκη ανά πείραμα. Ράβδος κλίμακας 10μm. (n = 3). \*: p<0.05*

### 3.7 Κατασκευή μοντέλου τεχνητού δέρματος από κερατινοκύτταρα (K14+) προερχόμενα από διαφοροποίηση ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (HuESCs)

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή το δέρμα είναι ένας από τους ιστούς κατά το σχηματισμό των οποίων συντελούνται ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις από τη βασική προς τις υπερβασικές στιβάδες. Η κατασκευή τρισδιάστατων δομών τεχνητού δέρματος από βλαστοκύτταρα έχει ήδη μελετηθεί (129) (137) (138). Επίσης έχειδειχθεί πως η έκφραση της RhoDG26V σε διαγονιδιακά ποντίκια, έχει οδηγήσει την έκφραση της πρωτεΐνης δείκτη κερατίνης 14 (K14) στις ανώτερες στιβάδες του δέρματος, μια ένδειξη για αλλαγή του τρόπου των κυτταρικών διαιρέσεων που συντελούνται στο δέρμα από ασύμμετρες σε συμμετρικές (64). Για να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση της RhoD στην κυτταρική διαίρεση έγινε η προσπάθεια για την κατασκευή ενός τρισδιάστατου τεχνητού μοντέλου δέρματος από κερατινοκύτταρα τα οποία προήλθαν από διαφοροποίηση των HuESCs.

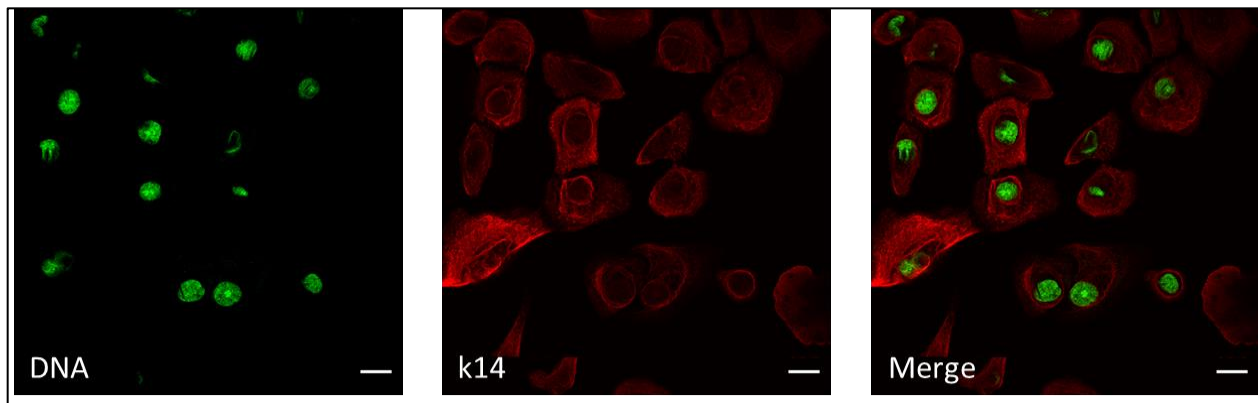
### 3.7.1 Η διαφοροποίηση των HuESCs σε κερατινοκύτταρα εγκαθιδρύθηκε με τη χρήση του αυξητικού παράγοντα BMP4 και του ρετινοϊκού οξέος (RA) σε χημικά καθορισμένο θρεπτικό μέσο

Τα βλαστικά κύτταρα καλλιεργήθηκαν και αποικίες χρησιμοποιήθηκαν για τη διαφοροποίηση όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 2.14 Πρωτόκολλο διαφοροποίησης hESCs προς κερατινοκύτταρα-δημιουργία μοντέλου δέρματος. Με τη χρήση 10ng/ml του αυξητικού παράγοντα BMP4 (Gibco) και 1μM ρετινοϊκού οξέος (Sigma) σε θρεπτικό μέσο Defined Keratinocyte Serum Free medium (DKSFM), έγινε η επαγωγή προς εξώδερμα και στις ημέρες 10, 20 και 30 της διαφοροποίησης, RNA απομονώθηκε για τον έλεγχο της ορθής εξέλιξης της με qRT – PCR. Όπως αναμενόταν, κατά τη διάρκεια των 30 ημερών, τα αποτελέσματα έδειξαν μείωση της πρωτεΐνης κερατίνης 18 και μείωση της πρωτεΐνης κερατίνης 8, οι οποίες είναι επιθηλιακοί δείκτες και έχουν μειωμένη έκφραση στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα. Αντίστοιχα εμφανίστηκε αύξηση της πρωτεΐνης κερατίνης 5 αλλά και της κερατίνης 14. Η τελευταία είναι και ο δείκτης που χαρακτηρίζει τα κερατινοκύτταρα καθώς βρίσκεται μόνο στη βασική στιβάδα του δέρματος η οποία δίνει γένεση στις υπερβασικές στιβάδες και τελικά στο δέρμα στην τελική του μορφή (Εικόνα 41).



**Εικόνα 41. Έκφραση των δεικτών διαφοροποίησης προς κερατινοκύτταρα με τη μέθοδο της qRT-PCR.** RNA που απομονώθηκε ανά 10 ημέρες κατά την πορεία της διαφοροποίησης, αναλύθηκε με qRT-PCR και ελέγχθηκε για τους δείκτες της διαφοροποίησης που οδηγούν στην παραγωγή των κερατινοκυττάρων. Στην εικόνα παρατηρούμε ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα διαφοροποίησης. Ως θετικά κύτταρα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν τα κύτταρα HaCAT τα οποία είναι πλήρως διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα ενώ σαν αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν βλαστικά κύτταρα H1. Η κανονικοποίηση έγινε με τη χρήση του GAPDH.

Τα κύτταρα τα οποία προέκυψαν στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν στο θρεπτικό μέσο της διαφοροποίησης για μερικές γενεές. Ο αρχικός πληθυσμός ήταν ανομοιογενής και περιείχε κύτταρα τα οποία δεν είχαν διαφοροποιηθεί αλλά και κύτταρα τα οποία είχαν διαφοροποιηθεί σε K14+ κύτταρα. Για να γίνει ομοιογενής κυτταρικός πληθυσμός χρησιμοποιώντας την ιδιότητα των κερατινοκυττάρων να προσκολλώνται στα πιάτα καλλιέργειας ισχυρά, σε αντίθεση με μη διαφοροποιημένα κύτταρα, έγινε επιλογή των K14+ κυττάρων, με τη χρήση της επιλεκτικής τρυψινοποίησης, όπου τα μη διαφοροποιημένα κύτταρα αποκολλώνται γρήγορα με τη χρήση τρυψίνης κατά την ανακαλλιέργεια σε αντίθεση με κύτταρα τα οποία έχουν διαφοροποιηθεί και τα οποία μένουν προσκολλημένα στο πιάτο καλλιέργειας μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Με τη χρήση της παραπάνω μεθόδου, μετά από 4 ανακαλλιέργειες έγινε εφικτό να προκύψει ένας πληθυσμός ο οποίος ήταν ομοιογενής σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν καθολικά την κερατίνη 14 (Εικόνα 42)



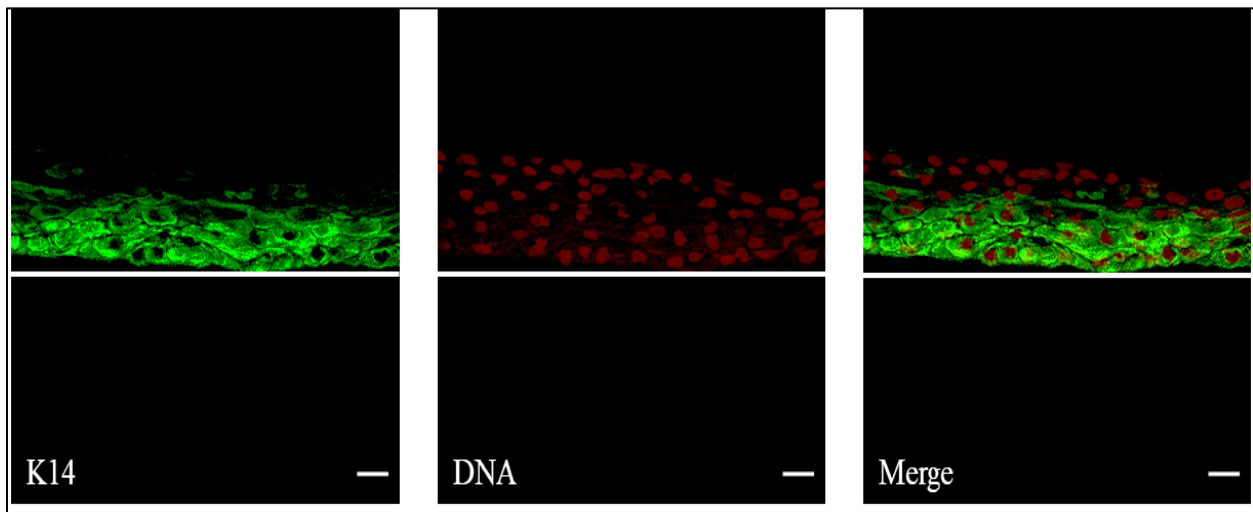
*Εικόνα 42. Εικόνα του ομοιογενούς πληθυσμού κερατινοκυττάρων μετά από 4 ανακαλλιέργειες. Αντιπροσωπευτική εικόνα του πληθυσμού των K14+ κυττάρων που προήλθαν από το πρωτόκολλο διαφοροποίησης 30 ημερών από HuESCs. Έχει προηγηθεί η επιλεκτική τρυψινοποίηση για την απόκτηση ενός ομοιογενούς πληθυσμού κυττάρων. Ράβδος κλίμακας 20μm.*

### **3.7.2 Η διαδικασία στρωματοποίησης και παραγωγής του τρισδιάστατου μοντέλου του δέρματος πραγματοποιήθηκε και προέκυψαν δομές που προσομοιώνουν δερματικές στιβάδες.**

Μετά την επιτυχή διαφοροποίηση HuESCs σε K14+ κύτταρα έγινε, η δοκιμή για τον σχηματισμό στιβάδων που να προσομοιώνουν τις δερματικές. Έτσι, τα K14+ κύτταρα επιστρώθηκαν στα φίλτρα πολυανθρακίτη έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του φίλτρου με κύτταρα. Η τροφοδοσία των κυττάρων με θρεπτικό υλικό γινόταν και από την επιφάνεια του φίλτρου με το θρεπτικό μέσο CnT Prime και την επόμενη ημέρα έγινε αλλαγή του θρεπτικού μέσου στο CnT 3D



Barrier. Από τα κύτταρα, την ημέρα 2, αφαιρέθηκε το θρεπτικό μέσο από την επιφάνεια του φίλτρου και η τροφοδότηση γινόταν μόνο από το φρεάτιο σε επαφή με το φίλτρο. Μετά από 14 ημέρες, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε υγρό άζωτο και έγινε ανοσοϊστοχημεία σε τομές που πραγματοποιήθηκαν σε κρουτόμο, με χρώση για την K14 η οποία θα πρέπει να χρωματίσει κύτταρα που βρίσκονται στη βασική στιβάδα και όχι κύτταρα τα οποία μπορεί να έχουν υποστεί διαφοροποίηση προς τις ανώτερες στιβάδες του τεχνητού δέρματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη στρωματοποίησης σε 4 με 5 επίπεδα κυττάρων από την επιφάνεια του φίλτρου και αρνητική χρώση για την K14 στα ανώτερα στρώματα τα οποία προέκυψαν, κάτι που υποδηλώνει την παρουσία κυτταρικών διαιρέσεων που διαφοροποίησαν τα κύτταρα από αυτά της βασικής μεμβράνης (Εικόνα 43).

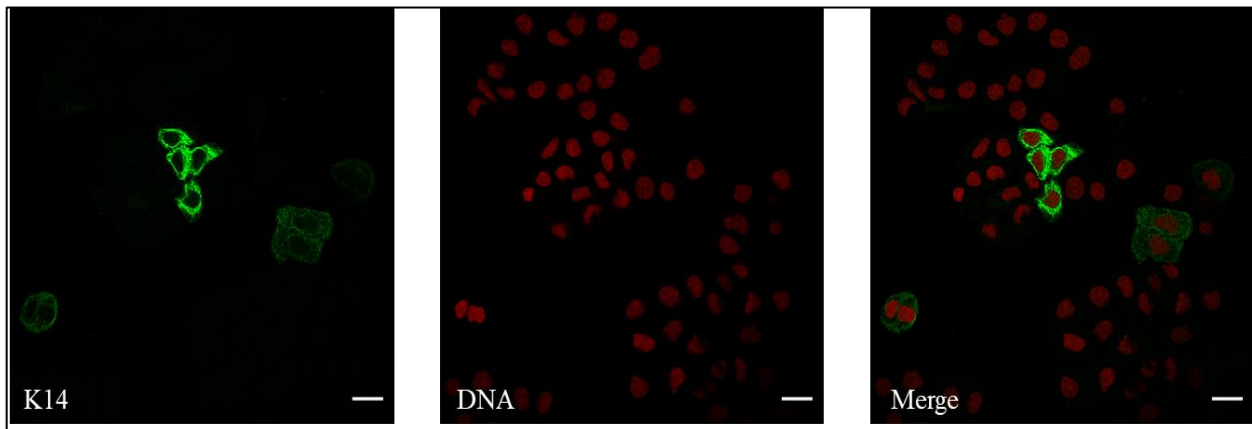


*Εικόνα 43. Δημιουργία στιβάδων του τεχνητού δέρματος. Τα θετικά στην K14 κύτταρα μετά την καλλιέργειά τους στα φίλτρα του πολυανθρακίτη για 14 μέρες και χωρίς την παρουσία θρεπτικού μέσου στην επιφάνεια τους, δημιούργησαν κυτταρικές στιβάδες. Οι κυτταρικές στιβάδες οι οποίες δεν διαφοροποιήθηκαν και προσομοιώνουν τη βασική δερματική στιβάδα ήταν θετικές στη χρώση με την πρωτεΐνη K14 μετά από δοκιμές ανοσοϊστοχημείας ενώ οι ανώτερες στιβάδες που μπορεί να διαφοροποιήθηκαν δεν εκφράζουν την K14 η οποία είναι ειδική για τη βασική στιβάδα του δέρματος. Ράβδος κλίμακας 20μm, ενώ η λευκή γραμμή κατά μήκος των κυττάρων χαρακτηρίζει την επιφάνεια του φίλτρου πολυανθρακίτη.*

### 3.8 Η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου επηρεάζει την κυτταρική διαίρεση και την ανομοιογένεια του πληθυσμού κυττάρων τριπλού αρνητικού καρκίνου του μαστού και επάγει τις συμμετρικές διαιρέσεις (MDA-MB-468)

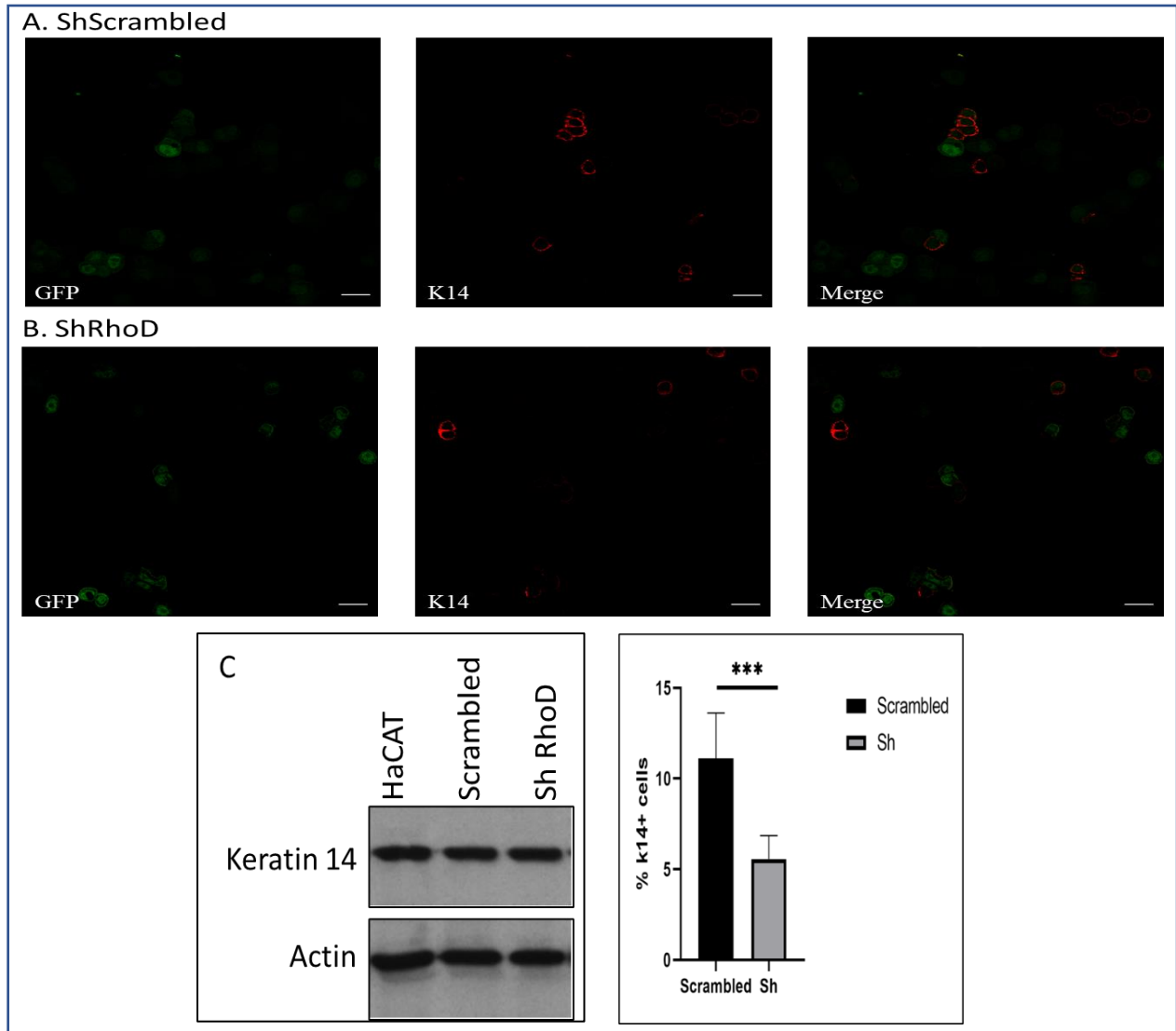
Η κυτταρική σειρά MDA-MB-468, είναι σταθερή κυτταρική σειρά κυττάρων καρκίνου του μαστού η οποία παρουσιάζει ανομοιογένεια στην έκφραση της πρωτεΐνης Κερατίνης 14. Επίσης, στα εν λόγω κύτταρα παρατηρούνται ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις οι οποίες προκαλούν

αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού στην K14 και κατά συνέπεια αύξηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων (97). Όπως έχει ήδη αναφερθεί λόγω της επίδρασης της RhoD στην έκφραση της K14 στο δέρμα, μελετήθηκε και η επίδραση της στον κυτταρικό πληθυσμό των MDA-MB-468. Αρχικά ελέγχθηκε η υπόθεση της ανομοιογένειας στον πληθυσμό των κυττάρων MDA-MB-468. Κύτταρα επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες και έγινε έλεγχος για την έκφραση της K14 με τη διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν μια ανομοιογενή κατανομή στην έκφραση της K14 μέσα στον κυτταρικό πληθυσμό (Εικόνα 44).



**Εικόνα 44.** Η ανομοιογενής έκφραση της Κερατίνης 14 σε κύτταρα MDA-MB-468. Κύτταρα MDA-MB-468 επιστρώθηκαν και έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός για τον έλεγχο της έκφρασης της K14. Η χρώση των πυρήνων έγινε με το Propidium Iodide (PI). Ράβδος κλίμακας 20μm.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η άμεση επίδραση της RhoD στην έκφραση της K14. Κύτταρα MDA-MB-468 τα οποία επιστρώθηκαν σε καλυπτρίδες, επιμολύνθηκαν με τον λέντι-ιό που εκφράζει το Sh RNA της RhoD (shRhoD) και με τον λέντι-ιό ελέγχου (shScrambled). Οι εν λόγω ιοί έχουν στο γονιδίωμα τους τον επίτοπο GFP και έτσι τα θετικά κύτταρα στους ιούς χρωματίζονταν πράσινα υπό το υπεριώδες φως. Τα κύτταρα μετρήθηκαν με τη χρήση του υπολογιστικού προγράμματος Fiji-ImageJ και τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη έκφραση της K14 στα κύτταρα τα οποία είχαν επιμολυνθεί με τον λέντι-ιό που εκφράζει το ShRhoD κατά ένα ποσοστό της τάξης του 50%. Για να πιστοποιηθεί πως η μείωση αυτή στην κερατίνη οφείλεται στην επίδραση της RhoD συγκεκριμένα στις ΑΚΔ, έγινε ανοσοαποτύπωση κατά western σε κύτταρα HaCAT τα οποία ως τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα δεν έχουν τη δυνατότητα να διαιρούνται ασύμμετρα. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης έδειξαν πως η αποσιώπηση του RhoD γονιδίου δεν επηρεάζει την έκφραση της κερατίνης 14 στα κύτταρα HaCAT (Εικόνα 45).

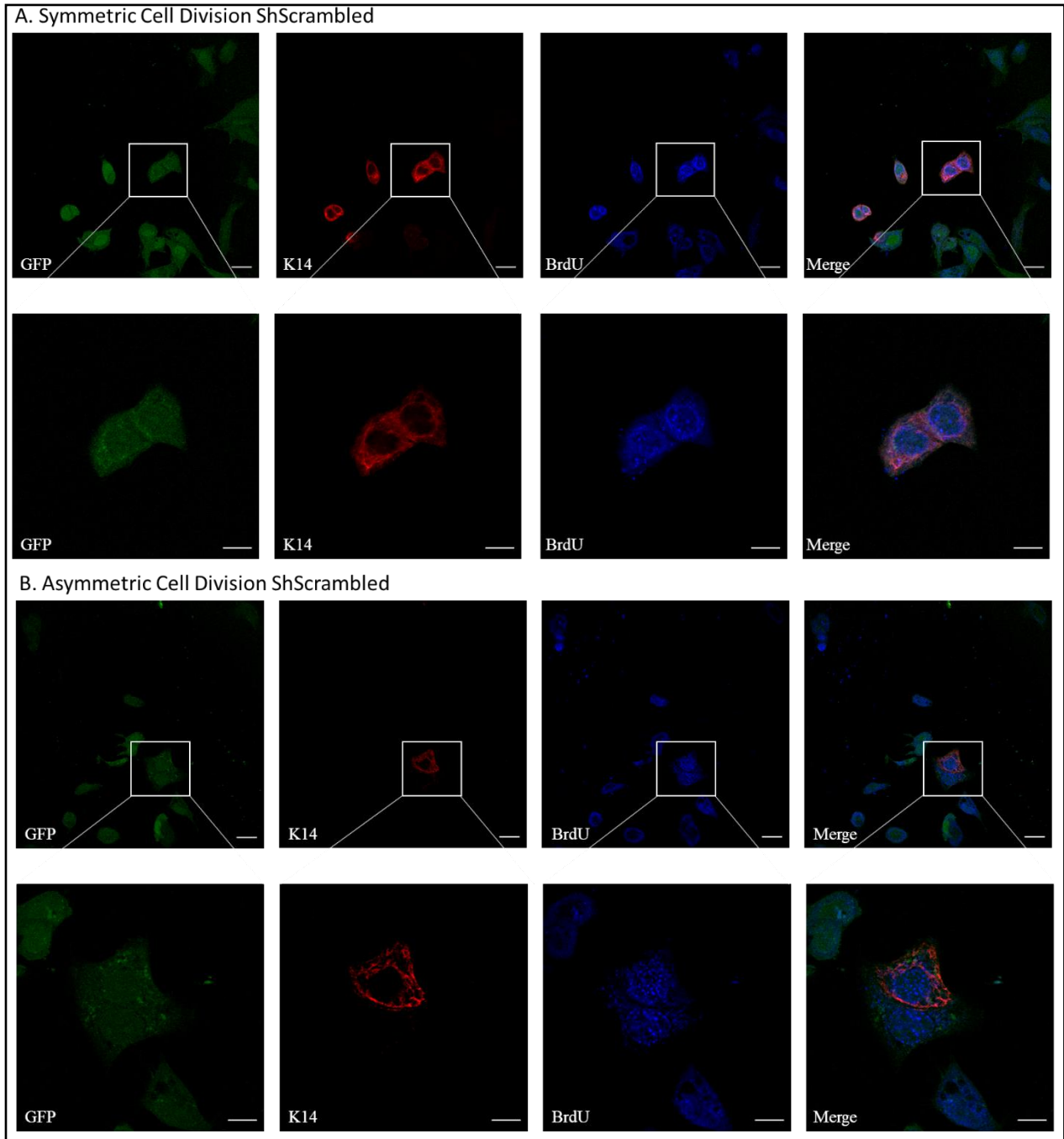


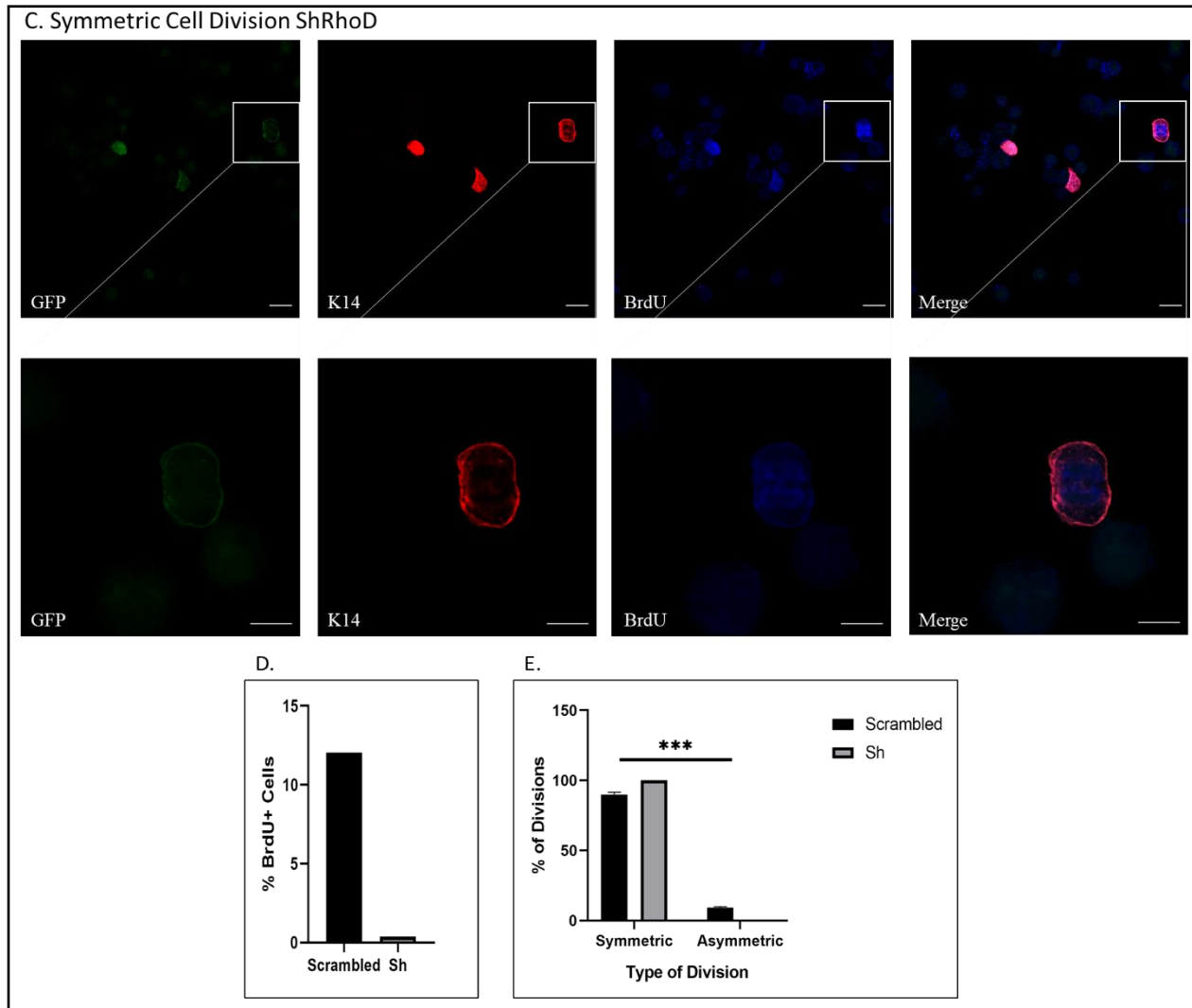
**Εικόνα 45.** Η έκφραση της Κερατίνης 14 (K14) μειώνεται σε κύτταρα τα οποία έχουν επιμολυνθεί με τον ιό της αποσιώπησης της RhoD (ShRhoD, B) σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου (ShScrambled, A). MDA-MB-468 κύτταρα επιμολύνθηκαν με τους λέντι-ιούς ελέγχου και ShRhoD και ελέγχθηκαν για την έκφραση της K14. Τα θετικά στους ιούς κύτταρα είχαν τον επίτοπο GFP και έτσι υπήρξε ο διαχωρισμός από τα κύτταρα τα οποία ήταν αρνητικά στους λέντι-ιούς. Σαν πείραμα ελέγχου σχετικά με την άμεση επίδραση της αποσιώπησης της RhoD στην έκφραση της κερατίνης 14 χρησιμοποιήθηκε η ανοσοαποτύπωση κατά western σε τελικός διαφοροποιημένα σειρά κερατινοκυττάρων HaCAT (C). Στο γράφημα παρατηρείται η έκφραση της K14 στο σύνολο των κυττάρων που μετρήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Fiji – ImageJ. Ράβδος κλίμακας 20 $\mu$ m, \*\*\*:  $p < 0.001$

Όπως αναφέρθηκε, ο κυτταρικός πληθυσμός των MDA-MB-468, εμφανίζει ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις σχετικά με τα κύτταρα που εκφράζουν την K14. Για να πιστοποιηθεί κατά πόσο οι πιθανές συμμετρικές ή ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις προήλθαν από το ίδιο κύτταρο, σε κύτταρα τα οποία είχαν επιμολυνθεί με τους λέντι-ιούς ShScrambled και ShRhoD, έγινε επώαση για 4 ώρες με τον παράγοντα BrdU και στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν για άλλες

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

24 ώρες για να πολλαπλασιαστούν. Έπειτα, έγινε έμμεσος ανοσοφθορισμός για την έκφραση της K14 και για τα θετικά σε BrdU κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων στα ShScrambled κύτταρα σε ποσοστό 10% των περιπτώσεων, ενώ υπήρχε ένα ποσοστό του συνολικού πληθυσμού θετικό στον BrdU στο 13%. Αντίθετα, στα κύτταρα τα οποία είχαν επιμολυνθεί με το ShRhoD, δεν παρατηρήθηκε καμία ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση, ενώ τα θετικά κύτταρα στον παράγοντα BrdU ήταν σε πολύ χαμηλό ποσοστό (Εικόνα 46).





**Εικόνα 46.** Έλεγχος της ασύμμετρης και της συμμετρικής κυτταρικής διαίρεσης σε κύτταρα MDA – MB – 468 μετά από την επιμόλυνση με τους λέντι – ιούς ShScrambled (A κ B) και ShRhoD (C). Κύτταρα MDA – MB – 468B επιμολύνθηκαν με τους λέντι – ιούς ShScrambled και ShRhoD και στη συνέχεια επωάστηκαν για 4 ώρες με τον παράγοντα BrdU (50µM). Μετά την αφαίρεση του BrdU τα κύτταρα επωάστηκαν άλλες 24 ώρες και ελέγχθηκαν με ανοσοφθορισμό, για την παρουσία της K14, του BrdU σε θετικά στην επιμόλυνση κύτταρα (GFP). **A)** Συμμετρική κυτταρική διαίρεση στα κύτταρα shScrambled και η μεγέθυνση της (ράβδος κλίμακας, 20µm και 10µm). **B)** Εικόνα ασύμμετρης κυτταρικής διαίρεσης στα κύτταρα shScrambled και η μεγέθυνση της (ράβδος κλίμακας, 20µm και 10µm). **C)** Εικόνα συμμετρικής κυτταρικής διαίρεσης στα κύτταρα shRhoD και η μεγέθυνση της (ράβδος κλίμακας, 20µm και 10µm). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Fiji – ImageJ. Αναλύθηκε το ποσοστό των κυτταρικών διαιρέσεων που ήταν θετικό στον BrdU (**D**) και το σύνολο των κυτταρικών διαιρέσεων που χαρακτηρίζονται σαν συμμετρικές ή ασύμμετρες με βάση την έκφραση της K14, εκφραζόμενες ως ποσοστό σε σχέση με το σύνολο τους (**E**). \*\*\*:  $p < 0.001$

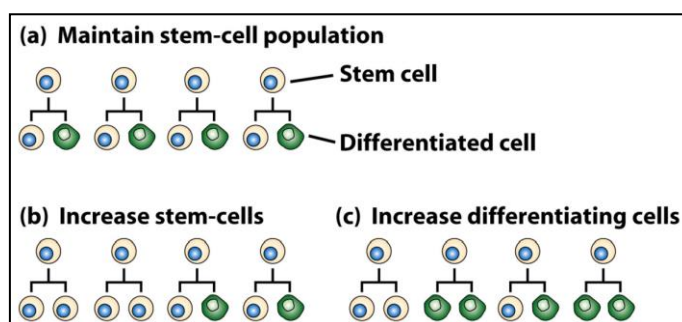
## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό, στην ανάπτυξη πολυκύτταρων οργανισμών, με τον οποίο ένα κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά, που έχουν διαφορετική αναπτυξιακή μοίρα. Ο ορισμός αυτός χρησιμοποιείται γενικευμένα ακόμη και αν μια κυτταρική διαίρεση παράγει ισομεγέθη θυγατρικά κύτταρα, με τη προϋπόθεση ότι σε αυτά κληρονομούνται μοριακές ασυμμετρίες που οδηγούν σε ξεχωριστή κυτταρική μοίρα. Η ΑΚΔ εκτελείται σε διαδοχικά βήματα, τα οποία συνίστανται από: α) την εγκαθίδρυση πολικότητας στο μητρικό κύτταρο, β) την ασύμμετρη κατανομή καθοριστικών παραγόντων κατά μήκος του άξονα πολικότητας, γ) τον προσανατολισμό της μιτωτικής ατράκτου κατά μήκος του άξονα πολικότητας, δ) την εκτέλεση της ασύμμετρης διαίρεσης και ε) την παγίωση της ξεχωριστής μοίρας των θυγατρικών κυττάρων (8). Κατά το πλείστον, οι γνώσεις, όσον αφορά την ΑΚΔ προέρχονται από πειράματα στους οργανισμούς μοντέλα, όπως *C. elegans* και *D. melanogaster* και αφορούν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών τύπων, όπως τον ζυγώτη του σκουληκιού και τους νευροβλάστες της μύγας. Οι μοριακοί μηχανισμοί που προτείνονται από τα αποτελέσματα αυτά δεν εξηγούν όμως επαρκώς την ΑΚΔ σε άλλους οργανισμούς. Για το λόγο αυτό η μελέτη της ΑΚΔ σε περισσότερους οργανισμούς μοντέλα, και κυρίως σε ανθρώπινα κύτταρα/συστήματα, όπως στην παρούσα διατριβή, θα δώσει μια πιο γενικευμένη εικόνα των εξελικτικά συντηρημένων μοριακών μηχανισμών της ΑΚΔ.

Τα αδιαφοροποίητα εμβρυικά κύτταρα δεν είναι τα μόνα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να διαιρούνται ασύμμετρα. ΑΚΔ έχουν παρατηρηθεί τόσο σε βακτήρια και μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (139), όσο και σε βλαστικά κύτταρα ενηλίκου στον άνθρωπο και το ποντίκι (140), (94). Είναι επίσης γνωστό ότι ακόμη και διαφοροποιημένα κύτταρα (π.χ., πρόιμα λεμφοκύτταρα) διαιρούνται ορισμένες φορές με ασύμμετρο τρόπο (141). Άρα, η ΑΚΔ θα πρέπει να θεωρηθεί ως ένας εναλλακτικός τρόπος κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ο οποίος ενεργοποιείται εκλεκτικά όταν χρειάζεται να δημιουργηθούν νέοι κυτταρικοί τύποι (142), (8). Αυτή η ανάγκη εμφανίζεται κυρίως κατά την εμβρυική ανάπτυξη, αλλά και όταν πρέπει να επιτευχθεί ταχεία προσαρμογή σε ένα νέο χυμικό (humoral) περιβάλλον, ή να αναπληρωθούν απώλειες που συμβαίνουν στην ενήλικη ζωή (ανατροφοδότηση φυσιολογικών και ανάπλαση/επιδιόρθωση κατεστραμμένων ιστών). Η εναλλακτική χρησιμοποίηση ασύμμετρων

και συμμετρικών διαιρέσεων είναι μέρος μιας ευρύτερης στρατηγικής των βλαστικών κυττάρων για να διατηρούν το λόγο βλαστικών/διαφοροποιημένων κυττάρων στην επιθυμητή για κάθε ιστό ισορροπία (143). Έτσι, η χρησιμοποίηση κατά κύριο λόγο ΑΚΔ οδηγεί στη δημιουργία διαφοροποιημένων κυττάρων χωρίς να επηρεάζεται η δεξαμενή των βλαστικών κυττάρων (Εικόνα 47a). Η υπερίσχυση των συμμετρικών διαιρέσεων αυτοανανέωσης (και τα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι βλαστικά) οδηγεί σε αύξηση της δεξαμενής των βλαστικών κυττάρων (Εικόνα 47b), ενώ η υπερίσχυση των συμμετρικών διαιρέσεων διαφοροποίησης (και τα δύο θυγατρικά κύτταρα είναι διαφοροποιημένα) οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των διαφοροποιημένων κυττάρων (Εικόνα 47c).



Εικόνα 47. Στρατηγικές των βλαστικών κυττάρων αναφορικά με την εναλλακτική χρησιμοποίηση συμμετρικών και ασύμμετρων κυτταρικών διαιρέσεων (Morrison & Kimble, 2006)

## 4.2 Η ΑΚΔ στην εμβρυική ανάπτυξη και τον καρκίνο

Η μελέτη των μοριακών μηχανισμών της ΑΚΔ κατά την διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων απαιτεί εστίαση είτε με τη μελέτη της δραστηριότητας κάποιου συγκεκριμένου μοριακού στόχου είτε μελετώντας τις επιδράσεις κάποιου συγκεκριμένου μορίου. Πράγματι είναι μάλλον αδύνατο να μελετήσει κανείς συγχρόνως τους μηχανισμούς των πέντε (α-ε) διαδοχικών βημάτων της ΑΚΔ. Ένας άλλος λόγος για τον οποίο πολλές φορές είναι δύσκολο να μελετηθούν οι μηχανισμοί της ΑΚΔ σε βλαστικά κύτταρα είναι τα τεχνικά προβλήματα επιμόλυνσης/μόλυνσης φορέων εμβρυικών βλαστικών κυττάρων για την έκφραση μόνιμα ενεργών/ανενεργών μορφών μορίων ή την αποσιώπηση των γονιδίων τους. Πρόβλημα επίσης μπορεί να αποτελέσει ενδεχόμενη εμβρυική θνησιμότητα από το διαγονίδιο. Στις περιπτώσεις αυτές η μόνη εναλλακτική δυνατότητα μελέτης των μοριακών μηχανισμών της ΑΚΔ είναι τα καρκινικά κύτταρα και ο καρκίνος. Ο τελευταίος συμβαίνει όταν τα φυσιολογικά κύτταρα επαναπρογραμματίζονται ως συνέπεια της συσσώρευσης γενετικών αλλαγών που παρέχουν στα κύτταρα ορισμένες «επίκτητες» ικανότητες.

Οι αποκτηθείσες ιδιότητες των καρκινικών κυττάρων, τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα του καρκίνου, μοιάζουν με τις ιδιότητες των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα σε αντίθεση με τους φυσιολογικούς επιθηλιακούς ομολόγους παρουσιάζουν ταχύ πολλαπλασιασμό, απώλεια διαφοροποίησης, μείωση των ιδιοτήτων προσκόλλησης, βελτιωμένη επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάβαση που οδηγεί σε εισβολή και μετάσταση, και ικανότητα επαγωγής αγγειογένεσης για να αναφέρουμε μερικά από αυτά. Πληθώρα δεδομένων δείχνουν ότι η εμβρυϊκή ανάπτυξη και ο καρκίνος χρησιμοποιούν τα ίδια γονίδια και ρυθμιστικά κυκλώματα σε αντίθετες κατευθύνσεις. Πολλά μόρια που παίζουν βασικό ρόλο κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης απορρυθμίζονται ή μεταλλάσσονται στον καρκίνο. Είναι γνωστό ότι πολλές εμβρυϊκές πρωτεΐνες, που επανεκφράζονται από τα καρκινικά κύτταρα, είναι σημαντικοί διαγνωστικοί και προγνωστικοί δείκτες. Η φυσιολογική ανάπτυξη χρησιμοποιεί αυτούς τους μηχανισμούς κυριολεκτικά με εποικοδομητικό τρόπο για να χτίσει έναν πολυκύτταρο οργανισμό, αλλά ο καρκίνος διακόπτει αυτά τα κυκλώματα για να καταργήσει την τάξη και να προκαλέσει αποδιοργάνωση των ιστών.

#### 4.3 Η απάλειψη της RhoD επηρεάζει τη σηματοδότηση της Ακτιβίνης A

Η RhoD είναι μια ενδοσωματικά εντοπισμένη RhoD GTPάση. Για να μελετηθεί ο ρόλος της RhoD στις λειτουργίες της ενδοσωματικής σηματοδότησης, εξετάστηκε η επίδραση της απάλειψης της RhoD στη σηματοδότηση παραγόντων ανάπτυξης που είναι γνωστό ότι σηματοδοτούν από τα ενδοσώματα, όπως η Activin A και ο TgFb. Αυτή η επιλογή υπαγορεύθηκε περαιτέρω λόγω του ευρήματος του εργαστηρίου του Wrana ότι η RhoD αλληλοεπιδρά με τη SMAD2, εμπλέκοντάς τη στους καταρράκτες σηματοδότησης της Activin A και του TgFb (144). Η προσοχή επικεντρώθηκε στην Activin A, ένα μέλος της υπεροικογένειας του TgFb, που επιλέχθηκε επειδή συμμετέχει σε σημαντικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η αγγειογένεση, η εμβρυϊκή ανάπτυξη μέσω επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μετάβασης και η μετανάστευση για την συντονισμένη ολοκλήρωση αναπτυξιακών σταδίων όπως η αυλάκωση και η γαστριδίωση (145).

Το αρχικό σχέδιο ήταν η απάλειψη της RhoD σε ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα, οπότε σχεδιάστηκε μια στρατηγική γονιδιακής στόχευσης (knock out) CRISPR και οι πρώτες δοκιμές έγιναν αρχικά σε κύτταρα HEK 293. Χρησιμοποιώντας τα κύτταρα HEK 293 CRISPR KO RhoD δοκιμάστηκαν οι αποκρίσεις στην επαγωγή με Activin A. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι



η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου/απάλειψη της RhoD GTPάσης **i)** οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της φωσφορυλιωμένης μορφής της SMAD2 και λιγότερο αυτής της SMAD3 στις σταθερές κυτταρικές σειρές στις οποίες η RhoD δεν εκφράζεται, ενώ ταυτόχρονα οι συνολικές SMAD2 και SMAD3 παρέμειναν σταθερές, **ii)** δεν είχε ουδεμία επίπτωση στην έκφραση ή φωσφορυλίωση των SMAD1/5/9 πρωτεϊνών μετά από επαγωγή με BMP4, **iii)** δεν βρέθηκαν ενδείξεις άμεσης φυσικής σύνδεσης μεταξύ RhoD/RhoDG26V και SMAD 2/3 ή 4, σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, και **iv)** μείωσε την έκφραση χαρακτηριστικών πρωτεϊνών-δεικτών όπως η EEA1, η CD63 και η Rabankyrin στα πρώιμα ενδοσώματα, τα όψιμα ενδοσώματα και τα μακροπινοςώματα, αντίστοιχα, ενώ η εντόπιση της Rabankyrin 5 άλλαξε από ενδοσωματική σε διάχυτη κυτταροπλασματική.

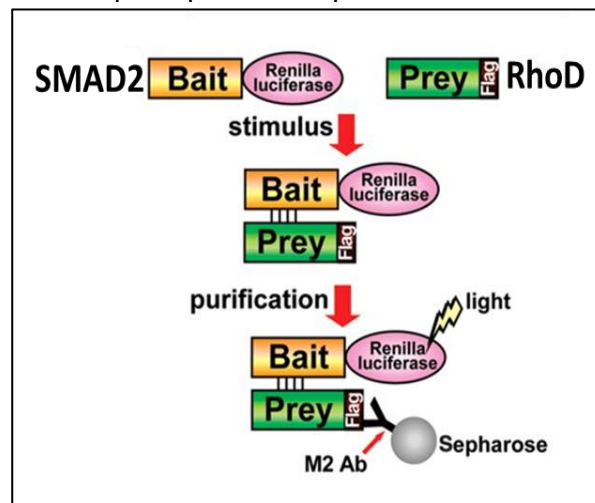
Η αύξηση της φωσφορυλίωσης πρωτίστως της SMAD2 και σε μικρότερο βαθμό της SMAD3 κατά την απάλειψη της RhoD GTPάσης, υποδεικνύει ότι η παρουσία της τελευταίας πρέπει να παίζει κατασταλτικό ρόλο στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 πρωτεϊνών. Λόγω της εντόπισης της RhoD στην πλασματική και τις ενδοσωματικές μεμβράνες, η δράση της στις SMAD2/3/4 φαίνεται να διαφοροποιείται από τη σύνδεση/αλληλεπίδραση μιας πλειάδας πρωτεϊνών (μεταγραφικών παραγόντων, συνενεργοποιητών, αποσιωποιητών) με τις SMAD πρωτεΐνες, οι οποίες τροποποιούν τη SMAD2/3-δραστικότητα (Πίνακας 5). Η δραστικότητα της RhoD έχει μια σαφή εκλεκτικότητα αναστέλλοντας κυρίως τη φωσφορυλίωση της SMAD2 και δευτερευόντως αυτή της SMAD3, αφήνοντας ανεπηρέαστη τη φωσφορυλίωση των SMAD1/5/9. Η φωσφορυλίωση των SMAD1/5/9 πρωτεϊνών, μετά από επαγωγή με BMP4, δεν επηρεάζεται ούτε θετικά ούτε αρνητικά. Η RhoD-επαγόμενη καταστολή στην φωσφορυλίωση της SMAD2 δεν φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα φυσικής σύνδεσης (άμεσης αλληλεπίδρασης) της RhoD με την SMAD2 καθώς οι δύο αυτές πρωτεΐνες δεν αλληλο-ανοσοκατακρημνίζονται. Είναι πιθανό ότι η RhoD να αλληλοεπιδρά με κάποια από τις υπομονάδες (εκτός SMAD2) του συμπλέγματος ACTIVIN A/ACVR2B/ACVR1B/SARA/SMAD2 δρώντας ανασταλτικά στη φωσφορυλίωση της SMAD2.

Πίνακας 5. Εξωπυρηνικά εντοπιζόμενες πρωτεΐνες που έχουν τη δυνατότητα να τροποποιούν τη δραστηριότητα των φωσφορυλιωμένων R-SMADS. ■: φωσφορυλίωση, □: αναστολή φωσφορυλίωσης, ◆: καμία επίδραση, κενό: δεν έχει ελεγχθεί

Πρωτεΐνη	SMAD πρωτεΐνες					Φυσική Σύνδεση	Περιγραφή	BIB
	2	3	1	5	9			
RhoD	□	□?	◆	◆	◆	-	Rho GTPάση πρώιμων ενδοσωμάτων	
ARIP1		□				+	Πρωτεΐνη προσαρμοστής στους υποδοχείς της ακτιβίνης	(146)
GRK2	□	□				+	Φωσφορυλίωση του συνδετικού τμήματος των R-SMAD	(147)
PDK1	□	□				+	Κινάση για την ενεργοποίηση της AKT/PKB	(148)
ERBIN	□	□				+	Αναστολή της TGFβ/Ακτιβίνης EMT	(149)
RGS3	□	□				+	Ρυθμιστική πρωτεΐνη των G πρωτεϊνών	(150)
HEF1		■				+	Κυτταροπλασματική πρωτεΐνη ελλειμισμού	(151)
SnoN	■	■				+	Κατακράτηση των SMAD πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα	(152)
β-catenin		■				+	Ρύθμιση απόπτωσης και διακυτταρικής προσκόλλησης	(153)
TMEPAI	■	■	◆	◆	◆	+	Ανταγωνισμός με τη SARA	(154)
CKI2		■				+	Ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση της SMAD3	(155)
NEDD4-2	□	□	□	□	□	+	Αποικοδόμηση SMAD2, TGFβRI και BMPRI	(156)
WW/Tiul2	□	□	□			+	Ρυθμίζει την Αποικοδόμηση της SMAD2 μέσω TGIF	(157)
SMURF1	□	□	□	□	□	+	Αποικοδόμηση των BMP, R-SMAD και TGFRI	(158)
SCF/Roc1		□				+	Ουβικιτίνωση και αποικοδόμηση της SMAD3	(159)
CHIP	■	■	■			+	Αναστέλλει την TGFβ/BMP EMT	(160)
AMSH			□			+	Ενίσχυση της αναστολής κυτταρικής ανάπτυξης	(161)
APC		■				+	Λιγάση ουβικιτίνωσης/πρωτεϊνική αποικοδόμηση	(162)
SARA	■	■				+	Αλληλοεπιδρά με TGFβRI, II	(163)
HRS	■	■	■	■	■	+	Ενίσχυση σύνδεσης SARA-SMAD2, εμπλοκή στο BMP μονοπάτι	(164)
cPML	■	■				+	Συμβάλλει στη ενδοσωματική εντόπιση των TGFβRI, II	(166)
Axin		■				+	Προσαρμοστής στον TGFβRI διαμέσου της SMAD3	(167)
Dab2	■	■				+	Προσαρμοστής στις TGFβRI, II ανεξαρτήτως προσδέματος	(168)
DOK-1	■	■				+	Προσαρμοστής των ACTRIB, ACTRIIA υποδοχέων	(169)
ELF		■				+	Απώλεια των TGFβ επαγόμενων αποκρίσεων	(170)
Arkadia	■	■				+	Ενίσχυση της p-SMAD2/3 μεταγραφικής ενεργοποίησης	(171)
Itch	■	■				+	Πολυουβικιτίνωση και αύξηση της p-SMAD2, θετική επίδραση στη p-SMAD3	(172) (173)
TLP	■	□				+	Προαγωγή SMAD2-p, αναστολή SMAD3-p	(174)
Calmodulin	□	■				+	Καταστολή SMAD2-p, αύξηση SMAD3-p	(175)
PAR-3						+	Ρυθμιστής της κυτταρικής πολικότητας	(176)
Dishevelled						+	Ρυθμιστής της κυτταρικής πολικότητας	(176)

MPS kinase	■	■				+	Ενεργοποίηση γονιδίων μέσω των SMAD που είναι σημαντικά στη μίτωση	(177)
------------	---	---	--	--	--	---	--	-------

Αν και τα πειραματικά δεδομένα, μάλλον αποκλείουν την άμεση φυσική σύνδεση της SMAD2 με την RhoD, οι δύο πρωτεΐνες βρέθηκαν σε σύμπλεγμα στο εργαστήριο του Wrana κατά τη διάρκεια σάρωσης (screening) υψηλής απόδοσης με μεθοδολογία συμβατή για την δημιουργία συμπλεγμάτων με άμεσες και έμμεσες αλληλεπιδράσεις (144). Η μέθοδος LUMIERE που ακολουθήθηκε αποτελεί μια μέθοδο όπου δύο πρωτεΐνες που βρίσκονται σε εγγύτητα η μία με την άλλη μπορούν να εντοπιστούν (Εικόνα 48). Διερευνώντας την πιθανή συν-εντόπιση των SMAD2 και RhoD, παρατηρήσαμε συσσώρευση των δύο πρωτεϊνών κοντά στο κεντρόσωμα, χωρίς αυτό



*Εικόνα 48. Η μέθοδος LUMIERE όπως χρησιμοποιήθηκε για τη RhoD και τη SMAD2. Η SMAD2 ήταν έφερε τη λουσιφεράση και η RhoD ήταν σημασμένη με τον επίτοπο FLAG. Στο ενδεχόμενο εγγύτητας μεταξύ των 2 και στη συνέχεια με τη χρήση φωτός, υπήρχε αποδέσμευση της αλληλοεπιδρούσας πρωτεΐνης και παγίδευση με σφαιρίδια και εντοπισμός με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Barrios & Rodiles, 2005).*

μόνο του να μπορεί να εξηγήσει την αυξημένη φωσφορυλίωση της SMAD2. Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να περιλαμβάνει την πρωτεΐνη SMURF2 (SMAD Ubiquitination Regulatory Factor 2), μια E3 λιγάση της ουβικιτίνης (E3 ubiquitin ligase) που αλληλοεπιδρά με τις SMAD1, SMAD2 και SMAD3. Αν και οι απόψεις για τη SMURF2 δίστανται αναφορικά με τη εξειδίκευση της δραστηριότητάς της έναντι στις SMAD1, 2 και 3 (178), (179) φαίνεται ότι η SMURF2 στοχεύει τόσο τη SMAD2 όσο και τη SMAD1 αλλά με προτίμηση προς τη SMAD2 (178). Έτσι, η SMURF2 αύξησε την αποικοδόμηση και μείωσε δραστικά τη μεταγραφική δραστηριότητα της SMAD2 κατά τη σηματοδότηση του TgFb. Παράλληλα, η επίδραση που είχε

στην αποικοδόμηση και τη μεταγραφική ικανότητα της SMAD3 ήταν μικρή παρά την δυνατότητα αλληλεπίδρασης με αυτή *in vitro* (178). Είναι λοιπόν πιθανό ότι η SMURF2 απενεργοποιεί επιλεκτικά ένα υποσύνολο αποκρίσεων σηματοδότησης που διαμεσολαβείται από τη SMAD2 αλλά όχι τη SMAD3 ή τη SMAD1. Αυτά τα δεδομένα σε συνδυασμό με την αλληλεπίδραση της RhoD με τη SMAD2 και τη SMURF2 (144) είναι σε θέση να εξηγήσουν τον ρόλο της SMURF2 στην επίπτωση του φαινοτύπου της απάλειψης της RhoD. Πράγματι, τα πειράματα, δείχνουν ότι κατά την απάλειψη της RhoD η φωσφορυλίωση της SMAD1/5/9 μετά από επαγωγή με BMP4 δεν επηρεάστηκε, όπως επίσης και η φωσφορυλίωση της SMAD3 μετά από επαγωγή με Activin A, αλλά αντίθετα τα επίπεδα της pSMAD2 αυξήθηκαν, πιθανά λόγω φυσικής σύνδεσης της RhoD με κάποια από τις υπομονάδες του συμπλέγματος της Activin A με τους υποδοχείς της, ενδεχομένως τη SMURF2, στοχεύοντας έτσι τη pSMAD2 για αποικοδόμηση αυξάνοντας τα επίπεδά της όταν απαλείφεται η RhoD.

#### 4.4 Η απάλειψη της RhoD μεταβάλλει το ενδοκυτταρικό διαμέρισμα

Λόγω της αλλαγής της σηματοδότησης που προκάλεσε η απάλειψη της RhoD, εξετάστηκαν πιο προσεκτικά, γνωστοί δείκτες του ενδοκυτταρικού διαμερίσματος για να ελεγχθεί αν αυτό άλλαξε με οποιονδήποτε τρόπο. Πράγματι, βρέθηκαν μειωμένα επίπεδα αρκετών πρωτεϊνών στα ενδοσώματα συμπεριλαμβανομένων των EEA1, Rab5 και Rabankyrin5. Τα πρώιμα ενδοσώματα αντιπροσωπεύουν τον πρώτο σταθμό διαλογής για τους υποδοχείς μετά το Clathrin-Mediated Endocytosis (CME). Υπό κανονικές συνθήκες τα πρώιμα ενδοσώματα περιέχουν Rab5 και τον τελεστή EEA1 (Early Endosomal Auto-antigen). Η πλήρης απάλειψη του EEA1 είναι ασύμβατη με την επιβίωση των κυττάρων, ωστόσο κύτταρα στα οποία η απάλειψη οδηγεί σε μείωση του επιπέδου της EEA1 κατά 80-90% τελικά επιβιώνουν και εμφανίζουν μείωση στην αποικοδόμηση του EGFR (180). Επομένως, η μείωση των ενδοσωματικών επιπέδων του EEA1 που προκύπτει από την απάλειψη της RhoD μπορεί να επιφέρει σημαντικές επιδράσεις στην αποικοδόμηση του υποδοχέα και αυτό πρέπει να μελετηθεί μελλοντικά.

Η Rab5 είναι μια πολύ σημαντική πρωτεΐνη της οικογένειας των Rab πρωτεϊνών. Οι Rab πρωτεΐνες είναι τα ανάλογα των Ras αλλά στον εγκέφαλο. Η μετάβαση από την GTP στην GDP μορφή της Rab5 και η αλληλοεπίδρασή της με τελεστές όπως είναι η Rabankyrin, την εμπλέκει στην ενδοσωματική μετακίνηση, την μεμβρανική μεταφορά και σε σηματοδοτικά μονοπάτια (181). Η απάλειψη της RhoD, μείωσε τα επίπεδα της Rab5. Επίσης η απάλειψη της RhoD, άλλαξε

τα επίπεδα της Rabankyrin 5, μιας πρωτεΐνης που φαίνεται να εμπλέκεται στη μακροπικοκυττάρωση. Στην περίπτωση της Rabankyrin 5, παλαιότερα πειράματα 2 υβριδίων του εργαστηρίου έδειξαν την αλληλοεπίδραση με τη RhoD και τα αποτελέσματα της γονιδιακής αποσιώπησης του RHOD, δείχνουν εκτός από μείωση στην έκφραση της Rabankyrin 5, μια πιθανή αλλαγή στον εντοπισμό της από ενδοσωματική σε κυτταροπλασματική.

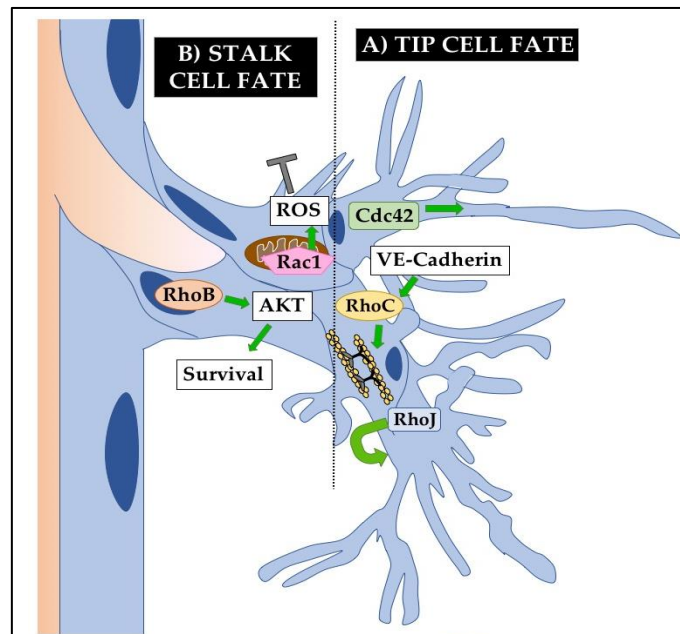
Συμπερασματικά, η απάλειψη του γονιδίου της *RHOD* οδήγησε όχι μόνο στη μειωμένη έκφραση της RhoD στο ενδοκυτταρικό διαμέρισμα, αλλά προκάλεσε και μείωση των βασικών επιπέδων των ενδοσωματικών πρωτεϊνών EEA1, Rabankyrin5 και Rab5. Επίσης παρατηρήθηκαν αλλαγές στον εντοπισμό της RhoD υποδηλώνοντας ευρύτερες μεταβολές σε όλη την ενδοκυτταρική οδό, η σημασία των οποίων απομένει να καθοριστεί.

#### 4.5 Η αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου αναστέλλει σειρά αγγειογενετικών δοκιμασιών

Η ΑΚΔ δεν είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται μόνο από τα βλαστικά κύτταρα, αλλά παρατηρείται και σε άλλα κύτταρα. Επειδή ήδη με βάση το δυσπρόσιτο της μελέτης των βημάτων της ΑΚΔ στα βλαστικά κύτταρα, σε συνδυασμό με τις δυσκολίες που παρουσιάζονται στη διαχείρισή τους (επιμόλυνση με ιϊκούς φορείς/διαμόλυνση με πλασμίδια), έγινε επίσης η εναλλακτική μελέτη της ΑΚΔ στον καρκίνο και τη νεοπλασματική αγγειογένεση. Συνοπτικά, η απάλειψη της RhoD GTPάσης οδήγησε στα παρακάτω αποτελέσματα σε σχέση με την αγγειογένεση:

- i.** μείωση της μεταναστευτικής ικανότητας των HUVE κυττάρων στη δοκιμασία επούλωσης τραύματος παρουσία FGF2 και θρεπτικού μέσου EGM2, που περιέχει πληθώρα αυξητικών παραγόντων,
- ii.** στατιστικά σημαντική μείωση των παραγόντων (διακλαδώσεις, κόμβοι, βρόγχοι κτλ.) που ορίζουν την ωριμότητα και σταθερότητα του αγγειακού δικτύου σε υπόστρωμα Matrigel, με αποτέλεσμα ένα σχεδόν κατεστραμμένο δίκτυο μετά από 12 ώρες.
- iii.** στατιστικά σημαντική μείωση της ωριμότητας και σταθερότητα του αγγειακού δικτύου σε υπόστρωμα Matrigel σε συγκαλλιέργεια με μεσεγχυματικά κύτταρα (MSCs) τα οποία σταθεροποιούν την αγγειογένεση. Τα αποτελέσματα ήταν ίδια με αυτά του σημείου ii.
- iv.** στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού των CD34+ κυττάρων HUVE ασύμβατη με τη σωστή διεκπεραίωση της διαδικασίας της αγγειοποίησης σε πειράματα συγκαλλιέργειας με MSCs.

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η απάλειψη της RhoD δεν είναι συμβατή με τη δημιουργία νέων αγγείων με αγγειογένεση ή αγγειοποίηση, διαδικασίες για τις οποίες φαίνεται ότι απαιτείται η παρουσία και η ενεργοποίηση της RhoD GTPάσης. Έτσι, η RhoD είναι η 8η Rho GTPάση που εμπλέκεται στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Πράγματι, η αγγειογένεση συμβαίνει μέσω του σχηματισμού εκβλαστήσεων που εκφύονται από προϋπάρχοντα αγγεία. Βασικά συστατικά μιας αγγειογενετικής εκβλάστησης είναι τα ακροκύτταρα (tip cells) που εξερευνούν και ακολουθούν διεγερτικές βαθμιδώσεις (π.χ. VEGF) και τα στελεχιαία κύτταρα (stalk cells) που υποστηρίζουν την επιμήκυνση των εκβλαστήσεων και την επέκταση του αυλού (Εικόνα 49). Η Cdc42 ρυθμίζει την κυτταροσκελετική οργάνωση στα ακροκύτταρα για την προώθηση του σχηματισμού λειτουργικών φιλοποδίων (182). Η RhoJ παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη βιολογία των ακροκυττάρων ρυθμίζοντας την επιλογή τους (183) (Εικόνα 49A). Η RhoB είναι γνωστό ότι ρυθμίζει την επιβίωση των στελεχιαίων κυττάρων μέσω της ρύθμισης της σηματοδότησης AKT από τον πυρήνα (184), (185). Εν τω μεταξύ, η Rac1 ρυθμίζει την παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου από τον μοναδικό εντοπισμό της στα μιτοχόνδρια των στελεχιαίων κυττάρων, αναστέλλοντας την αναπτυξιακή τους πορεία (μοίρα) (186) (Εικόνα 49B). Η RhoC παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της συστατικότητας της ακτομυοσίνης που απαιτείται για την αγγειογένεση (187). Στην εικόνα δεν απεικονίζονται Rho GTPases που είναι γνωστό ότι παίζουν



Εικόνα 49. Οι Rho GTPάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Barlow και Cleaver, 2019

σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, αλλά χωρίς καθορισμένο κυτταρικό μηχανισμό, συμπεριλαμβανομένων των RhoA (188), (189) και Rac2 (190).

#### 4.5 Η αποσιώπηση της RhoD GTPάσης εμπλέκεται στη ρύθμιση της ΑΚΔ στα MDA-MB-468 κύτταρα

Η συνεπιβλέπουσα Δρ. C. Murphy έχει ταυτοποιήσει τη RhoD GTPάση, η οποία εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη και στο πρώιμο ενδόσωμα (54). Πρόσφατα, έχει παρατηρηθεί ότι η μόνιμα ενεργή μορφή RhoDG26V προκαλεί υπερ-πολλαπλασιασμό σε συνδυασμό με ανεπαρκή διαφοροποίηση των επιδερμικών στιβάδων (πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που διατηρούν την έκφραση του δείκτη K14), όταν εκφράζεται στο δέρμα διαγονιδιακών ποντικών (64). Η επέκταση των κυττάρων βασικής στιβάδας (βασικής μεμβράνης) που εκφράζουν το K14 στις υπερ-βασικές στιβάδες της επιδερμίδας είναι συμβατή με μια αλλαγή στη διαίρεση των κυττάρων βασικής στιβάδας από ασύμμετρο σε συμμετρικό τρόπο. Πράγματι, τα βλαστικά κύτταρα της βασικής μεμβράνης διαιρούνται ασύμμετρα δημιουργώντας ένα βλαστικό (αδιαφοροποίητο) κύτταρο που διατηρεί την επαφή με τη βασική μεμβράνη και ένα διαφοροποιημένο θυγατρικό κύτταρο που δεν είναι προσκολλημένο στη βασική μεμβράνη κινούμενο μέχρι τις υπερ-βασικές στιβάδες (17). Αυτό επιτυγχάνεται με τον επαναπροσανατολισμό του μιτωτικού άξονα ώστε να είναι κάθετος προς τον άξονα της βασικής μεμβράνης κατά την ασύμμετρη διαίρεση. Συνεπώς, οι υπερ-βασικές στιβάδες της επιδερμίδας τροφοδοτούνται συνεχώς με διαφοροποιημένα κύτταρα, χωρίς επέκταση της βλαστικής στιβάδας της βασικής μεμβράνης. Έτσι με βάση αυτά τα δεδομένα έγινε εστίαση στην έρευνα των μοριακών μηχανισμών της ΑΚΔ διερευνώντας τον πιθανό ρόλο της RhoD, σύμφωνα με τις ενδείξεις από τα προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα της ομάδας μας. Για το σκοπό αυτό έγινε προσπάθεια να αποσιωπηθεί το γονίδιο *RHOD* σε H1 ανθρώπινα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (hESCs) χρησιμοποιώντας την τεχνολογία CRISPR/Cas9. Παρά τις επανειλημμένες προσπάθειες, αυτή η αποσιώπηση δεν έγινε ποτέ δυνατή, ενώ χρησιμοποιώντας ακριβώς την ίδια μεθοδολογία έγινε αποσιώπηση του *RHOD* γονιδίου σε ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού (HEK293). Άλλα μέλη της ερευνητικής ομάδας, χρησιμοποιώντας το ίδιο πρωτόκολλο, αποσιώπησαν το γονίδιο της ARF6 GTPάσης στα H1 hESC κύτταρα.

Μετά από τις βιοχημικές αλλά και τις λειτουργικές δοκιμές οι οποίες έγιναν για την επίδραση της απάλειψης/αποσιώπησης της RhoD, το επόμενο βήμα ήταν η προσπάθεια του ελέγχου της επίδρασης της σε δοκιμασίες που σχετίζονται με την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.

Το πρώτο βήμα ήταν η απόπειρα να δοκιμαστεί η επίδραση της RhoD σε ένα τεχνητό μοντέλο δέρματος 3D το οποίο από τη βιβλιογραφία φαίνεται πως μπορεί να εγκαθιδρυθεί με αρκετή επιτυχία (129) (138) (191). Η διαφοροποίηση των H1 hESCs σε θετικά K14 επιδερμικά κύτταρα λειτούργησε καλά και απέδωσε 100% θετικά κύτταρα K14. Όμως, όταν τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε φίλτρα για να δημιουργήσουν στρωματοποιημένο δέρμα, διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του δείκτη K14 δεν περιοριζόταν μόνο στη βασική στιβάδα αλλά εκφράζονταν σε όλη την επιδερμίδα, υποδηλώνοντας ότι τα κύτταρα δεν υποβλήθηκαν στο αναμενόμενο πρόγραμμα διαφοροποίησης. Έγιναν δοκιμές για την περαιτέρω ικανότητα των κυττάρων να διαφοροποιούνται όπως αναμενόταν χρησιμοποιώντας μπλοκ κολλαγόνου, ωστόσο τα κύτταρα ήταν πολύ ευαίσθητα στο ορό FBS και υπήρχε σημαντικό ποσοστό θνησιμότητας κυττάρων. Επομένως, αυτό απαιτεί περισσότερη δουλειά για τη βελτιστοποίηση του συστήματος. Επιπλέον, υπήρχαν τεχνικά προβλήματα με το γενετικό χειρισμό των θετικών κυττάρων K14. Τα κύτταρα αυτά ήταν ανθεκτικά σε μόλυνση από λέντι- και άδενο-ϊούς και διαμόλυνση. Σε μεταγενέστερα πειράματα, έγινε δοκιμή επίσης με τον Αδενοσχετιζόμενο ιό (Adeno-associated virus) και βρέθηκε ότι οι ορότυποι 6 και 7, αλλά όχι ο 2, μολύνει τα K14 + κύτταρα επιτρέποντας την έκφραση του GFP. Δυστυχώς, ο χρόνος δεν επέτρεψε τη δημιουργία των σχετικών ιών που εκφράζουν RhoD και siRhoD.

Τελικά, μελετήθηκε η επίδραση της μείωσης των επιπέδων της RhoD στην ΑΚΔ στο μοντέλο του τριπλά αρνητικού καρκίνου του μαστού. Πράγματι, στον καρκίνο αυτό η διαφοροποίηση συμβάλλει στη φαινοτυπική κυτταρική ετερογένεια εντός της νεοπλασματικής μάζας επηρεάζοντας την εξέλιξη της νόσου και τη θεραπεία. Σε τριπλά αρνητικούς βασικούς καρκίνους μαστού, τα κύτταρα που εκφράζουν την κερατίνη K14 διαθέτουν κατάσταση διαφοροποίησης που σχετίζεται με αυτή των φυσιολογικών αυλικών προγονικών κυττάρων, ενώ τα K14 αρνητικά κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση πλησιέστερη σε εκείνη των ώριμων αυλικών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι τα κύτταρα αυτά μπορούν να μεταβαίνουν μεταξύ αυτών των καταστάσεων διαφοροποίησης μέσω ασύμμετρων διαιρέσεων, οι οποίες παράγουν ένα K14 + και ένα θυγατρικό K14 - κύτταρο, και ότι αυτές οι ασύμμετρες διαιρέσεις συμβάλλουν στη δημιουργία κυτταρικής ετερογένειας (97). Επίσης, ρυθμιστές ελέγχουν το ποσοστό των κυττάρων K14 + στον πληθυσμό αυξάνοντας (EZH2 και Notch) ή μειώνοντας (FOXA1) τον αριθμό τους διαμέσου της επαγωγής των συμμετρικών ή ασύμμετρων διαιρέσεων, αντίστοιχα (97).



Η ετερογένεια αυτή προκαλείται από ΑΚΔ των καρκινικών κυττάρων που ρυθμίζονται από το σύμπλεγμα TGFβ/Par6 ή την πρωτεΐνη NOTCH (95), (96), (97), (99). Στο ερευνητικό πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα MDA-MB-468, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη ετερογένεια στην έκφραση της πρωτεΐνης K14 (97). Το ενδιαφέρον εύρημα των δοκιμασιών με τα κύτταρα MDA-MB-468, στα οποία χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της μόλυνσης με λέντι-ιούς για την αποσιώπηση της RhoD διότι ως κύτταρα είναι ιδιαίτερα δύσκολο να διαμολυνθούν, ήταν πως στην περίπτωση της μείωσης του επιπέδου της RhoD δεν εντοπίστηκε καμία ΑΚΔ. Αυτό παρατηρήθηκε στα κύτταρα ελέγχου σε ένα ποσοστό που βρισκόταν σε συνέπεια με τα αποτελέσματα τα οποία ήταν ήδη γνωστά (97), παρόλο που ο συνολικός αριθμός των διαιρούμενων κυττάρων στην περίπτωση της γονιδιακής αποσιώπησης της RhoD, ήταν μικρός. Επίσης, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων θετικών στην κερατίνη K14 ήταν αισθητά μειωμένος στην περίπτωση μείωσης του επιπέδου της RhoD. Δεδομένης της ετερογένειας της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς και με βάση τους συγγραφείς της συγκεκριμένης έρευνας πως ένα κύτταρο το οποίο είναι θετικό στην κερατίνη 18, μπορεί να διαιρεθεί ασύμμετρα και να δώσει ένα κύτταρο θετικό στη κερατίνη 14 και ένα αρνητικό, τότε φαίνεται πως η απάλειψη της RhoD αλλάζει τον τρόπο με το οποίο αυτό συμβαίνει περιορίζοντας τις ασύμμετρες κυτταρικές διαιρέσεις των καρκινικών κυττάρων μειώνοντας τον συνολικό πληθυσμό της κερατίνης K14. Στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού, η ύπαρξη αυξημένου πληθυσμού κερατίνης K14, σχετίζεται με αυξημένη μεταστατική ικανότητα των κυττάρων. Η μείωση αυτή στην κερατίνη K14, αποτέλεσμα της αποσιώπησης της RhoD μπορεί να καθιστά τις συγκεκριμένες μορφές καρκίνου λιγότερο επιθετικές.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Η ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση (ΑΚΔ) ενός μητρικού κυττάρου παράγει θυγατρικά κύτταρα εγγενώς προγραμματισμένα να ακολουθήσουν διαφορετικές αναπτυξιακές πορείες. Στην περίπτωση αυτή, συγκεκριμένες πρωτεΐνες, RNA και άλλα μακρομόρια κατανέμονται ασύμμετρα στην μία πλευρά του υπό διαίρεση κυττάρου και με αυτό τον τρόπο το θυγατρικό κύτταρο που έχει τους προαναφερθέντες παράγοντες θα ακολουθήσει διαφορετική αναπτυξιακή πορεία από το άλλο επιτρέποντας στα κύτταρα να αυτοανανεώνονται και ταυτόχρονα να διατηρούν το αναπτυξιακό δυναμικό τους. Αυτό ισχύει στα βλαστικά κύτταρα αλλά και σε άλλες διεργασίες, όπως η αγγειογένεση, η δημιουργία του δέρματος και ο καρκίνος

Η RhoD GTPάση εντοπίζεται στο κυτταροπλασματικό διαμέρισμα και στο πρώιμο ενδόσωμα. Η μόνιμα ενεργή μορφή της RhoD, RhoDG26V, προκαλεί ανεπαρκή διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων όταν εκφράζεται στο δέρμα διαγονιδιακών ποντικών. Η επέκταση των στιβάδων της επιδερμίδας στην περίπτωση της RhoDG26V, οδηγεί στην έκφραση της Κερατίνης 14, στις ανώτερες στιβάδες, κάτι που είναι συμβατό με αλλαγή του τύπου της κυτταρικής διαίρεσης από ασύμμετρη σε συμμετρική. Με βάση αυτά τα δεδομένα έγινε εστίαση στην έρευνα στην επίδραση της RhoD στους μηχανισμούς της ΑΚΔ και πιο συγκεκριμένα η επίδραση της απάλειψης του *RHOD* γονιδίου.

Αρχικά, έγιναν λειτουργικές δοκιμασίες για την επίδραση της απάλειψης της RhoD. Το γονίδιο *RHOD* απαλείφθηκε επιτυχώς σε κύτταρα HEK293 κάτι που δεν έγινε εφικτό στα βλαστοκύτταρα H1 λόγω κυτταρικού θανάτου. Το γεγονός πως η RhoD αποτελεί μια ενδοσωματικά εντοπισμένη πρωτεΐνη σε συνδυασμό με αποτελέσματα τα οποία υποδήλωναν αλληλοεπίδραση της RhoD με τη SMAD2, έγινε έλεγχος της επίδρασης της αποσιώπησης του *RHOD* γονιδίου στην επαγωγή από παράγοντες ανάπτυξης που είναι γνωστό πως σηματοδοτούν από τα ενδοσώματα όπως η Activin A, μέλος της υπερικογένειας του TGFβ η οποία συμμετέχει σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απάλειψη του *RHOD* γονιδίου οδήγησε σε αυξημένη επαγωγή της φωσφορυλίωσης της SMAD2, και λιγότερο της SMAD3, από την Activin A, υποδηλώνοντας πως η παρουσία της RhoD παίζει κατασταλτικό ρόλο στη φωσφορυλίωση των SMAD2 και SMAD3. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες SMAD1/5/9 έμειναν ανεπηρέαστες.

Καθώς δεν έχουμε ανιχνεύσει φυσική σύνδεση των SMAD2/3 με τη RhoD, μια εξήγηση της αύξησης των p-SMAD2/3 μετά από επαγωγή με Ακτιβίνη Α, απουσία RhoD, είναι η δυνατότητα έμμεσων αλληλοεπιδράσεων τους λόγω συνύπαρξής τους στο ίδιο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα. Επειδή η διακίνηση μεμβρανών πιθανά επηρεάζεται από την απάλειψη της RhoD, εξετάστηκαν δείκτες του ενδοκυτταρικού διαμερίσματος για να ελεγχθούν αλλαγές της σύστασής του. Πράγματι, τα αποτελέσματα έδειξαν πως βρέθηκαν μειωμένα τα επίπεδα των EEA1, CD63 και Rabankyrin 5. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αυτό επιτυγχάνεται δεν είναι γνωστοί και αυτό απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Η ΑΚΔ δεν είναι όπως αναφέρθηκε μια διαδικασία αποκλειστικά στα βλαστικά κύτταρα αλλά παρατηρείται και σε άλλα κύτταρα και διεργασίες όπως στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατά την αγγειογένεση. Η αποσιώπηση της RhoD GTPάσης στα κύτταρα HUVE μείωσε τόσο το μεταναστευτικό δυναμικό τους όσο και την ικανότητά τους να αναπτύξουν ένα σταθερό αγγειακό δίκτυο σε υπόστρωμα Matrigel μετά από 12 ώρες. Επίσης τα κύτταρα HUVE έδειξαν μειωμένη ωριμότητα και σταθερότητα του αγγειακού δικτύου σε συγκαλλιέργεια με μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία σταθεροποιούν περαιτέρω την αγγειογένεση. Τέλος, οι αγγειογενετικές δοκιμασίες έδειξαν και μειωμένο αριθμό θετικών στον δείκτη CD34 κυττάρων HUVE κάτι που τα καθιστά ασύμβατα με τη διαδικασία της αγγειοποίησης.

Μετά τις λειτουργικές δοκιμές και τις βιοχημικές δοκιμές οι οποίες έγιναν για την επίδραση της απάλειψης/αποσιώπησης της RhoD, έγινε ο έλεγχος της επίδρασης σε δοκιμασίες που σχετίζονται με την ΑΚΔ. Το μοντέλο του τεχνητού δέρματος το οποίο ήταν η πρώτη προσέγγιση δεν δούλεψε παρότι προέκυψε 100% πληθυσμός κυττάρων θετικών στο δείκτη της κερατίνης 14. Εξαιτίας αυτού, μελετήθηκε η επίδραση της μείωσης των επιπέδων της RhoD στην ΑΚΔ στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού και πιο συγκεκριμένα στην κυτταρική σειρά των MDA-MB-468 η οποία χαρακτηρίζεται από κυτταρική ετερογένεια και ΑΚΔ που δίνουν κύτταρα θετικά στην κερατίνη 14. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως στην περίπτωση της μείωσης των επιπέδων της RhoD, δεν εντοπίστηκε καμία ΑΚΔ κάτι που παρατηρήθηκε στα κύτταρα ελέγχου σε επίπεδα συμβατά με τη βιβλιογραφία. Επίσης, ο συνολικός αριθμός των κυττάρων θετικών στην Κερατίνη 14, ήταν αισθητά μειωμένος στην περίπτωση της μείωσης των επιπέδων της RhoD. Δεδομένου πως ο αυξημένος πληθυσμός της κερατίνης 14 στον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού σχετίζεται με αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων, η μείωση αυτή μπορεί να κάνει τις συγκεκριμένες μορφές καρκίνου λιγότερο επιθετικές.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν μια σημαντική συσχέτιση της RhoD στον τρόπο που ελέγχεται το κυτταρικό διαμέρισμα και η κυτταρική διαίρεση κάτι που μπορεί να είναι αντικείμενο περαιτέρω διερεύνησης σε όλα τα επίπεδα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)

The Asymmetric Cell Division (ACD) of a mother cell, gives birth to daughter cells intrinsically programmed to follow different developmental pathways, allowing the cells to maintain their self-renewal and developmental dynamics at the same time. ACD happens mainly in stem cells but also in other processes like angiogenesis, creation of skin layers and cancer.

RhoD GTPase is an endosomally localized protein. Constitutively active RhoD mutant, RhoDG26V, leads to dysfunctional differentiation of the epidermal layers when expressed in the basal layer of the epidermis of transgenic mice. Keratin 14, a protein normally expressed in the basal layer of the epidermis, is expressed in suprabasal layers upon expression of RhoDG26V. One possible explanation for this, even though other explanations are also possible, could be a swift in the mode of cell division from asymmetric to symmetric. Based on the above, we decided to address whether RhoD might be implicated in ACD using knock-out of *RHOD* gene.

Our lab, and others, have shown that Activin A and TGF $\beta$  signal from the endocytic compartment. Internalization of the ligand/receptor complex is required for the phosphorylation of SMAD proteins, which mediate downstream signaling events. A high-throughput screen carried out by the Wrana lab, implicated RhoD in Activin A/TGF $\beta$  signaling cascades by reporting the presence of RhoD in a SMAD2 complex. Due to the known involvement of TGF $\beta$  in asymmetry and the role of Activin A in development, we decided to address whether RhoD was implicated in SMAD phosphorylation and signaling. Thus, we knocked out *RHOD* gene successfully in HEK293 cells using the CRISPR/Cas9 technology. Using these cells, we found that in the absence of RhoD, induction by Activin A leads to increased phosphorylation of SMAD2 and to a lesser extent of SMAD3, indicating that the presence of RhoD has a suppressive role on the phosphorylation of SMAD2 and SMAD3. Silencing of *RHOD* gene on the other hand, had no effect on the phosphorylation of SMAD1/5/9 induced by BMP2.

As we have not detected a direct interaction of SMAD2/3 to RhoD, one explanation for the increase in p-SMAD2/3 after induction with Activin A, in the absence of RhoD, is the possibility of their indirect interactions due to their coexistence in the same protein complex. Because membrane trafficking is likely to be affected by the deletion of RhoD, markers of the endocytic compartment were examined to check for changes in its composition. Indeed, the results showed

that levels of EEA1, CD63 and Rabankyrin 5 were found to be reduced. The mechanisms by which this is achieved are not known and this requires further investigation.

As stated before, ACD is not a process restricted to stem cells but also occurs in other cell types. Asymmetric positioning of the mitotic spindle during endothelial tip cell division generates daughters of distinct size with discrete ‘tip’ or ‘stalk’ phenotypes. The silencing of RhoD GTPase in HUVECs, by siRNA and shRNA, caused a number of alterations including reduced number of CD34+ tip cells, reduced HUVEC migratory potential and decreased ability to develop a stable angiogenic network on Matrigel. Furthermore, silencing of RhoD in HUVECs caused a reduced maturity and stability of the angiogenic network in co-culture assays with mesenchymal cells, which are responsible for the stabilization of the endothelial cells during angiogenesis.

After the functional and biochemical evaluation of the knock-out/silencing of *RHOD* gene, we tested the effect of its knock-out in cells exhibiting ACD. We set-up a 3D skin model from human embryonic stem cells, 100% of the produced cells expressed Keratin 14 as expected. The cells formed a multi-layered tissue but the layers were not clearly delineated. K14 was expressed through all cell layers, and not only in the basal layer as expected. Therefore, we did investigate the role of RhoD in this system. We also tested the effect of reduced levels of RhoD in ACDs taking place in triple negative cancer cell line MDA-MD-468. MDA-MD-468 is characterized by a molecular heterogeneity and ACDs that produce cells expressing Keratin14. We found that upon RhoD silencing, ACDs are reduced. Furthermore, the total number of cells positive for Keratin14 was reduced in the case of RhoD silencing. Taking into consideration that increased Keratin14 levels are linked to increased invasive capability of the cancer cells, the reduction upon RhoD silencing could potentially lead to a less aggressive cancer.

The results demonstrated in this thesis show an important correlation of RhoD in the way that the endocytic compartment and cell division are regulated, which must be further investigated.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric stem cell division: Precision for robustness. *Cell Stem Cell*. 2012.
2. Goley ED, Toro E, McAdams HH, Shapiro L. Dynamic chromosome organization and protein localization coordinate the regulatory circuitry that drives the bacterial cell cycle. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2009.
3. Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* (80- ). 1997;
4. Munro E, Bowerman B. Cellular symmetry breaking during *Caenorhabditis elegans* development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009.
5. St Johnston D, Ahringer J. Cell polarity in eggs and epithelia: Parallels and diversity. *Cell*. 2010.
6. Gönczy P. Mechanisms of asymmetric cell division: Flies and worms pave the way. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008.
7. Knoblich JA. Asymmetric cell division: Recent developments and their implications for tumour biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010.
8. Knoblich J a. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*. 2008;132(4):583–97.
9. Schober M, Schaefer M, Knoblich JA. Bazooka recruits inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 1999;
10. Wodarz A, Ramrath A, Kuchinke U, Knust E. Bazooka provides an apical cue for inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature*. 1999;
11. Yu F, Wang H, Qian H, Kaushik R, Bownes M, Yang X, et al. Locomotion defects, together with Pins, regulates heterotrimeric G-protein signaling during *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Genes Dev*. 2005;
12. Yu F, Ong CT, Chia W, Yang X. Membrane Targeting and Asymmetric Localization of *Drosophila* Partner of Inscuteable Are Discrete Steps Controlled by Distinct Regions of the Protein. *Mol Cell Biol*. 2002;
13. Izumi Y, Ohta N, Hisata K, Raabe T, Matsuzaki F. *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat Cell Biol*. 2006;
14. Siller KH, Cabernard C, Doe CQ. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates

- spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat Cell Biol.* 2006;
15. Bowman SK, Neumüller RA, Novatchkova M, Du Q, Knoblich JA. The *Drosophila* NuMA Homolog Mud Regulates Spindle Orientation in Asymmetric Cell Division. *Dev Cell.* 2006;
  16. Siller KH, Doe CQ. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature Cell Biology.* 2009.
  17. Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature.* 2005;
  18. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang H-R, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science.* 2005;307(5715):1603–9.
  19. Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E. Sticky business: Orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 2003.
  20. Vaezi A, Bauer C, Vasioukhin V, Fuchs E. Actin cable dynamics and Rho/Rock orchestrate a polarized cytoskeletal architecture in the early steps of assembling a stratified epithelium. *Dev Cell.* 2002;
  21. Sahai E, Marshall CJ. RHO - GTPases and cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2002.
  22. Clayton E, Doupe DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature.* 2007;
  23. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* 2001;
  24. Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, et al.  $\gamma$ -Secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell.* 2004;
  25. Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* 2006;20(21):3022–35.
  26. Nguyen BC, Lefort K, Mandinova A, Antonini D, Devgan V, Gatta G Della, et al. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev.* 2006;
  27. Lee J, Basak JM, Demehri S, Kopan R. Bi-compartmental communication contributes to the opposite proliferative behavior of Notch1-deficient hair follicle and epidermal



- keratinocytes. *Development*. 2007;
28. Yamashita YM, Fuller MT. Asymmetric centrosome behavior and the mechanisms of stem cell division. *Journal of Cell Biology*. 2008.
  29. Betschinger J, Knoblich JA. Dare to be different: Asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Current Biology*. 2004.
  30. Boureux A, Vignal E, Faure S, Fort P. Evolution of the Rho family of Ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2007;
  31. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 1991.
  32. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: New insights into their functions from in vivo studies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008.
  33. Fu HW, Casey PJ. Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. In: *Recent Progress in Hormone Research*. 1999.
  34. Solski PA, Helms W, Keely PJ, Su L, Der CJ. RhoA biological activity is dependent on prenylation but independent of specific isoprenoid modification. *Cell Growth Differ*. 2002;
  35. Du W, Lebowitz PF, Prendergast GC. Cell Growth Inhibition by Farnesyltransferase Inhibitors Is Mediated by Gain of Geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol*. 1999;
  36. Freeman JL, Abo A, David Lambeth J. Rac 'insert region' is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem*. 1996;
  37. Bento CF, Puri C, Moreau K, Rubinsztein DC. The role of membrane-trafficking small GTPases in the regulation of autophagy. *Journal of Cell Science*. 2013.
  38. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: A family reunion. *Cell*. 2000.
  39. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology*. 2004.
  40. De Pascalis C, Etienne-Manneville S. Single and collective cell migration: The mechanics of adhesions. *Molecular Biology of the Cell*. 2017.
  41. Friedl P, Mayor R. Tuning collective cell migration by cell-cell junction regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;
  42. Lawson CD, Ridley AJ. Rho GTPase signaling complexes in cell migration and invasion. *Journal of Cell Biology*. 2018.
  43. Ridley AJ. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015.

44. Paluch EK, Raz E. The role and regulation of blebs in cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. 2013.
45. Paterson EK, Courtneidge SA. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS Journal*. 2018.
46. Pertz O, Fritz RD. The dynamics of spatio-temporal Rho GTPase signaling: Formation of signaling patterns. *F1000Research*. 2016.
47. de Beco S, Vaidžiulytė K, Manzi J, Dalier F, di Federico F, Cornilleau G, et al. Optogenetic dissection of Rac1 and Cdc42 gradient shaping. *Nat Commun*. 2018;
48. Chircop M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases*. 2014.
49. Ocegüera-Yanez F, Kimura K, Yasuda S, Higashida C, Kitamura T, Hiraoka Y, et al. Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. *J Cell Biol*. 2005;
50. Yasuda S, Ocegüera-Yanez F, Kato T, Okamoto M, Yonemura S, Terada Y, et al. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature*. 2004;
51. Narumiya S, Yasuda S. Rho GTPases in animal cell mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006.
52. Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, et al. Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell*. 2002;
53. Freeman SN, Ma Y, Cress WD. RhoBTB2 (DBC2) is a mitotic E2F1 target gene with a novel role in apoptosis. *J Biol Chem*. 2008;
54. Murphy C, Saffrich R, Grummt M, Gournier H, Rybin V, Rubino M, et al. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Vol. 384, Nature*. 1996. p. 427–32.
55. Shimizu F, Watanabe TK, Okuno S, Omori Y, Fujiwara T, Takahashi EI, et al. Isolation of a novel human cDNA (rhoHP1) homologous to rho genes. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 1997;
56. RCSB PDB - 2J1L: Crystal Structure of Human Rho-related GTP-binding protein RhoD [Internet]. [cited 2020 Jul 20]. Available from: <https://www.rcsb.org/structure/2J1L>
57. Jaiswal M, Kalawy Fansa E, Dvorsky R, Ahmadian R. New insight into the molecular switch mechanism of human Rho family proteins: shifting a paradigm. *Biological Chemistry*. 2012.

58. Jank T, Pack U, Gieseemann T, Schmidt G, Aktories K. Exchange of a single amino acid switches the substrate properties of RhoA and RhoD toward glucosylating and transglutaminating toxins. *J Biol Chem.* 2006;
59. Gasman S, Kalaidzidis Y, Zerial M. RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol.* 2003;
60. Kato T, Watanabe N, Morishima Y, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J Cell Sci.* 2001;
61. Dean SO, Rogers SL, Stuurman N, Vale RD, Spudich JA. Distinct pathways control recruitment and maintenance of myosin II at the cleavage furrow during cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;
62. Rundle DR, Gorbsky G, Tsiokas L. PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells: Role of mDia1 in PKD2 localization to mitotic spindles. *J Biol Chem.* 2004;
63. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* 2006;
64. Kyrkou a, Soufi M, Bahtz R, Ferguson C, Bai M, Parton RG, et al. RhoD participates in the regulation of cell-cycle progression and centrosome duplication. *Oncogene* [Internet]. 2012;32(14):1831–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2012.195>
65. Nehru V, Voytyuk O, Lennartsson J, Aspenström P. Rhod binds the rab5 effector rabankyrin-5 and has a role in trafficking of the platelet-derived growth factor receptor. *Traffic.* 2013;14(12):1242–54.
66. Gad AKB, Nehru V, Ruusala A, Aspenström P. RhoD regulates cytoskeletal dynamics via the actin nucleation-promoting factor WASp homologue associated with actin Golgi membranes and microtubules. *Mol Biol Cell.* 2012;
67. Durkin CH, Leite F, Cordeiro J V., Handa Y, Arakawa Y, Valderrama F, et al. RhoD Inhibits RhoC-ROCK-Dependent Cell Contraction via PAK6. *Dev Cell.* 2017;41(3):315-329.e7.
68. Zerial M, Mcbride H. Heterogeneity of Rab effectors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;
69. Castrillon DH, Wasserman SA. diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development.* 1994;

70. Blom M, Reis K, Heldin J, Kreuger J, Aspenström P. The atypical Rho GTPase RhoD is a regulator of actin cytoskeleton dynamics and directed cell migration. *Exp Cell Res.* 2017;352(2):255–64.
71. Murphy C, Saffrich R, Olivo-Marin JC, Giner A, Ansorge W, Fotsis T, et al. Dual function of rhoD in vesicular movement and cell motility. *Eur J Cell Biol.* 2001;
72. Tsubakimoto K, Matsumoto K, Abe H, Ishii J, Amano M, Kaibuchi K, et al. Small GTPase RhoD suppresses cell migration and cytokinesis. *Oncogene.* 1999;18(15):2431–40.
73. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000.
74. Nguyen Q-D, Faivre S, Bruyneel E, Rivat C, Seto M, Endo T, et al. RhoA- and RhoD-dependent regulatory switch of G $\alpha$  subunit signaling by PAR-1 receptors in cellular invasion. *FASEB J.* 2002;
75. Zanata SM, Hovatta I, Rohm B, Püschel AW. Antagonistic effects of Rnd1 and RhoD GTPases regulate receptor activity in semaphorin 3A-induced cytoskeletal collapse. *J Neurosci.* 2002;
76. Tong Y, Chugha P, Hota PK, Alviani RS, Li M, Tempel W, et al. Binding of Rac1, Rnd1, and RhoD to a novel Rho GTPase interaction motif destabilizes dimerization of the plexin-B1 effector domain. *J Biol Chem.* 2007;
77. Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E. Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;
78. Ray S, Lechler T. Regulation of asymmetric cell division in the epidermis. *Cell Div* [Internet]. 2011;6(1):12. Available from: <http://www.celldiv.com/content/6/1/12>
79. Nishikawa SI, Osawa M. What is a stem cell niche? Ernst Schering Res Found Workshop. 2006;
80. Tiede S, Kloeppe JE, Bodò E, Tiwari S, Kruse C, Paus R. Hair follicle stem cells: Walking the maze. *Eur J Cell Biol.* 2007;
81. Waters JM, Richardson GD, Jahoda CAB. Hair follicle stem cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2007.
82. Fernandes KJL, Toma JG, Miller FD. Multipotent skin-derived precursors: Adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2008.

83. Fuchs E. Skin stem cells: Rising to the surface. Vol. 180, *Journal of Cell Biology*. 2008. p. 273–84.
84. Strong CDG, Wertz PW, Wang C, Yang F, Meltzer PS, Andl T, et al. Lipid defect underlies selective skin barrier impairment of an epidermal-specific deletion of Gata-3. *J Cell Biol*. 2006;
85. Elias PM. The skin barrier as an innate immune element. *Seminars in Immunopathology*. 2007.
86. Watt FM. Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. *J Cell Biol*. 1984;
87. Watt FM, Hogan BLM. Out of eden: Stem cells and their niches. *Science*. 2000.
88. Poulson ND, Lechler T. Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis. *J Cell Biol*. 2010;191(5):915–22.
89. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001.
90. Bajaj J, Zimdahl B, Reya T. Fearful symmetry: Subversion of asymmetric division in cancer development and progression. *Cancer Res*. 2015;
91. Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in Drosophila Neural Stem Cells. *Cell*. 2006;
92. Bello B, Reichert H, Hirth F. The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of Drosophila. *Development*. 2006;
93. Bowman SK, Rolland V, Betschinger J, Kinsey KA, Emery G, Knoblich JA. The Tumor Suppressors Brat and Numb Regulate Transit-Amplifying Neuroblast Lineages in Drosophila. *Dev Cell*. 2008;
94. Wu M, Kwon HY, Rattis F, Blum J, Zhao C, Ashkenazi R, et al. Imaging Hematopoietic Precursor Division in Real Time. *Cell Stem Cell*. 2007;
95. Gómez-López S, Lerner RG, Petritsch C. Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2014;71(4):575–97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3901929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Vilorio-Petit AM, David L, Jia JY, Erdemir T, Bane AL, Pinnaduwa D, et al. A role for

- the TGFbeta-Par6 polarity pathway in breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(33):14028–33. Available from: <http://www.pnas.org/content/106/33/14028.full>
97. Granit RZ, Masury H, Condiotti R, Fixler Y, Gabai Y, Glikman T, et al. Regulation of Cellular Heterogeneity and Rates of Symmetric and Asymmetric Divisions in Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep*. 2018;
  98. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*. 2011.
  99. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*. 2011.
  100. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* (80- ). 2013;
  101. Granit RZ, Gabai Y, Hadar T, Karamansha Y, Liberman L, Waldhorn I, et al. EZH2 promotes a bi-lineage identity in basal-like breast cancer cells. *Oncogene*. 2013;
  102. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011.
  103. Butler JM, Kobayashi H, Rafii S. Instructive role of the vascular niche in promoting tumour growth and tissue repair by angiocrine factors. *Nature Reviews Cancer*. 2010.
  104. Folkman J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007;
  105. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*. 2003.
  106. Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circulation Research*. 2009.
  107. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010;
  108. Costa G, Harrington KI, Lovegrove HE, Page DJ, Chakravartula S, Bentley K, et al. Asymmetric division coordinates collective cell migration in angiogenesis. *Nat Cell Biol*. 2016;
  109. Li R. The art of choreographing asymmetric cell division. *Developmental Cell*. 2013.

110. Aydogan V, Lenard A, Denes AS, Sauteur L, Belting HG, Affolter M. Endothelial cell division in angiogenic sprouts of differing cellular architecture. *Biol Open*. 2015;
111. Denes AS, Kanca O, Affolter M. A cellular process that includes asymmetric cytokinesis remodels the dorsal tracheal branches in *Drosophila* larvae. *Dev*. 2015;
112. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;
113. Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 2010;
114. Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science*. 2010.
115. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2011.
116. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* (80- ). 2013;
117. Cho SW, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol*. 2013;
118. Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013;
119. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* (80- ). 2012;
120. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;
121. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* (80- ). 2013;
122. Chiang TWW, Le Sage C, Larrieu D, Demir M, Jackson SP. CRISPR-Cas9D10A nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci Rep*. 2016;
123. Davis L, Maizels N. Homology-directed repair of DNA nicks via pathways distinct from

- canonical double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;
124. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;
  125. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;
  126. Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods*. 2014;
  127. Wood E. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Biochem Educ. 1983;
  128. Markou M, Kouroupis D, Badounas F, Katsouras A, Kyrkou A, Fotsis T, et al. Tissue Engineering Using Vascular Organoids From Human Pluripotent Stem Cell Derived Mural Cell Phenotypes. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;
  129. Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* [Internet]. 2009;374(9703):1745–53. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61496-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61496-3)
  130. Thul PJ, Akesson L, Wiking M, Mahdessian D, Geladaki A, Ait Blal H, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science* (80- ). 2017;
  131. Richards M, Hetheridge C, Richards M, Hetheridge C, Mellor H. The Formin FMNL3 Controls Early Apical Specification in Endothelial Cells by Regulating the Polarized Trafficking of Podocalyxin Report The Formin FMNL3 Controls Early Apical Specification in Endothelial Cells by Regulating the Polarized Trafficking of Po. *Curr Biol* [Internet]. 2015;25(17):2325–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.045>
  132. Litwin M, Radwańska A, Paprocka M, Kieda C, Dobosz T, Witkiewicz W, et al. The role of FGF2 in migration and tubulogenesis of endothelial progenitor cells in relation to pro-angiogenic growth factor production. *Mol Cell Biochem*. 2015;
  133. Wang Y, Zang QS, Liu Z, Wu Q, Maass D, Dulan G, et al. Regulation of vegf-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2011;
  134. Aksel H, Huang GTJ. Human and Swine Dental Pulp Stem Cells Form a Vascularlike Network after Angiogenic Differentiation in Comparison with Endothelial Cells: A Quantitative Analysis. *J Endod*. 2017;



135. Guo X, Liu L, Zhang M, Bergeron A, Cui Z, Dong JF, et al. Correlation of CD34+ cells with tissue angiogenesis after traumatic brain injury in a rat model. *J Neurotrauma*. 2009;
136. Pozzoli O, Vella P, Iaffaldano G, Parente V, Devanna P, Lacovich M, et al. Endothelial fate and angiogenic properties of human CD34+ progenitor cells in zebrafish. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;
137. Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(21):8797–802.
138. Petrova A, Celli A, Jacquet L, Dafou D, Crumrine D, Hupe M, et al. 3D in vitro model of a functional epidermal permeability barrier from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2014;2(5):675–89.
139. Horvitz HR, Herskowitz I. Mechanisms of asymmetric cell division: Two Bs or not two Bs, that is the question. Vol. 68, *Cell*. 1992.
140. Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: Identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*. 2007;109(12).
141. Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, Schambach F, Intlekofer AM, Banerjee A, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* (80- ). 2007;315(5819).
142. Hawkins ED, Russell SM. Upsides and downsides to polarity and asymmetric cell division in leukemia. Vol. 27, *Oncogene*. 2008.
143. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* [Internet]. 2006;441(7097):1068–74. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16810241](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16810241)
144. Barrios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, et al. High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science*. 2005;307(5715):1621–5.
145. Shin M, Alev C, Wu Y, Nagai H, Sheng G. Activin/TGF-beta signaling regulates Nanog expression in the epiblast during gastrulation. *Mech Dev* [Internet]. 2011 May [cited 2021 Apr 23];128(5–6):268–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21402155/>

146. Shoji H, Tsuchida K, Kishi H, Yamakawa N, Matsuzaki T, Liu ZH, et al. Identification and characterization of a PDZ protein that interacts with activin type II receptors. *J Biol Chem.* 2000;
147. Ho J, Cocolakis E, Dumas VM, Posner BI, Laporte SA, Lebrun JJ. The G protein-coupled receptor kinase-2 is a TGF $\beta$ -inducible antagonist of TGF $\beta$  signal transduction. *EMBO J.* 2005;
148. Seong HA, Jung H, Kim KT, Ha H. 3-Phosphoinositide-dependent PDK1 negatively regulates transforming growth factor- $\beta$ -induced signaling in a kinase-dependent manner through physical interaction with Smad proteins. *J Biol Chem.* 2007;
149. Dai F, Chang C, Lin X, Dai P, Mei L, Feng X-H. Erbin Inhibits Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling through a Novel Smad-Interacting Domain. *Mol Cell Biol.* 2007;
150. Yau DM, Sethakorn N, Taurin S, Kregel S, Sandbo N, Camoretti-Mercado B, et al. Regulation of smad-mediated gene transcription by RGS3. *Mol Pharmacol.* 2008;
151. Nourry C, Maksumova L, Pang M, Liu X, Wang T. Direct interaction between Smad3, APC10, CDH1 and HEF1 in proteasomal degradation of HEF1. *BMC Cell Biol.* 2004;
152. Krakowski AR, Laboureau J, Mauviel A, Bissell MJ, Luo K. Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF- $\beta$  signaling by sequestration of the Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;
153. Zhou B, Liu Y, Kahn M, Ann DK, Han A, Wang H, et al. Interactions between  $\beta$ -catenin and transforming growth factor- $\beta$  signaling pathways mediate epithelial- mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J Biol Chem.* 2012;
154. Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, et al. TMEPAI, a Transmembrane TGF- $\beta$ -Inducible Protein, Sequesters Smad Proteins from Active Participation in TGF- $\beta$  Signaling. *Mol Cell.* 2010;
155. Guo X, Waddell DS, Wang W, Wang Z, Liberati NT, Yong S, et al. Ligand-dependent ubiquitination of Smad3 is regulated by casein kinase 1 gamma 2, an inhibitor of TGF- $\beta$  signaling. *Oncogene.* 2008;
156. Kuratomi G, Komuro A, Goto K, Shinozaki M, Miyazawa K, Miyazono K, et al. NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-2) negatively regulates TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) signalling by inducing ubiquitin-mediated

- degradation of Smad2 and TGF- $\beta$  type I receptor. *Biochem J.* 2005;386(3):461–70.
157. Seo SR, Lallemand F, Ferrand N, Pessah M, L’Hoste S, Camonis J, et al. The novel E3 ubiquitin ligase Tiul1 associates with TGIF to target Smad2 for degradation. *EMBO J.* 2004;23(19):3780–92.
158. Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, et al. Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- $\beta$  Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *J Biol Chem [Internet].* 2001;276(16):12477–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C100008200>
159. Fukuchi M, Imamura T, Chiba T, Ebisawa T, Kawabata M, Tanaka K, et al. Ligand-dependent degradation of Smad3 by a ubiquitin ligase complex of ROC1 and associated proteins. *Mol Biol Cell.* 2001;12(5):1431–43.
160. Li L, Xin H, Xu X, Huang M, Zhang X, Chen Y, et al. CHIP Mediates Degradation of Smad Proteins and Potentially Regulates Smad-Induced Transcription. *Mol Cell Biol.* 2004;24(2):856–64.
161. Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin C, Dijke P, Itoh S. Promoting Bmp Signaling Through Negative Regulation of Inhibitory Smads. 2001;20(15).
162. Stroschein SL, Bonni S, Wrana JL, Luo K. Smad3 recruits the anaphase-promoting complex for ubiquitination and degradation of SnoN. *Genes Dev.* 2001;15(21):2822–36.
163. Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF $\beta$  receptor. *Cell.* 1998;95(6):779–91.
164. Miura S, Takeshita T, Asao H, Kimura Y, Murata K, Sasaki Y, et al. Hgs (Hrs), a FYVE Domain Protein, Is Involved in Smad Signaling through Cooperation with SARA. *Mol Cell Biol [Internet].* 2000 Dec 15;20(24):9346 LP – 9355. Available from: <http://mcb.asm.org/content/20/24/9346.abstract>
165. Miura S, Mishina Y. Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hgs) is involved in BMP signaling through phosphorylation of SMADS and TAK1 in early mouse embryo. *Dev Dyn.* 2011 Nov;240(11):2474–81.
166. Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. Cytoplasmic PML function in TGF- $\beta$  signalling. *Nature.* 2004;431(7005):205–11.
167. Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, Shimada S, Nakamura Y, et al. Axin Facilitates Smad3 Activation in the Transforming Growth Factor  $\beta$  Signaling Pathway. *Mol*

- Cell Biol. 2001;21(15):5132–41.
168. Hocevar BA, Smine A, Xu XX, Howe PH. The adaptor molecule disabled-2 links the transforming growth factor  $\beta$  receptors to the Smad pathway. *EMBO J.* 2001;20(11):2789–801.
  169. Yamakawa N, Tsuchida K, Sugino H. The rasGAP-binding protein, Dok-1, mediates activin signaling via serine/threonine kinase receptors. *EMBO J.* 2002;21(7):1684–94.
  170. Katuri V, Tang Y, Marshall B, Rashid A, Jogunoori W, Volpe EA, et al. Inactivation of ELF/TGF- $\beta$  signaling in human gastrointestinal cancer. *Oncogene.* 2005;24(54):8012–24.
  171. Le Scolan E, Zhu Q, Wang L, Bandyopadhyay A, Javelaud D, Mauviel A, et al. Transforming growth factor- $\beta$  suppresses the ability of ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer Res.* 2008;68(9):3277–85.
  172. Park SH, Jung EH, Kim GY, Kim BC, Lim JH, Woo CH. Itch E3 Ubiquitin Ligase Positively Regulates TGF- $\beta$  Signaling to EMT via Smad7 Ubiquitination. *Mol Cells.* 2015;38(1):20–5.
  173. Bai Y, Yang C, Hu K, Elly C, Liu YC. Itch E3 ligase-mediated regulation of TGF- $\beta$  signaling by modulating Smad2 phosphorylation. *Mol Cell.* 2004;15(5):825–31.
  174. Felici A, Wurthner JU, Parks WT, Giam LR, Reiss M, Karpova TS, et al. TLP, a novel modulator of TGF-beta signaling, has opposite effects on Smad2- and Smad3-dependent signaling. *EMBO J.* 2003 Sep;22(17):4465–77.
  175. Zimmerman CM, Kariapper MST, Mathews LS. Smad proteins physically interact with calmodulin. *J Biol Chem* [Internet]. 1998;273(2):677–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.2.677>
  176. Warner DR, Pisano MM, Roberts EA, Greene RM. Identification of three novel Smad binding proteins involved in cell polarity. *FEBS Lett.* 2003;539(1–3):167–73.
  177. Zhu S, Wang W, Clarke DC, Liu X. Activation of Mps1 promotes transforming growth factor- $\beta$ -independent smad signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 2007;282(25):18327–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M700636200>
  178. Lin X, Liang M, Feng XH. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):36818–22.
  179. Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad

- degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3).
180. Leonard D, Hayakawa A, Lawe D, Lambright D, Bellve KD, Standley C, et al. Sorting of EGF and transferrin at the plasma membrane and by cargo-specific signaling to EEA1-enriched endosomes. *J Cell Sci*. 2008;121(20).
181. Olchowik M, Miaczyńska M. Effectors of GTPase Rab5 in endocytosis and signal transduction. Vol. 55, *Postepy biochemii*. 2009.
182. Fantin A, Lampropoulou A, Gestri G, Raimondi C, Senatore V, Zachary I, et al. NRP1 Regulates CDC42 Activation to Promote Filopodia Formation in Endothelial Tip Cells. *Cell Rep*. 2015;11(10).
183. Kusuhara S, Fukushima Y, Fukuhara S, Jakt LM, Okada M, Shimizu Y, et al. Arhgef15 Promotes Retinal Angiogenesis by Mediating VEGF-Induced Cdc42 Activation and Potentiating RhoJ Inactivation in Endothelial Cells. *PLoS One*. 2012;7(9).
184. Adini I, Rabinovitz I, Sun JF, Prendergast GC, Benjamin LE. RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev*. 2003;17(21).
185. Gerald D, Adini I, Shechter S, Perruzzi C, Varnau J, Hopkins B, et al. RhoB controls coordination of adult angiogenesis and lymphangiogenesis following injury by regulating VEZF1-mediated transcription. *Nat Commun*. 2013;4.
186. Shi D, Qi M, Zhou L, Li X, Ni L, Li C, et al. Endothelial mitochondrial preprotein translocase tomm7-rac1 signaling axis dominates cerebrovascular network homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(11).
187. Wu D, Asiedu M, Wei Q. Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC. *Oncogene*. 2009;28(22).
188. Bryan BA, Dennstedt E, Mitchell DC, Walshe TE, Noma K, Loureiro R, et al. RhoA/ROCK signaling is essential for multiple aspects of VEGF-mediated angiogenesis. *FASEB J*. 2010;24(9).
189. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. Vol. 301, *Experimental Cell Research*. 2004.
190. De P, Peng Q, Traktuevc DO, Li W, Yoder MC, March KL, et al. Expression of RAC2 in

- endothelial cells is required for the postnatal neovascular response. *Exp Cell Res.* 2009;315(2).
191. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Hérin M, Coquette a. A simple reconstructed human epidermis: Preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res.* 2004;296(5):203–11.