



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ TGFβ/ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α
ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SARA**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Α. ΣΦΛΩΜΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΤGFβ/ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α
ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ
ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SARA**

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Α. ΣΦΛΩΜΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2009

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

Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» του κ. Σφλώμου Γεωργίου: 21-11-2005

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής: 21-11-2005 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία», έγγραφο του Επιστημονικού Υπευθύνου κ. Ιωάννη Λαζαρίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Βιολογίας.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Φώτη Θεόδωρο Καθηγητή Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων, επιβλέποντα

Carol Murphy, Ερευνήτρια Β' στο ΙΒΕ, μέλος

Χριστοφορίδη Σάββα Λέκτορα Βιολογικής Χημείας για τις ανάγκες του ΠΣΕ Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Ορισμός Θέματος: 21-11-2005

«Μεταγωγή του σήματος του TGF-β/ακτιβίνης Α και πρώιμα ενδοσώματα. Ο ρόλος της πρωτεΐνης SARA»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Carol Murphy	Ερευνήτρια Β' στο ΙΒΕ Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 11-12-2009

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής
Παρασκευή Σβεντούρη-Ζώη



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού (Τμήματος Ιατρικής συνεργαζόμενο με το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων) Μεταπτυχιακού Προγράμματος με τίτλο Βιοτεχνολογία σε συνέχεια της απόκτησης του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης (Μ.Δ.Ε.-Μ.Sc). Η διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε τόσο στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, στα εργαστήρια της Βιολογικής Χημείας του Λειτουργικού-Κλινικοεργαστηριακού τομέα όσο και στα εργαστήρια του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων (ΙΒΕΙ) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ), που εδρεύει στο Ηράκλειο Κρήτης και είναι ένα από τα μεγαλύτερα ερευνητικά κέντρα της Ελλάδας. Η χρηματοδότηση μου προήλθε από το Πρόγραμμα Ενίσχυσης Ερευνητικού Δυναμικού ΠΕΝΕΔ 2003 της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας του Υπουργείου Ανάπτυξης καθώς και από το ΙΤΕ. Η επιστημονική και ερευνητική διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό την αέναη επίβλεψη-καθοδήγηση της Ερευνήτριας Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων κα. Carol Murphy και του Καθηγητή της Ιατρικής Σχολής και Διευθυντή του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων κ. Φώτση Θεόδωρο τους οποίους και ευχαριστώ για τη δυνατότητα που μου παρείχαν να διευρύνω τους ερευνητικούς μου ορίζοντες και να έρθω σε επαφή με το σύγχρονο γίνεσθαι των βιοεπιστημών τόσο στον Ελλαδικό χώρο όσο και σε παγκόσμιο επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής την Αναπλ. Καθηγήτρια Θ. Παπαμαρκάκη, τον Επικ. Καθηγητή Σ. Χριστοφορίδη, την Επικ. Καθηγήτρια Α. Πολίτου, τον Καθηγητή Σ. Γεωργάτο και τον Καθηγητή Δ. Γαλάρη. Η επαφή μαζί τους τόσο με μικρές αλλά σημαντικές παρεμβάσεις, όσο και με το αμείωτο ενδιαφέρον για την ερευνητική μου πορεία συνέβαλε και αυτή στην ομαλή ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Φώτση και για τη δυνατότητα που μου παρείχε να συμμετάσχω ενεργά σε διάφορα συνέδρια τόσο με αναρτημένες εργασίες όσο και προφορικές ανακοινώσεις, όπως ενδεικτικά αναφέρω το *33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference* και το *Advance Lecture Course on Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer, FEBS/EACR*. Επιπλέον,

πρωτόγνωρη για τα Ελληνικά δεδομένα ήταν η πραγματοποίηση άκρως πετυχημένων και εποικοδομητικών ετήσιων ερευνητικών συναντήσεων με τα υπόλοιπα μέλη του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 2003/03ΕΔ562, δηλαδή τον Δρ. Α. Πίντζα Ερευνητή Α΄-Ινστιτούτο Βιολογικών Ερευνών και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, τον Δρ. Δ. Γιαννουκάκο Ερευνητή Β΄-Υπεύθυνο Εργαστηρίου Μοριακής Διαγνωστικής, «Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος», τον Δρ. Ρ. Σανδαλιτζόπουλο, Αναπ. Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας, Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης, και τον Δρ Γ. Παναγιώτου Ερευνητή Α΄ από το Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Ερευνών Αλέξανδρος Φλέμινγκ.

Χρωστώ επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες στους υποψήφιους διδάκτορες, παρελθόντα και παρόντα μέλη του εργαστηρίου του Καθηγητή κ. Φώτση για τη γόνιμη επιστημονική συνεργασία, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και ιδέες και για την κατανόηση που έδειξαν σε δύσκολες ερευνητικές στιγμές. Ακόμη, ευχαριστώ τα μέλη της Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα εργασίας όλα αυτά τα χρόνια. Για τη συνεισφορά τους τόσο στη θεωρητική όσο και στην πρακτική προσέγγιση της παρούσας επιστημονικής εργασίας ιδιαίτερη μνεία αποδίδω στον Βιολόγο Υπ. Διδ. Ε. Κωσταρά και τη Βιοχημικό Δρ. Α. Πανοπούλου, μέλη του εργαστηρίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη Βασιλική η οποία με την κατανόηση και τη συνεχή συμπαράσταση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια αυτής της ξεχωριστής μελέτης συνέβαλε ουσιαστικά στην ευχάριστη ολοκλήρωση αυτού του ταξιδιού.

Κλείνοντας τον πρόλογο τούτο και με την ευκαιρία που μου δίνεται, θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου στον πατέρα μου Αριστοτέλη και τη μητέρα μου Ελένη για την αδιάλειπτη παρότρυνση και υλική υποστήριξη που μου παρείχαν όλα τα χρόνια των σπουδών μου. Η συνεισφορά τους στην υλοποίηση των στόχων μου δεν ήταν μόνο σημαντική αλλά μάλλον προϋπόθεση, ενώ ορισμένα εξαιρετικά χαρακτηριστικά της προσωπικότητάς τους με οδηγούν στη συνεχή πνευματική αναζήτηση και επιθυμία για την κατάκτηση της γνώσης.

I've spent more time than many will believe [making microscopic observations], but I've done them with joy, and I've taken no notice those who have said why take so much trouble and what good is it?"

Antonie van Leeuwenhoek (Dutch Biologist, 1632-1723)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ABBREVIATIONS.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1 Η υπερουκογένεια του TGFβ.....	7
1.1.1 Γενικά	7
1.1.2 Διαδικασία έκκρισης και ωρίμανσης του TGFβ	11
1.1.3 Η μεταγωγή σήματος από τον TGFβ.....	14
1.2 Οι πρωτεΐνες SMAD.....	16
1.2.1 Γενικά	16
1.2.2 Δομικά χαρακτηριστικά των SMAD διαμεσολαβητών.....	16
1.2.3 Ενδοκυτταρική εντόπιση των SMAD πρωτεϊνών και μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις	19
1.2.4 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επάγονται από τον TGFβ και είναι ανεξάρτητα από τις SMAD πρωτεΐνες.....	21
1.3 Μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και πρώιμα ενδοσώματα.....	22
1.3.1 Η πρωτεΐνη SARA	22
1.3.2 Η σημασία της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων στη μεταγωγή του σήματος από την οικογένεια του TGFβ.....	25
1.4 Αρνητική ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ.....	29
1.4.1 Οι ανασταλτικές SMADs πρωτεΐνες.....	29
1.4.2 Ουβικουτινιλίωση	30
1.4.3 Αναστολή της ενεργότητας των υποδοχέων του TGFβ-Φωσφατάσες.....	31
1.4.4 Ρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων από τις SMADs	32
1.4.5 Αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των SMAD πρωτεϊνών	33
1.4.6 Αναστολή της ενεργότητας του υποδοχέα TGFβ.....	33
1.5 Η πρωτεΐνη ERBIN	35
1.5.1 Οι ισομορφές της ERBIN.....	35
1.5.2 Η πρωτεϊνική οικογένεια LAP (Leucine-rich repeats and PDZ domain)	36
1.5.3 Προτεινόμενη υπόθεση για τη δημιουργία της LAP οικογένειας	39
1.5.4 Επιπρόσθετοι σημαντικοί ρόλοι της πρωτεΐνης ERBIN.....	41
1.5.5 Ενδοκυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης ERBIN	42
1.5.5.1 Παλμιτοϋλίωση και ενδοκυτταρική εντόπιση της ERBIN.....	43
ΣΚΟΠΟΣ	45
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	47
2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες- Διαμολύνσεις κυτταρικών σειρών.....	47
2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC.....	48
2.3 Δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών.....	49

2.4 Κατασκευή, πολλαπλασιασμός και τιτλοποίηση ανασυνδυασμένων αδενοϊών	50
2.5 Πλασμιδιακές κατασκευές και siRNAs	51
2.6 Αντισώματα και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες.....	54
2.7 Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	55
2.8 Μέθοδοι ανεύρεσης και ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων	56
2.8.1 Ανεύρεση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη SARA-Σύστημα δύο υβριδίων.....	56
2.8.2 Δοκιμασία, <i>in vitro</i> , πρωτεϊνικής καταβύθισης (Glutathione S-transferase pull-down assay) -Έκφραση και απομόνωση χημικών GST πρωτεϊνών με τη χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης-αγαρόζης.....	56
2.8.3 Δοκιμασία, <i>in vivo</i> , ανοσοκατακρήμνισης	58
2.9 Δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς	59
2.10 Τεχνική επίπλευσης σε ασυνεχή βαθμίδωση σουκρόζης.....	60
2.11 Πειράματα ανταγωνισμού.....	60
2.12 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων	61
2.13 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	61
2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από <i>E.coli</i> σε μικρή και μεσαία κλίμακα	62
2.15 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών.....	63
2.16 Στατιστική Ανάλυση	63
2.17 Ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλουχιών	64
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1 Η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ERBIN: Ταυτοποίηση με το σύστημα των δύο υβριδίων.....	65
3.2 Η SARA αλληλεπιδρά με την ERBIN: Επιβεβαίωση με βιοχημικές τεχνικές.....	70
3.3 Η πρωτεΐνη SARA στρατολογεί την πρωτεΐνη ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα.....	72
3.4 Μοριακή χαρτογράφηση της περιοχής της πρωτεΐνης SARA που αλληλεπιδρά με την ERBIN.....	74
3.5 Η περιοχή της πρωτεΐνης ERBIN (1208-1265aa) ταυτοποιείται για πρώτη φορά να αλληλεπιδρά με τη SARA καθώς και με τις SMAD2/3 πρωτεΐνες	77
3.6 Οι πρωτεΐνες SMAD2/3 και η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρούν με την ERBIN ανεξάρτητα η μια της άλλης και έτσι ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στην περιοχή SSID της ERBIN.	82
3.7 Η πρωτεΐνη SARA ή το πολυπεπτίδιο ERBID αντιστρέφει την ανασταλτική επίδραση της πρωτεΐνης ERBIN στις μεταγραφικές αποκρίσεις του TGFβ και της Ακτιβίνης A.....	84
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	89

4.1 Η πρωτεΐνη ERBIN	89
4.2 Η SARA στρατολογεί την ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα	90
4.3 Μοριακή χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων της ERBIN με τη SARA και τις SMAD2/3 πρωτεΐνες	91
4.4 Οι ισομορφές της ERBIN και η περιοχή SSID	94
4.5 Η προτεινόμενη λειτουργία της ERBIN στη μεταγωγή του σήματος από TGFβ/Ακτιβίνη Α	94
4.6 ERBIN και TGFβ/Ακτιβίνη Α-Προοπτικές και προκλήσεις	97
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	99
5.1 Επιλογή χρήσιμων ιστοσελίδων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία	99
5.2 Επιλογή χρήσιμων βιβλίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	99
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	101
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY	103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ABBREVIATIONS

Aa	Amino acid
ActR	Υποδοχέας της ακτιβίνης
Ad	Αδενοϊός (Adenovirus)
ALK	Υποδοχέας της ακτιβίνης-κινάση (Activin receptor-Like Kinase)
APS	Υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate)
ARE	Στοιχείο απόκρισης της ακτιβίνης (Activin Response Element)
BBCE	Ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου βοός (Bovine Brain Capillary Endothelial Cells)
BMP	Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (Bone Morphogenetic Proteins)
CCP	Πρωτεΐνη ελέγχου του συμπληρώματος (Complement Control Protein)
CCVMR	Clathrin-coated vesicle mediated route
CHAPS	3-[(3-χολαμίδοπρόπυλο-διμεθυλαμμώνιο)]-1-προπανοσουλφονικό οξύ
CTD	Καρβοξυτελικός τομέας (Carboxy-Terminal Domain)
dH₂O	Απεσταγμένο νερό (distilled water)
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ (deoxyribonucleic acid)
DTT	Διθειοθρεϊτόλη (Dithithreitol)
EC	Ενδοθηλιακό κύτταρο (Endothelial Cell)
ECM	Εξωκυττάρια ουσία (Extracellular matrix)
EDTA	(C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) αιθυλενοδινιτροτετραοξικό οξύ (ethylene dinitrilotetra-acetic acid)
EE	Πρώιμο ενδόσωμα (Early Endosome)
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor)
EGFR	Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor)
EMT	Επιθηλιακή-μεσεγγυματική διαφοροποίηση (Epithelial-mesenchymal transition)
ERBIN	ERBB2IP
FBS	Ορός εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum)
FLAG	Οκταπεπτίδιο. N-Asp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C
GADD34	G rowth a rrest and D N A d amage p rotein
GFP	Πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein)
GST	Τρανσφεράση-μεταφοράση της γλουταθειόνης (Glutathione-S-Transferase)
HEK 293	Ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα 293 (Human Embryonic Kidney)
HRP	Ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase)
HUVEC	Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από φλέβα ομφαλίου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IPTG	Ισοπροπυλοθειο-β-γαλακτοσίδιο (Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside)
I-SMAD	Ανασταλτική SMAD πρωτεΐνη (Inhibitory SMAD)
Kb	Χίλιες βάσεις (Kilobase)
LAP	L atency- A ssociated P eptide
LAP	L eucine-rich repeats and P DZ domains
LRR	Επαναλήψεις πλούσιες στο αμινόξυ λευκίνη, Leu, L, (Leucine-Rich Repeats)

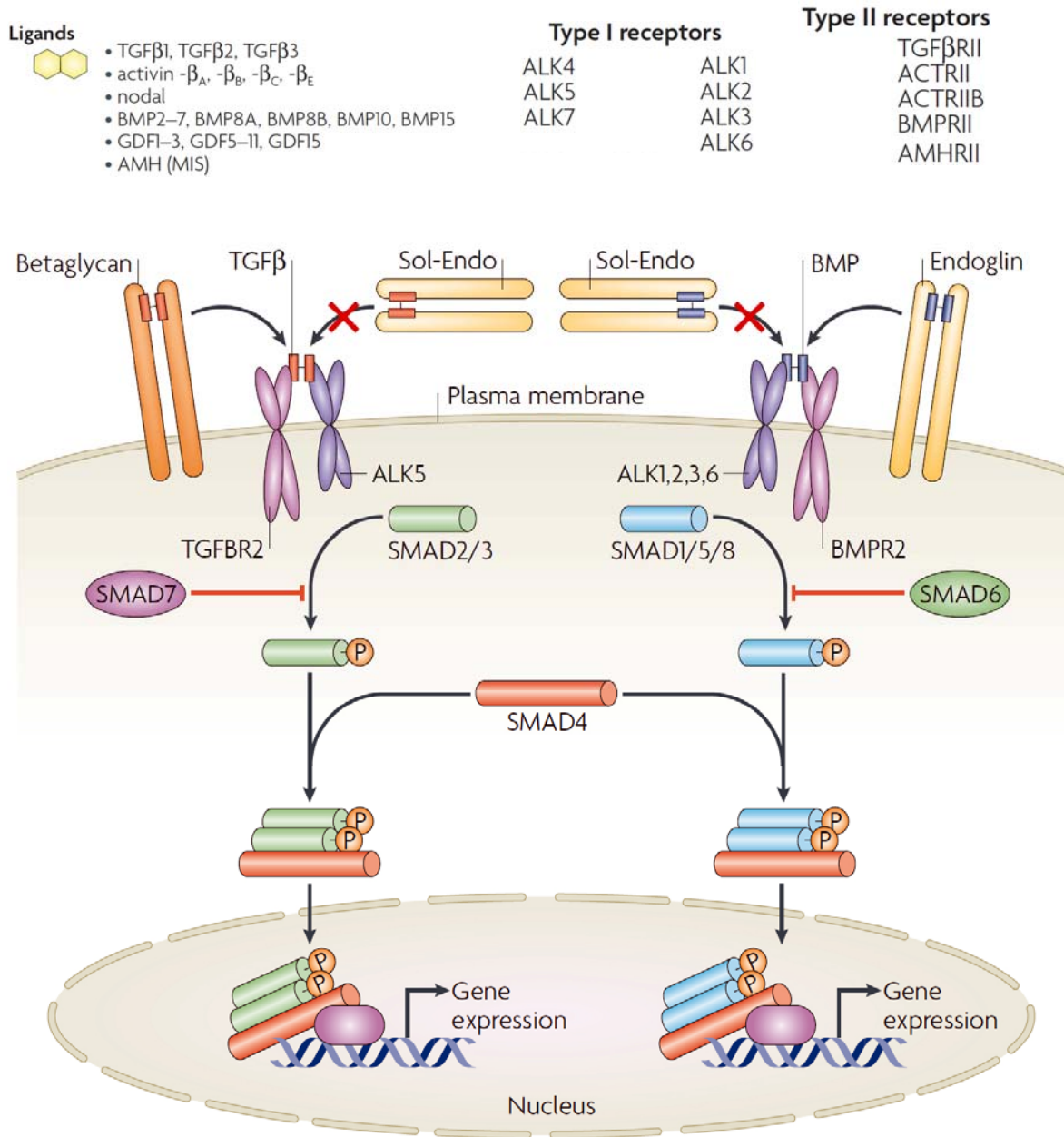
LTBP	L atent T ransforming growth factor-beta (TGF-beta)- b inding p rotein
MH	Περιοχή ομολογίας των Mad (M ad H omology domain)
MIRO-2	Μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Rho (M itochondrial R ho 2)
MOI	Πολλαπλότητα μόλυνσης (M ultiplicity O f I nfection)
Mowiol	Πολυβινυλική αλκοόλη
NTD	Αμινοτελικός τομέας (N - T erminal D omain)
ONPG	ο-νιτροφαινυλο-β, D-γαλακτοσίδιο (<i>ortho</i> -Nitrophenyl-β-galactoside)
PBD	Τομέας σύνδεσης με φωσφατάση (P hosphatase- B inding D omain)
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (p olymerase chain r eaction)
PDZ	Αρχικά των πρωτεϊνών PSD-95/Discs-large/ZO-1
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C (P rotein K inase C)
PP1BD	Τομέας πρόσδεσης στην πρωτεϊνική φωσφατάση 1 (P rotein P hosphatase 1 B inding D omain)
PP2A	Πρωτεϊνική φωσφατάση 2A
PtdIns(3)P	3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (P hosphatidyl i nositol 3 - P hosphate)
R-SMAD	SMAD πρωτεΐνη, η οποία ρυθμίζεται από τον υποδοχέα (R eceptor-regulated S MAD)
SARA	Πρωτεΐνη αγκυροβόλησης των πρωτεϊνών R-SMADs για ενεργοποίηση από τους υποδοχείς (S MAD A nchor F or R eceptor A ctivation)
SDS	Θεϊκό δωδεκυλικό νάτριο (S odium D odecyl S ulfate)
SMAD	Σύμπτυξη των φράσεων <i>C.elegans</i> Sma και Mad (Mothers against decapentaplegic)
TEMED	Τετραμεθυλένο διαμίνη (N, N, N, N- t etramethylene d iamine)
TGFβ	Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (T ransforming G rowth F actor- β)
Tm	Θερμοκρασία τήξης (t emperature m elting)
Tris	Υδροξυ-μεθυλαμινομεθάνιο (hydroxymethyl-aminomethan)
TRITC	Ισοθειοκυανική τετραμεθυλοροδαμίνη (T etramethyl r hodamine I so t hiocyanate)
VEGF	Ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (V ascular E ndothelial G rowth F actor)
WD40	Trp-Asp (W-D)
wt	Φυσικός-άγριος τύπος (w ild t ype)
X-gal	5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολυλ-β,D-γαλακτοσίδιο (bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside)

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η υπερικογένεια του TGFβ

1.1.1 Γενικά

Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Transforming Growth Factor β, TGFβ) συνιστά μια μεγάλη οικογένεια πλειοτροπικών κυτταροκινών που δρουν ως ρυθμιστές της κυτταρικής ανάπτυξης και η οποία στα θηλαστικά περιλαμβάνει τον TGFβ1, -β2 και -β3, [1]. Η οικογένεια του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ) έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον εξαιτίας της ικανότητάς της να ελέγχει βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Οι λειτουργίες αυτές καλύπτουν ευρύ βιολογικό φάσμα από την ανάπτυξη του εμβρύου μέχρι και τη διατήρηση της κυτταρικής-ιστικής ομοιόστασης. Ειδικότερα, ο TGFβ είναι μια εκκρινόμενη ομοδιμερής πρωτεΐνη η οποία ανακαλύφθηκε πριν από τρεις δεκαετίες όταν οι de Largo και Todaro παρατήρησαν ότι αυξητικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από κύτταρα ινοβλαστών (επίμυος) που ήταν μετασχηματισμένα με τον ιό του σαρκώματος, ήταν ικανοί να επάγουν τη δημιουργία αποικιών στη δοκιμασία ρευστού άγαρ (soft agar) [2]. Λίγο αργότερα βρέθηκε ότι οι ενεργοί παράγοντες ήταν δυο διαφορετικοί αυξητικοί παράγοντες-πολυπεπίδια, ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α και β [3, 4]. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι ο TGFβ είναι ένας πολυδύναμος αναπτυξιακός παράγοντας ο οποίος δρα σε όλο το σώμα και επηρεάζει τους περισσότερους τύπους κυττάρων. Συγκεκριμένα, ο TGFβ έχει εμπλακεί στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετανάστευσης, της εναπόθεσης της εξωκυτταρικής ουσίας και της απόπτωσης [5-7]. Επίσης, ο TGFβ είναι ο πιο γνωστός παράγοντας της σύνθεσης και εναπόθεσης της εξωκυτταρικής ουσίας, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην επούλωση τραυμάτων όσο και στην ιστική ίνωση.



Σχήμα 1.1: Μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ. Η μεταγωγή του σήματος από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ) απεικονίζεται με δυο κύρια ενδοκυτταρικά μονοπάτια ανάλογα με τους SMAD διαμεσολαβητές: είτε SMAD2/3, είτε SMAD1/5/8. Τα μέλη της οικογένειας TGFβ δεσμεύονται σε συγκεκριμένους υποδοχείς με ενεργότητα Ser/Thr, τύπου II και τύπου I. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ο TGFβ μεταγεί το σήμα του μέσω του υποδοχέα TGFBR2 και ALK5 (επίσης γνωστός και ως υποδοχέας TGFβ τύπου I; TGFBR1), ενώ οι μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών (bone morphogenetic proteins, BMPs) μεταγουν το σήμα μέσω του υποδοχέα τύπου BMP II (BMPRII) και ALK1, -2, -3 και -6. Οι βοηθητικοί υποδοχείς betaglycan και endoglin ρυθμίζουν τη μεταγωγή του σήματος μέσω των υποδοχέων τύπου II και τύπου I. Η betaglycan προάγει τη δέσμευση του TGFβ2 στους υποδοχείς TGFβ, ενώ και η endoglin έχει παρόμοια δράση. Οι ενεργοποιημένοι τύπου I υποδοχείς επάγουν τη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, των R-SMADs, οι οποίες είναι οι ενδοκυτταρικοί τελεστές της

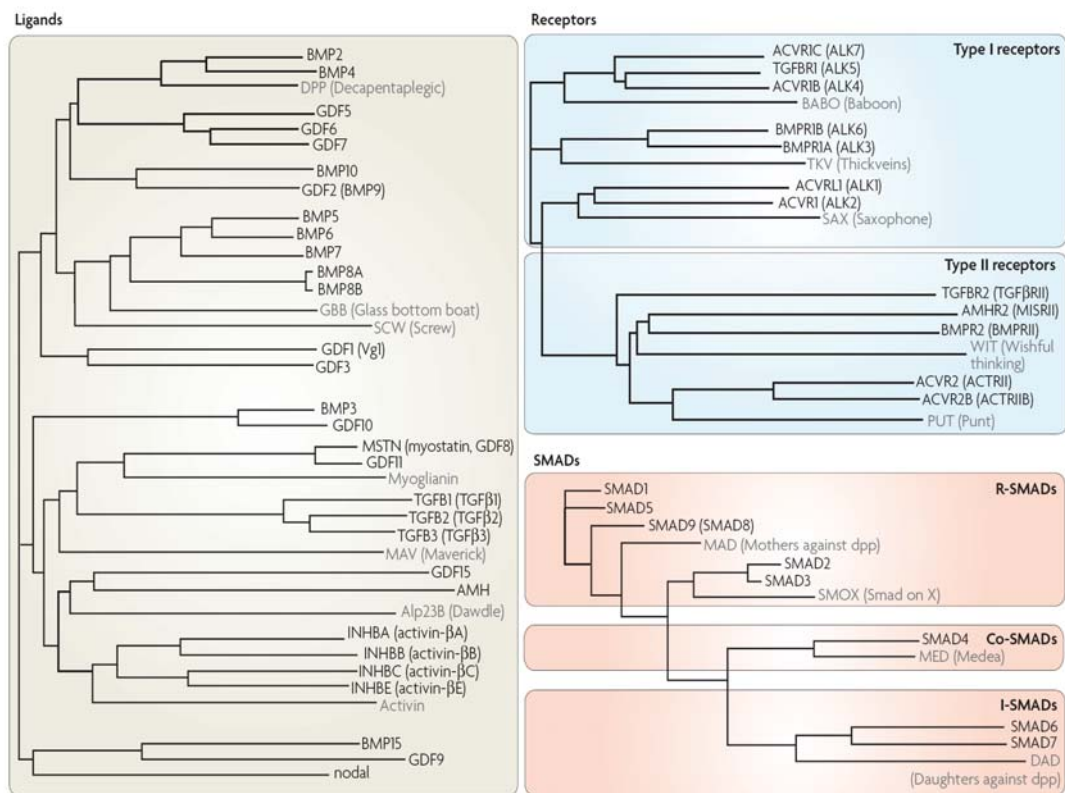
οικογένειας του TGFβ. Στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους, ο TGFβ επάγει τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 και ο BMPs επάγει τη φωσφορυλίωση των SMAD1/5/8. Οι ενεργοποιημένες R-SMADs σχηματίζουν ετερομερή σύμπλοκα με τη SMAD4 και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων όπως η SERPINE1, αναστολέας των πρωτεασών σερίνης (plasminogen activator inhibitor) και η ID1 (inhibitor of DNA binding-1). Η παραπάνω ρύθμιση πραγματοποιείται σε συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες, συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς της μεταγραφής. Οι ανασταλτικές SMADs, όπως η SMAD6 και η SMAD7, ανταγωνίζονται τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ αναστέλλοντας την ενεργοποίηση των R-SMAD [7, 8].

Η βασική μηχανή του σηματοδοτικού μονοπατιού TGFβ αποτελείται από δύο τύπους υποδοχέων, τον τύπου I και II, με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης και μια οικογένεια διαμεσολαβητών, τις SMAD πρωτεΐνες (σχήμα 1.1). Όλα τα μέλη της οικογένειας του TGFβ μετάγουν το σήμα μέσω του «κανονικού» μονοπατιού το οποίο περιλαμβάνει, στην πλασματική μεμβράνη, ένα ετεροτετραμερές σύμπλοκο που απαρτίζεται από δυο τύπου I και δυο τύπου II υποδοχείς με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης και κυτταροπλασματικούς τελεστές που δρουν καθοδικά και ονομάζονται SMAD πρωτεΐνες [9].

Η υπεροικογένεια του TGFβ απαρτίζεται από παρόμοιες δομικά πρωτεΐνες με μοριακό βάρος γύρω στα 25KDa. Αναλυτικότερα, η υπεροικογένεια του TGFβ αριθμεί 42 πρωτεΐνες στον άνθρωπο, εννέα πρωτεΐνες στη φρουτόμυγα *Drosophila melanogaster* και έξι πρωτεΐνες στο νηματώδη σκόληκα *Caenorhabditis Elegans* [10]. Στα θηλαστικά, τα προσδέματα της υπεροικογένειας αυτής κωδικοποιούνται από τουλάχιστον 30 γονίδια, στα οποία περιλαμβάνονται 3 γονίδια για τις ισομορφές του TGFβ, 4 για τις β-αλυσίδες της ακτιβίνης, 1 για το nodal, 10 για τις πρωτεΐνες οστικής μορφογένεσης (Bone Morphogenetic Proteins, BMPs) και 11 για τους παράγοντες αύξησης και διαφοροποίησης (Growth and Differentiation Factor, GDFs) [7]. Οι προαναφερόμενες πρωτεΐνες-προσδέματα διακρίνονται σε δύο υπο-οικογένειες: στην υπο-οικογένεια των TGFβ/Ακτιβίνη A/Nodal και στην υπο-οικογένεια των BMP/GDF/MIS (Muellerian Inhibiting Substance), οι οποίες καθορίζονται με βάση τις ομοιότητες στη δομή και στην αμινοξική τους αλληλουχία, αλλά και την εξειδίκευση που παρουσιάζουν ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν [11].

Στα θηλαστικά έχουν προσδιοριστεί τρία γονίδια που κωδικοποιούν τις ισομορφές του TGFβ που είναι οι: TGFβ1 [12], TGFβ2 [13] και TGFβ3 [14]. Οι ισομορφές

εμφανίζουν 70-80% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία ενώ παρουσιάζουν διαφορετική βιοδραστικότητα: για παράδειγμα σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η TGFβ1 και η TGFβ3 ισομορφή αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ η ισομορφή TGFβ2 δεν έχει επίδραση στον πολλαπλασιασμό [15]. Αν και οι τρεις αυτές ισομορφές παρουσιάζουν υψηλή ομολογία στην αλληλουχία των αμινοξέων τους, εν τούτοις διαφέρουν κυρίως στο άμινο-τελικό άκρο, την α-έλικα και τις θηλιές μεταξύ των β-πτυχωτών φύλλων.



Σχήμα 1.2: Φυλογενετικά δέντρα των προσδεμάτων, των υποδοχέων και των SMAD πρωτεϊνών της TGFβ υπερκοιγένειας. Τα φυλογενετικά δέντρα προέρχονται από πρωτεϊνικές αντιστοιχίσεις (ομοιότητα αμινοξέων) των κυριότερων συστατικών του μονοπατιού του TGFβ τόσο στον άνθρωπο όσο και στη *Drosophila melanogaster*. Οι ανθρώπινες πρωτεΐνες παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα ενώ οι πρωτεΐνες της *D.melanogaster* με γκρι χρώμα. Τα εναλλακτικά πρωτεϊνικά ονόματα δίνονται σε παρένθεση. Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου όσον αφορά τα προσδέματα, χρησιμοποιήθηκαν οι ώριμες, πλήρως επεξεργασμένες μορφές. ACVR, activin receptor; ALK, activin receptor-like kinase; AMH, anti-Muellerian hormone; AMHR2, AMH receptor-2; BMP, bone morphogenetic protein; BMPR, BMP receptor; GDF, growth and differentiation factor; I-SMAD, inhibitory SMAD; R-SMAD, receptor-regulated SMAD; TGF, transforming growth factor; TGFBR, TGFβ receptor. BMP, Bone Morphogenetic Protein; GDF, Growth and Differentiation Factor; TGF, Transforming Growth Factor [7].

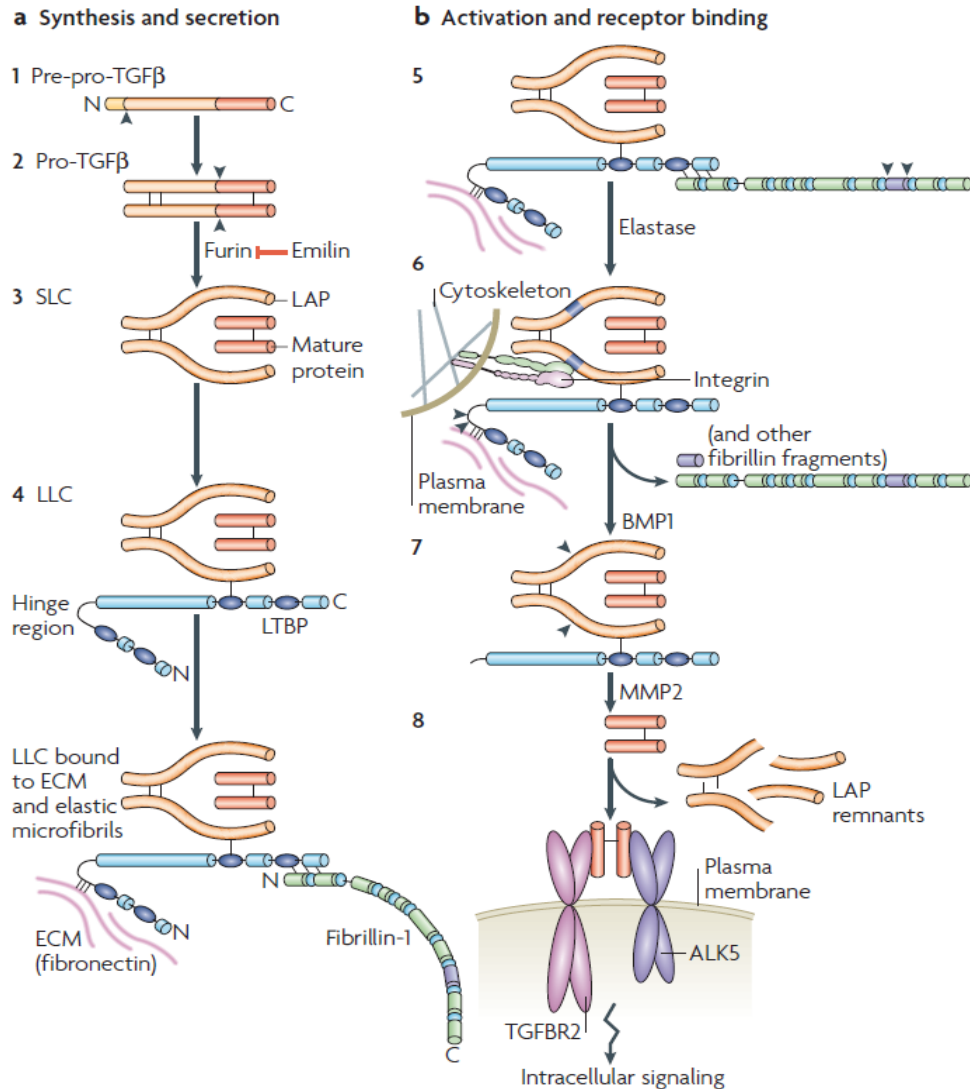
1.1.2 Διαδικασία έκκρισης και ωρίμανσης του TGFβ

Η ώριμη μορφή του TGFβ, απαρτίζεται από ομοδιμερή που συγκρατούνται από έναν δισουλφιδικό δεσμό και πλήθος υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Κάθε μονομερές έχει 110-140 αμινοξέα, 4 αντιπαράλληλα πτυχωτά φύλλα, μία α-έλικα και τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι σχηματίζουν μια διακριτή περιοχή αποκαλούμενη περιοχή κόμβου κυστεΐνης (cysteine-knot domain) [11, 16, 17]. Στα θηλαστικά έχουν προσδιοριστεί τρία διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν για τις αντίστοιχες ισομορφές του TGFβ: TGFβ1, TGFβ2 και TGFβ3.

Η Ακτιβίνη Α απομονώθηκε για πρώτη φορά το έτος 1986 από ωοθηλακικό υγρό με βάση την ικανότητά της να επάγει την απελευθέρωση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone, FSH) από κύτταρα υπόφυσης [18]. Από τις πιο σημαντικές λειτουργίες της ακτιβίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι η επαγωγή μεσοδέρματος σε έμβρυα *Xenopus laevis* [19]. Η Ακτιβίνη Α είναι ένα διμερές πολυπεπτίδιο, το οποίο έχει γενική δομή παρόμοια με τον TGFβ, όπως άλλωστε και τα περισσότερα μέλη της υπερικογένειας αυτής. Η Ακτιβίνη Α ανήκει στην οικογένεια των ινχιμπινών/ακτιβινών, τα μέλη της οποίας προέρχονται από το διμερισμό δύο ανόμοιων υπομονάδων: της υπομονάδας α και της υπομονάδας β [20]. Η υπομονάδα β έχει πολλές ισομορφές (βΑ, βΒ, βC, βD και βE). Τα γονίδια τα οποία κωδικοποιούν καθεμία από αυτές εντοπίζονται σε διαφορετικό χρωμόσωμα, με αποτέλεσμα η σύνθεσή τους να είναι ανεξάρτητη [21]. Οι ακτιβίνες Α, Β, ΑΒ είναι διμερή (βΑ-βΑ, βΒ-βΒ, και βΑ-βΒ) των πολυπεπτιδικών αλυσίδων βΑ και βΒ. Παράλληλα, οι αλυσίδες βΑ και βΒ μπορούν να ετεροδιμεριστούν με την αλυσίδα α, παράγοντας έτσι τον ανταγωνιστή της ακτιβίνης Α, την ινχιμπίνη Α (α-βΑ) και την ινχιμπίνη Β (α-βΒ) (inhibin Α και Β, σχήμα 1.3) [22]. Όπως συμβαίνει και με τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας του TGFβ, η βιολογικά ενεργή Ακτιβίνη Α είναι προϊόν μιας ανενεργής πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης. Η πρόδρομη μορφή της ακτιβίνης είναι ένα διμερές των 110 kDa, που περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, μια γλυκοζυλιωμένη περιοχή και την ώριμη ενεργή περιοχή στο καρβόξυτελικό άκρο [21]. Η ώριμη μορφή της ακτιβίνης δεν είναι γλυκοζυλιωμένη και για το λόγο αυτό ενδοκυτταρικές πρωτεολυτικές επεξεργασίες είναι απαραίτητες για την πλήρη βιολογική δράση της.

Ο TGFβ παράγεται σε λανθάνουσα μορφή που δεν είναι ικανή να δεσμευτεί στον υποδοχέα του. Ειδικότερα ο TGFβ εκκρίνεται από τα κύτταρα ως ένα βιολογικά ανενεργό

σύμπλεγμα μορίων, που ονομάζεται μεγάλο λανθάνον σύμπλεγμα (large latent complex, LLC) και διατηρείται στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία (extracellular matrix, ECM) μέχρι να ενεργοποιηθεί. Αυτό αποτελείται από τη λανθάνουσα συνδετική πρωτεΐνη του TGFβ (latent TGFβ-binding protein, LTBP, μεγέθους ~125-240 kDa), την πρωτεΐνη LAP (μεγέθους ~75 kDa) και το ώριμο διμερές του TGFβ (μεγέθους ~25 kDa) ενώ η σύνδεση της LTBP με τη LAP γίνεται μέσω δισουλφιδικού δεσμού, η σύνδεση της LAP με τον ώριμο TGFβ γίνεται μη-ομοιοπολικά (LSKL και RKPK αμινοξέα). Σε αυτή την μορφή ο TGFβ είναι ανενεργός ενώ το σύμπλοκο αυτό είναι ικανό να συνδέεται με την εξωκυτταρική ουσία (ECM). Η απελευθέρωση του ώριμου βιοενεργού TGFβ από το σύμπλεγμα αυτό μπορεί να γίνει με δύο τρόπους: α) με την πρωτεόλυση της LAP από πρωτεάσες, όπως η πλασμίνη, η θρομβίνη, η πλασματική τρανσγλουταμινάση και ενδογλυκοσιδάσες [23] και β) με τη σύνδεση πρωτεϊνών της ECM, όπως η θρομβοσπονδίνη-1, στην LSKL αλληλουχία της LAP [24], οπότε και τελικά απελευθερώνεται το ώριμο βιοενεργό μόριο του TGFβ, λόγω διάσπασης του μη-ομοιοπολικού δεσμού του με τη LAP (σχήμα 1.3).



Σχήμα 1.3: Ρύθμιση της βιοδιαθεσιμότητας του TGFβ. Σχηματική απεικόνιση της σύνθεσης και της έκκρισης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ) (a) της ενεργοποίησης και της σύνδεσης στον υποδοχέα (b). Ο TGFβ συντίθεται ως pre-pro-protein, η οποία υπόκειται σε πρωτεολυτική επεξεργασία στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (1). Δυο μονομερή του TGFβ διμερίζονται μέσω δισουλφιδικών γεφυρών (disulphide bridges) (2). Το διμερές pro-TGFβ στη συνέχεια κόβεται από την furin convertase για να δώσει το μικρό λανθάνον TGFβ σύμπλοκο (SLC), στο οποίο το λανθάνον συνδετικό πεπτίδιο (LAP; πορτοκαλί) και το ώριμο πεπτίδιο (κόκκινο) συνδέονται με μη ομοιοπολικό δεσμό (3). Αυτό το βήμα αναστέλλεται από την emilin. Το μεγάλο λανθάνον TGFβ σύμπλεγμα (large latent complex, LLC) σχηματίζεται από την ομοιοπολική σύνδεση της μεγάλης λανθάνουσας συνδετικής πρωτεΐνης (large latent TGFβ binding protein, LTBP, μπλέ στο (4). Η άμινο τελική και η συνδετική (hinge) περιοχή του LTBP αλληλεπιδρά με συστατικά της (ECM) όπως η fibronectin. Η καρβόξυ τελική περιοχή του LTBP (μπλέ) αλληλεπιδρά με την άμινο-τελική περιοχή της fibrillin (πράσινο; 4). Στη συνέχεια (b), ένα εσωτερικό

κομμάτι της fibrillin (απεικονίζεται ως πορφυρό χρώμα 5) μπορεί να απελευθερωθεί με πρωτεόλυση (πραγματοποιείται από τις ελαστάσες στα σημεία που φαίνεται με τα μαύρα βέλη 5) και αλληλεπιδρά με την άμινο-τελική περιοχή της fibrillin για να αντικαταστήσει τον LTBP και να απελευθερώσει το μεγάλο λανθάνον TGFβ σύμπλεγμα LLC (6). Το LLC μπορεί να στοχευθεί στην κυτταρική επιφάνεια μέσω των συνδέσεων με τις integrins, RGD αλληλουχίες (μπλέ περιοχή) στην LAP (6). Η μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών-1 (BMP1) μπορεί να δρασει σε δυο θέσεις στην περιοχή συνάρθρωσης του LTBP (τοξοτό βέλος 6), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του LLC (7). Η μεταλλοπρωτεΐναση 2 (MMP2), καθώς και άλλες πρωτεάσες μπορούν να διασπάσουν την LAP (μαύρο βέλος 7) προκειμένου να απελευθερωθεί η ώριμη μορφή του TGFβ (κόκκινο) η οποία μπορεί να δεσμευτεί στους υποδοχείς TGFBR2 και ALK5 [8].

1.1.3 Η μεταγωγή σήματος από τον TGFβ

Η μεταγωγή του σήματος από τα μέλη της οικογένειας του TGF-β πραγματοποιείται μέσω των τύπων I και II διαμεμβρανικών υποδοχέων. Στα σπονδυλωτά έχουν βρεθεί πέντε τύπου II και επτά τύπου I υποδοχείς (σχήμα 1.4).

	Ligand	Receptor II	Receptor I	Coreceptor	Smad
TGFβ	TGF-β1,2,3	TβR-II	TβR-I	Betaglycan	Smad2,3 with Smad4
	Activin-A,B,C	ActR-IIA,B	ALK4		
	Myostatin	ActR-IIA,B	ALK4		
	Nodal	ActR-IIA,B	ALK4,7	Cripto	
	GDF-1,3	ActR-IIA,B	ALK4,7	Cripto	
	Inhibin	ActR-IIA,B	—	Betaglycan	
	Lefty-1,2	ActR-IIA,B	—	Cripto	
BMP	BMP-2,4	BMPR-II, ActR-II	BMPR-IA,B	RMG-a,b,c	Smad1,5, 8 with Smad4
	BMP-5,6,7	BMPR-II, ActR-II	BMPR-IA, ALK2		
	BMP-9,10	BMPR-II, ActR-II	ALK1	Endoglin	
	GDF-5,6,7	BMPR-II, ActR-II	BMPR-IA,B		
	AMH/MIS	AMHR-II	BMPR-IA, ALK2		

Σχήμα 1.4: Συνοπτικό διάγραμμα που παρουσιάζει τις σχέσεις ανάμεσα σε συνδέτη-υποδοχέα-συνυποδοχέα-SMADs (ligand-receptor-coreceptor-SMAD) στο μονοπάτι του TGFβ (πράσινο) και του BMP (μπλε). Ο συνδυασμός των αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους δυο τύπους υποδοχέων καθορίζει τη μεταγωγή του σήματος. Στο σχήμα αυτό, περιγράφονται οι πιο γνωστοί συνδυασμοί μεταξύ των υποδοχέων και των πρωτεϊνών R-SMAD [25].

Οι τύπου I υποδοχείς, που ονομάζονται επίσης και ALKs, είναι δομικά παρόμοιες διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες με μοριακά βάρη για τον τύπου I στα 50-60 kDa και για τον τύπου II στα 70-85 kDa (σχήμα 1.4). Απαρτίζονται από την εξωκυτταρική αμινοτελική περιοχή που περιέχει περισσότερες από 10 κυστεΐνες, και η οποία είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση του προσδέματος και το διμερισμό, τη διαμεμβρανική περιοχή και την καρβόξυτελική περιοχή στην οποία οφείλεται και η ενεργότητα σερίνης-θρεονίνης. Επίσης, οι τύπου III υποδοχείς είναι βοηθητικοί υποδοχείς (coreceptor), οι οποίοι έχουν μικρή ενδοκυτταρική περιοχή και διαδραματίζουν έμμεσο ρόλο στη μεταγωγή του σήματος. Η β-γλυκάνη (betaglycan), η ενδογλίνη (endoglin) και ο κρύπτο (crypto) είναι τρία παραδείγματα υποδοχέων τύπου III (σχήμα 1.4). Οι υποδοχείς αυτοί ρυθμίζουν την πρόσβαση του TGFβ στους υποδοχείς, που είναι υπεύθυνοι για την μετάδοση του σήματος, και διευκολύνουν την πρόσδεσή του στο σύμπλοκο TβR-I/TβR-II [26]. Κάθε μέλος της οικογένειας του TGFβ δεσμεύεται σε συγκεκριμένο συνδυασμό των δυο υποδοχέων. Η δέσμευση του συνδέτη στον υποδοχέα τύπου II επάγει τη συνάθροιση των υποδοχέων σε σύμπλοκα και την άμεση φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα στην περιοχή GS από τον υποδοχέα τύπου II. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας I στη συνέχεια μπορεί να φωσφορυλιώσει και να ενεργοποιήσει άλλα μόρια, γνωστά ως SMAD πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην καθοδική μεταγωγή του σήματος [27, 28].

Οι υποδοχείς της ακτιβίνης είναι και αυτοί διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και II με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες ακολουθούν το πρότυπο της οικογένειας TGF-β [29]. Υπάρχουν δύο επιμέρους υποδοχείς του τύπου II για την ακτιβίνη, ο ActRII και ο ActRIIB [30]. Το εξωκυτταρικό τμήμα των υποδοχέων τύπου II είναι πλούσιο σε κυστεΐνες, ενώ το ενδοκυτταρικό τμήμα περιέχει την περιοχή με την δραστικότητα κινάσης χαρακτηριστική των σερινών/θρεονινών κινασών. Σε αναλογία με τους τύπου II υποδοχείς, δύο μορφές τύπου I υποδοχέων έχουν αναφερθεί για την ακτιβίνη, οι οποίοι είναι γνωστοί ως ActRII ή ALK-4 και ως ActRI ή ALK-2 [30, 31]. Ο επικρατέστερος τύπου I υποδοχέας για την ακτιβίνη θεωρείται ο ALK-4. Ο ALK-2 αν και χαρακτηρίστηκε αρχικά ως τύπου I υποδοχέας της ακτιβίνης, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι δρα και ως υποδοχέας των πρωτεϊνών BMPs [32]. Οι τύπου I υποδοχείς όπως και οι τύπου II έχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνες, ενώ σε αντίθεση με τους τύπου II, έχουν μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες (GS region) ανάμεσα

στην διαμεμβρανική περιοχή και την περιοχή της κινάσης [33]. Η ακτιβίνη προσδένεται στους υποδοχείς τύπου II, οι οποίοι όμως δε μπορούν να μετάγουν σήματα από χωρίς τη συνεργασία των τύπου I υποδοχέων [26, 34]. Επομένως, οι ακτιβίνες μεταδίδουν σήματα μέσω ετεροδιμερών συμπλόκων των υποδοχέων κινάσης τύπου II και τύπου I. Η πρόσδεση ακτιβίνης στον υποδοχέα τύπου II επάγει την φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα στην περιοχή GS από τον υποδοχέα τύπου II. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας τύπου I στη συνέχεια μπορεί να φωσφορυλιώσει και ενεργοποιήσει τα καθοδικά μόρια που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος από την ακτιβίνη.

1.2 Οι πρωτεΐνες SMAD

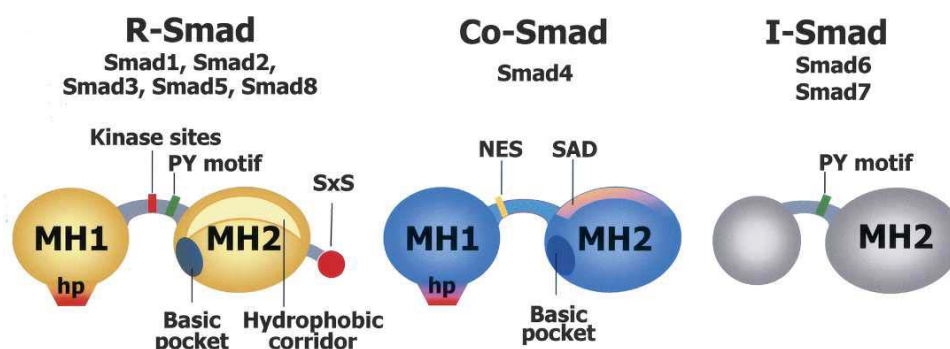
1.2.1 Γενικά

Οι SMAD πρωτεΐνες ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη φρουτόμυγα *D. melanogaster*, ως τα προϊόντα των γονιδίων *Mad*, και στο *C. elegans* ως τα προϊόντα των γονιδίων *sma* [35]. Στο ανθρώπινο και το γονιδίωμα του επίμυου κωδικοποιούνται οκτώ πρωτεΐνες της οικογένειας των SMAD ενώ τέσσερα και τρία μέλη κωδικοποιούνται στο γονιδίωμα της *D. melanogaster* και του *C. elegans* αντίστοιχα (σχήμα 1.2). Οι SMAD πρωτεΐνες διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) τις SMAD που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς (Receptor-activated SMADs, R-SMADs). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι SMAD2 και SMAD3 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους TGFβ, Ακτιβίνη Α και Nodal, και οι SMAD1, SMAD5 και SMAD8 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τους παράγοντες BMP, β) η συν-διαμεσολαβούσα SMAD4 (co-mediator SMAD4, Co-SMAD4), η οποία είναι κοινή για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TGFβ, και η οποία δημιουργεί ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-SMADs τα οποία μεταφέρονται στον πυρήνα για να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή, και γ) οι ανασταλτικές SMADs (Inhibitory SMADs, I-SMADs) SMAD6 και SMAD7 που αναστέλλουν τη δράση των R-SMADs παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα [11, 36, 37].

1.2.2 Δομικά χαρακτηριστικά των SMAD διαμεσολαβητών

Οι R-SMADs, η Co-SMAD και οι I-SMADs παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες. Ειδικότερα, οι R-SMADs αποτελούνται από την άμινο-τελική MH1 περιοχή (Mad

homology domain 1) και την καρβόξυ-τελική MH2 (Mad homology 2) περιοχή. Οι δυο αυτές περιοχές συνδέονται μεταξύ τους με την περιοχή σύνδεσης (linker domain) η οποία είναι πλούσια στο αμινοξύ προλίνη και διαφέρει αρκετά ως προς την αμινοξική της αλληλουχία μεταξύ των διαφόρων SMAD (σχήμα 1.5).



Σχήμα 1.5: Δομικά χαρακτηριστικά των SMAD πρωτεϊνών. Οι SMAD πρωτεΐνες αποτελούνται από δυο καλά συντηρημένες σφαιρικές περιοχές - τον τομέα MH1 και τον τομέα MH2 - και μια μεταβλητή συνδετική περιοχή. Στο σχήμα απεικονίζονται οι επτά SMAD πρωτεΐνες των θηλαστικών και οι τάξεις στις οποίες ανήκουν. Όσον αφορά τις R-SMADs και τη SMAD4, ο MH1 τομέας περιέχει δομή φουρκέτας (β-hairpin) για τη σύνδεση στο DNA. Οι ανασταλτικές SMADs, I-SMADs, δεν έχουν MH1 τομέα. Η συνδετική περιοχή των R-SMADs περιέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης για τις MAPKs, CDKs καθώς και άλλες κινάσες. Στις R-SMADs και I-SMADs η συνδετική περιοχή περιέχει ένα μοτίβο PY το οποίο αναγνωρίζεται από τους τομείς WW που απαντώνται στις λιγάσες ουβικουΐτινης Smurf. Η συνδετική περιοχή της SMAD4 περιέχει ένα σήμα NES. Ο MH2 τομέας περιέχει ένα βασικό pocket για αλληλεπίδραση με τον ενεργοποιημένο τύπου I υποδοχέα στην περίπτωση της R-SMADs και τόσο στις R-SMADs όσο και στη SMAD4 για αλληλεπίδραση με το μοτίβο pS-x-pS (κόκκινη σφαίρα) των R-SMADs. Στην επιφάνεια του MH2 τομέα στις R-SMADs, ένα σύνολο υδροφοβικών περιοχών αποτελεί σημείο ικανό για πολλαπλές αλληλεπιδράσεις [9].

Ο τομέας MH1 χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά για την ικανότητά του να αναστέλλει τη δράση των R-SMAD μέσω της αλληλεπίδρασης με την περιοχή MH2 [38]. Ο MH1 είναι ιδιαίτερα συντηρημένος τομέας σε όλες τις R-SMADs και στη SMAD4, όχι όμως στις I-SMADs. Επιπρόσθετα, ο τομέας MH1 είναι υπεύθυνος για την πρόσδεση των R-SMAD στο DNA καθώς και για την αλληλεπίδρασή τους με μεταγραφικούς παράγοντες [39]. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόνο η SMAD3 έχει την ικανότητα να προσδένεται άμεσα στο DNA μέσω μιας δομής β-φουρκέτας (β-hairpin). Επιπλέον, ο τομέας αυτός περιέχει θέσεις φωσφορυλίωσης καθώς και την αλληλουχία σήματος πυρηνικής εντόπισης, NLS,

που είναι υπεύθυνη για τη μετακίνηση των πρωτεϊνών στον πυρήνα [36]. Για παράδειγμα, η συνεχής μετακίνηση της SMAD4 από και προς τον πυρήνα του κυττάρου οφείλεται στο σήμα πυρηνικού εντόπισμού που βρίσκεται στην περιοχή MH1 καθώς και ενός μόνιμα ενεργού σήματος πυρηνικής εξόδου (NES) πλούσιου σε λευκίνη, που εντοπίζεται στην άμινο-τελική περιοχή του συνδετικού τμήματος [40]. Επιπλέον, η φωσφορυλιωμένη SMAD3 μεταφέρεται στον πυρήνα διαμέσου του σήματος πυρηνικού εντοπισμού που βρίσκεται στην MH1 περιοχή και το οποίο αλληλεπιδρά άμεσα με την importin-β1, μια διαδικασία η οποία απαιτεί τη RAN-GTPάση [41, 42].

Από την άλλη πλευρά ο τομέας MH2 είναι συντηρημένος ανάμεσα στις SMADs και είναι υπεύθυνος για ποικίλες πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Ειδικότερα, μια περιοχή με πολλαπλές υδροφοβικές υπό-περιοχές, γνωστή και ως υδροφοβική αύλακα (hydrophobic corridor) που βρίσκεται στην επιφάνεια του MH2 τομέα, διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα και με πρωτεϊνικούς παράγοντες συγκράτησης στο κυτταρόπλασμα, ενώ συμβάλλει στη δημιουργία ομο-διμερών ή έτερο-τριμερών μεταξύ των R-SMAD-SMAD4 [43]. Επιπρόσθετα, δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και με συστατικά του πυρηνικού συμπλέγματος του πυρηνικού πόρου (nucleoporins) καθώς επίσης και με μεταγραφικούς παράγοντες που προσδένονται στο DNA μέσω της α-έλικας αH-2 [44]. Επιπλέον, περιέχει το συντηρημένο καρβόξυ-τελικό μοτίβο Ser-X-Ser στο οποίο φωσφορυλιώνονται οι R-SMADS από τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Ακόμη, εδώ εντοπίζεται και η περιοχή πρόσδεσης με την πρωτεΐνη SARA [45]. Τέλος, στην περιοχή MH2 εμπεριέχεται και μια αλληλουχία που δρα ως σήμα εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Signal, NES), ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό των SMAD πρωτεϊνών [36, 37]. Οι μεταλλάξεις των σερινών στο μοτίβο SSXS έχουν ως αποτέλεσμα τη σταθερή σύνδεση της SMAD2 με τον υποδοχέα καθώς και κυρίαρχα αρνητική επίδραση στη μεταγωγή του σήματος. Οι μεταλλαγμένες SMAD μορφές δεν φωσφορυλιώνονται και δε συνδέονται με τη SMAD4 για να δημιουργήσουν ετεροδιμερή ή να εισέλθουν στον πυρήνα. Επιπλέον, οι μεταλλάξεις αυτές αποτρέπουν την από τον TGFβ επαγόμενη ενεργοποίηση. Ειδικότερα, η SMAD4 δεν έχει το μοτίβο SSXS και για το λόγο αυτό δε φωσφορυλιώνεται ύστερα από επαγωγή από BMP ή TGFβ. Είναι πολύ πιθανό ότι η φωσφορυλίωση των R-SMADs στο SSXS αναστρέφει την αναστολή που προκαλεί ο τομέας MH1. Επομένως, ύστερα από επαγωγή με το συνδέτη, οι

ενεργοποιημένοι υποδοχείς τύπου I φωσφορυλιώνουν τις R-SMADs με αποτέλεσμα την αναδίπλωση τους και τη δημιουργία ετεροδιμερών με την κοινή SMAD4 πρωτεΐνη. Εξάλλου, όταν η συνάθροιση των ετεροδιμερών συμπλόκων αποτρέπεται, τότε οι κυτταρικές αποκρίσεις του TGFβ παρεμποδίζονται. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι ενώ η χιμαιρική GAL4-MH2 μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή γονιδίων απουσία TGFβ [46], η πλήρους μήκους GAL4-SMAD παρουσιάζει μεταγραφική ενεργότητα μόνο με την προσθήκη TGFβ. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν ότι η ενεργοποίηση των SMADs από τους υποδοχείς “απελευθερώνει” (relieves) την ανασταλτική δράση της άμινο τελικής περιοχής MH1 στον τομέα MH2 που δρά ως τελεστής και η ενεργότητα του κατά κάποιο τρόπο ελέγχεται από την παρουσία του τομέα MH1.

Η συνδετική περιοχή που ενώνει τους τομείς MH1 και MH2 (linker domain), εμπεριέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις πρωτεϊνικές κινάσες MAPK [47]. Όταν οι SMAD φωσφορυλιωθούν στην περιοχή αυτή, παρεμποδίζεται η είσοδος τους στον πυρήνα. Επιπλέον, μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνη και τυροσίνη (PY motif), η οποία απαντάται στις R-SMADs και στις I-SMADs, διευκολύνει την αναγνώριση τους από τις λιγάσες ουβικουιτινίωσης Smurf [48, 49]. Ειδικά για τη SMAD4, στη συνδετική περιοχή της βρίσκεται η αλληλουχία NES καθώς και μια περιοχή αλληλοκαλυπτόμενη με την MH2 περιοχή γνωστή με τα αρχικά SAD (SMAD4 Activation Domain, SAD) που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με ενεργοποιητές και καταστολείς της μεταγραφής [50].

1.2.3 Ενδοκυτταρική εντόπιση των SMAD πρωτεϊνών και μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις

Απουσία TGFβ, το μεγαλύτερο ποσοστό των πρωτεϊνών SMAD2 και SMAD3 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Αυτή η εντόπιση είναι το αποτέλεσμα της σύνδεσης των SMAD2/3 με πρωτεΐνες που τις συγκρατούν στο κυτταρόπλασμα όπως η πρωτεΐνη SARA [51], οι μικροσωληνίσκοι [52] και η φιλαμίνη [53] ή ακόμη μπορεί και να οφείλεται στο γρηγορότερο ρυθμό εξόδου των SMAD2/3 από τον πυρήνα σε σχέση με την είσοδο σε αυτόν [54]. Παρά την ιδιότητα των R-SMAD πρωτεϊνών να μετακινούνται συνεχώς μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος μελέτες ανοσοϊστοχημείας έχουν δείξει ότι στα βασικά επίπεδα οι R-SMAD πρωτεΐνες εντοπίζονται πρωταρχικά στο κυτταρόπλασμα [40, 55]. Πιστεύεται ότι αυτό είναι το αποτέλεσμα της δράσης πρωτεϊνών του κυτταροπλάσματος

που συνδέονται άμεσα με τις R-SMAD πρωτεΐνες. Αυτό επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από το γεγονός ότι στα βασικά επίπεδα οι R-SMAD πρωτεΐνες έχουν βρεθεί σε ολιγομερή σύμπλοκα υψηλού μοριακού βάρους [56]. Πράγματι, υπάρχουν διάφορες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δρουν ως πρωτεΐνες αγκυροβόλησης των SMAD.

Μια από τις πρωτεΐνες που συγκρατούν τις R-SMADs στο κυτταρόπλασμα είναι και η πρωτεΐνη με το όνομα SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) (βλεπε ενότητα 1.3.1) [51]. Κρυσταλλογραφικές μελέτες της δομής του συμπλόκου SMAD2-SBD, έχουν δείξει ότι ο τομέας SBD της SARA έρχεται σε επαφή με τρεις συνεχόμενες υδροφοβικές περιοχές (hydrophobic patches) της επιφάνειας του τομέα MH2 [45]. Η ίδια περιοχή εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση τόσο με τις νουκλεοπορίνες όσο και με τους μεταγραφικούς παράγοντες που δεσμεύονται στο DNA [45, 57]. Με βάση τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η αλληλεπίδραση των SMAD2/3 με τη SARA δεν είναι συμβατή με τη μετατόπιση τους στον πυρήνα του κυττάρου και τη δημιουργία μεταγραφικών συμπλόκων. Είναι άξιο ιδιαίτερης προσοχής το γεγονός ότι η φωσφορυλίωση των SMADs από τον υποδοχέα προκαλεί μείωση στη συγγένεια σύνδεσης της SMAD2 με τη SARA [58]. Αυτό συμβαίνει, βέβαια, χωρίς επακόλουθη αύξηση της συγγένειας των SMAD για τις νουκλεοπορίνες. Εντούτοις, *in vivo*, αυτή η μείωση της συγγένειας για τη SARA είναι ικανή για το διαχωρισμό των SMAD2/3 από αυτήν και τη μετέπειτα μετακίνηση τους στον πυρήνα, όπου οι SMAD2/3 ενεργοποιούν τα γονίδια στόχους του μονοπατιού.

Οι μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις είναι αντιστρεπτές διαδικασίες. Το ενζυμο από-ουβικουιτινίωσης UCH37/UCHL5 αλληλεπιδρά με τη SMAD7 και εξουδετερώνει την από την Smurf2-επαγομενη ουβικουιτινίωση του υποδοχέα TGFβ τύπου I [59]. Οι τύπου I HDAC1 και τύπου III αποακετυλάσες των ιστονών SIRT1 αναστρέφουν την από την p300-διαμεσολαβούμενη SMAD7 αποακετυλίωση και έτσι επιταχύνεται η SMAD7 ουβικιτινίωση και αποικοδόμηση [60, 61]. Οι SMADs μπορούν επίσης να τροποποιηθούν με σουμυλίωση (sumoylation) [27, 62], χωρίς ακόμη να είναι γνωστό αν αυτή ανταγωνίζεται με την ουβικουιτινίωση των SMAD. Η πρωτεΐνη Arkadia, μια τύπου RING E3 λιγάση ουβικιτίνης, έχει δειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης SMAD7 και προάγει τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ/Nodal [63]. Καθώς η SMAD7 ανταγωνίζεται το μονοπάτι του TGFβ, η Arkadia έχει δειχθεί να προάγει το μονοπάτι του TGFβ. Σε σωματικά κύτταρα δεσμεύεται σε φωσφορυλιωμένες SMAD2/3 και τις στοχεύει

για πολύ-ουβικουιτινιλίωση και αποικοδόμηση, ενώ την ίδια στιγμή αυξάνει τη μεταγραφική τους ενεργότητα. Ο μηχανισμός αυτός επιτρέπει τη γρήγορη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που ρυθμίζονται από τις SMAD2/3, ενώ επιτρέπει τη δυναμική ρύθμιση των μονοπατιών Nodal/SMAD κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.

1.2.4 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος που επάγονται από τον TGFβ και είναι ανεξάρτητα από τις SMAD πρωτεΐνες

Αν και οι SMAD είναι οι περισσότερο μελετημένες και χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται καθοδικά της υπεροικογένειας του υποδοχέα του TGFβ, ωστόσο και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν επίσης να ενεργοποιηθούν άμεσα μετά από επίδραση του TGFβ. Το πιο συντηρημένο σηματοδοτικό μονοπάτι που επάγεται από το σύμπλοκο των TGFβ υποδοχέων περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση των SMAD πρωτεϊνών και τη μετάβασή τους στον πυρήνα του κυττάρου, όπου πραγματοποιείται η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων στόχων. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι κυτταρικές αποκρίσεις που επάγονται από το ίδιο ενεργοποιημένο σύμπλοκο των TGFβ υποδοχέων, μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και το ευρύτερο πλαίσιο της ενεργοποίησης (context stimulation). Συγκεκριμένα, ο TGFβ αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων και επάγει την απόπτωση, ενώ αντιθέτως, έχει μιτογόνο δράση σε ινοβλάστες και επάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίησή τους (EMT) [64, 65]. Το παραπάνω “παράδοξο” βρήκε την εξήγησή του με την ταυτοποίηση και άλλων πρωτεϊνών που δρουν καθοδικά από τους υποδοχείς του TGFβ, σηματοδοτώντας μια πληθώρα κυτταρικών αποκρίσεων όπως η απόπτωση, η επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίηση (EMT), η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η παραγωγή εξωκυτταρικής ουσίας και η διαφοροποίηση. Παραδείγματος χάρη, ο τύπου II υποδοχέας φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη PAR6, έναν ρυθμιστή της επιθηλιακής πολικότητας, με αποτέλεσμα τη διάλυση των στενοσυνδέσμων (tight junctions) γεγονός που χαρακτηρίζει το αρχικό στάδιο για την EMT [66]. Ο TGFβ μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει το μονοπάτι μεταγωγής του σήματος από την ERK MAP κινάση (MAPK) μέσω της ικανότητας του υποδοχέα ALK5 να φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη ικρίωμα ShcA, η οποία στρατολογεί την Grb και τη Sos, καθιστώντας έτσι δυνατή την ενεργοποίηση της Ras και των καθοδικών MAPKs [67]. Επιπλέον, σε δυο πολύ πρόσφατες μελέτες έχει

περιγραφεί ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο TGFβ επάγει το μονοπάτι JNK και p38 MAPK [68, 69]. Στην παραπάνω περίπτωση, η TRAF6 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του TGFβ και η επαγωγή από τον TGFβ οδηγεί στην από την K63 ουβικουτινίωση του TRAF6. Το γεγονός αυτό με τη σειρά του οδηγεί στην ενεργοποίηση της MAPKKK Tak1 (ανοδικό ενεργοποιητή της JNK και του p38). Τελικά, σε μεσεγχυματικά κύτταρα, αλλά όχι σε επιθηλιακά κύτταρα, ο TGFβ ενεργοποιεί την κινάση PAK2 και αυτό συμβαίνει μέσω της ενεργοποίησης της μικρής GTPασης Rac1 και Cdc42 [70]. Η βάση αυτής της διαφοράς εξηγήθηκε σε πρόσφατη μελέτη και δείχθηκε ότι στην ουσία και στους δυο κυτταρικούς τύπους ο TGFβ μπορεί να ενεργοποιεί την πρωτεΐνη PAK2, αλλά στα επιθηλιακά κύτταρα η ενεργοποιημένη PAK2 δεσμεύεται και αναστέλλεται από το σύμπλοκο που απαρτίζεται από τις πρωτεΐνες ERBIN και την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Merlin [71]. Αυτό δε συμβαίνει σε μεσεγχυματικά κύτταρα, καθώς αυτά τα κύτταρα εκφράζουν πολύ χαμηλά επίπεδα από την πρωτεΐνη ERBIN.

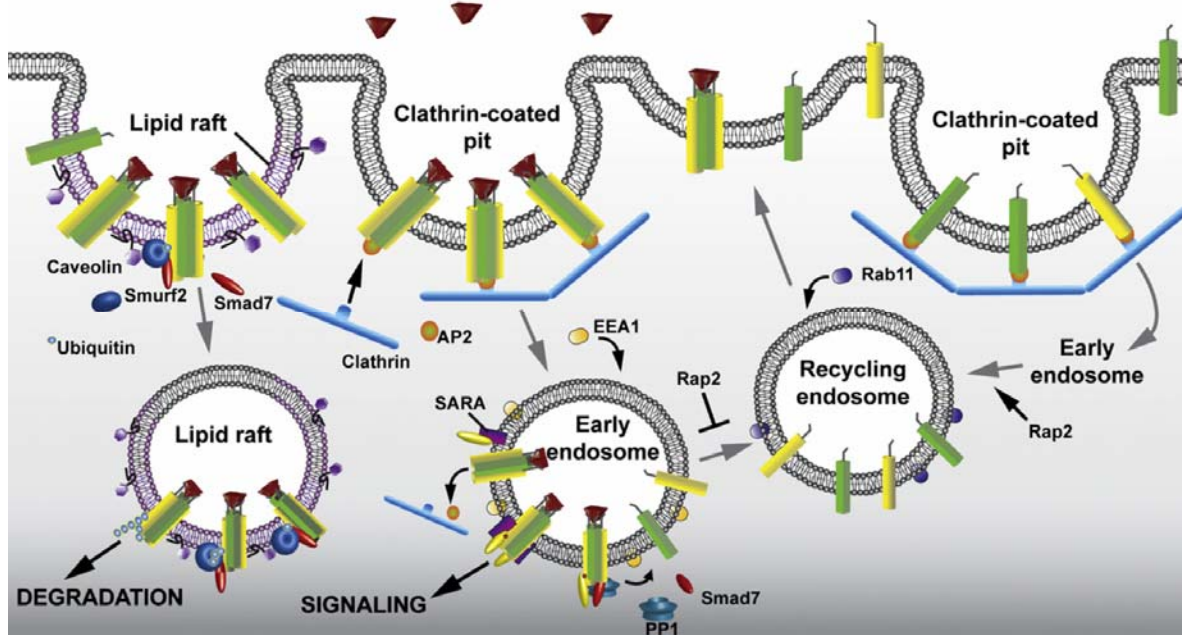
1.3 Μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και πρώιμα ενδοσώματα

1.3.1 Η πρωτεΐνη SARA

Το πρώτο ενδοκυτταρικό βήμα στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ, δηλαδή η στρατολόγηση των SMAD πρωτεϊνών στο σύμπλοκο των υποδοχέων, ελέγχεται από την πρωτεΐνη SARA (σχήμα 1.7). Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation, SARA) ανέδειξε την πολυπλοκότητα της μεταγωγής του σήματος από την υπεροικογένεια του TGFβ. Η SARA έχει την ικανότητα να συνδέεται με τις μη φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2 και SMAD3 πρωτεϊνών [51] και βασική λειτουργία της είναι η παρουσίαση των SMAD2 και SMAD3 πρωτεϊνών στον ενεργοποιημένο τύπου I υποδοχέα. Δομικά περιέχει μία περιοχή από οκτώ συντηρημένες κυστεΐνες οι οποίες περιβάλλουν δύο ιόντα ψευδαργύρου [72]. Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή δακτύλου FYVE (FYVE finger domain) και βρέθηκε ότι δένεται ειδικά σε PI(3)P [73]. Η ονομασία FYVE προέρχεται από τα αρχικά των τεσσάρων πρωτεϊνών στις οποίες ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά να περιέχουν αυτό το μοτίβο (Fab1, YOTB, Vac1, και EEA1) που αποτελείται από ~70 αμινοξέων. Ο τομέας FYVE προσδιορίστηκε από τον Stenmark, ως μέρος της αλληλουχίας μιας ενδοσωμικής πρωτεΐνης, της EEA1 [72, 74]. Τα πρώτα δομικά χαρακτηριστικά του τομέα FYVE έγιναν γνωστά από την κρυστάλλωση του

τομέα της πρωτεΐνης vps27 της ζύμης [75]. Επίσης, έχει γίνει γνωστή μια δεύτερη κρυσταλλική δομή, αυτήν την φορά της περιοχής FYVE της πρωτεΐνης Hrs (d-Hrs) από την *D. melanogaster* [76]. Τέλος, έχει αναφερθεί η δομή του κανονικού τομέα FYVE (canonical FYVE domain) της EEA1 [75]. Η αλληλεπίδραση του τομέα FYVE με το λιπίδιο PI3P έγινε γνωστή από την παρατήρηση ότι η αλληλεπίδραση της EEA1 με τις μεμβράνες ήταν ευαίσθητη στον αναστολέα της κινάσης της 3-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (PI3K), wortmannin [77] και από πειραματικά αποτελέσματα που υπέδειξαν ότι η περιοχή FYVE της EEA1 είχε υψηλή συγγένεια για το λιπίδιο PI3P [73]. Ο τομέας FYVE υπάρχει σε ένα περιορισμένο αριθμό πρωτεϊνών, πολλές από τις οποίες εμφανίζονται να έχουν ρόλο στη μεταγωγή του σήματος ή στη μεμβρανική μετακίνηση ή και στα δυο [78].

Η SARA εκτός από την περιοχή FYVE περιέχει και την περιοχή 80 αμινοξέων SBD (SMAD Binding Domain), η οποία συνδέεται με τις μη φωσφορυλιωμένες SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες και όχι με άλλα μέλη της οικογένειας των SMAD [51]. Η περιοχή SBD βρίσκεται καθοδικά της περιοχής FYVE και προς το καρβοξυτελικό άκρο της SARA ενώ συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο (MH2 τόμεα) των πρωτεϊνών SMAD2 ή SMAD3. Η σύνδεση αυτή οφείλεται σε ένα μοτίβο πλούσιο σε προλίνες στην περιοχή SBD, το οποίο συνδέεται με την περιοχή MH2 των SMAD [45]. Επιπλέον, το κατάλοιπο ασπαραγίνης (N381) στη SMAD2 (συντηρημένο και στη SMAD3) παίζει καθοριστικό ρόλο στη σύνδεση με τη SARA [45]. Το σύμπλοκο SARA-SMAD στη συνέχεια συνδέεται με τον υποδοχέα τύπου I μέσω του άμινο-τελικού άκρου της SARA [51].



Σχήμα 1.6: Οι υποδοχείς υφίστανται συνεχή εσωτερικοποίηση. Η εσωτερικοποίηση των υποδοχέων πραγματοποιείται μέσω της διαμεσολαβούμενης από την κλαθρίνη και των θετικά σε καβεολίνη λιπιδιακών rafts. Η SMAD7/Smurf2 διαμεσολαβούμενη αποικοδόμηση συμβαίνει στα λιπιδιακά rafts, ενώ οι υποδοχείς ανακυκλώνονται στην πλασματική μεμβράνη μέσω ενδοσωμάτων. Η ενεργοποίηση του σήματος πραγματοποιείται στα θετικά με την EEA1 πρώιμα ενδοσώματα όπου η SARA παρουσιάζει τις R-SMADs στα σύμπλοκα των ενεργοποιημένων υποδοχέων. Η πρωτεϊνική φωσφατάση PP1 αποφωσφορυλιώνει τους υποδοχείς με τρόπο που εξαρτάται από την πρωτεΐνη SMAD7[79]. Η Ras GTPase Rap2 προάγει την ανακύκληση (recycling) απουσία σήματος ενώ την καθυστερεί παρουσία σήματος [80].

Ο κύριος ρόλος, λοιπόν, της SARA είναι να στρατολογήσει τις SMAD πρωτεΐνες και να τις φέρει σε επαφή με τον υποδοχέα, ώστε να φωσφορυλιωθούν και να δημιουργήσουν σύμπλοκα με την κοινή SMAD4 για την επιτυχή μεταγωγή του σήματος. Η μετέπειτα φωσφορυλίωση των SMAD2 ή SMAD3 επάγει την αποσύνδεσή τους από την SARA με αποτέλεσμα να μη σχηματίζονται ποτέ ταυτόχρονα τα σύμπλοκα SMAD2/SMAD3-SMAD4 με τα σύμπλοκα SMAD2/SMAD3-SARA. Η SARA επομένως είναι απαραίτητος διαμεσολαβητής για τη μεταγωγή του σήματος από τον παράγοντα TGFβ γιατί στρατολογεί τις πρωτεΐνες SMAD στις μεμβράνες που περιέχουν τον υποδοχέα ελέγχοντας με τον τρόπο αυτό την ενεργοποίησή τους (σχήμα 1.6).

Ωστόσο, η πρωτεΐνη SARA δε διαδραματίζει μόνο ενεργοποιητικό ρόλο στην από τον TGFβ επαγόμενη σηματοδότηση. Επιπρόσθετα, όπως πρωτοπαρατηρήθηκε στη *D. melanogaster* και επιβεβαιώθηκε αργότερα και στα θηλαστικά, η SARA συμβάλλει στην συγκρότηση ενός συμπλόκου που αποτελείται από τις SMAD7-GADD34-PP1c (GADD34, ρυθμιστική περιοχή της πρωτεϊνικής φωσφατάσης, PP1), (PP1c, καταλυτική περιοχή της PP1) που έχει στόχο την αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I του TGFβ [79, 81]. Παρόμοιο ρόλο διαδραματίζει και η πρωτεΐνη Dullard η οποία καταστέλλει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I του BMP και προάγει την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του υποδοχέα τύπου II του ίδιου συνδέτη.

Τέλος, πρόσφατα βρέθηκε ότι ο ρόλος της πρωτεΐνης SARA στα αναπτυσσόμενα επιθηλιακά κύτταρα των φτερών της *D. melanogaster* είναι η στόχευση μορίων του Dpp μονοπατιού, όπως ο υποδοχέας Tkv, στα ενδοσώματα τα οποία συνδέονται με την άτρακτο (spindle machinery) [82]. Με αυτόν τον τρόπο, η SARA διασφαλίζει τόσο την ορθή κατανομή των σηματοδοτικών μορίων στα δυο θυγατρικά κύτταρα ύστερα από τη μίτωση όσο και τη διατήρηση των κατάλληλων επιπέδων Dpp κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

1.3.2 Η σημασία της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων στη μεταγωγή του σήματος από την οικογένεια του TGFβ

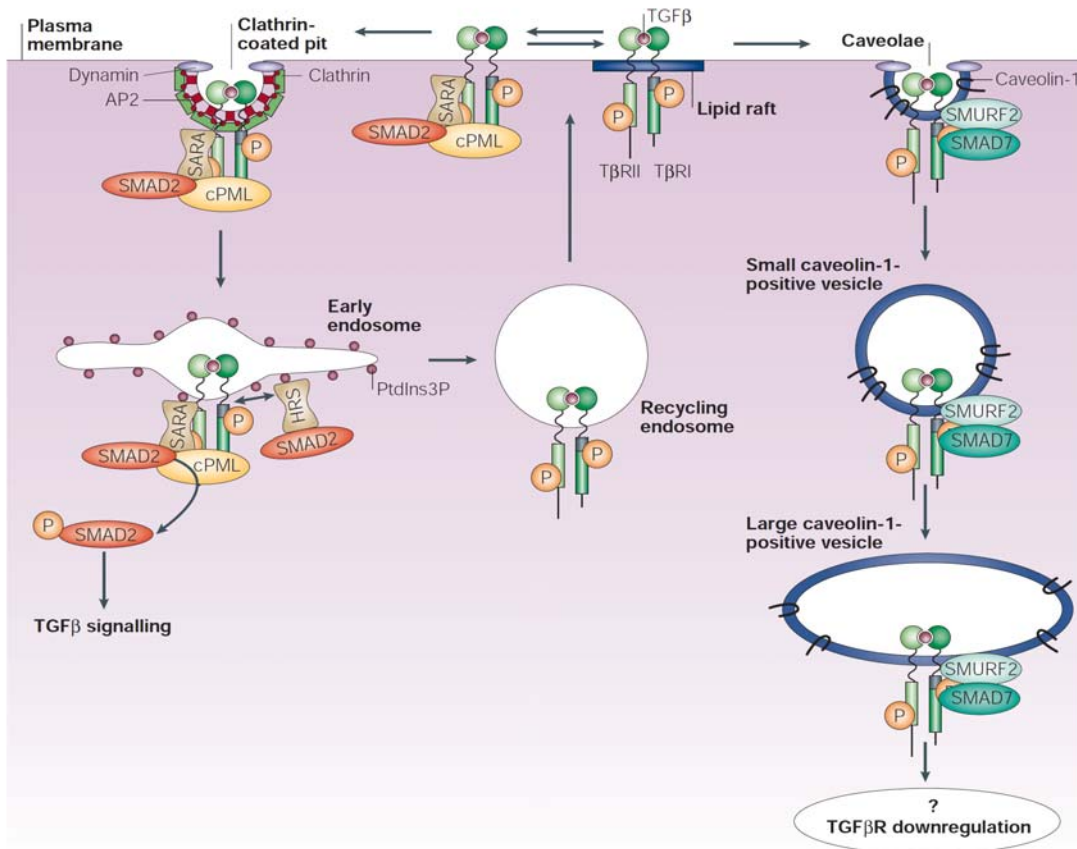
Η ενδοκυττάρωση για χρόνια είχε θεωρηθεί, κυρίως, ως το μέσο για τον τερματισμό της μεταγωγής σήματος μέσω αποικοδόμησης των συμπλόκων των ενεργοποιημένων υποδοχέων, μετά την εσωτερικοποίησή τους. Εξαιτίας της μονομερούς αυτής θεώρησης, η προσοχή των ερευνητών είχε επικεντρωθεί κυρίως στον προσδιορισμό των συστατικών που είναι απαραίτητα για τη σηματοδότηση. Εντούτοις, με τον καιρό γινόταν όλο και πιο ξεκάθαρο ότι η σηματοδότηση δεν εξαρτάται μόνο από την ενεργοποίηση πρωτεϊνών, αλλά επίσης στο πού και για πόσο χρονικό διάστημα το σήμα είναι ενεργό μέσα στο κύτταρο.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα προτείνουν ότι η σηματοδοτική μηχανή μπορεί να πετύχει υψηλής οργάνωσης αυτορρύθμιση αξιοποιώντας τόσο τη διαμερισματοποίηση όσο και τη λειτουργική ειδικότητα του μονοπατιού της ενδοκυττάρωσης. Είναι προφανές ότι οι μελέτες αυτές ανοίγουν νέους δρόμους πέρα από τη συμβατική θεώρηση της ενδοκυττάρωσης στην αποικοδόμηση του φορτίου (cargo). Πράγματι, τα ενδοσώματα είναι ιδανικά για μια τέτοια ρύθμιση καθώς οργανώνονται σε δίκτυα διακριτών μεμβρανών, οι

οποίες διασυνδέονται με ένα αυστηρά ελεγχόμενο σύστημα μεταφοράς κυστιδίων [83, 84]. Η πρόσφατη βιβλιογραφία, λοιπόν, υποστηρίζει την πρόταση ότι τα ενδοσώματα μπορούν να διαδραματίσουν άμεσο και καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση και τον πολλαπλασιασμό του σήματος. Όντως, αμέσως μετά την προσθήκη του συνδέτη το μεγαλύτερο μέρος των ενεργοποιημένων υποδοχέων του επιδερμικού παράγοντα αύξησης (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) καθώς και των πρωτεϊνών που δρουν καθοδικά του μονοπατιού (Shc, η Grb2 και η mSOS), δεν εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, αλλά στα πρώιμα ενδοσώματα [85] προτείνοντας έτσι, ένα σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος από το συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα [86]. Ένας προφανής ρόλος της ενδοκυττάρωσης στη μεταγωγή του σήματος είναι η χρονική ρύθμιση, δεδομένου ότι η διάρκεια του σήματος είναι μια σημαντική παράμετρος στη σηματοδότηση [87]. Η διάρκεια ζωής των σηματοδοτικών συμπλόκων εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένων της κινητικής, της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων και των ενδοκυτταρικών προορισμών τους. Η διάρκεια εξαρτάται επίσης από το ποσοστό των υποδοχέων που αποικοδομούνται έναντι εκείνων που ανακυκλώνονται στην πλασματική μεμβράνη. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμη και μέσα σε μια οικογένεια υποδοχέων αυτές οι παράμετροι μπορούν να διαφέρουν σημαντικά [88].

Ειδικότερα, οι υποδοχείς του TGFβ εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου με δυο κυρίως διακριτά μονοπάτια, α) το μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης [89] και β) το μονοπάτι μέσω των caveolae [90]. Το μονοπάτι της ενδοκυττάρωσης διαμέσου των caveolae έχει δειχθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση των υποδοχέων από το πρωτεόσωμα και κατ'επέκταση στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης από τον TGFβ. Αντίθετα, άλλες παρατηρήσεις τονίζουν ότι η διαμεσολαβούμενη από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση παίζει θετικό ρόλο και προάγει τη σηματοδότηση από τον TGFβ. Πράγματι, μετά την εσωτερικοποίηση σε καλυμμένα με κλαθρίνη κυστίδια, οι υποδοχείς εντοπίζονται για μεγάλο χρονικό διάστημα κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα, ενώ επίσης έχουν βρεθεί και σε ανακυκλούμενα ενδοσώματα (recycling endosomes) [90]. Εξάλλου, αναστολή της διαμεσολαβούμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης, είτε με κυρίαρχα αρνητικές μορφές της δυναμίνης (dynamin) ή της EPS15 είτε με μείωση του K⁺, οδηγούν σε αναστολή της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ [91].

Από την άλλη πλευρά, τα πρώιμα ενδοσώματα είναι εμπλουτισμένα στην πρωτεΐνη SARA [92, 93] γεγονός που καθιστά το κυτταρικό αυτό διαμέρισμα κομβικό σημείο για τη δημιουργία των συμπλόκων υποδοχέων/SARA/SMAD2-3. Ειδικότερα στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ, η πρωτεΐνη SARA στρατολογείται ειδικά στα πρώιμα ενδοσώματα στην υποπεριοχή που εντοπίζεται η πρωτεΐνη Rab5. Επιπλέον, η περιοχή αυτή είναι πλούσια στο λιπίδιο PI(3)P. Είναι επίσης σημαντικό ότι η SARA εμφανίζεται να διαδραματίζει διττό ρόλο στα ενδοσώματα, ρυθμίζοντας τόσο την μεταγωγή σήματος όσο και τη μετακίνηση φορτίου μέσω του Rab5 κυτταρικού διαμερίσματος [93, 94]. Ο συνεντοπισμός του υποδοχέα του TGFβ με την πρωτεΐνη SARA είναι απαραίτητος για την φωσφορυλίωση της SMAD2 και τη μετάδοση του σήματος, γεγονός που εξηγεί γιατί η εσωτερικοποίηση του υποδοχέα του TGFβ στα πρώιμα ενδοσώματα είναι αναγκαία για τη σωστή μεταγωγή του σήματος. Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση που έγινε στο εργαστήριο του κ. Φώτση, είναι ότι η υπερέκφραση της συνεχώς ανενεργής Rab5 (Rab5S34N) προάγει τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ, ενώ η υπερέκφραση της συνεχώς ενεργής μορφής Rab5 (Rab5Q79L) δεν έχει καμία επίδραση [93]. Μια εξήγηση για αυτήν την παρατήρηση είναι ότι η αναστολή της Rab5 μπορεί να τροποποιήσει τη μεταφορά των υποδοχέων διαμέσου των πρώιμων ενδοσωμάτων, αναδεικνύοντας έτσι την επίδραση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας στη μεταγωγή του σήματος. Επίσης, η ουσία wortmannin, η οποία αναστέλλει την κινάση PI3K και μειώνει την ενδοσωμικό απόθεμα των λιπιδίων PtdIns3P, όπως και η υπερέκφραση της SARA στην οποία έχει αφαιρεθεί η FYVE περιοχή, που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση με τις μεμβράνες, έχουν το ίδιο αποτέλεσμα της αναστολής της σηματοδότησης από τον TGFβ [93]. Επομένως, το μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης προάγει το συνεντοπισμό των υποδοχέων με καθοδικά μόρια του σήματος όπως τη SARA και τη SMAD2 πρωτεΐνη στα πρώιμα ενδοσώματα.



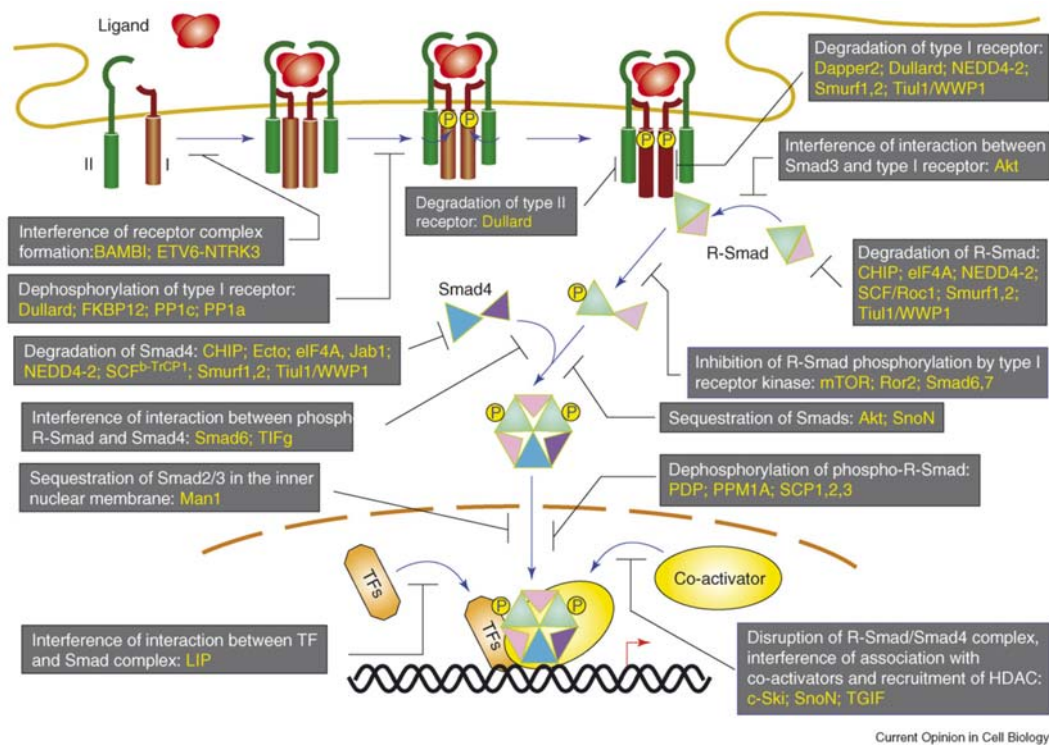
Σχήμα 1.7: Η εσωτερικοποίηση του TGFβ υποδοχέα μέσω της κλαθρίνης και της διαμεσολαβούμενης από λιπιδιακά rafts ενδοκυττάρωσης. Στην πλασματική μεμβράνη, το τετραμερές σύμπλοκο του υποδοχέα (TGFβR) εσωτερικοποιείται από δύο διακριτά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης. Το σύμπλοκο TGFβR απαρτίζεται από δυο τύπου-I TGFβRs (TβRIs) και δυο τύπου-II TGFβRs (TβRIIs), και σε αυτό το σύμπλοκο, ο συνεχώς ενεργός TβRII φωσφορυλιώνει τον TβRI. Για λόγους σχηματικής απλότητας, το τετραμερές σύμπλοκο παρουσιάζεται ως ένα διμερές σύμπλοκο TβRII–TβRI. Στη διαμεσολαβούμενη από κυστίδια καλυμμένα με κλαθρίνη πορεία, οι υποδοχείς κατευθύνονται στα πρώιμα ενδοσώματα, τα οποία είναι εμπλουτισμένα με 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PtdIns3P). Στο σημείο αυτό οι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες SARA και HRS (hepatocyte-growth-factor-regulated tyrosine-kinase, HRS) που είναι συνδεδεμένες με τη SMAD2. Η κυτταροπλασματική cPML (promyelocytic leukaemia protein, PML) που αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς TGFβRs, τη SARA και τις SMADs, είναι απαραίτητη για τον ενδοσωμικό εντοπισμό των παραπάνω πρωτεϊνών [95]. Αξίζει να σημειωθεί ότι η SARA, η SMAD2 και η cPML είναι πιθανό ότι αλληλεπιδρούν με τα σύμπλοκα TGFβ–TGFβR στην πλασματική μεμβράνη. Από τα πρώιμα ενδοσώματα, οι υποδοχείς TGFβRs είναι ικανοί να μετάγουν το σήμα (μέσω της φωσφορυλίωσης της SMAD2) και ανακυκλώνονται πίσω στην κυτταρική επιφάνεια. Στο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που διαμεσολαβείται από λιπιδιακά-raft/caveolae, οι υποδοχείς TGFβRs συνδέονται με την SMAD7–SMURF2 και εσωτερικοποιούνται στα θετικά στην caveolin-1 κυστίδια. Αυτό οδηγεί στην εξαρτώμενη από την ουβικουτίνη αποικοδόμηση των υποδοχέων. Ωστόσο, το ακριβές κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο οι υποδοχείς αποικοδομούνται δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί. AP2, adaptor protein-2; P, phosphate [96].

1.4 Αρνητική ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ

1.4.1 Οι ανασταλτικές SMADs πρωτεΐνες

Οι ανασταλτικές I-SMADs (SMAD6 και SMAD7) πρωτοανακαλύφθηκαν ως οι vascular SMADs που επάγονται ισχυρά από διατμητική τάση (shear stress) του ενδοθηλίου και είναι οι φυσικοί αναστολείς της ενεργοποίησης των R-SMAD που επάγεται από τον TGFβ [97]. Ο τομέας MH2 των I-SMADs παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με αυτόν των πρωτεϊνών R-SMADs και Co-SMADs ενώ η άμινο τελική περιοχή διαφέρει πάρα πολύ σε σχέση με τις άλλες SMADs. Οι I-SMADs υπερεκφράζονται πολύ γρήγορα ύστερα από την ενεργοποίηση του μονοπατιού από τον TGFβ λαμβάνοντας μέρος στην ανάδρομη αρνητική ρύθμιση [98, 99]. Οι I-SMADs ασκούν τις ανταγωνιστικές δράσεις τους με ποικίλους τρόπους. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, είναι γνωστό ότι οι I-SMADs αλληλεπιδρούν με τον τύπου I υποδοχέα, με αποτέλεσμα την εμπόδιση της ενεργοποίησης των SMAD [99]. Ενώ η SMAD7 είναι γενικός αναστολέας της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ, η SMAD6 θεωρείται ότι είναι ειδική για την αναστολή του BMP μονοπατιού [98]. Ειδικότερα, η SMAD7, απουσία διεγέρτη, εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα του κυττάρου ενώ μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα ύστερα από επαγωγή με TGFβ [98]. Επιπλέον, για τη SMAD6 έχει δειχθεί ότι ασκεί τις ανασταλτικές τις δράσεις μέσω ανταγωνισμού με τη SMAD4 για τη σύνδεση στη SMAD1 αποτρέποντας έτσι το σχηματισμό του συμπλόκου SMAD1/SMAD4 [100]. Ακόμη, έχει δειχθεί ότι στρατολογεί τον συν-καταστολέα (co-repressor) CtBP και έτσι καταστέλλει τη μεταγραφή [101]. Τέλος, οι I-SMADs στρατολογούν τους παράγοντες Smurfs στους υποδοχείς και στις SMAD πρωτεΐνες και με αυτόν τον τρόπο επάγουν την ουβικουιτινίωση και την αποικοδόμηση τους. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η SMAD7 μέσω της περιοχής PY (PY motif) συνδέεται με τις λιγάσες της ουβικιτίνης της Smurf1 και Smurf2 [48, 49]. Το σύμπλοκο SMAD7/Smurf στρατολογείται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I και αναστέλλει την φωσφορυλίωση των R-SMADs [48]. Στο μεμβρανικό αυτό σύμπλοκο, η Smurf1 επάγει την άμεση αποικοδόμηση των υποδοχέων μέσω του πρωτεοσωμικού και λυσοσωμικού μονοπατιού [49]. Εκτός από τις I-SMAD, οι πρωτεΐνες Smurf συνδέονται και με τις R-SMADs, τις οποίες οδηγούν σε ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Η Smurf1 συνδέεται επιλεκτικά με τις R-SMAD της οικογένειας BMP, ενώ η Smurf2 συσχετίζεται και με τις R-SMADs της οικογένειας TGF-β/ακτιβίνης, αλλά και με τις BMP

R-SMADs [102]. Συγκεκριμένα μοτίβα στις πρωτεΐνες Smurf (WW μοτίβα) αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές στην ενδιάμεση περιοχή (linker region) των R-SMAD πλούσιες σε προλίνες (PY μοτίβα) [49]. Η αποικοδόμηση των R-SMAD από τις Smurf ελαττώνει την ικανότητα της υπερικογένειας του TGFβ να μετάγει συγκεκριμένες κυτταρικές ανταποκρίσεις [102].



Σχήμα 1.8: Γενική απεικόνιση των επιπέδων ρύθμισης του TGFβ μονοπατιού. Τα μπλε και γκρι βέλη δείχνουν ενεργοποίηση και απενεργοποίηση αντίστοιχα [103].

1.4.2 Ουβικουτινίωση

Πολλές φορές τα κύτταρα προκειμένου να αποικοδομήσουν ανεπιθύμητες πρωτεΐνες χρησιμοποιούν το σύστημα της ουβικουτίνης-πρωτεοσώματος. Με το σύστημα αυτό, οι πρωτεΐνες που πρόκειται να αποικοδομηθούν συχνά διακρίνονται από την παρουσία μιας βραχείας αλληλουχίας αμινοξέων η οποία στοχοποιεί την πρωτεΐνη ως υπονήφια για προσθήκη μορίων ουβικιτίνης και τελικά αποικοδόμηση από το πρωτεόσωμα. Αυτό το πρωτεολυτικό σύστημα που εξαρτάται από την ουβικουτίνη, αναγνωρίζει επίσης και

αποικοδομεί μετουσιωμένες πρωτεΐνες, πρωτεΐνες με λανθασμένη πτύχωση, όπως και πρωτεΐνες οι οποίες περιέχουν αμινοξέα που έχουν υποστεί οξείδωση ή κάποια άλλη βλάβη. Τα ένζυμα που καταλύουν την προσθήκη της ουβικουιτίνης στις πρωτεΐνες αυτές φαίνεται ότι αναγνωρίζουν ειδικά σήματα που αποκαλύπτονται στην επιφάνεια των πρωτεϊνών από λάθος πτύχωση ή χημική βλάβη (όπως αλληλουχίες αμινοξέων ή δομικά μοτίβα τα οποία, συνήθως, είναι απροσπέλαστα και κρυμμένα στο εσωτερικό των μορίων). Το μονοπάτι αυτό ελέγχεται από ένα σύνολο ενζύμων που περιλαμβάνει τα E1 ενεργοποιητές της ουβικιτίνης, τα E2 συζευγμένα με ουβικουιτίνη και τις E3 λιγάσες πρωτεΐνες-ουβικουιτίνης [104]. Οι E3 λιγάσες στρατολογούν υποστρώματα στη μηχανή της ουβικουιτίνης χαρακτηρίζοντας ποιές πρωτεΐνες πρόκειται να αποικοδομηθούν. Συγκεκριμένες SMADs και οι τύπου I υποδοχείς προορίζονται για ουβικουιτινίωση. Η SMAD7 και η SMAD6 αλληλεπιδρούν με τις Smurfs, οι οποίες είναι λιγάσες με HECT-τομέα ουβικουιτίνης και οι οποίες οδηγούν τους υποδοχείς του TGFβ για αποικοδόμηση [49, 63, 105].

1.4.3 Αναστολή της ενεργότητας των υποδοχέων του TGFβ-Φωσφατάσες

Η ρύθμιση της ισορροπίας της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης ελέγχεται αυστηρά από τις κινάσες και τις φωσφατάσες. Οι φωσφατάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν το φωσφοεστερικό δεσμό των πρωτεϊνών, λιπιδίων ή μικρών μορίων-υποστρωμάτων. Οι φωσφατάσες είναι βασικοί ρυθμιστές πολλών βιολογικών διαδικασιών. Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες: α) πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης (Protein Tyrosine Phosphorylation, PTPs), οι οποίες υδρολύουν κατάλοιπα φωσφο-τυροσίνης, β) φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης (Protein Phosphatase, PPs) αποφωσφορυλιώνουν κατάλοιπα φωσφο-σερίνης ή/και κατάλοιπα φωσφο-θρεονίνης, γ) διπλής εξειδίκευσης φωσφατάσες (Dual Specificity Phosphatases, DUSPs), γνωστές και ως MAPK φωσφατάσες (MAPK phosphatases, MKPs), οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν τόσο κατάλοιπα φωσφορυλιωμένης τυροσίνης όσο και φωσφορυλιωμένης θρεονίνης. Ιστορικά, οι φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης ήταν ανάμεσα στις πρώτες φωσφατάσες που αναγνωρίστηκαν κατά τη δεκαετία του 1970. Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες της τυροσίνης (δεκαετία 1990) και, τέλος, οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (από το 1993 μέχρι σήμερα). Οι υποδοχείς του TGFβ είναι κινάσες

σερίνης/θρεονίνης και για το λόγο αυτό είναι στόχοι των φωσφατασών σερίνης/θρεονίνης. Ειδικότερα, μελέτες στην *Drosophila melanogaster* έχουν δείξει ότι η PP1 ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ. Ο μοριακός μηχανισμός για την παραπάνω δράση της φωσφατάσης είναι μέσω της δέσμευσης της στον υποδοχέα dpp ο οποίος είναι υποδοχέας τύπου I με ένα τρόπο που εξαρτάται από τη πρωτεΐνη SARA [81]. Οι ίδιοι ερευνητές σε μια προσπάθεια να διευρύνουν την έρευνα τους για την ανασταλτική δράση της PP1 στο μονοπάτι του dpp χρησιμοποίησαν αναστολείς της φωσφατάσης σερίνης/θρεονίνης (αναστολέας-2) και έδειξαν ότι η αναστολή της ενεργότητας της PP1 είχε ως αποτέλεσμα φαινότυπο που χαρακτηρίζονταν από υπερανπτυγμένα φτερά [106]. Επιπλέον, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η πρωτεΐνη SMAD7 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη GADD34, η οποία είναι μια ρυθμιστική υπομονάδα της PP1c και ακόμη ότι η PP1c στρατολογείται στο σύμπλοκο των πρωτεϊνών που απαρτίζεται από τον υποδοχέα TGFβ τύπου I, τη SMAD7 και τη GADD34 προκειμένου να αποφωσφορυλιώσει τον υποδοχέα TGFβ τύπου I [79].

1.4.4 Ρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων από τις SMADs

Πολλές από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις SMADs μπορούν να ρυθμίζουν τις εξαρτώμενες από τις SMADs κυτταρικές αποκρίσεις συγκρατώντας αυτές σε συγκεκριμένα υποκυτταρικά διαμερίσματα ή ακόμη και επηρεάζοντας αρνητικά τη δημιουργία του συμπλόκου R-SMAD/SMAD4. Είναι γεγονός ότι αρκετές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις SMADs έχει δειχθεί ότι δρουν με τον παραπάνω τρόπο (σχήμα 1.6). Για παράδειγμα, η κυτταροπλασματική SnoN πρωτεΐνη, ένας μεταγραφικός συν-καταστολέας έχει δειχθεί ότι απομονώνει τις SMADs στο κυτταρόπλασμα [107]. Επιπρόσθετα, πρόσφατη μελέτη αναφέρει ότι η πρωτεΐνη Man1 (γνωστή και ως LEMD3), μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στην πυρηνική μεμβράνη, αλληλεπιδρά με τις R-SMADs και αναστέλλει τη μεταγωγή του σήματος από την οικογένεια του TGFβ περιορίζοντας τις R-SMADs στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη [108, 109]. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Akt, καθοριστικός παράγοντας της κυτταρικής επιβίωσης, έχει προταθεί ότι αναστέλλει την από TGFβ/SMAD3-επαγόμενη απόπτωση αλληλεπιδρώντας με τη μη-φωσφορυλιωμένη SMAD3 πρωτεΐνη απομονώνοντάς την μακριά από τους υποδοχείς του TGFβ [110]. Πρόσφατη μελέτη [111] ταυτοποίησε τον TIF1g ως μεταγραφικό παράγοντα της ενεργοποιημένης R-SMADs ο

οποίος ανταγωνίζεται για τη σύνδεση με τη SMAD4 και πρότεινε ότι το σύμπλοκο R-SMAD/TIF1g προάγει τη διαφοροποίηση των ερυθροκυττάρων ενώ το σύμπλοκο R-SMAD/SMAD4 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αιμοποιητικών αρχέγονων κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό η ισορροπία μεταξύ των δυο συμπλόκων R-SMAD/TIF1g και R-SMAD/SMAD4 στα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα είναι ουσιώδης για την εκάστοτε κυτταρική λειτουργία.

1.4.5 Αναστολή της μεταγραφικής ενεργότητας των SMAD πρωτεϊνών

Η συγγένεια σύνδεσης για το DNA που έχουν οι SMAD πρωτεΐνες είναι σχετικά χαμηλή και από μόνες τους δεν είναι ικανές να οδηγήσουν σε μεταγραφή των γονιδίων στόχων του μονοπατιού. Ως εκ τούτου, οι SMADs χρειάζονται επιπρόσθετους μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται αποτελεσματικά με υποκινητές και στρατολογούν συν-ενεργοποιητές της μεταγραφής. Για το λόγο αυτό δεν πρέπει να μας εκπλήσσει το γεγονός ότι η παρέμβαση τόσο στη σύνδεση των SMAD με το DNA, όσο και στην προσέλκυση των συν-ενεργοποιητών έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα σε συγκεκριμένες γονιδιακές αποκρίσεις που επάγονται από τις SMAD (σχήμα 1.6) [112].

1.4.6 Αναστολή της ενεργότητας του υποδοχέα TGFβ

Η πρωτεΐνη SARA έχει θετικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος στρατολογώντας τις SMAD2/3 στον ενεργοποιημένο TGFβ υποδοχέα. Η αντίστοιχη της πρωτεΐνη στη *D. melanogaster* έχει δειχθεί ότι ρυθμίζει αρνητικά τον υποδοχέα τύπου I Dpp (ορθόλογο με αυτόν των θηλαστικών BMP) παρουσιάζοντας σε αυτόν την πρωτεϊνική φωσφατάση PP1c [81]. Στα θηλαστικά η SMAD7 έχει δειχθεί να στρατολογεί ένα σύμπλοκο που απαρτίζεται από την πρωτεϊνική φωσφατάση PP1c και την πρωτεΐνη GADD34 στον ενεργοποιημένο υποδοχέα TGFβ τύπου I, και έτσι προάγει την αποφωσφορλίωση και απενεργοποίηση του υποδοχέα [79]. Παρομοίως, με την εύρεση του ρόλου της SARA στη *D. melanogaster*, η συνάθροιση της PP1c με το σύμπλοκο SMAD7–GADD34, σε κύτταρα θηλαστικών, προάγεται από τη SARA και το αποτέλεσμα είναι η πιο αποδοτική αποφωσφορλίωση του τύπου I TGFβ υποδοχέα [79]. Παρόμοιος είναι και ο μηχανισμός με τον οποίο η PP1a, σε ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει δειχθεί ότι στρατολογείται στον υποδοχέα ALK1 με τρόπο που εξαρτάται από την πρωτεΐνη SMAD7 και στοχοποιεί έναν άλλο υποδοχέα τύπου I, τον

ALK1, για αποφωσφορυλίωση [113]. Η Dullard, μια πρωτεΐνη που ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγωγή του σήματος από τον BMP, συνδέεται με τον τύπου I BMP υποδοχέα προκειμένου να καταστείλει την από τον BMP εξαρτώμενη φωσφορυλίωση και να προάγει την πρωτεοσωμική αποικοδόμηση του υποδοχέα BMP τύπου II. Τέλος, άμεση φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του υποδοχέα BMP τύπου IB και του υποδοχέα με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης *Rot2* έχει δειχθεί ότι αναστέλλει το SMAD1/5 μονοπάτι, παρέχοντας περαιτέρω αποδείξεις ότι οι τυροσινικοί υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης μπορούν να ανταγωνίζονται τους υποδοχείς σερίνης/θρεονίνης [114].

1.5 Η πρωτεΐνη ERBIN

1.5.1 Οι ισομορφές της ERBIN

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ERBIN αποτελείται από τουλάχιστον 26 εξόνια και εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 5. Στην πλειονότητα των ιστών έχουν βρεθεί πολλαπλά αντίγραφα του γονιδίου της τα οποία διαφέρουν στην κωδικοποιούσα περιοχή. Η περιοχή αυτή τοποθετείται ανοδικά ή και μέσα στον τομέα PDZ [115]. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί επτά ισομορφές της πρωτεΐνης. Οι ισομορφές αυτές θεωρείται ότι προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα μεταξύ των εξονίων 21 και 26. Οι διαφορές μεταξύ των ισομορφών εντοπίζονται ανοδικά ή μέσα στον τομέα PDZ. Ειδικότερα, οι ισομορφές 2, 3, 6 και 7 διαφέρουν από τη μεγαλύτερη σε μήκος ισομορφή, την ισομορφή 1, σε μια περιοχή που εντοπίζεται ανοδικά του τομέα PDZ. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι ισομορφές 4 και 5, οι οποίες δεν έχουν το εξόνιο 24 ή 25, αντίστοιχα, παρουσιάζουν ελλειμματική μορφή του τομέα PDZ. Επιπλέον, έχει βρεθεί μια διαφορά, προϊόν πολυμορφισμού (polymorphic difference), στη θέση 3909 A/G, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση K1207E.

Η πρωτεΐνη ERBIN προσδιορίστηκε για πρώτη φορά ως ο παράγοντας που δεσμεύεται στον ERBB2 υποδοχέα [116]. Ο ERBB2 υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF (Epidermal Growth Factor, EGF) και εντοπίζεται στη βασοπλευρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων γεγονός πολύ σημαντικό για τη λειτουργία του. Με την ανακάλυψή της πρωτεΐνης ERBIN ορίστηκε η οικογένεια των πρωτεϊνών (LAP οικογένεια) που αποτελούνται από περιοχές πλούσιες σε λευκίνη και φέρουν PDZ τομέα (βλέπε 1.5.2). Ειδικότερα οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από 16 περιοχές πλούσιες σε λευκίνη (LRRs) στο άμινο-τελικό άκρο και από μια μέχρι και τέσσερις PDZ τομείς στο καρβόξυ-τελικό άκρο [116]. Ο PDZ τομέας αποτελείται από 80-90 αμινοξέα και συνδέεται με αλληλουχίες που συνήθως βρίσκονται στο καρβόξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών [117]. Τα αλλά μέλη της οικογένειας (Densin-180, LET-413, και η Scribble) εμπλέκονται κυρίως στον καθορισμό της κυτταρικής πολικότητας. Η πλασματική μεμβράνη των περισσότερων κυτταρικών τύπων που παράγονται από τους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι πολωμένη. Αυτό κατά κύριο λόγο σημαίνει ότι η μεμβράνη χωρίζεται σε λειτουργικά διακριτές περιοχές μέσω ενός

περίπλοκου μηχανισμού ταξινόμησης ο οποίος κατευθύνει τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια στις κατάλληλες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης.

1.5.2 Η πρωτεϊνική οικογένεια LAP (Leucine-rich repeats and PDZ domain)

Η οικογένεια περιλαμβάνει 4 πρωτεΐνες στα θηλαστικά (hScrib, ERBIN, Densin-180 και Lano), 1 στην *Drosophila melanogaster* (Scribble) και 1 στο *Caenorhabditis elegans* (LET-413). Οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια LAP (Leucine-rich repeats and PDZ domains, LAP) [118] απαρτίζονται από τους τομείς PDZ και LRR. Ο τομέας PDZ ονομάστηκε από τα αρχικά γράμματα των πρωτεϊνών στις οποίες για πρώτη φορά προσδιορίστηκε (PSD-95, Discs-Large και ZO-1, PDZ) ενώ εντοπίζεται στο καρβόξυ τελικό άκρο των πρωτεϊνών. Τα μέλη της οικογένειας LAP περιέχουν 1 μέχρι και 4 τομείς PDZ. Από την άλλη πλευρά στο αμινο-τελικό άκρο υπάρχουν 16 επαναλήψεις περιοχών πλούσιων στο αμινοξύ λευκίνη (leucine-rich repeats, LRRs). Οι δυο αυτοί κύριοι τομείς που χαρακτηρίζουν την οικογένεια LAP έχουν κύριο λειτουργικό χαρακτηριστικό την ιδιότητα τους να δεσμεύονται σε άλλες και να συμμετέχουν μαζί με άλλες πρωτεΐνες στη δημιουργία συμπλόκων. Ανάμεσα όμως στους δυο προαναφερόμενους τομείς υπάρχουν 38 αμινοξέα που απαρτίζουν έναν τομέα που προσομοιάζει με τον LRR. Ο τομέας αυτός ονομάζεται LAPSDa και είναι τομέας υπογραφή για την οικογένεια αυτή [118, 119]. Μια προσεκτική μελέτη της αλληλουχίας καθοδικά του LAPSD αποκάλυψε μια δεύτερη περιοχή που αποτελείται από 24 κατάλοιπα και είναι συντηρημένη και ειδική για τις πρωτεΐνες LAP ενώ δεν έχει σχέση με το μοτίβο LRR (σχήμα 1.9). Η περιοχή αυτή ονομάζεται LAPSDb. Η περιοχή ανάμεσα στις LAPSDa και LAPSDb ποικίλλει σε μήκος, από 41 μέχρι και 132 αμινοξέα και πιθανά σχηματίζει μια α -έλικα. Η περιοχή αυτή δε δείχνει προφανή ομοιότητα ανάμεσα στα μέλη της οικογένειας, εκτός από τις πρωτεΐνες ERBIN και Densin-180, στις οποίες παρουσιάζει 56% ταύτιση αμινοξέων. Επιπλέον, η Densin-180 έχει επιπρόσθετα 90 aa από το τέλος της α -έλικας μέχρι και την αρχή του LAPSDb.

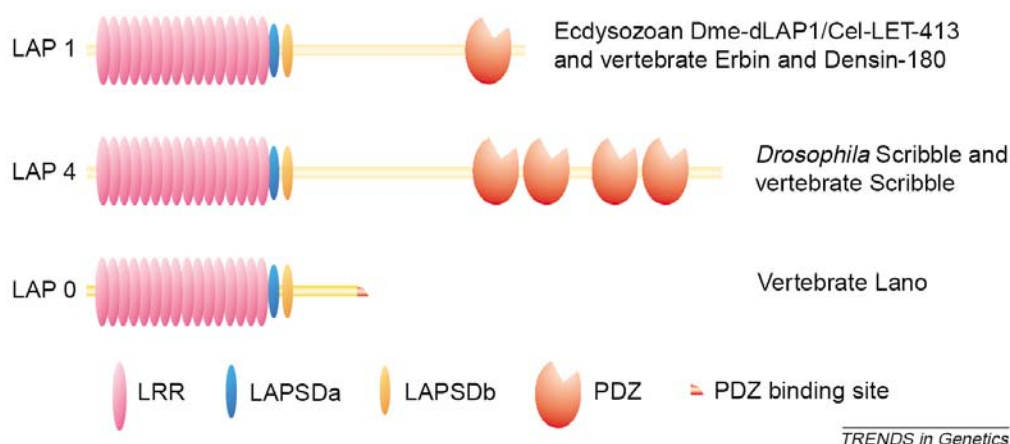
Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για το λειτουργικό ρόλο των πρωτεϊνών που ανήκουν στην LAP οικογένεια, πρωτίστως σε μη νευρωνικές κυτταρικές σειρές. Η πιο καλά μελετημένη πρωτεΐνη της οικογένειας αυτής είναι η πρωτεΐνη scribble. Στη *Drosophila melanogaster* η πρωτεΐνη αυτή χρειάζεται για τη διατήρηση της κορυφαίας-

βασοπλευρικής πολικότητας, της αρχιτεκτονικής των συνάψεων και της κυτταρικής πλαστικότητας [120]. Στα κύτταρα θηλαστικών η scribble ρυθμίζει την κυτταρική πολικότητα (planar cell polarity) [121, 122], την κυκλοφορία των υποδοχέων [123], τη βασοπλευρική ενδοκυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης APC (adenomatous polyposis coli) [124] και την εξωκυττάρωση [125]. Τόσο η scribble [125] όσο και η Densin-180, μια άλλη πρωτεΐνη της ίδιας οικογένειας, [126] έχει προταθεί, ότι δρουν ως πρωτεΐνες ικριώματα (scaffolding proteins).

Η κυτταρική πολικότητα είναι ουσιώδης για τη δράση των κυττάρων που εντοπίζονται σε λειτουργικές διεπιφάνειες (physical–functional interfaces). Η κορυφαία επιφάνεια ελέγχει πολλές από τις λειτουργίες στις οποίες εξειδικεύονται τα επιθηλιακά κύτταρα. Για παράδειγμα τα επιθηλιακά κύτταρα στον πεπτικό σωλήνα (digestive track) έχουν μια κορυφαία μεμβράνη που τα προσανατολίζει προς τον αυλό του στομάχου και απορροφά τα θρεπτικά συστατικά μέσω του μεγάλου αριθμού μικρολαχνών. Τα επιθηλιακά κύτταρα στο έντερο και το νεφρό έχουν μεγάλη ικανότητα απορρόφησης και έκκρισης και η κορυφαία μεμβράνη μπορεί να εσωτερικοποιηθεί και να αντικατασταθεί εξ ολοκλήρου μέσα σε ώρες. Από την άλλη πλευρά η βασοπλευρική μεμβράνη μεσολαβεί για τις επαφές με τα γειτονικά επιθηλιακά κύτταρα πλευρικά των κυττάρων και στην βάση της βασοπλευρικής μεμβράνης. Η κορυφαία και η βασοπλευρική μεμβράνη διαχωρίζονται μεταξύ τους με εξειδικευμένες μεμβρανικές περιοχές που ονομάζονται σφικτοί σύνδεσμοι ή στενοσύνδεσμοι (tight junctions) και προσκολλητικοί σύνδεσμοι (adherens junction), οι οποίοι σφραγίζουν το χώρο ανάμεσα στα κύτταρα και βοηθούν στη στερέωση των γειτονικών κυττάρων μεταξύ τους.

Η ανακάλυψη ότι οι LAP πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την κυτταρική πολικότητα των επιθηλιακών κυττάρων έδωσε το έναυσμα για τη μελέτη των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή. Ποικίλες εκδοχές παρέχουν εξήγηση για το ρόλο αυτό: α) μπορεί να σχηματίζουν ένα φραγμό για το διαχωρισμό των συστατικών της βασοπλευρικής από την κορυφαία μεμβράνη, β) επιπλέον συμμετέχουν στη διαλογή των κυστιδίων μεταφοράς τα οποία συνεχώς μετακινούνται κυκλικά ανάμεσα σε διαφορετικά κυτταρικά διαμερίσματα και μεταφέρουν τις πρωτεΐνες στον κατάλληλο προορισμό και τέλος γ) μπορούν να αγκυροβολούν πρωτεΐνες σε συγκεκριμένες περιοχές στην κυτταρική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη let-23, ομόλογη της ERBIN στο νηματοειδές

Caenorhabditis elegans, συγκρατείται στη βασοπλευρική μεμβράνη σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο που απαρτίζεται από τρεις πρωτεΐνες όλες με PDZ τομέα και παρέχει ένα παράδειγμα για την τελευταία υπόθεση. Ο Borg και οι συνεργάτες του έχουν προτείνει ότι η πρωτεΐνη ERBIN διαδραματίζει ένα παρεμφερή ρόλο για τον ERBB2 υποδοχέα [116]. Πρόσφατη εργασία παρουσιάζει ότι η SMAD3 συνδέεται με τρεις πρωτεΐνες (ERBIN, Par-3, or Dvl-1), μεταξύ των οποίων και η ERBIN. Οι πρωτεΐνες αυτές έχουν πολύ καλά τεκμηριωμένο ρόλο στην κυτταρική πολικότητα. Άρα οι ενεργοποιημένες από τον TGFβ SMAD πρωτεΐνες μπορεί να εμπλέκονται στη δημιουργία της πολικότητας [127]. Αν και ο TGFβ δεν είχε προηγουμένως αποδειχθεί ότι συνδέεται άμεσα με την κυτταρική πολικότητα, ωστόσο έχει δειχθεί ότι συνδέεται με την προαγωγή της επιθηλιακής-μεσεγχυματικής μεταδιαφοροποίησης EMT (Epithelial-mesenchymal transition, EMT), μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από την απώλεια της κυτταρικής πολικότητας, από την απώλεια της κυτταρικής εντόπισης της E-cadherin στις κυτταρικές συνδέσεις (cell junctions), και την υιοθέτηση ατρακτοειδούς μορφολογίας [128, 129]. Ειδικότερα, ο TGFβ ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση (EMT) μέσω κυρίως του εξής μηχανισμού: οι ενεργοποιημένες SMAD ρυθμίζουν γονίδια όπως αυτά που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη Snail, έναν καταστολέα της μεταγραφής του γονιδίου της E-cadherin, οδηγώντας έτσι στη διάλυση των συνδέσμων προσκόλλησης. Εναλλακτικά, οι υποδοχείς συνδέουν την πρωτεΐνη occludin και την πρωτεΐνη Par6 που εμπλέκεται στην πολικότητα. Κατά την ενεργοποίηση από το πρόσδεμα, ο τύπου II υποδοχέας φωσφορυλιώνει άμεσα την Par6. Έπειτα, η Par6 στρατολογεί τη λιγάση ουβικιτινυλίωσης Smurf1, η οποία ουβικιτινιώνει και αποικοδομεί την RhoA, οδηγώντας κατά συνέπεια στη διάλυση των στεγανών συνδέσμων. Η συνδυασμένη δράση των δύο μονοπατιών προάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση EMT.



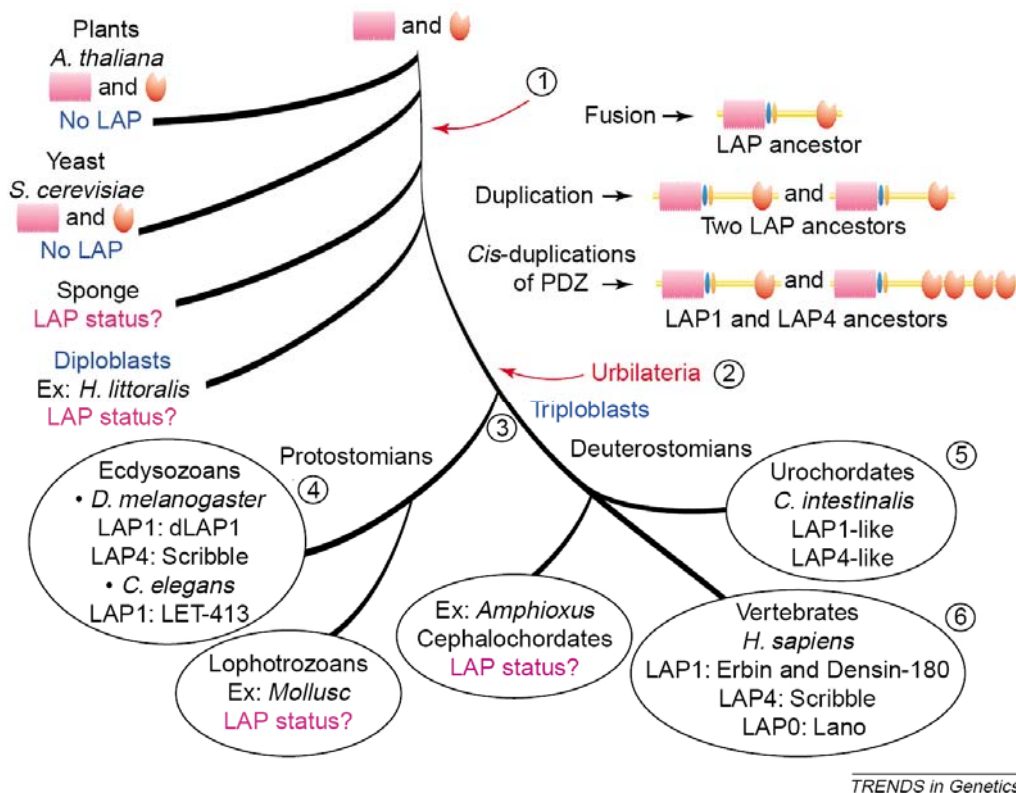
Σχήμα 1.9: Αρχιτεκτονική οργάνωση των πρωτεϊνών της οικογένειας *LAP*. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής έχουν στο αμινοτελικό άκρο 16 LRR (*Leucine-Rich Repeats*), έναν LRR-like LAPSD τομέα και από ένα μέχρι και τέσσερις PDZ τομείς στο καρβοξυτελικό άκρο [130].

1.5.3 Προτεινόμενη υπόθεση για τη δημιουργία της *LAP* οικογένειας

Αν και οι τομείς LRR και PDZ υπάρχουν στα βακτήρια, σε κύτταρα ζύμης ακόμη και σε αναλύσεις πρωτεωμάτων από το φυτικό βασίλειο, η παρουσία και των δύο τομέων σε μια πρωτεΐνη όπως συμβαίνει στις πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια *LAP* είναι μοναδικό χαρακτηριστικό των μετάρζων. Το παραπάνω, προφανώς, συνέβη ύστερα από το διαχωρισμό των μυκήτων από τα φυτά και τα μετάρζα. Αν και η λειτουργία του τομέα LRR δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως, ωστόσο έχει προταθεί ότι ο τομέας αυτός καθώς και η LAPSD περιοχή μπορεί να βοηθάει στην αγκυροβόληση της πρωτεΐνης στις μεμβράνες [130]. Πολλά περισσότερα είναι γνωστά για τη συνεισφορά του παραπάνω τομέα στη συνάθροιση πρωτεϊνικών συμπλόκων καθώς επίσης και για την εμπλοκή του στη μεταγωγή του σήματος και την ενδοκυτταρική εντόπιση των πρωτεϊνών.

Γενετικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν σε μύγες και σκουλήκια, δίνουν μεγάλη έμφαση στο ρόλο των *LAP* πρωτεϊνών όσον αφορά την εγκαθίδρυση πολωμένων ιστών που διατηρούνται από διακυτταρικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα. Θεωρείται [130] ότι οι *LAP* πρωτεΐνες έχουν εξελιχθεί προκειμένου να συμμετέχουν, κατά κύριο λόγο, σε γεγονότα που σχετίζονται με την κυτταρική πολικότητα και ειδικότερα στα τελευταία στάδια της μορφογένεσης τα οποία είναι χαρακτηριστικά στα bilaterians, όπως για

παράδειγμα η διακυτταρική σύνδεση. Πράγματι, οι πρωτεΐνες ERBIN και Densin-180 συνδέονται με σύμπλοκα καδερίνης/κατενίνης τα οποία είναι πολύ σημαντικά για τη δημιουργία διακυτταρικών συνδέσεων (cell-cell junctions). Οι διακυτταρικές συνδέσεις πιστεύεται ότι βρίσκονται μόνο στα μετάζωα, δηλαδή στα ζώα με τυπική πολυκυτταρική οργάνωση, ανάπτυξη ιστών από 3 εμβρυικά βλαστικά δέρματα που έχουν τυπικό στάδιο βλαστιδίου. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη αναφέρει την ύπαρξη προσκολλητικών συνδέσμων (adherens junctions) που περιέχουν μια ομόλογη της β -catenin στο *Dictyostelium discoideum*, ένα μη-μετάζωο ευκαρυωτικό χωρίς όμως, μέχρι σήμερα, να έχει επιβεβαιωθεί η ύπαρξη γονιδίων lap στο γονιδίωμα αυτό [131]. Σε μια ενδιάμεση κατάσταση πριν την εμφάνιση των Urbilateria, το lap1-like γονίδιο-πρόγονος διπλασιάστηκε και η αλληλουχία που κωδικοποιούσε για τον PDZ τομέα cis-διπλασιάστηκε δίνοντας το έναυσμα για τη δημιουργία του lap4-like γονιδίου (σχήμα 1.10).



Σχήμα 1.10: Υποθετικό εξελικτικό σενάριο για την οργάνωση της οικογένειας **LAP**. Οι τομείς LRR και PDZ εμφανίζονται στα προ-μετάζωα όπου (1) η σύντηξη μεταξύ των δυο τομέων έγινε ύστερα από το διαχωρισμό φυτών-ζύμης/μετάζωων. Ύστερα από μια

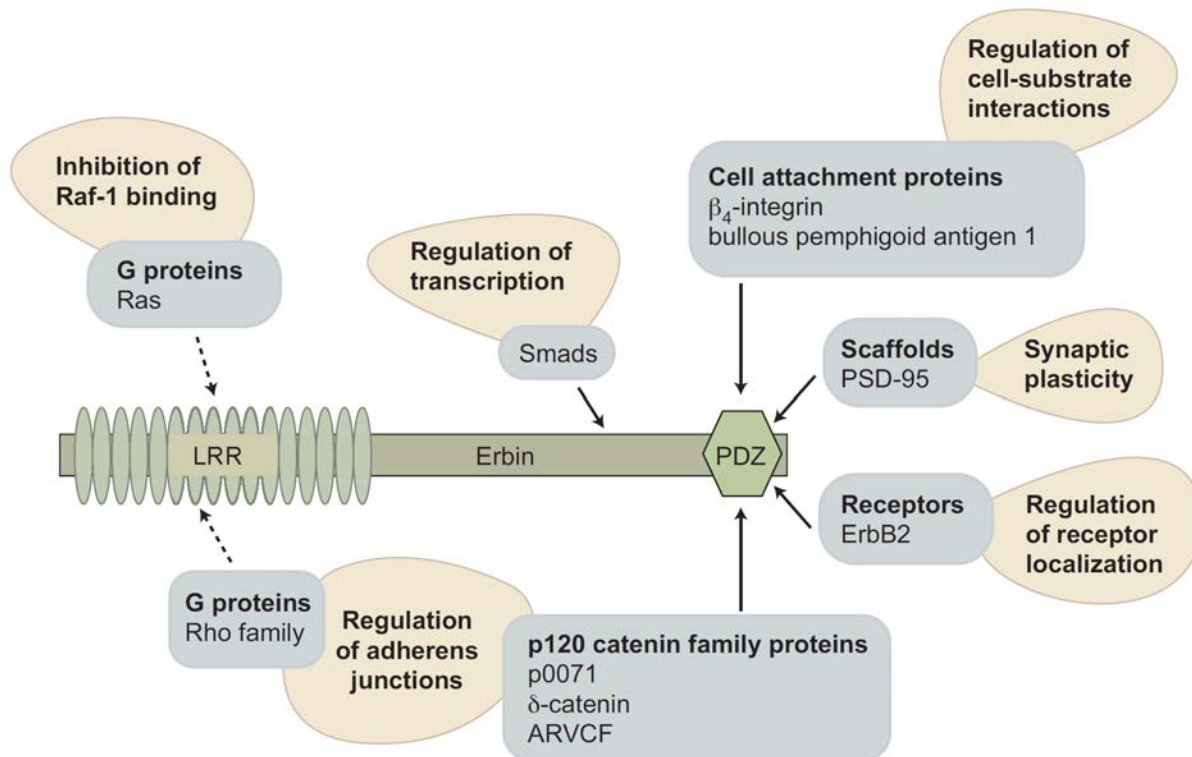
ακολουθία διπλασιασμών, ο εικαζόμενος κοινός πρόγονος των πρωτοστομιών και δευτεροστομιών (*Urbilateria*), πιθανώς είχε ένα *LAP1* και ένα *LAP4* (2). Υστερα από την έκθεση των μετάζωων σε ακτινοβολία, (3) οι δυο αυτοί τύποι μορίων είναι ακόμη παρών στον κλάδο των πρωτοστομιών, για παράδειγμα στη *Drosophila melanogaster*, ενώ μόνο ένα παραμένει στο *C.elegans* (4). Στον κλάδο των δευτεροστομιών, (5) το γονιδίωμα *Ciona intestinalis* (*Urochordate*), το οποίο δε διπλασιάστηκε, έχει μόνο δυο μέλη της οικογένειας *LAP* (6). Ένας μαζικός γενωμικός διπλασιασμός συνέβη στα σπονδυλωτά (*vertebrate lineage*), με απότοκο την ανάδυση μιας οικογένειας με τέσσερα μέλη [130].

Στα *Urbilateria*, τα δύο μέλη της οικογένειας *LAP* είναι πολύ πιθανό ότι συνυπάρχουν (*LAP1* και *LAP4*). Ο διπλασιασμός του γονιδίου κατά την εμφάνιση των σπονδυλωτών [132] μπορεί να εξηγήσει την παρουσία τεσσάρων *LAP* πρωτεϊνών: δυο πρωτεϊνών *LAP1* (*ERBIN* και *Densin-180*), μίας *LAP4* (*Scribble*) και μίας *LAP0* (*Lano*) (σχήμα 1.9). Η ισχυρή διακλάδωση της *Scribble* από τη μύγα και τον άνθρωπο προτείνει: α) έναν συντηρημένο ρόλο της *LAP* οικογένειας κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, β) την ύπαρξη συντηρημένων μοριακών δικτύων τα οποία σχετίζονται με τα παραπάνω ορθόλογα ειδικά όταν αναφερόμαστε για τους τομείς *PDZ* και γ) μια δυναμικά ογκοκατασταλτική ενεργότητα της ανθρώπινης *Scribble*, όπως ανάλογα έχει δειχτεί για την *Scribble* της *D. melanogaster* [133]. Είναι βέβαιο ότι γενετικές μελέτες στα σπονδυλωτά θα αποκαλύψουν περισσότερα στοιχεία για τις λειτουργίες κάθε μέλους της οικογένειας *LAP*.

1.5.4 Επιπρόσθετοι σημαντικοί ρόλοι της πρωτεΐνης *ERBIN*

Η *ERBIN* πρωτοπροσδιορίστηκε πριν από μια δεκαετία ως η πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά, μέσω του τομέα *PDZ*, με τον υποδοχέα *ErbB2/HER2* και χρειάζεται για τη βασοπλευρική του εντόπιση [116]. Από τότε και μέχρι σήμερα, πολλές πρωτεΐνες βρέθηκαν να συνδέονται με την *ERBIN*. Ορισμένα παραδείγματα είναι η *PSD-95* [134], η *BPAG1* (*Bullous Pemphigoid Antigen 1*, *BPAG1*) και η υπομονάδα β_4 της ιντεγκρίνης (*integrin 4 subunit*) [115], η *p120* κατενίνη [135-138], οι *SMADs* [127], η *EBP50* [139], η *Nod2* [140], η *Sur-8* [141] και η πρωτεΐνη-διάυλος *Cav1.3 Ca²⁺* [142] (σχήμα 1.11). Η *ERBIN* ρυθμίζει τόσο τη μεταγωγή του σήματος από τον *NRG1* και τη διαδικασία της μυελινοποίησης (*myelination*), δηλαδή το σχηματισμό της προστατευτικής ουσίας γύρω από τις νευρικές ίνες [143] όσο και την ευαισθησία των κυττάρων *MCF-7* στον υποδοχέα *TRAIL* μέσω του μονοπατιού *ErbB2/AKT/NF- κ B* [144]. Επιπρόσθετα, η *ERBIN* ρυθμίζει

τη μορφογένεση των δενδριτικών κυττάρων μέσω της ρύθμισης του εντοπισμού της δ -catenin [145], ενώ πολύ πρόσφατα βρέθηκε ότι συνεργατικά με την πρωτεΐνη MERLIN ρυθμίζει την κύτταρο-ειδική ενεργοποίηση της PAK2 από τον TGF β [71].



Σχήμα 1.11: ERBIN είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη (multifunctional protein). Τα βέλη υποδηλώνουν άμεση σύνδεση. Τα διακεκομμένα βέλη υποδηλώνουν έμμεση αλληλεπίδραση. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την ERBIN είναι σε γκρι πλαίσια. Ο πιθανός λειτουργικός ρόλος των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι σε κίτρινα πλαίσια. Οι λεπτομέρειες περιγράφονται στο κείμενο 1.5.4 [146].

1.5.5 Ενδοκυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης ERBIN

Η πρωτεΐνη ERBIN και ο υποδοχέας ERBB2/HER2 εντοπίζεται στην πλευρική μεμβράνη των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου [116]. Στην ίδια εργασία, πειράματα ανοσοϊστοχημείας ημίλεπτων κατεψυγμένων ιστικών τομών (semi-thin frozen) προερχόμενων από παχύ έντερο ανθρώπου με χρήση αντισώματος έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης ERBIN, έδειξαν ότι αυτή συνεντοπίζεται στα επιθηλιακά κύτταρα με τον γνωστό μάρτυρα της βασοπλευρικής μεμβράνης των εντερικών κυττάρων, τον 525 Ag. Αντιθέτως, δεν εντοπίστηκε συνεντοπισμός με το καρκινοεμβρυϊκό αντιγόνο

(carcinoembryonic antigen, CEA), γνωστό μάρτυρα της κορυφαίας επιφάνειας, επιβεβαιώνοντας ότι η ERBIN, τουλάχιστον σε ανθρώπινα εντερικά κύτταρα, εντοπίζεται βασοπλευρικά.

Αναζητώντας στη βιβλιογραφία πληροφορίες για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ERBIN είναι φανερό ότι μέχρι σήμερα ελάχιστες εργασίες έχουν μελετήσει το θέμα αυτό. Ειδικότερα, μεμονωμένα θετικά σε ERBIN κυτταροπλασματικά κυστίδια έχουν περιγραφεί σε βασικό κυτταρικό καρκίνωμα (basal cell carcinoma) με την τεχνική της ανοσοϊστοχημείας [147]. Επιπρόσθετα, στικτή (punctate) ERBIN χρώση έχει παρατηρηθεί με ανοσοφθορισμό σε εγγύς δενδριτικά κύτταρα [142]. Επιπλέον, σε κερατινοκύτταρα η ERBIN έχει βρεθεί να δεσμεύεται σε συστατικά των ημιδεσμοσωμάτων όπως για παράδειγμα η $\beta 4$ -integrin [115]. Τέλος, έχει προταθεί ότι η ERBIN εμπλέκεται στη ρύθμιση της οργάνωσης και τη διατήρηση της διακυτταρικής προσκόλλησης πιθανώς μέσω των μικρών GTPασών και ειδικότερα των πρωτεϊνών της οικογένειας Rho [138]. Σε πολλές κυτταρικές σειρές, COS-7, 804G, PtK2, HaCat, και PAJEB- $\beta 4$ κερατινοκύτταρα, η χημική πρωτεΐνη EGFP-ERBIN⁹³²⁻¹⁴¹² βρέθηκε είτε να είναι διάχυτα κατανεμημένη σε όλο το κυτταρόπλασμα ή να εντοπίζεται στην πλευρική μεμβράνη σε σημεία επαφής μεταξύ των κυττάρων. Επιπλέον, περιστασιακά έχει παρατηρηθεί και πυρηνική χρώση της πρωτεΐνης ERBIN. Παρόμοια αποτελέσματα έδωσε και η πλήρους μήκους πρωτεΐνη ERBIN (ισομορφή 2) συντηγμένη με τον επίτοπο HA στο καρβόξυ τελικό άκρο της πρωτεΐνης [115]. Επιπρόσθετα, σε αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα, αντίσωμα έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης παρουσιάζει κυρίως διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση με ελάχιστη χρώση στην πλασματική μεμβράνη. Από την άλλη πλευρά σε διαφοροποιημένα κύτταρα, η κυρίαρχη χρώση είναι η μεμβρανική [115].

1.5.5.1 Παλμιτοϋλίωση και ενδοκυτταρική εντόπιση της ERBIN

Είναι γνωστό ότι ορισμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες συνδέονται ομοιοπολικά με ένα ή περισσότερα λιπίδια διαφόρων τύπων: μακριά αλυσίδα λιπαρών οξέων, ισοπρενοϊδή, στερόλες και γλυκοζυλιωμένα παράγωγα της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Το προσκολλημένο λιπίδιο παρέχει μια υδροφοβική άγκυρα που εισέρχεται στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα και κρατάει την πρωτεΐνη στη μεμβρανική επιφάνεια. Η δύναμη της υδροφοβικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της διπλοστοιβάδας και μιας μονής αλυσίδας υδρογονανθράκων

(single hydrocarbon chain) που συνδέεται με την πρωτεΐνη, σπάνια είναι ικανή για να την αγκυροβολήσει με ασφάλεια, εξάλλου πολλές πρωτεΐνες έχουν παραπάνω από ένα στοιχείο σύνδεσης με την μεμβράνη. Όταν μια ελλειμματική κατασκευή, που προκύπτει από απαλοιφή μέρος του τομέα LRR στην άμινο τελική περιοχή της ERBIN (1-32aa), υπερεκφράζεται σε κύτταρα η πρωτεΐνη αυτή δεν εντοπίζεται πλέον στην πλασματική μεμβράνη, αλλά στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, βρέθηκε ότι οι κυστεΐνες στις θέσεις 14 και 16 στην άμινο τελική περιοχή της ERBIN παλμιτουλιώνονται *in vivo*. Υπερεκφρασμένες κατασκευές στις οποίες η κυστεΐνη 14 και/ή η κυστεΐνη 16 αντικαταστάθηκαν από σερίνες δεν εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη, υποδηλώνοντας ότι η παλμιτοϋλίωση της ERBIN είναι απαραίτητη για την εντόπισή της στην πλασματική μεμβράνη [148]. Από την άλλη πλευρά, η υπερεκφρασμένη άμινο τελική περιοχή της ERBIN (1–196 aa), η οποία δεν έχει το υπόλοιπο μισό της LRR, είναι μεν ικανή να υφίσταται παλμιτοϋλίωση, ωστόσο δεν εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη ενώ παρουσιάζει μια διάχυτη κυτταροπλασματική κατανομή. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν, αν και ο μηχανισμός είναι ακόμη άγνωστος, ότι για την εντόπιση της ERBIN στην πλασματική μεμβράνη χρειάζονται τόσο η παλμιτοϋλίωση όσο και ο τομέας LRR.

Έχει επίσης προταθεί ότι πρέπει να υπάρχουν δυο μορφές της ίδιας πρωτεΐνης μέσα στο κύτταρο, η παλμιτοϋλιωμένη και η μή παλμιτοϋλιωμένη. Το αν η ERBIN θα βρίσκεται στη μια ή στην άλλη μορφή πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από την ισορροπία των ενζυμικών ενεργοτήτων PAT και PTE [149]. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον ότι μια σημειακή μετάλλαξη στην περιοχή LRR (P315L) αναστέλλει την παλμιτοϋλίωση της ERBIN. Η παλμιτοϋλίωση προάγει τη σύνδεση πρωτεϊνών, που γενικά είναι διαλυτές, με τις μεμβράνες του κυττάρου. Η παλμιτοϋλίωση, πέρα από τη μεμβρανική αγκυροβόληση που μπορεί να προσφέρει στις πρωτεΐνες που την υφίστανται, έχει μεγάλο εύρος λειτουργιών [149]. Μεταξύ των λειτουργιών περιλαμβάνεται η πρωτεϊνική μεταφορά, η μεταγωγή σήματος από τις G-πρωτεΐνες, η συνάθροιση ιοντικών καναλιών (ion channel clustering), η μετα-συναπτική πλαστικότητα (post-synaptic plasticity) και η πρωτεϊνική σταθερότητα [149, 150]. Η ενδογενής πρωτεΐνη ERBIN, σε κύτταρα HeLa, εντοπίζεται κυρίως στην πλασματική μεμβράνη προσκολλητικών συνδέσμων [148]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι σε μεμονωμένα κύτταρα HeLa τα οποία δεν έχουν αναπτύξει ακόμη δια-κυτταρικές συνδέσεις, η πρωτεΐνη ERBIN δεν εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη.

ΣΚΟΠΟΣ

Από τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα και από πρόσφατες μελέτες του εργαστηρίου στο οποίο εκπονήθηκε η διατριβή αυτή, αναδεικνύεται η μεγάλη σημασία της πρωτεΐνης SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) στη μεταγωγή του σήματος από τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού β (TGFβ). Η πρωτεΐνη SARA, που εντοπίζεται στο εμπλουτισμένο με το λιπίδιο PtdIns3P πρώιμο ενδόσωμα, όχι μόνο αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του TGFβ, αλλά ακόμη στρατολογεί τις R-SMAD πρωτεΐνες στο σύμπλοκο των υποδοχέων του TGFβ/Ακτιβίνη Α για φωσφορυλίωση.

Κύριος σκοπός της διατριβής αυτής είναι να εστιάσει με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στους μοριακούς μηχανισμούς δράσης της πρωτεΐνης SARA στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ και πιο συγκεκριμένα:

1. Να ταυτοποιήσει πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τη SARA χρησιμοποιώντας τεχνικές δύο-υβριδίων.
2. Να χαρακτηρίσει λειτουργικά το ρόλο της αλληλεπίδρασης με μια από αυτές (ERBIN) στη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ. Συγκεκριμένα:
 - 2.1. Να επιβεβαιώσει την αλληλεπίδραση SARA-ERBIN με βιοχημικές τεχνικές.
 - 2.2. Να διερευνήσει το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο συμβαίνει η αλληλεπίδραση SARA-ERBIN.
 - 2.3. Να χαρτογραφήσει τις περιοχές οι οποίες διαμεσολαβούν την αλληλεπίδραση της SARA με την ERBIN.
 - 2.4. Να μελετήσει το ρόλο της ERBIN στην καθοδική μεταγωγή του σήματος του TGFβ (φωσφορυλίωση των SMAD2/3 και μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων αναφοράς).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Κυτταρικές καλλιέργειες- Διαμόλυνσεις κυτταρικών σειρών

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) απομονώθηκαν όπως έχει περιγράψει προηγουμένως [151]. Διατηρήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 (με L-γλουταμίνη και Earle's, Invitrogen), εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (Fetal calf serum, FCS, Invitrogen) θερμικά απενεργοποιημένο, 58 μg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS, Sigma) και 10 units/ml ηπαρίνη (Sigma, St.Louis, MO). Τα τρυβλία και οι καλυπτρίδες στα οποία καλλιεργήθηκαν τα HUVEC είχαν υποστεί πριν επεξεργασία με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I (BD Biosciences) για 30 λεπτά στους 37°C και εκπλυθεί με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS, Invitrogen). Για τις ανάγκες των πειραμάτων της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα πρώτης γενιάς. *Μετασχηματισμένα επιθηλιακά εμβρυονικά κύτταρα προερχόμενα από ανθρώπινο νεφρό (Human Embryonic Kidney, HEK 293)* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη. *Καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα από το δέρμα 85άχρονης καρκινοπαθούς (A431)* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, 10% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη. *Ινοβλαστικά κύτταρα από έμβryo το γονιδίωμα του επίμοσ NIH 3T3 (NIH 3T3, Mouse embryonic fibroblast cell line)* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1g/L, 10% ορό εμβρύου βοός θερμικά απενεργοποιημένο (Fetal Bovine Serum, FBS), 100U/ml πενικιλίνη και 100μg/ml στρεπτομυκίνη. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 37°C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO₂. Όλα τα θρεπτικά υλικά ήταν ελεύθερα τοξινών και εμπλουτισμένα με 100 U/ml πενικιλίνη, 100 μg/ml στρεπτομυκίνη. Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν 24 ώρες πριν τη διαδικασία διαμόλυνσης, σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11mm και σε συγκέντρωση 40.000 κύτταρα/φρεάτιο. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε

το λιπίδιο Metafectene Pro (Biontix Laboratories GmbH, Germany) σε αναλογία με το DNA 4:1 και σε διάλυμα M199, μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Το μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονταν σε υλικό καλλιέργειας M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS και διατηρήθηκε για 4h, πριν αντικατασταθεί με πλήρες θρεπτικό μέσο. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες μετά από 24 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO₂. Τα κύτταρα HEK 293 cells διαμολύνθηκαν είτε με το αντιδραστήριο Lipofectamine 2000 (www.invitrogen.com), είτε με το αντιδραστήριο FuGENE 6 (www.roche-applied-science.com), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC

Για την απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) χρησιμοποιήθηκε φρέσκος ανθρώπινος ομφάλιος λώρος εντός αποστειρωμένου δοχείου με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS) από το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων. Μέχρι τη στιγμή της επεξεργασίας 10 min-3h ο ανθρώπινος ομφάλιος λώρος διατηρείται σε πάγο. Στο ενδιάμεσο ετοιμάζεται η κολλαγενάση με αραιώση σε PBS (0,1% κολλαγενάση) και φιλτράρισμα (0,2μm). Η κολλαγενάση παρέμεινε σε υδατόλουτρο 37°C για μία ώρα έως την τελική χρήση της. Ακολούθησε καθαρισμός του ομφάλιου λώρου εξωτερικά με PBS. Με τη βοήθεια μιας σύριγγας που περιείχε PBS, εντοπίστηκε με ψηλάφηση η φλέβα του λώρου από κάθε πλευρά και διανοίχθηκε. Στις δύο πλευρές της φλέβας τοποθετήθηκαν βαλβίδες τριών σημείων (3-Way Stopcocks, πεταλούδες) και δέθηκαν με χειρουργικό νήμα. Στη συνέχεια, η φλέβα πλύθηκε εσωτερικά με το απαιτούμενο PBS προκειμένου αυτό να εξέρχεται καθαρό από την άλλη πλευρά της. Από το ένα άκρο, η φλέβα διαποτίστηκε με τη μέγιστη δυνατή ποσότητα κολλαγενάσης (περίπου 20ml). Προσοχή απαιτείται ώστε να μην υπάρχει αέρας εντός της φλέβας και διαρροή. Ακολούθησε επώαση του λώρου σε βάζο με PBS (που βρισκόταν ήδη σε υδατόλουτρο στους 37°C) για 12 λεπτά στους 37°C. Κατά τη διάρκεια των 12 λεπτών, τοποθετήθηκαν 5ml κολλαγόνο τύπου I (συγκέντρωσης 50μg/ml) σε τρυβλίο 10cm και ακολούθησε επώαση του σε κλίβανο 37°C. Λίγο πριν περάσουν τα 12 λεπτά, δύο σύριγγες τοποθετήθηκαν στα άκρα του λώρου, η μία εκ των οποίων γεμάτη θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS. Με το πέρας των 12 λεπτών, το θρεπτικό

υλικό μεταφέρθηκε με πίεση στην άλλη σύριγγα (ώστε να παρασύρει τα κύτταρα και να απενεργοποιήσει την κολλαγενάση) και από εκεί σε ένα σωλήνα φυγοκέντρησης. Το τελευταίο επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 1700rpm και 24°C και έπειτα αφαιρέθηκε το υπερκείμενο ενώ το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 10ml πλήρες θρεπτικό υλικό για HUVEC. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το κολλαγόνο από το τρυβλίο και πλύθηκε δύο φορές με 10ml PBS. Τέλος, τα κύτταρα στρώθηκαν στο τρυβλίο, και αναπτύχθηκαν στον επωαστικό κλίβανο. Μετά από πέντε ώρες, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και προστέθηκε νέο θρεπτικό υλικό. Το ίδιο επαναλήφθηκε και την επόμενη μέρα ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ερυθρά κύτταρα που παρασύρθηκαν μαζί με τα HUVEC. Η κολλαγενάση και το κολλαγόνο προέρχονται από την εταιρία Sigma (<http://www.sigmaaldrich.com>).

2.3 Δημιουργία σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών

Κύτταρα A431 διαμοιράστηκαν σε τρία τρυβλία των 10cm² προκειμένου την επόμενη μέρα η οπτική πληρότητα των κυττάρων να είναι 50-60%. Με χρήση του αντιδραστηρίου διαμόλυνσης FuGENE6 και σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή τα τρυβλία διαμολύνθηκαν με το πλασμιδίο pGL3-basic/(CAGA)₁₂-Luc και το πλασμιδίο που κωδικοποιεί το γονίδιο αντοχής στην πουρομυκίνη. Την επόμενη μέρα, τα τρυβλία διαμοιράστηκαν 1:20 σε πέντε τρυβλία των 10cm². Τα κύτταρα παρέμειναν για λίγες μέρες στον επωαστικό κλίβανο. Τα μη διαμολυσθέντα κύτταρα που είχαν αντιβιοτικό θανατώθηκαν ενώ στα διαμολυσθέντα κύτταρα που είχαν αντιβιοτικό, οι αποικίες που αναπτύχθηκαν σημάνθηκαν και τοποθετήθηκαν δακτύλιοι απομόνωσης σε κάθε αποικία. Μέσα σε κάθε δακτύλιο προστέθηκαν 100μl τρυψίνης και κάθε αποικία επιλέχθηκε, και στρώθηκε σε φρεάτιο από τρυβλίο 24άρων φρεατίων με πλήρες θρεπτικό υλικό. Από εδώ και στο εξής το θρεπτικό υλικό περιείχε πάντα και 0,4μg/ml πουρομυκίνη. Στις αποικίες πραγματοποιήθηκε δοκιμή για την ανταπόκριση του κλώνου στον TGFβ, συνθήκες μηδενικού ορού για οκτώ ώρες και ενεργοποίηση με +/- 2.5 ng/ml TGFβ για 16 ώρες και δοκιμή ενεργοποίησης με +/- 50 ng/ml Ακτιβίνης Α, ενώ επιλέχθηκαν οι 15 καλύτεροι κλώνοι με ανταπόκριση σε TGFβ και Ακτιβίνη Α. Η επόμενη γενιά σταθερά διαμολυσμένων κυτταρικών σειρών (A431/(CAGA)₁₂-Luc/Ren) περιλαμβάνει την ένταξη του γονιδίου της Renilla στο γένωμα των ανωτέρω δύο επιλεγμένων κλώνων. Τελικά,

προέκυψε ένας νέος κλώνος από τους δυο ανωτέρω κλώνους, ενώ η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε με το πλασμίδιο pRL-TK Vector (της εταιρίας Promega, που κωδικοποιεί το γονίδιο της Renilla) και το πλασμίδιο που κωδικοποιεί το γονίδιο αντοχής στο αντιβιοτικό G418 (0,75mg/ml).

2.4 Κατασκευή, πολλαπλασιασμός και τιτλοποίηση ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Οι ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την διαδικασία που προτείνει η εργασία [152] και η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην ιστοσελίδα (www.coloncancer.org/adeasy.htm). Όλοι οι φορείς και τα στελέχη βακτηρίων για τη δημιουργία των αδενοϊών ήταν ευγενική προσφορά του κ. Bert Vogelstein (The John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD). Η γνώση του τίτλου των ιών, αφού γνωρίζουμε και τον αριθμό των κυττάρων, είναι χρήσιμη στον υπολογισμό του MOI (Multiplicity Of Infection, πολλαπλότητα της μόλυνσης), που εκφράζει τον αριθμό των ιών που αντιστοιχούν σε κάθε κύτταρο. Η τιτλοποίηση των αδενοϊών έγινε με τη δοκιμασία των πλακών (plaque assay). Κύτταρα 293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο 6 φρεατίων (5×10^5 κύτταρα ανά φρεάτιο) μέχρι το 80-90% της πληρότητας τους. Την επόμενη μέρα, μολύνθηκαν με 5μl από διαφορετικές αραιώσεις του ιού (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Μετά από 4 ώρες μόλυνσης τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με 4ml άγαρ επικάλυψης που περιέχει 20mM HEPES, 12,5mM $MgCl_2$, 1% αγαρόζη (Gibco BRL), σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640. Για την αποφυγή του στεγνώματος της αγαρόζης πριν από το σχηματισμό των πλακών, προστέθηκε PBS μεταξύ των φρεατίων και το τρυβλίο τυλίχθηκε με πάραφιλμ. Η εμφάνιση των πλακών έγινε μετά από επτά μέρες ενώ στο μεταξύ έγιναν συνεχείς μετρήσεις ως την πλήρη εμφάνιση των πλακών. Τόσο ο πολλαπλασιασμός, όσο και η μέτρηση του τίτλου των ιών πραγματοποιούνται στις λεγόμενες κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος (packaging lines). Έτσι, για τους αδενοϊούς χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά 293 που παρέχει τα γονίδια του αδενοϊού E1 και E3. Κύτταρα 293 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες T-175 σε πληρότητα 80-90%. Για την μόλυνση χρησιμοποιήθηκε αδενοϊός με MOI 5 από προηγούμενο πολλαπλασιασμό του ιού σε φλάσκα T75. Όταν το 50% των κυττάρων αποκολλήθηκε, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μαζί με το θρεπτικό υλικό. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 5000g, για 5 λεπτά, στους 4°C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5 ml PBS. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με την

διαδικασία ψύξης-τήξης σε 4 κύκλους. Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (5000g, για 5 λεπτά, στους 4°C) και το υπερκείμενο κλασματοποιήθηκε. Ο πολλαπλασιασμός και η μέτρηση του τίτλου των ιών πραγματοποιούνται στις λεγόμενες κυτταρικές σειρές πακεταρίσματος (packaging lines). Έτσι για τους αδενοϊούς χρησιμοποιείται η κυτταρική σειρά HEK 293 που παρέχει τα γονίδια του αδενοϊού E1 και E3. Κύτταρα HEK 293 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες T-175 σε πληρότητα 80-90%. Για τη μόλυνση χρησιμοποιήθηκε αδενοϊός με MOI 5 από προηγούμενο πολλαπλασιασμό του ιού σε φλάσκα T75. Όταν το 50% των κυττάρων αποκολλήθηκε, τα κύτταρα συλλέχθηκαν μαζί με το θρεπτικό υλικό. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 5000g, για 5 λεπτά, στους 4°C και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 5 ml PBS. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με την διαδικασία ψύξης-τήξης σε 4 κύκλους. Τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση (5000g, για 5 λεπτά, στους 4°C) και το υπερκείμενο κλασματοποιήθηκε.

2.5 Πλασμιδιακές κατασκευές και siRNAs

Οι πλασμιδιακές κατασκευές της πρωτεΐνης ERBIN GST-ERBIN 1240-1371 (E4), myc-ERBIN 1-1371 (ισομορφή 2), myc-ERBIN P315L, καθώς και η myc-ERBIN LRR ήταν μια ευγενική προσφορά του Jean-Paul Borg (*Institut de Cancérologie de Marseille, <http://umr599.marseille.inserm.fr>, France*). Οι κατασκευές pGEX4T-1-ERBIN1081-1265 (Y2HID), pGEX4T-1-ERBIN 1081-1188 (E1), pGEX4T-1-ERBIN 1124-1215 (E2), pGEX4T-1-ERBIN 1159-1265 (E3), pGEX4T-1-ERBIN 1208-1265 (E3C), pGEX4T-1-ERBIN 1208-1240 (E3C.1), pGEX4T-1-ERBIN 1241-1265 (E3C.2), pcDNA3-HA-SARA 667-926 (SARA-1), pcDNA3-HA-SARA 906-1204 (SARA-2), pcDNA3-HA-SARA 1170-1323 (SARA-3), pcDNA3-HA-SARA 722-926 (SARA-1ΔSBD), pcDNA3-HA-SARA 730-926 (SARA-1ΔSBDΔPPI) και pGEX4T-1-SBD 667-721 (SMAD Binding Domain, SBD), pCMV-Shuttle-FLAG-SARA1-753 (SARA N-terminus) δημιουργήθηκαν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές όπως αυτοί περιγράφονται στον πίνακα 1. Συνεχώς ενεργές μορφές των πρωτεϊνών SMAD2/3 δημιουργήθηκαν με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (site-directed mutagenesis). Προκειμένου να δημιουργηθεί μια συνεχώς ενεργή πρωτεΐνη που προσομοιάζει στις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMADs, οι θέσεις φωσφορυλίωσης της σερίνης (SSMS) στο καρβόξυ τελικό άκρο των πρωτεϊνών SMAD2 και SMAD3 μεταλλαχθήκαν σε όξινα

κατάλοιπα EDME και EDVE, αντίστοιχα, όπως ακριβώς έχει περιγραφεί και στη βιβλιογραφία [153]. Όλες οι πλασμιδιακές κατασκευές επαληθεύτηκαν με αλληλούχιση DNA (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Germany). Η κατασκευή pGEX4T-1-ERBIN-PDZ (1262-1371aa, E5) ήταν προσφορά του Yutaka Hata (Department of Medical Biochemistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan). Οι κατασκευές pRK5-FLAG-SMAD2 και pRK5-FLAG-SMAD3 μας δόθηκαν από τον κ. Dimitri Kardassi (Laboratory of Biochemistry, Department of Basic Sciences, University of Crete Medical School, Greece). Η κατασκευή HA-ERBIN ήταν ένα δώρο από τον κ. Mei Lin (Medical College of Georgia, Augusta, USA). Ο πλασμιδιακός φορέας Renilla pRL-TK Vector, προέρχεται από την εταιρία Promega (Promega Corporation, Madison, USA). Το πλασμίδιο ARE-luc ήταν κατασκευή του κ. Jeff Wrana (University of Toronto, Canada), ενώ το πλασμίδιο FAST-2 μας το παρέιχε ο κ. Lai E. (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA). Τα GACA-luc και BRE-luc ήταν του Peter ten Dijke (Molecular Cell Biology, Leiden University Medical Center, The Netherlands). Οι πρωτεΐνες myc-SMAD1 και myc-SMAD5 προέρχονται από τον κ. Zhang YE (Laboratory of Cellular and Molecular Biology, National Cancer Institute, Maryland, USA). Οι YFP-Rabankyrin5, GFP-Rab5, GFP-Rab7 και GFP-Caveolin1 όλες προήλθαν από τον κ. Marino Zerial (Max-Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany). Τα siRNAs για την πρωτεΐνη ERBIN αγοράστηκαν από τις εταιρίες Qiagen, SI02778188 και Ambion, AM 16708 ID: 132625. Όλοι οι χειρισμοί του ανασυνδυασμένου DNA πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχει στην ιστοσελίδα της η εταιρία Fermentas (<http://www.fermentas.com>).

Πίνακας 1: Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να δημιουργηθούν οι πλασμιδιακές κατασκευές.

Όνομα πλασμιδιακής κατασκευής	Υποκινητής 1	Υποκινητής 2	Αμινοξέα (aa)
Y2HID	CGGGGATCCTCTCCTCCA CAGCCTCTG	CCGCTCGAGTCACTGTGTA TATGGAGGCTG	1081-1265aa
E1	GGATCCTCCTCCACAGC CTCTGTAA	CGAGTCATCCTGGAGGATC TAATAA	1080-1188aa
E2	GGATCCCAGAGACCCCT TTCTGCAC	CGAGTCAACTCAAAGGCAT CTTTCTAAC	1124-1215aa
E3	GGATCCGTTAGTGATTTC AATTATTCACG	CTCGAGTCACTGTGTATAT GGAGGCTG	1159-1265aa
E3C.1	GGATCCAAGTTAGAAAA GATGCCTTTGAG	CTCGAGTCACACAGATGCC TGAGGG	1208-1240aa
E3C.2	GGATCCGCA AGGCATCCCTCTAGAGA	CTCGAGTCACTGTGTATAT GGAGGCTG	1241-1265aa
E3C	GGATCCAAGTTAGAAAA GATGCCTTTGAG	TCGAGTCACTGTGTATATG GAGGCTG	1208-1265aa
SARA-1	GAATTCTGCCTCAAGCC AGAGCCC	GGGTCGACTCATTACTGC CAAGGAAACTTTG	667-926aa
SARA-2	ATTCTGCAGGGAATGTG GTGAGC	GTACCTCATCCATTTGCTTT ATATTCTGATC	906-1204aa
SARA-3	ATTCTGACAAGAACGTT AGCAAGG	GGTACCTTATACGATGTTT TCCAGAATA	1170-1323aa
SARA 1-753	GCGGCCGCCACCATGG ACTACAAGGACGACG	GATATCTTATCCTGCAGAG GAAGTTCC	1-753aa
SARA SBD	GGATCCGCCTCAAGCCA GAGCCCT	CTCGAGTCATCTGGGCTGA GCCACTTCT	667-721aa
SARA-1ΔSBD	GAATTCTGAGCAGAGGC GAGTTTGGT	CCGCGGGTCGACTCATTTA CTGCCAAGGAAACTTTG	722-926aa
SARA-1ΔSBD-PP1	GAATTCTGATGGGATCTT GCCCAATG	CCGCGGGTCGACTCATTAC TGCCAAGGAAACTTTG	730-926aa

2.6 Αντισώματα και ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες

Ο ανασυνδυασμένος αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β , TGF β 1, προήλθε από την εταιρεία R&D (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Η ανασυνδυασμένη Ακτιβίνη Α ήταν ευγενική προσφορά του Yuzuru Etoh (Ajinomoto Co., Japan) και παρασκευάστηκε στο κατά χρώση Gram αρνητικό εντεροβακτήριο *E.Coli* όπως έχει περιγραφεί [154]. Ο BMP2 (πρωτεΐνη οστικής μορφογένεσης, Bone Morphogenetic Protein) προέρχονταν από την εταιρεία Immunotools, Germany. Το πολυκλωνικό αντίσωμα που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη EEA1 προήλθε από τον κ. Marino Zerial (Max-Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics, Dresden, Germany). Το α -FLAG M2 αντίσωμα (F3165) αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma, (Sigma-Aldrich, MO, USA). Μονοκλωνικό αντίσωμα αρουραίου που αναγνωρίζει τον επίτοπο HA (κλώνος 3F10) ήταν από την εταιρία Roche (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Το 9E10 (α -myc) μονοκλωνικό αντίσωμα καθαρίστηκε από το αντίστοιχο υβρίδωμα (hybridomas) χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές. Πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός, που αναγνωρίζει την πρωτεΐνη SARA (sc-8881) αγοράστηκε από την εταιρία Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology, USA). Όλα τα δευτερογενή αντισώματα προήλθαν από τη Dianova (Dianova GmbH, Hamburg, Germany). Μονοκλωνικό αντίσωμα το γονιδίωμα του επίμοις FLAG-M2 προήλθε από την εταιρία Sigma. Πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου φωσφο-SMAD2, ήταν μια ευγενική προσφορά του κ. Αριστείδη Μουστάκα (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden). Όλα τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανδική υπεροξειδάση προήλθαν από την εταιρία Dianova.

Πολυκλωνικό αντίσωμα προερχόμενο από κουνέλι δημιουργήθηκε σε συνεργασία με την εταιρία Davids Biotechnology Germany (<http://www.dabio.de/>) χρησιμοποιώντας ως αντιγόνο τη χμιαϊκή πρωτεΐνη GST-ERBIN 1240-1371aa και καθαρίστηκε με βασικές βιοχημικές μεθόδους όπως περιγράφεται (<http://ivaan.com/protocols/121.html>) [134, 155]. Η ειδικότητα των αντισωμάτων ελέγχθηκε σε ενδογενή και υπερεκφρασμένα επίπεδα της ERBIN, με siRNA της ERBIN καθώς και με ανταγωνισμό με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη.

2.7 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Για τη μελέτη του συνεντοπισμού των πρωτεϊνών έλαβαν χώρα πειράματα ανοσοφθορισμού. Ειδικότερα, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες ενώ στην περίπτωση που τα κύτταρα ήταν HUVE οι καλυπτρίδες είχαν προκαλυφθεί με κολλαγόνο τύπου I και σε ορισμένες περιπτώσεις με ζελατίνη. Με το πέρας της επώασης έγινε πλύση των κυττάρων μια φορά με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση είτε σε κρύα μεθανόλη (-20°C) για την περίπτωση που απαιτείται μετουσίωση της GFP πρωτεΐνης (π.χ. για επιμόλυνση με ιούς), είτε σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3,7% για 15 λεπτά για την περίπτωση που θέλαμε να διατηρήσουμε την ιδιότητα της GFP να φθορίζει. Στην τελευταία περίπτωση, για την εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεΐδης ακολούθησε επώαση με 50mM NH_4Cl (σε PBS) για 15 λεπτά και επώαση με το απορρυπαντικό Triton X 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με 10% FCS (που είχε προηγουμένως υπερφυγοκεντρηθεί) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρωτογενούς αντισώματος για μια ώρα. Με το πέρας της επώασης και εφόσον γινόταν πλύση των κυττάρων μια φορά με PBS, γινόταν επώαση με το διάλυμα του δεύτερου αντισώματος. Τα δευτερογενή αντισώματα κόνικλου ή το γονιδίωμα του επίμους συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRITC) προήλθαν από την εταιρία Dianova και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200. Τα δευτερογενή αντισώματα, συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη ή CY5 (FITC, TRITC ή CY5), ήταν ειδικά μόνο για το αντίστοιχο πρωτογενές. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με διάλυμα ProLong Gold antifade reagent της εταιρείας Invitrogen και οι παρατηρήσεις των δειγμάτων έγιναν σε συνεστιακό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561 και λογισμικό Leica TCS. Οι αντικειμενικοί φακοί που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία Leica PL APO 100x/1.40 και 63x/1.32 και το 59 ειδικό λάδι βύθισης ήταν Zeiss 518N. Οι

αναλύσεις των εικόνων έγιναν με τη βοήθεια των προγραμμάτων Image J, Photoshop (Adobe Systems Incorporated) και Corel (Corel Corporation). Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 10% FCS.

2.8 Μέθοδοι ανεύρεσης και ανίχνευσης πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων

2.8.1 Ανεύρεση πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τη SARA-Σύστημα δύο υβριδίων

Η σάρωση (screen) με το σύστημα δύο υβριδίων και η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη συνεισφορά της εταιρίας Hybrigenics που εδράζεται στη Γαλλία (S.A., Paris, France). Συνοπτικά, η πρωτεΐνη SARA (667-1323aa) κλωνοποιήθηκε σε φορέα του συστήματος των δύο υβριδίων που έχει βελτιστοποιηθεί από την προαναφερόμενη εταιρία (<http://pim.hybrigenics.com/pimriderext/tgf-beta/methods.html>), ενώ για τη σάρωση χρησιμοποιήθηκε τυχαία δημιουργημένη (randomly primed) cDNA βιβλιοθήκη προερχόμενη από ανθρώπινο πλακούντα. Προκειμένου να εκτιμηθεί η αξιοπιστία κάθε αλληλεπίδρασης, χρησιμοποιήθηκε ένα προβλεπόμενο βιολογικό σκορ (Predicted Biological Score, PBS). Το PBS στηρίζεται στα πειραματικά δεδομένα και λαμβάνει υπόψη ξεχωριστά κάθε αλληλεπίδραση [156]. Ειδικότερα, η τιμή PBS ποσοτικοποιεί την αξιοπιστία κάθε αλληλεπίδρασης και βασίζεται σε ένα στατιστικό μοντέλο που λαμβάνει υπόψη τον ανταγωνισμό για την δέσμευση στο δόλωμα (bait) ανάμεσα στα διάφορα τμήματα των πρωτεϊνών θηραμάτων (preys) και διακυμαίνεται από την τιμή 0 (ειδική αλληλεπίδραση) μέχρι και 1 (πιθανό τεχνικό λάθος). Για πρακτικούς λόγους, οι τιμές αυτές διαιρούνται σε τέσσερις κατηγορίες, από το A (τιμή πλησιέστερα στο 0) στο D (πλησιέστερα του 1). Στον πίνακα 2 περιγράφονται οι πρωτεΐνες και το όνομα κάθε γονιδίου που ανιχνεύθηκε με το σύστημα δύο υβριδίων. Η ταξινόμηση έχει γίνει σε σχέση με την κατηγορία της τιμής PBS. Ακόμη, στον ίδιο πίνακα (πίνακας 1) αναγράφεται ο αριθμός των κλώνων, για κάθε πρωτεΐνη, που απομονώθηκαν.

2.8.2 Δοκιμασία, *in vitro*, πρωτεϊνικής καταβύθισης (Glutathione S-transferase pull-down assay) -Έκφραση και απομόνωση χμαιορικών GST πρωτεϊνών με τη χρήση σφαιριδίων γλουταθειόνης-αγαρόζης

Η προετοιμασία των κυτταρικών εκχυλισμάτων και ο καθαρισμός των χμαιορικών GST πρωτεϊνών έχει περιγραφεί προθύστερα [127]. Η στρατηγική για τον καθαρισμό που

ακολουθείται είναι η δέσμευση της GST χμαιοτικής πρωτεΐνης σε στήλη ακινητοποιημένης γλουταθειόνης, η απομάκρυνση με έκπλυση της στήλης, του μη δεσμευμένου εκχυλίσματος, και τελικά η έκλυση της πρωτεΐνης από τη στήλη. Η πρωτεϊνική έκφραση υπόκειται στον έλεγχο του υποκινητή *tac* (*tac promoter*), ο οποίος επάγεται χρησιμοποιώντας το ανάλογο της λακτόζης, το IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside). Τα κύτταρα συλλέχθηκαν και λύθηκαν ύστερα από κατεργασία είτε με υπερήχους, (Branson Digital Sonifier^R 250-D, USA), είτε με μηχανικά μέσα με τη χρήση του French pressure cell (SIM-AMINCO, 40.0000PSI). Ειδικότερα, οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν στα επιδεκτικά κύτταρα BL21 (protease free) και BL21(DE) του βακτηρίου *E.coli*. Συνοπτικά, ακολουθήθηκε η εξής πειραματική πορεία: ύστερα από το μετασχηματισμό του *E.coli* με τα αντίστοιχα πλασμίδια (pGEX), ακολούθησε επώαση της καλλιέργειας στους 37°C. Όταν η οπτική απορρόφηση έφτασε την τιμή 0,6 (OD_{600nm}=0,6), δηλαδή στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, προστέθηκε IPTG σε τελική συγκέντρωση 300μM. Ακολούθησε περαιτέρω επώαση στους 37°C για ακόμη δύο ώρες (υπερέκφραση των GST χμαιοτικών πρωτεϊνών). Μετά το πέρας των δυο ωρών τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση, 6.000g Sorvall RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, Germany, κεφαλή GSA, για 15 λεπτά. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύθηκε, στον πάγο, σε συνολικό όγκο 20 ml διαλύματος (50mM Tris pH 8, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, protease inhibitors). Ακολούθησε λύση των κυττάρων με μηχανικά μέσα (French pressure cell, SIM-AMINCO, 40.0000 PSI). Το εκχύλισμα συλλέχθηκε και αμέσως φυγοκεντρήθηκε, 12.000g Sorvall, κεφαλή SS-34, για 30 λεπτά, στους 4 °C. Το υπερκείμενο υπέστη διαπίδυση σε διάλυμα: 150mM NaCl, 20mM Hepes pH 7.9, 0.1% Nonidet P40, 1mM DTT, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, στους 4°C. Οι χμαιοτικές GST πρωτεΐνες επώαστηκαν με σφαιρίδια γλουταθειόνης και η έκφραση τους ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική 10%, SDS-πολυακρυλαμιδίου. Συνοπτικά, οι χμαιοτικές GST πρωτεΐνες ή η GST πρωτεΐνη (~15-30μg, ισομοριακές ποσότητες) επώαστηκαν για 60min at 4°C με 20μl σφαιριδίων γλουταθειόνης-αγαρόζης (Amersham Biosciences, NJ, USA), σε διάλυμα (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% NP-40). Ύστερα από πλύσιμο τρεις φορές με το παραπάνω διάλυμα τα σφαιρίδια συνδυάστηκαν με κυτταρικά εκχυλίσματα 293 παροδικά διαμολυσμένα ή μολυσμένα (infected) με την εκάστοτε πρωτεΐνη και επώαστηκαν περαιτέρω για 4 h στους 4°C υπό ανάδευση. Τα

σφαιρίδια πλύθηκαν πέντε φορές με διάλυμα λύσης πριν από την έκλουση των δεσμευμένων πρωτεϊνών με διάλυμα SDS. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση 10%-12% SDS-PAGE και ανάλυση κατά Western blot.

2.8.3 Δοκιμασία, *in vivo*, ανοσοκατακρήμνιση

HEK 293 κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα κατάλληλα cDNA, ανάλογα με την εκάστοτε δοκιμασία, με το αντιδραστήριο FuGENE 6 (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Με την πάροδο 36 ωρών, (σε περιπτώσεις όπου απαιτούνταν ενεργοποίηση με Ακτιβίνη Α (50ng/ml) ή TGFβ (2,5ng/ml), τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες έλλειψης ορού (καθόλου παροχή ορού στο θρεπτικό μέσο) για 3 ώρες και ακολούθησε επαγωγή τους για 45 λεπτά, τα κύτταρα αφού εκπλύθηκαν με κρύο (4°C) ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), λύθηκαν με διάλυμα λύσης που περιείχε: 50mM Tris, pH 7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Triton X-100 και αναστολείς φωσφατασών 25mM NaF (sodium fluoride), 2mM Na₃VO₄ (sodium orthovanadate), 25mM β-glycerophosphate, 50nM οκαδαϊκό οξύ (okadaic acid), μίγμα αναστολέων πρωτεασών (Roche Applied Science, Indianapolis, USA) και φυγοκεντρήθηκαν στις 13,000rpm, για 5 λεπτά, στους 4°C. Από τα υπερκείμενα, 5μl χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης των δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford ενώ ο υπόλοιπος όγκος επώαστηκε με σφαιρίδια σεφαρόζης-πρωτεΐνης A ή G (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) (ανάλογα με τη συγγένεια του ισotyπου του αντισώματος) στους 4°C για 1 ώρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 10.000g και συλλέχθηκε το υπερκείμενο (το ίζημα περιείχε τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A/G, και μόρια ή σύμπλοκα μορίων των κυττάρων που δέθηκαν μη ειδικά μαζί τους). Από τα “καθαρά” υπερκείμενα των δειγμάτων κρατήθηκαν 30μg ώστε να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών των οποίων μελετάται η ενδεχόμενη ανοσοκατακρήμνιση (co-immunoprecipitation assay) ενώ το υπόλοιπο διαχωρίστηκε σε δύο δείγματα που περιείχαν ίσα ποσά (μg) πρωτεΐνης και επώαστηκαν (σε αναλογία: 1μg αντισώματος/IgG ανά 300μg πρωτεΐνης) το ένα με το αντίσωμα και το δεύτερο με την αντίστοιχη ανοσοσφαιρίνη (ως δείγμα αρνητικός μάρτυρας, προκειμένου να αποκλείσουμε μή ειδική ανοσοκατακρήμνιση του αντιγόνου) στους 4°C για 5 ώρες ή ολονύχτια ανάλογα με την ισχύ της συγγένειας αντιγόνου-αντισώματος, προκειμένου να σχηματιστεί το σύμπλεγμα αντιγόνου-ειδικού αντισώματος.

Κατόπιν, στο παραπάνω μίγμα αντιγόνου-αντισώματος προστέθηκαν τα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A/G και ακολούθησε επώαση για 2 περαιτέρω ώρες. Ακολούθησε έκπλυση των σφαιριδίων, 5 φορές με όγκο 1ml από το διάλυμα λύσης. Οι προσδεμένες στα σφαιρίδια πρωτεΐνες εκλούστηκαν με τη χρήση διαλύματος Laemmli. Οι συνανοσοκατακρημνιζόμενες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE και ανιχνεύτηκαν με ανάλυση κατά Western χρησιμοποιώντας σε κάθε πείραμα το αντίστοιχο αντίσωμα.

2.9 Δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς

Κύτταρα HEK 293 τοποθετήθηκαν σε 24-θέσεων φρεάτιο περί τον αριθμό (150,000 κύτταρα/φρεάτιο). Η διαμόλυνση πραγματοποιήθηκε την επόμενη μέρα χρησιμοποιώντας FuGENE 6 σε πλήρες θρεπτικό μέσο, ενώ 20 h αργότερα τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό μέσο με 0.2% FBS για 8 h. Μετέπειτα, στα κύτταρα προστέθηκε 50 ng/ml Ακτιβίνη Α και επώαστηκαν για περαιτέρω 16 h. Ακολούθησε η διαδικασία της λουσιφεράσης όπως περιγράφεται από την εταιρία Promega E4030 luciferase kit (Promega Corporation, Madison, USA), και μετρήθηκε η ενεργότητα της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal) χρησιμοποιώντας κλασικές τεχνικές. Η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης έγινε με το εμπορικό προϊόν της Promega Luciferase Assay System σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή σε λουμινόμετρο Berthold (junior EG G, Berthold). Η πρωτεΐνη λουσιφεράση κωδικοποιείται από το γονίδιο Luc. Η λουσιφεράση αποτελεί το συνηθέστερο χρησιμοποιούμενο ένζυμο για εφαρμογές που βασίζονται στην ανίχνευση χημειοφωταύγειας. Για τη δράση του ενζύμου δε χρειάζεται καμία μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Υπάρχουν διάφορων ειδών ένζυμα λουσιφεράσης ανάλογα με τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται. Η πλέον χρησιμοποιούμενη λουσιφεράση προέρχεται από την πυγολαμπίδα *Photinus Pyralid*. Η κανονικοποίηση της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τις τιμές β-gal. Για τη δοκιμασία αυτή τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρία ανεξάρτητα φρεάτια για κάθε μεμονωμένη περίπτωση και το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές. Ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση υπολογίστηκαν από τρία φρεάτια χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα της Microsoft, Excel 2003.

2.10 Τεχνική επίπλευσης σε ασυνεχή βαθμίδωση σουκρόζης

Ιστός προερχόμενος από ανθρώπινο πλακούντα ομογενοποιήθηκε σε διάλυμα 250mM σουκρόζης, 0.5mM EDTA, 3mM ιμιδαζόλιο σε pH 7.4. Μετέπειτα, το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε σε 10,000g για 30 λεπτά και το ίζημα αποβλήθηκε. Το υπερκείμενο φυγοκεντρήθηκε στα 100,000g για 1h στην κεφαλή 90Ti σε φυγόκεντρο Beckman Coulter στους 4°C. Το νέο υπερκείμενο αποβλήθηκε και το ίζημα τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 λεπτά και επαναδιαλύθηκε σε 0.5ml διαλύματος ομογενοποίησης που περιείχε αναστολείς πρωτεασών. Η ομογενοποίησή των μεμβρανών επιτεύχθηκε με πέρασμά τους δέκα φορές μέσω σύριγγας 25G 5/8 1ml ενώ ακολούθησε φυγοκέντρωση για 30 λεπτά στις 5,000g στους 4°C και συλλογή του υπερκείμενου. Το υπερκείμενο προσαρμόστηκε σε 40.6% σουκρόζη χρησιμοποιώντας αρχικό διάλυμα (62% σουκρόζης, 3mM ιμιδαζόλιο σε pH 7.4) (τελικός όγκος 1.2ml) και τοποθετήθηκε στο κάτω μέρος του σωλήνα φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε στοιβάδα σουκρόζης αποτελούμενη από τρεις στοιβάδες τοποθετήθηκε σε διάλυμα διαβαθμισμένης πυκνότητας σουκρόζης (1.5ml of 35% sucrose, 3mM imidazole at pH 7.4, 1.5ml of 25% sucrose, 3mM imidazole σε pH 7.4, 0.9ml διάλυμα ομογενοποίησης) και φυγοκεντρήθηκε 100,000g για 4 ώρες χρησιμοποιώντας την κεφαλή MLS-50. Μετά από τη φυγοκέντρωση συλλέχθηκαν 10 κλάσματα των 0.3ml από την κορυφή ως το κατώτατο σημείο του σωλήνα ενώ ένα μέρος από το καθένα ηλεκτροφορήθηκε σε SDS-PAGE και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.11 Πειράματα ανταγωνισμού

Το βακτηριακό στέλεχος της *E.Coli*, BL21, χρησιμοποιήθηκε για να εκφραστεί η συντηγμένη με την GST E3C πρωτεΐνη. Κύτταρα HEK 293 μολύνθηκαν για 24 h με τον αδενοϊό FLAG-SARAΔ1-664. Επιπλέον, κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν παροδικά με την κατασκευή myc-SMAD2ca ή την κατασκευή myc-SMAD3ca για 36 h χρησιμοποιώντας το λιπίδιο διαμόλυνσης FuGENE 6 (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Για τη λύση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα λύσης (50mM Tris-HCl, pH 8, 150mM NaCl, 0.1% NP-40) το οποίο περιείχε μίγμα αναστολέων των πρωτεασών (Roche Applied Science, Indianapolis, USA). Εν συντομία, η χημεικκή πρωτεΐνη E3C-GST ή η GST πρωτεΐνη (5-10 μg, ισομοριακά ποσά) επώαστηκαν με 20 μl

σφαιριδίων γλουταθειόνης-αγαρόζης (Amersham Biosciences, NJ, USA), για 120min στους 4°C σε διάλυμα 50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% NP-40. Ύστερα από τρία διαδοχικά πλυσίματα με το παραπάνω διάλυμα, τα σφαιρίδια συνδυάστηκαν με κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων HEK 293 που ήταν προσωρινά διαμολυσμένα με myc-SMAD2ca ή myc-SMAD3ca ενώ ακολούθησε περαιτέρω επώαση για 4h στους 4°C με συνεχή περιστροφή. Τέλος, πριν από την προσθήκη κυτταρικών εκχυλισμάτων μολυσμένων με τον αδενοϊό FLAG-SARAΔ1-664, τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν μια φορά με το παραπάνω διάλυμα, και επώαστηκαν περαιτέρω κατά τη διάρκεια της νύχτας στους 4°C. Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες υπεβλήθησαν σε 12% SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και αναλύθηκαν με Western blot. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman GmbH Dassel, Germany) και ανοσοαποτύπωση.

2.12 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων

Χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη BL21 και DH10β της *E. coli*, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υγρό ή στερεό θρεπτικό μέσο LB παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού. Η ανάπτυξη τους πραγματοποιήθηκε στους 37°C, σε επωαστικούς θαλάμους. Για τις υγρές καλλιέργειες, η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση (200rpm) σε αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες μιας χρήσης των 15 mL ή σε υάλινες κωνικές φιάλες των 2L (καλλιέργειες σε μεγάλη κλίμακα). Για όλες τις καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε επώαση για χρόνο 16 h. Τα μετασχηματισμένα και μη μετασχηματισμένα βακτήρια διατηρούνται στους -80°C στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο παρουσία 20% γλυκερόλης.

2.13 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Κυτταρικά εκχυλίσματα ελήφθησαν με διάλυμα φωσφορικών pH 7,0 (PBS) που περιείχε 0,1% SDS, 100μM PMSF. Εν συνεχεία τα δείγματα βράστηκαν για 10 λεπτά αφού προηγήθηκε κατεργασία με υπερήχους, (Branson Digital Sonifier^R 250-D, USA) 10 δευτερόλεπτα-τρεις φορές. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.200g για 20 λεπτά και συλλογή του υπερκείμενου. Κυτταρικά εκχυλίσματα ή πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμίδιου 8%-13% και μεταφερθήκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Scheicher and Schuell, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο εγχειρίδιο μεθόδων μοριακής βιολογίας Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Για τον

έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης χρωματίστηκε με Ponceau S (0,1% σε οξικό οξύ 1%) για ένα λεπτό και ξεβάφτηκε με νερό. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western (1M Tris pH 7,2, 0,1% Tween 20, και 150mM NaCl) είτε σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα είτε στους 4°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας, υπό ανακίνηση, για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα αντίστοιχα αντισώματα για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε 5% άπαχο γάλα σκόνης σε διάλυμα Western. Στη συνέχεια ακολούθησαν τρεις σύντομες πλύσεις (10 λεπτά) σε διάλυμα Western. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα συζευγμένα με την ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις όπως αναφέρεται παραπάνω. Η εμφάνιση του σήματος έγινε με το αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham.

2.14 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από *E.coli* σε μικρή και μεσαία κλίμακα

Μετά το μετασχηματισμό των επιλεκτικών βακτηριακών κυττάρων με τους ανασυνδυασμένους φορείς, 5-10 αποικίες από την επιφάνεια των τρυβλίων επιλογής ενοφθαλμίστηκαν, κάθε μια ξεχωριστά, σε 5ml L.B το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 100μg/μl. Ακολούθησε ολονύχτια επώαση υπό ανάδευση στους 37°C. Την επόμενη μέρα 1.5ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε σωληνάριο και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.500g για 5 λεπτά, σε φυγόκεντρο erppendorf, centrifuge 5415D). Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100μl διαλύματος P₁ (P₁: 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM EDTA, 100 μg/μl Rnase A) και στο εναιώρημα προστέθηκαν διαδοχικά τα διαλύματα P₂ (P₂: 200mM NaOH, 1% SDS) και P₃ (P₃: 3 M οξικό κάλιο, pH 5.5). Μετά από ήπια ανάδευση τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (13.500 g, για 5 λεπτά). Το ίζημα, που αποτελείται από το χρωμοσωμικό DNA και τα κυτταρικά υπολείμματα, απομακρύνθηκε. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωληνάριο. Το πλασμιδιακό DNA καταβυθίστηκε με την προσθήκη στο υπερκείμενο, 1 ml παγωμένης αιθανόλης (-20°C) και ακολούθησε φυγοκέντρωση (13.500g για 10 λεπτά, φυγόκεντρο erppendorf, centrifuge 5415D). Ακολούθησε πλύση του DNA με 500μl 70% v/v αιθανόλης, φυγοκέντρωση (13.500g, για 10 λεπτά) και επαναιώρηση του ιζήματος σε 50μl ddH₂O. Για

την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μεσαία κλίμακα έγινε χρήση του πακέτου υλικών (midi-preparation, QIAGEN^R Plasmid Purification kit). Χρησιμοποιήθηκε 1 ml από την θετική καλλιέργεια μικρής κλίμακας. Το απομονωμένο DNA επαναδιαλύθηκε σε 150 μl ddH₂O. Η καθαρότητα και η συγκέντρωσή του υπολογίσθηκαν φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίσθηκε με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα ($OD_{260} = 1$) αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA/ml διαλύματος. Η καθαρότητα του διαλύματος του DNA προσδιορίστηκε με βάση το λόγο OD_{260}/OD_{280} και θεωρήθηκε καθαρό για $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$.

2.15 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Στις περιπτώσεις όπου τα κυτταρικά εκχυλίσματα περιείχαν SDS, TritonX-100 ή και CHAPS χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος με το βικινχρωμικό οξύ BCA (Bicinchromic acid, BCA) σύμφωνα με το εμπορικό αντιδραστήριο BCA Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce [157]. Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin, BSA), 2μg/ml, ενώ προστέθηκε ποσότητα διαλύματος λύσης με απορρυπαντικό ίση με την ποσότητα των δειγμάτων προς μέτρηση. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά ενώ η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562 nm. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford της εταιρίας Biorad που βασίζεται στην παρατήρηση ότι κατά τη σύνδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες σε όξινο pH, το διάλυμά της παρουσιάζει μετατόπιση του μέγιστου της απορρόφησής του από τα 465 nm στα 595 nm [158]. Η πρότυπη καμπύλη έγινε όπως αναφέρεται πιο πάνω, ενώ τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά πριν την μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.

2.16 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με το τεστ Mann-Whitney μη-παραμετρικά και έπειτα από τη δοκιμασία t-τέστ (two-sided test), χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences 10.0, statistical software SPSS, Inc., Chicago, IL). Τα κριτήρια σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκαν είναι της τάξεως $P < 0,05$.

2.17 Ανάλυση πρωτεϊνικών αλληλουχιών

Για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε ο δικτυακός φορέας PredictProtein [159]. Η πρόβλεψη για πρωτεϊνικές περιοχές χωρίς οργανωμένη δομή πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα δικτυακά προγράμματα PONDR-VXLT [160] [161], RONN [162], DisEMBL [163], IUPred [164] και DISOPRED2 [165]. Η πρόβλεψη που παρέχουν τα παραπάνω προγράμματα βασίζεται σε ανάλυση της πρωτοταγούς αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών.

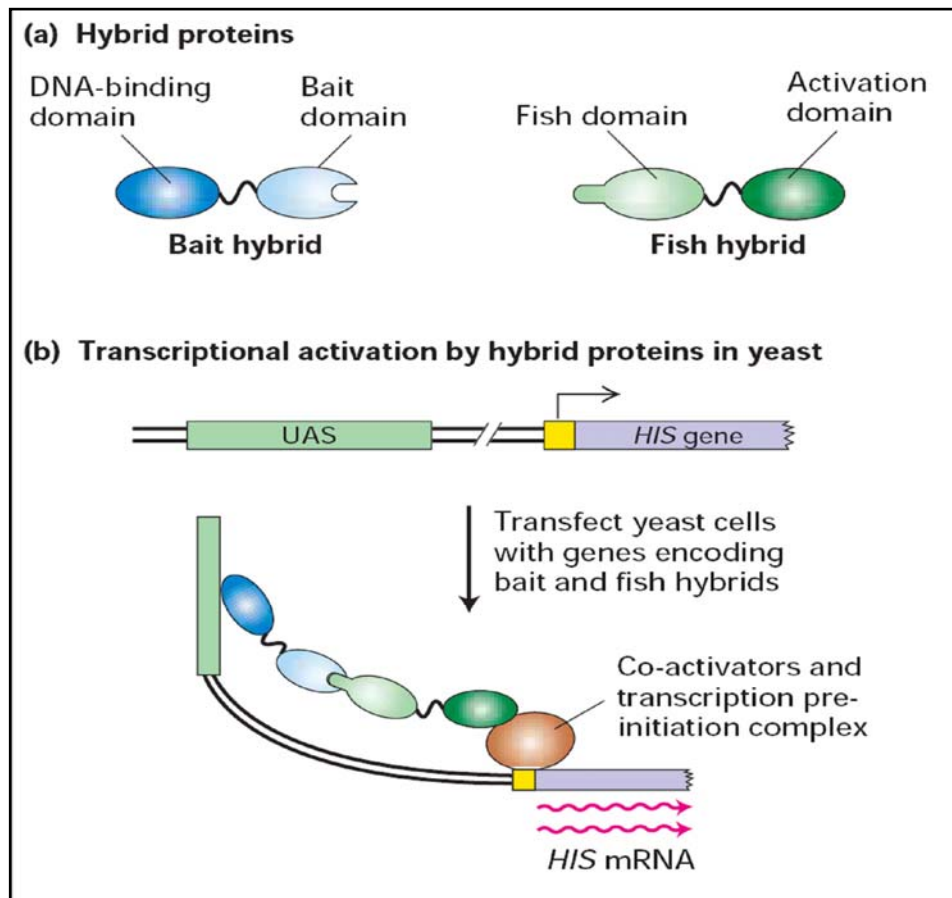
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Η SARA αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ERBIN: Ταυτοποίηση με το σύστημα των δύο υβριδίων

Προκειμένου να ταυτοποιήσουμε πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA χρησιμοποιήσαμε την τεχνική του συστήματος των δύο υβριδίων. Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη δυνατότητα λειτουργικής αναπλήρωσης (functional complementation) μεταξύ δυο διακριτών πρωτεϊνικών περιοχών με την προϋπόθεση ότι οι περιοχές αυτές θα έρθουν σε άμεση ή ακόμη και έμμεση αλληλεπίδραση στον πυρήνα κυττάρων ζύμης. Η αναπλήρωση της λειτουργίας μετριέται μέσω της ενεργοποίησης ενός ευχερώς μετρήσιμου γονιδίου αναφοράς (reporter gene). Στο σύστημα των δύο υβριδίων η πρωτεΐνη, της οποίας θέλουμε να μελετήσουμε τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις (δόλωμα-bait protein), κλωνοποιείται σε φορέα ζύμης, συντηγμένη με την περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain) ενός ενεργοποιητή της μεταγραφής διαμέσου μιας ευέλικτης συνδετικής περιοχής (linker region). Η υβριδική αυτή πρωτεΐνη αποκαλείται υβρίδιο-δόλωμα (bait-hybrid) (σχήμα 3.1). Από την άλλη πλευρά, τα cDNA μιας βιβλιοθήκης κλωνοποιούνται σε ένα δεύτερο φορέα ζύμης. Ο φορέας αυτός εκφράζει τις πρωτεΐνες, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα cDNA της βιβλιοθήκης (θηράματα-preys), συντηγμένες με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του ίδιου με το δόλωμα ενεργοποιητή, διαμέσου μιας συνδετικής περιοχής (αλιευτικό υβρίδιο-fish hybrid). Στη συνέχεια, το υβρίδιο-δόλωμα και τα αλιευτικά υβρίδια μετασχηματίζονται σε γενετικά τροποποιημένα κύτταρα ζύμης, στα οποία το μόνο αντίγραφο ενός γονιδίου που απαιτείται για τη σύνθεση της ιστιδίνης υπόκειται στον έλεγχο ενός UAS (Upstream Activating Sequence-Ανοδική Ενεργοποιητική Αλληλουχία) με θέσεις δέσμησης για την περιοχή πρόσδεσης στο DNA του υβριδίου-δολώματος. Έτσι, η ενεργοποίηση του γονιδίου της ιστιδίνης πραγματοποιείται μόνο στα μετασχηματισμένα κύτταρα όπου η πρωτεΐνη-δόλωμα αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-θήραμα του αλιευτικού υβριδίου (σχήμα 3.1).

Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων γίνεται με την επιλογή δύο σταδίων. Το υβρίδιο-δόλωμα, εκτός από την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει εκφράζει επίσης το γονίδιο που κωδικοποιεί για το αμινοξύ θρυπτοφάνη (TRP), ενώ το αλιευτικό υβρίδιο εκφράζει το γονίδιο που κωδικοποιεί για το αμινοξύ λευκίνη (LEU). Τα

μετασηματισμένα κύτταρα αναπτύσσονται αρχικά σε θρεπτικό υλικό το οποίο δεν περιέχει θρυπτοφάνη και λευκίνη, αλλά ωστόσο περιέχει ιστιδίνη. Στο θρεπτικό μέσο επιβιώνουν μόνο τα κύτταρα που έχουν το υβρίδιο-δόλωμα καθώς και ένα από τα τα αλιευτικά υβρίδια. Στη συνέχεια τα κύτταρα που έχουν επιβιώσει επιστρώνονται σε τρυβλία που δεν περιέχουν ιστιδίνη. Τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται μια πρωτεΐνη-θήραμα που δεν αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη-δόλωμα δεν παράγουν ιστιδίνη και επομένως δε σχηματίζουν αποικία σε αυτό το θρεπτικό υλικό. Αντιθέτως, τα κύτταρα στα οποία πραγματοποιείται η αλληλεπίδραση αναπτύσσονται και σχηματίζουν αποικίες στο θρεπτικό μέσο χωρίς ιστιδίνη. Το τελευταίο βήμα είναι η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης-θηράματος του φορέα "θηράματος" μετά από απομόνωση του πλασμιδίου, το οποίο διαμόλυνε τα επιβιώσαντα κύτταρα και αλληλούχιση του cDNA-ενθέματός του.



Σχήμα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της αρχής του συστήματος των δύο υβριδίων. (Ανατύπωση από: Harvey Lodish et al., Molecular Cell Biology, Fifth Edition edition, New York: W.H. Freeman and Company, August 22, 2003).

Στην παρούσα μελέτη, η σάρωση με το σύστημα των δύο υβριδίων πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Hybrigenics, S.A. (Paris, Γαλλία) όπως περιγράφεται στον δικτυακό τόπο <http://pim.hybrigenics.com/pimriderext/tgf-beta/methods.html>. Η αξιοπιστία των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων κατηγοριοποιήθηκε από την ίδια εταιρεία σύμφωνα με ένα προβλεπόμενο βιολογικό στατιστικό σκορ το οποίο ονομάζεται PBS (Predictive Biological Score, PBS). Το PBS στηρίζεται στα πειραματικά δεδομένα και λαμβάνει υπόψη ξεχωριστά κάθε αλληλεπίδραση [156]. Ειδικότερα, η τιμή PBS ποσοτικοποιεί την αξιοπιστία κάθε αλληλεπίδρασης ενώ βασίζεται σε ένα στατιστικό μοντέλο που λαμβάνει υπόψη τον ανταγωνισμό για τη δέσμευση στην πρωτεΐνη-δόλωμα (bait) ανάμεσα στα διάφορα τμήματα των πρωτεϊνών θηραμάτων (preys) και διακυμαίνεται από την τιμή 0 (ειδική αλληλεπίδραση) μέχρι και 1 (πιθανό τεχνικό λάθος). Για πρακτικούς λόγους, οι τιμές αυτές διαιρέθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες, από το A (τιμή πλησιέστερα στο 0) ως το D (πλησιέστερα του 1) (πίνακας 3.1).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως υβρίδιο-δόλωμα η καρβοξυτελική περιοχή της πρωτεΐνης SARA (664-1323aa) η οποία συντήχθηκε με την περιοχή σύνδεσης στο DNA του μεταγραφικού παράγοντα LexA (LexA-BD). Από την άλλη πλευρά, ως αλιευτικά υβρίδια χρησιμοποιήθηκαν πρωτεΐνες-θηράματα, προερχόμενες από βιβλιοθήκη ανθρώπινου πλακούντα, συντηγμένες με την περιοχή ενεργοποίησης της μεταγραφής του ιδίου μεταγραφικού παράγοντα (LexA-AD) (σχήμα 3.1). Με το σύστημα LexA των δύο υβριδίων ταυτοποιήθηκαν 32 πρωτεΐνες, οι οποίες δυνητικά αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA (πίνακας 3.1).

Με βάση τα αποτελέσματα (πίνακας 3.1), η σάρωση των δύο υβριδίων κρίνεται ως επιτυχημένη, καθώς, μεταξύ άλλων πρωτεϊνών, βρέθηκαν και τρεις πρωτεΐνες που είναι γνωστό, από προηγούμενες μελέτες, ότι αλληλεπιδρούν με τη SARA. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι οι R-SMADs (SMAD2 και SMAD3) [51] καθώς και η πρωτεϊνική φωσφατάση PP1 [51, 81].

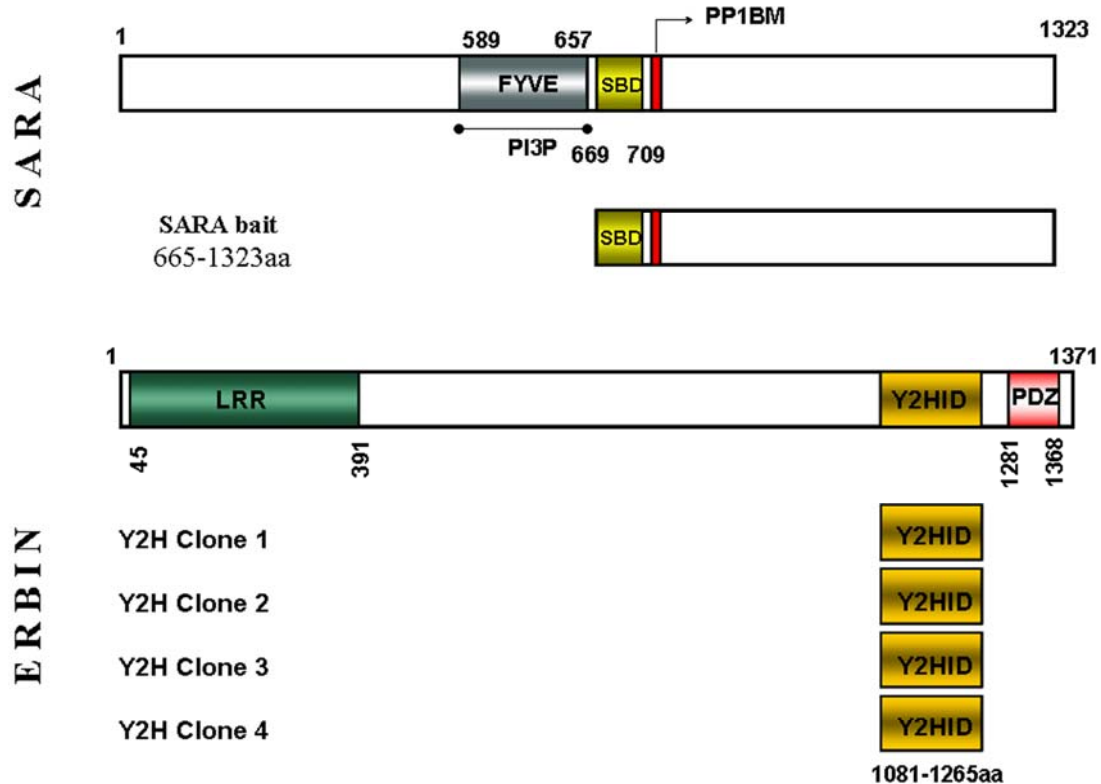
Πίνακας 3.1: Οι πρωτεΐνες που ανιχνεύθηκαν με βάση το σύστημα των δύο υβριδίων σε κύτταρα ζύμης και είναι υποψήφιες για αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη SARA (LexA σύστημα).



Αριθμός	Όνομα πρωτεΐνης	Τιμή PBS	Αριθμός	Όνομα πρωτεΐνης	Τιμή PBS
1	PPP1CA	A	17	BMP4	D
2	PPP1CB	A	18	DKFZP566I1024	D
3	PPP1CC	A	19	FHL2	D
4	ETS2	A	20	FLJ22369	D
5	FLJ20037	A	21	IMAGE 3882729	D
6	IMAGE 3510047	A	22	IMAGE 5269682	D
7	RNF11	A	23	JUP	D
8	SMAD2	A	24	MIRO-2	D
9	ERBIN	A	25	NIT1	D
10	DAZAP2	A	26	PP2R1A	D
11	β-catenin	B	27	RBQ-1	D
12	FLJ90754	B	28	RNPEP	D
13	NUP155	B	29	SUPT5H	D
14	PRKCBP1	C	30	TAHCCP1	D
15	SMAD3	C	31	ZNF36	D
16	BAT30	D	32	EIF4G1	D

Με το σύστημα των δύο υβριδίων, μεταξύ άλλων, ταυτοποιήθηκαν τέσσερις πανομοιότυποι κλώνοι που αντιστοιχούν σε 185 αμινοξέα της πρωτεΐνης ERBIN (ERBB2-Interacting Protein) (σχήμα 3.2). Η περιοχή αυτή αρχίζει από το αμινοξύ σερίνη στη θέση

1081aa και εκτείνεται μέχρι και το αμινοξύ γλουταμίνη στη θέση 1265aa. Την περιοχή αυτήν την ονομάζουμε από τώρα και για τη συνέχεια αυτής της εργασίας ως περιοχή αλληλεπίδρασης με βάση το σύστημα των δύο υβριδίων Y2HID (Yeast 2-Hybrid Interaction Domain, Y2HID). Η πρωτεΐνη ERBIN πρωτοπροσδιορίστηκε σε σάρωση δύο υβριδίων βιβλιοθήκης cDNA προερχόμενης από νεφρό του γονιδιώματος του επίμυο χρησιμοποιώντας τα τελευταία εννέα αμινοξέα του υποδοχέα ERBB2, ως θήραμα, συντηγμένα με τον GAL4 τομέα σύνδεσης στο DNA [116]. Ο ERBB2 υποδοχέας ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGF (Epidermal Growth Factor, EGF) και εντοπίζεται στη βασοπλευρική μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων [166].



Σχήμα 3.2: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών *SARA* και *ERBIN*. Η περιοχή της *SARA* που χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα στο σύστημα των δύο υβριδίων απεικονίζεται στο σχήμα ως *SARA bait* (665-1323aa). Επιπλέον, η περιοχή της πρωτεΐνης *ERBIN* που αλιεύτηκε ως θήραμα με την ίδια τεχνική απεικονίζεται ως Y2HID (Yeast 2 Hybrid Interacting Domain, Y2HID, 1081-1265aa).

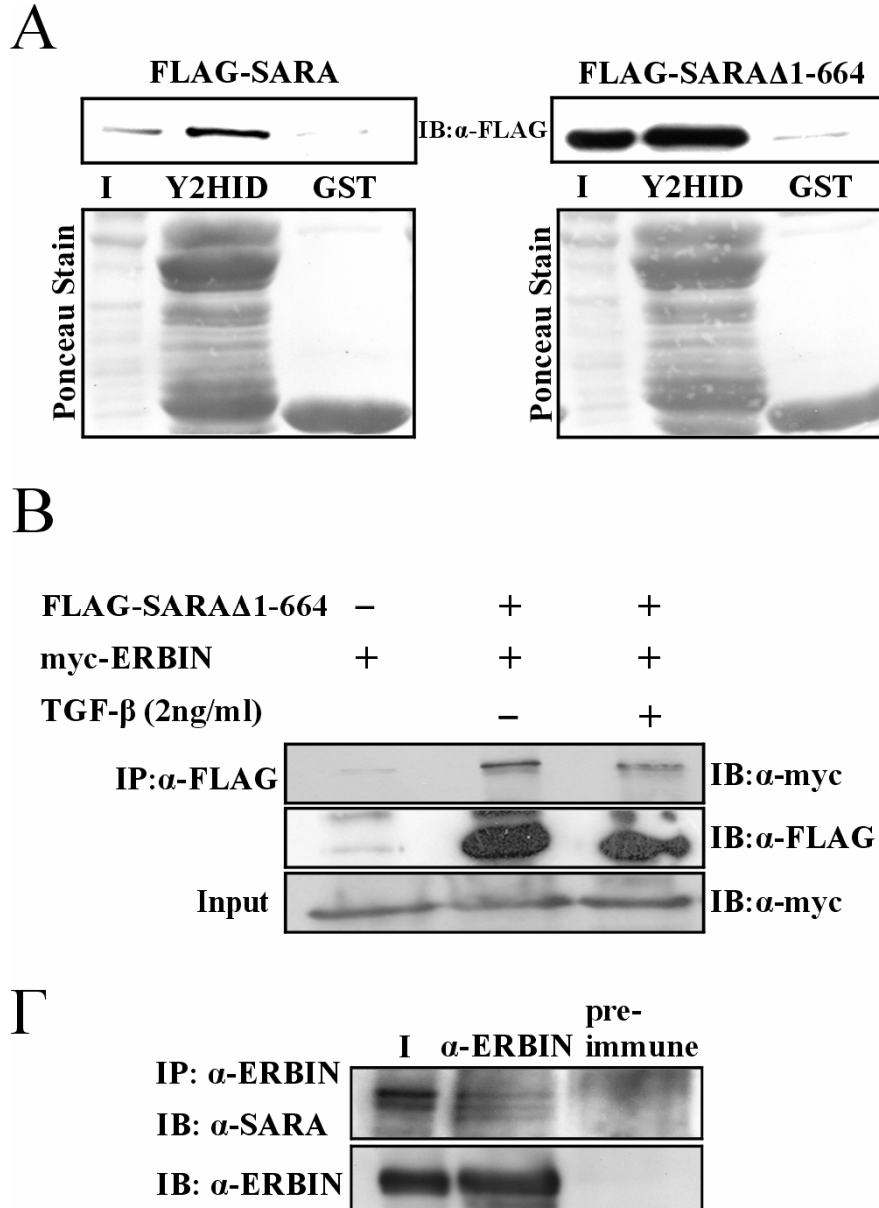
3.2 Η SARA αλληλεπιδρά με την ERBIN: Επιβεβαίωση με βιοχημικές τεχνικές

Για την επιβεβαίωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ των πρωτεϊνών SARA και ERBIN, η οποία ανιχνεύτηκε με το σύστημα των δύο υβριδίων, χρησιμοποιήθηκαν βιοχημικές τεχνικές. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία καταβύθισης (GST Pull Down assay). Ειδικότερα, η περιοχή Y2HID της πρωτεΐνης ERBIN συντήχθηκε με το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης (Glutathione S-Transferase, GST). Η χμιαϊκή πρωτεΐνη GST-Y2HID που δημιουργήθηκε υπερεκφράστηκε στο βακτηριακό στέλεχος BL21 και ο καθαρισμός της έγινε με σφαιρίδια γλουταθειόνης-σεφαρόζης (Glutathione Sepharose GST beads). Συνοπτικά, η βακτηριακά καθαρισμένη πρωτεΐνη GST-Y2HID επώαστηκε με τα σφαιρίδια της γλουταθειόνης-σεφαρόζης. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια αυτά επώαστηκαν με λύμα HEK 293 κυττάρων τα οποία είχαν μολυνθεί με τον αδενοϊό που εκφράζει την πρωτεΐνη FLAG-SARA (σχήμα 3.3, αριστερά) ή την πρωτεΐνη FLAG-SARAΔ1-667 (σχήμα 3.3, δεξιά). Τα σφαιρίδια, αφού συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, εκπλύθηκαν και ηλεκτροφορήθηκαν. Η FLAG-SARA και η FLAG-SARAΔ1-664 ανιχνεύτηκαν με αντίσωμα έναντι του FLAG επιτόπου (DYKDDDDK). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η GST πρωτεΐνη.

Πράγματι, η κατασκευή GST-Y2HID αλληλεπιδρά τόσο με τη SARA όσο και με τη SARAΔ1-667 και όχι με την πρωτεΐνη μάρτυρα GST (σχήμα 3.3A). Παρομοίως, η κατασκευή myc-ERBIN, σε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, συγκατακρημνίζεται με την κατασκευή FLAG-SARAΔ1-667, σε λύματα κυττάρων HEK 293, τόσο παρουσία όσο και απουσία επαγωγής από τον TGFβ1 (σχήμα 3.3B). Επιπρόσθετα, δημιουργήσαμε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ERBIN με το οποίο ήταν δυνατή η ανοσοκατακρήμνιση της ενδογενούς πρωτεΐνης ERBIN με την ενδογενή SARA (σχήμα 3.3Γ).

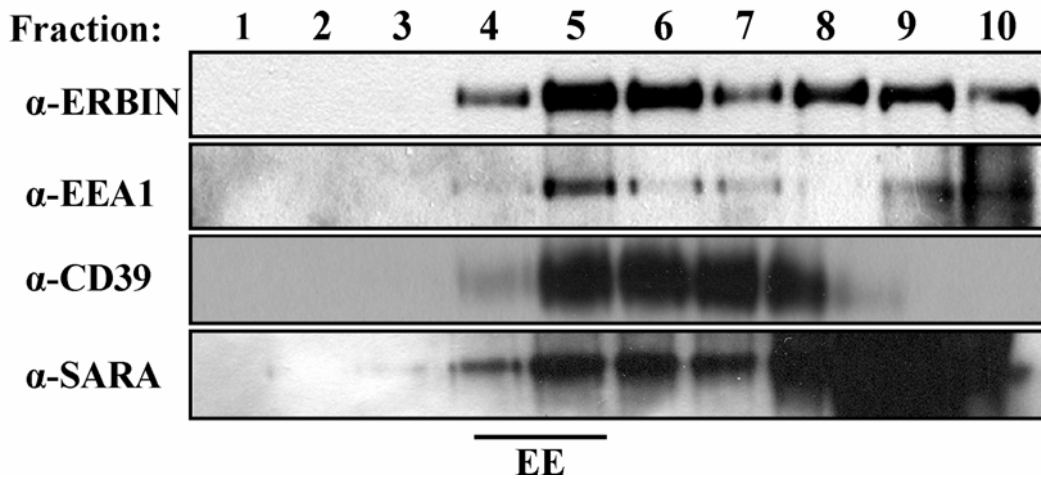
Ήταν ήδη γνωστό από προηγούμενες μελέτες ότι η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά ισχυρά με το μεμβρανικό λιπίδιο PI(3)P, μέσω του τομέα FYVE (Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1, and EEA1). Εξαιτίας του προαναφερόμενου χαρακτηριστικού η πρωτεΐνη SARA εντοπίζεται κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, στα πρώιμα ενδοσώματα [93]. Σε συμφωνία με την παρατηρούμενη αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών SARA και ERBIN, όταν κυτταρικές μεμβράνες από ανθρώπινο πλακούντα επιπλέουν σε βαθμίδωση σουκρόζης, η ERBIN είναι παρούσα εκτός από τη μεμβράνη και στα ίδια κλάσματα με τη SARA και την

EEA1, έναν γνωστό μάρτυρα του πρώιμου ενδοσώματος (σχήμα 3.4). Συμπερασματικά, η ERBIN είναι μια πρωτεΐνη η οποία για πρώτη φορά βρέθηκε να αλληλεπιδρά με τη SARA, πιθανότατα τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στο πρώιμο ενδόσωμα.



Σχήμα 3.3: Οι πρωτεΐνες SARA και ERBIN αλληλεπιδρούν *in vitro*. (A) Λύματα από κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν είτε FLAG-SARA είτε FLAG-SARAΔ1-664 επωάστηκαν με τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-Y2HID ή μόνο με τη GST πρωτεΐνη. Τα σύμπλοκα που σχηματίστηκαν αφού εκπλύθηκαν, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση (IB) με αντίσωμα α-FLAG. Στο κάτω μέρος του σχήματος εμφανίζεται η χρώση των GST πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο Ponceau S, practical grade. Το σύμβολο I (input) αντιπροσωπεύει το 10% του συνολικού κυτταρικού εκχυλίσματος. (B) Οι υπερεκφρασμένες πρωτεΐνες SARA και ERBIN αλληλεπιδρούν με

την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης. Κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν προσωρινά με την *myc-ERBIN* ενώ επιμολύνθηκαν με τη χημική πρωτεΐνη *FLAG-SARA*. Πραγματοποιήθηκαν ανοσοκατακρήμνισεις με α -FLAG αντίσωμα και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α -*myc*. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανοσοκατακρήμνιση της πρωτεΐνης *FLAG-SARA* οι μεμβράνες επώαστηκαν εκ νέου με αντίσωμα έναντι του *FLAG* επιτόπου (α -FLAG). (Γ) Οι ενδογενείς πρωτεΐνες *SARA* και *ERBIN* αλληλεπιδρούν. Κυτταρικά εκχυλίσματα HEK 293 επώαστηκαν με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης *ERBIN*, α -*ERBIN*, ή με αντίσωμα μάρτυρα *IgG*. Τα σύμπλοκα που δημιουργήθηκαν αφού εκπλύθηκαν αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης *SARA*, α -*SARA*. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ανοσοκαταβύθιση της *ERBIN*, οι μεμβράνες νιτροκυτταρίνης επώαστηκαν εκ νέου με αντίσωμα έναντι της *ERBIN*.



Σχήμα 3.4: Επίπλευση σε βαθμίδωση σουκρόζης. Ομογενοποίηση από πλακούντα διαχωρίστηκε χρησιμοποιώντας επίπλευση σε βαθμίδωση σουκρόζης. Έπειτα ακολούθησε ανάλυση κατά western blot (βλ. υλικά και μέθοδοι). Οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα α -ERBIN, α -SARA, α -CD39 και α -EEA1. Η ένδειξη EE αντιστοιχεί στα κλάσματα πλούσια σε πρώιμα ενδοσώματα. Τα κλάσματα ταξινομήθηκαν από το 1 ως και το 10. Το κλάσμα νούμερο 10 αντιστοιχεί στον πυθμένα του δοκιμαστικού σωλήνα.

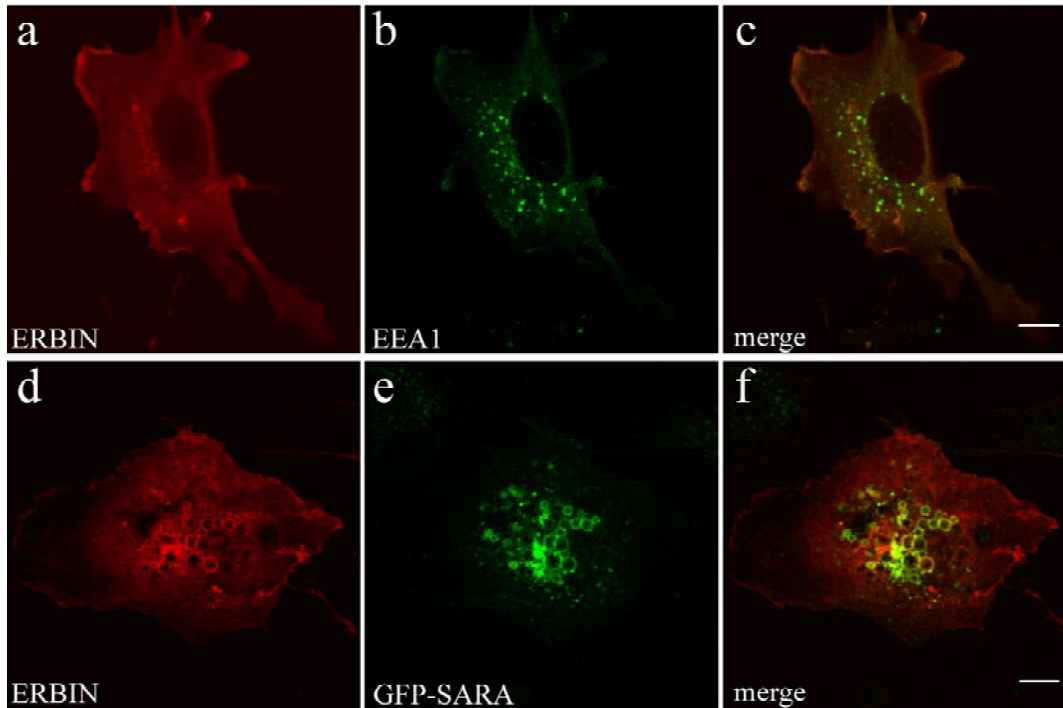
3.3 Η πρωτεΐνη SARA στρατολογεί την πρωτεΐνη ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα

Ανατρέχοντας κανείς στη βιβλιογραφία θα διαπιστώσει ότι όσον αφορά τον κυτταρικό εντοπισμό της ERBIN στο πρώιμο ενδοσώμα δεν έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες. Βέβαια, εκτός από την εντόπιση της στην πλασματική μεμβράνη η κυτταρική εντόπιση της πρωτεΐνης ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα δεν έχει δειχθεί με λεπτομερή ανάλυση, αφού στη βιβλιογραφία υπάρχουν κυρίως μεμονωμένες παρατηρήσεις και διατυπώσεις.

Ειδικότερα με την τεχνική της ανοσοιστοχημείας και σε βασικό κυτταρικό καρκίνωμα (basal cell carcinoma) έχουν παρατηρηθεί μεμονωμένα θετικά στην ERBIN κυτταροπλασματικά κυστίδια, ενώ έχει διατυπωθεί η πρόταση ότι πρόκειται για κυστίδια προϊόν ενδοκυττάρωσης [147]. Επιπρόσθετα, στικτή χρώση για την ERBIN έχει παρατηρηθεί και με ανοσοφθορισμό σε εγγύς δενδριτικά κύτταρα [142].

Καθώς λοιπόν δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές για τον εντοπισμό της στο πρώιμο ενδόσωμα θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε περαιτέρω την κυτταρική εντόπιση της ERBIN σε εμβρυονικά κύτταρα επίμυος NIH3T3. Ειδικότερα, ελέγξαμε το βαθμό συνεντοπισμού της υπερέκφρασμένης και μη συντηγμένης με κάποιο επίτοπο πρωτεΐνης ERBIN με το γνωστό μάρτυρα του πρώιμου ενδοσώματος, την πρωτεΐνη EEA1 [167]. Σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [94, 116], η πρωτεΐνη ERBIN βρέθηκε να εντοπίζεται τόσο στην πλασματική μεμβράνη όσο και στο κυτταρόπλασμα ενώ δεν παρουσίασε κάποιο βαθμό συνεντοπισμού με την πρωτεΐνη EEA1 (σχήμα 13, a-c). Εντούτοις, ύστερα από ταυτόχρονη υπερέκφρασή της με τη χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-SARA, η ERBIN παρουσιάζει σημαντικό βαθμό συνεντοπισμού (στο 50% περίπου των κυττάρων) με τη χιμαιρική πρωτεΐνη GFP-SARA στα πρώιμα ενδοσώματα (σχήμα 13, d-f). Επιπρόσθετα, η υπερέκφραση της SARA προκάλεσε διόγκωση των πρώιμων ενδοσωμάτων όπως ακριβώς έχει δειχθεί και από προηγούμενες εργασίες (σχήμα 3.5, d-f) [92-94].

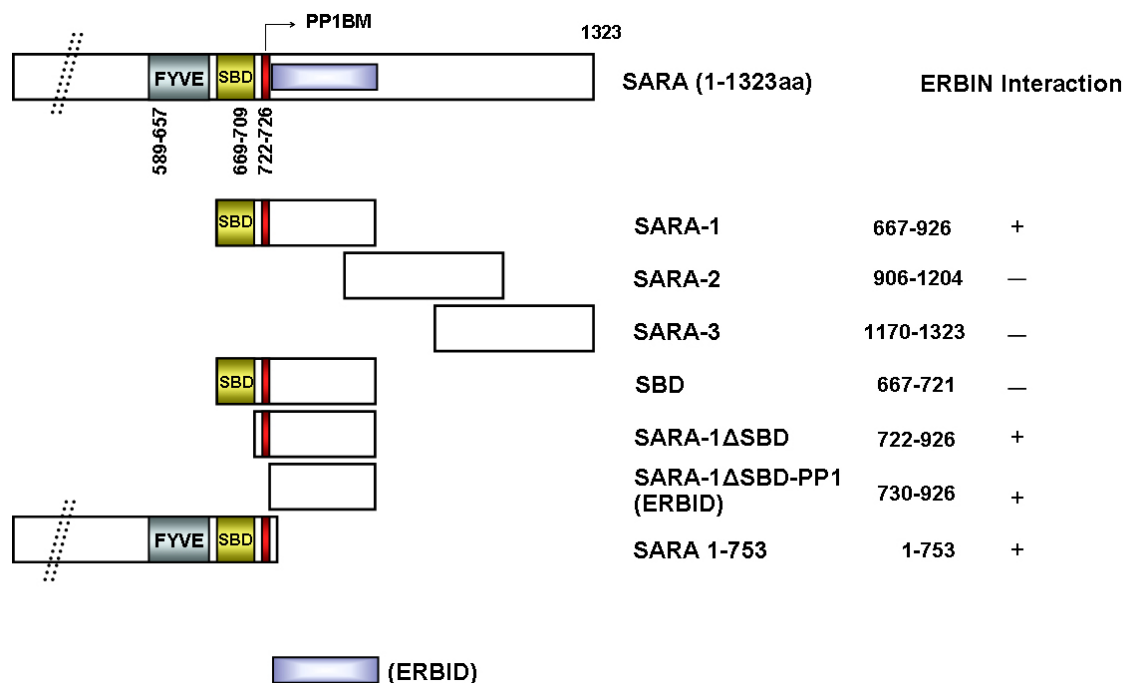
Αν και το πείραμα επίπλευσης μεμβρανών έδειξε ότι ένα κλάσμα της ERBIN βρίσκεται στα ίδια μεμβρανικά κλάσματα που εντοπίζεται και η πρωτεΐνη SARA (σχήμα 3.4), εντούτοις η ποσότητα της πρωτεΐνης ERBIN η οποία στρατολογείται στα πρώιμα ενδοσώματα από τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης SARA είναι ανεπαρκής προκειμένου να ανιχνευθεί από το αντίσωμα έναντι της ενδογενούς ERBIN. Αποδεδειγμένα λοιπόν, η υπερέκφραση της GFP-SARA “εμπλουτίζει” την πρωτεΐνη αυτή στα πρώιμα ενδοσώματα και για το λόγο αυτό είναι δυνατή η ανίχνευση της με την τεχνική του ανοσοφθορισμού.



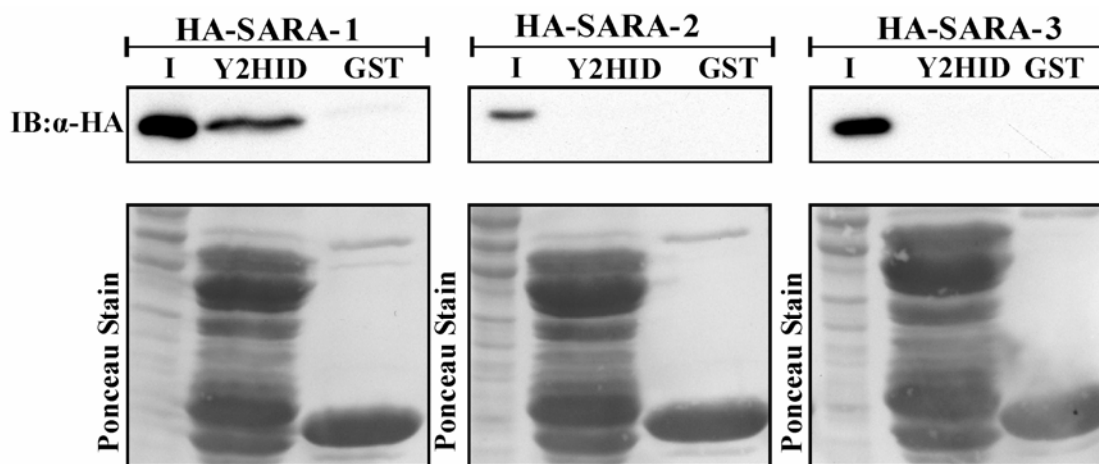
Σχήμα 3.5: Η SARA στρατολογεί την πρωτεΐνη ERBIN στο πρώιμο ενδόσωμα. Κύτταρα NIH3T3 διαμολύνθηκαν με την πρωτεΐνη ERBIN απουσία (a-c) ή παρουσία GFP-SARA (d-f). Η πρωτεΐνη ERBIN ανιχνεύτηκε με αντίσωμα κόνικλου α -ERBIN και η ενδογενής EEA1 ανιχνεύτηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα επίμοτος α -EEA1. Η γραμμή μήκους, στα σχήματα c και f (κάτω δεξιά), αντιστοιχεί σε 10 μ m.

3.4 Μοριακή χαρτογράφηση της περιοχής της πρωτεΐνης SARA που αλληλεπιδρά με την ERBIN

Προκειμένου να χαρακτηρίσουμε την περιοχή της πρωτεΐνης SARA που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την ERBIN, χρησιμοποιήσαμε λύματα ανθρώπινων επιθηλιακών εμβρυονικών κυττάρων προερχομένων από το νεφρό (HEK 293, Human Embryonic Kidney Cells). Ειδικότερα, έγινε παροδική διαμόλυνση των προαναφερομένων κυττάρων με αλληλεπικαλυπτόμενα μικρότερα τμήματα (SARA-1, SARA-2 και SARA-3) της περιοχής-δολώματος της πρωτεΐνης SARA (664-1323aa) (σχήμα 3.6), η οποία χρησιμοποιήθηκε στη σάρωση των δύο υβριδίων. Όλες αυτές οι κατασκευές σημάνθηκαν με τον επίτοπο HA (YPYDVPDYA). Από την άλλη πλευρά, η περιοχή-θήραμα της ERBIN (Y2HID) σημάνθηκε με την GST πρωτεΐνη. Σε πειράματα καταβύθισης, η GST-Y2HID συγκαταβύθισε τη SARA-1 (667-926aa), αλλά όχι τη SARA-2 (906-1204aa) ή τη SARA-3 (1170-1323aa) (σχήμα 3.7).



Σχήμα 3.6: Δομική οργάνωση της πρωτεΐνης SARA καθώς επίσης και των κατασκευών που δημιουργήθηκαν προκειμένου να εξεταστεί η αλληλεπίδραση με την ERBIN. Η αλληλεπίδραση ή η μη-αλληλεπίδραση κάθε κατασκευής με την ERBIN απεικονίζεται με σταυρό και παύλα αντίστοιχα. ERBID, ERBIN Interaction Domain..



Σχήμα 3.7: Η περιοχή Y2HID της ERBIN αλληλεπιδρά με την περιοχή SARA-1 της SARA. Κυτταρικά λύματα HEK 293 που εκφράζουν HA-SARA-1, HA-SARA-2 ή HA-SARA-3 επωάστηκαν με GST-Y2HID ή GST. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα, αφού πλύθηκαν, αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-HA. Το κάτω πλαίσιο σε κάθε περίπτωση απεικονίζει χρώση κατά ponceau των GST πρωτεϊνών. Το I (input) σε κάθε περίπτωση αντιπροσωπεύει το 10% του ολικού κυτταρικού λύματος.

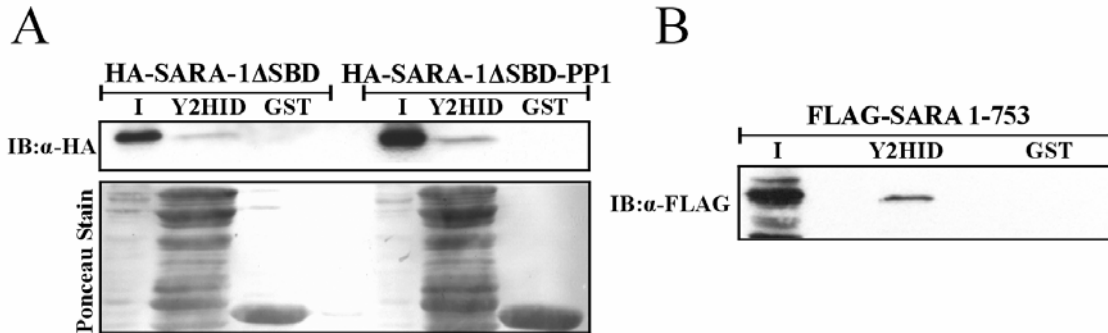
Καθώς η SARA-1 περιέχει δυο πολύ καλά χαρακτηρισμένες περιοχές, α) την περιοχή πρόσδεσης των πρωτεϊνών SMAD (SMAD binding domain, SBD) και β) το μοτίβο σύνδεσης με την πρωτεϊνική φωσφατάση PP1 (Phosphatase Binding Motif, PPIBM), θεωρήσαμε σκόπιμο να μελετήσουμε τη συμμετοχή των δυο αυτών τομέων της πρωτεΐνης SARA στην αλληλεπίδραση με την ERBIN. Αρχικά, χρησιμοποιώντας κυτταρικά λύματα HEK 293 και διεξάγοντας πειράματα καταβύθισης δεν ανιχνεύσαμε καμία αλληλεπίδραση της myc-ERBIN με τον τομέα SBD της SARA (σχήμα 3.8A). Στο ίδιο πείραμα, ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η γνωστή σύνδεση του τομέα αυτού με την πρωτεΐνη SMAD2. Πράγματι, η αλληλεπίδραση της FLAG-SMAD2 κατασκευής με τη χιμαιρική πρωτεΐνη GST-SBD ήταν ισχυρή (σχήμα 3.8B).



Σχήμα 3.8: Η ERBIN δεν αλληλεπιδρά με τον τομέα σύνδεσης των SMAD πρωτεϊνών της SARA. Κυτταρικά εκχυλίσματα HEK 293 που εκφράζουν myc-ERBIN ή FLAG-SMAD2 επωάστηκαν με GST-SBD ή μόνο με την GST. Τα σύμπλοκα πλύθηκαν και στη συνέχεια αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση είτε με αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc (α -myc) είτε με αντίσωμα έναντι του επίτοπου FLAG (α -FLAG ab) προκειμένου να ανιχνεύσουμε τις συντηγμένες με τον επίτοπο πρωτεΐνες ERBIN (A) ή SMAD2 (B), αντίστοιχα..

Στη συνέχεια, καθώς η HA-SARA-1ΔSBD και η HA-SARA-1ΔSBD-PP1 αλληλεπιδρούν με τη GST-Y2HID (σχήμα 3.9A), συμπεραίνουμε ότι ούτε ο τομέας SBD ούτε και το μοτίβο PPIBM (PPIBM, Protein Phosphatase 1 Binding Motif) της πρωτεΐνης SARA συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση της SARA με την ERBIN. Κατά συνέπεια, είναι προφανές ότι η SARA δεσμεύεται στην ERBIN μέσω μιας περιοχής η οποία εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 730 και 926. Επειδή, όμως, η κατασκευή SARA (1-753) αλληλεπιδρά επίσης με τη GST-Y2HID (σχήμα 3.9B) υποθέτουμε ότι η ενδεχόμενη ελάχιστη περιοχή της πρωτεΐνης SARA που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την ERBIN εκτείνεται ανάμεσα στα αμινοξέα 730 και 753. Ωστόσο, επειδή δε μπορούμε να αποκλείσουμε ότι και οι παρακείμενες περιοχές συμβάλλουν στην αλληλεπίδραση αυτή,

ονομάσαμε την ευρύτερη περιοχή, αμινοξέα 730 μέχρι 926, ως περιοχή σύνδεσης με την ERBIN (ERBIN Interaction Domain, ERBID).



Σχήμα 3.9: Η ελάχιστη πιθανή περιοχή της πρωτεΐνης SARA που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με την ERBIN εντοπίζεται ανάμεσα στα αμινοξέα 730 και 753. (A) Λύματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζουν είτε HA-SARA-1ΔSBD είτε HA-SARA-1ΔSBD-PPI επωάστηκαν με GST-Y2HID ή GST. Τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα πλύθηκαν και αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-FLAG. (B) Λύματα κυττάρων 293 που εκφράζουν FLAG-SARA1-753 επωαστήκαν με GST-Y2HID ή GST. Τα σύμπλοκα αφού πλύθηκαν αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση κατά SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-FLAG. Το I (input) σε κάθε περίπτωση αντιπροσωπεύει το 10% του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος.

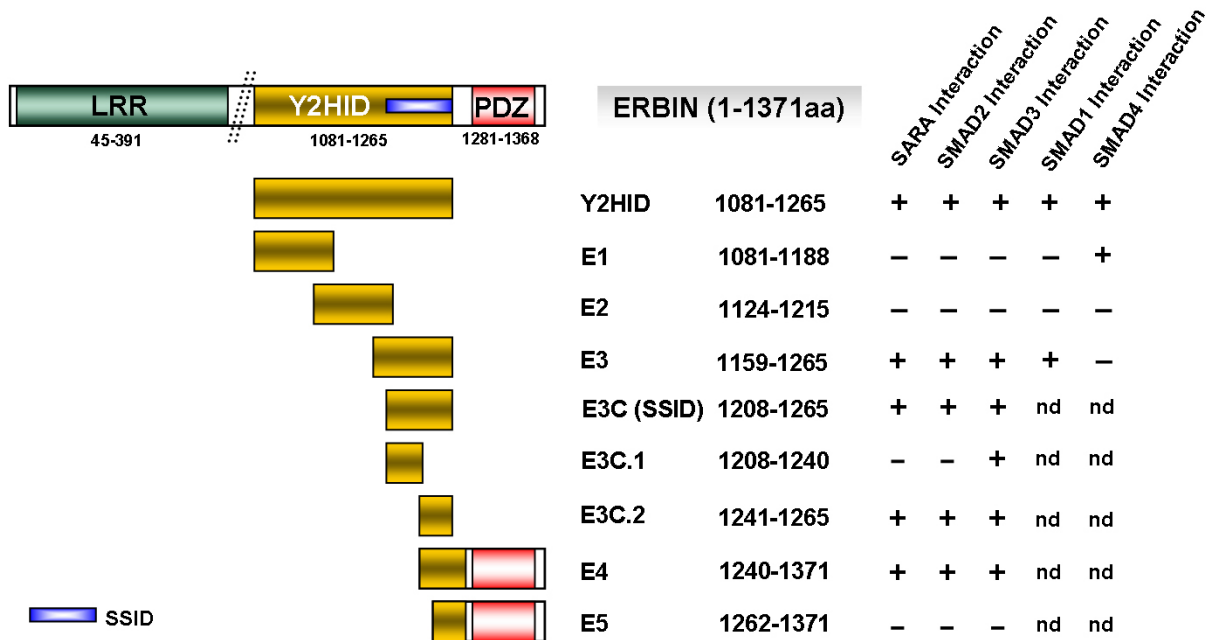
3.5 Η περιοχή της πρωτεΐνης ERBIN (1208-1265aa) ταυτοποιείται για πρώτη φορά να αλληλεπιδρά με τη SARA καθώς και με τις SMAD2/3 πρωτεΐνες

Προκειμένου να προσδιορίσουμε με περισσότερη ακρίβεια την ελάχιστη περιοχή της πρωτεΐνης ERBIN που διαμεσολαβεί στη σύνδεση με τη SARA, μελετήσαμε την αλληλεπίδραση της κατασκευής FLAG-SARAΔ1-664 με μικρότερα αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα της περιοχής Y2HID (σχήμα 3.10). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της καταβύθισης όπου η πρωτεΐνη GST συντήχθηκε με διάφορες περιοχές της πρωτεΐνης ERBIN. Οι κατασκευές αυτές δημιουργήθηκαν λαμβάνοντας υπόψη προγράμματα βιοπληροφορικής ανάλυσης δευτεροταγούς δομής που είναι διαθέσιμα στο διαδίκτυο, π.χ <http://www.predictprotein.org/>. Αρχικά, χρησιμοποιήσαμε τρία αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα της περιοχής Y2HID. Τις περιοχές αυτές τις ονομάσαμε E1 (1081-1188aa), E2 (1124-1215aa) και E3 (1159-1265aa). Επίσης, χρησιμοποιήσαμε και μια τέταρτη κατασκευή που ονομάσαμε E4 (1240-1371aa) και η οποία περιλαμβάνει τον τομέα

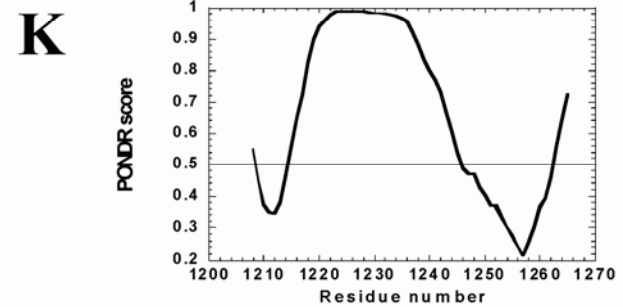
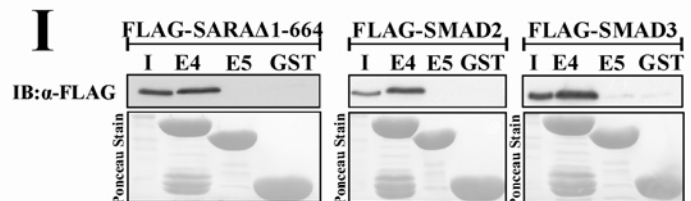
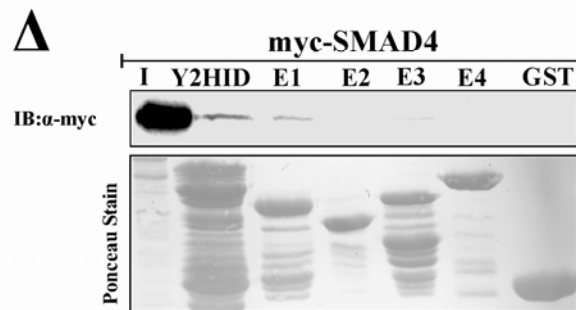
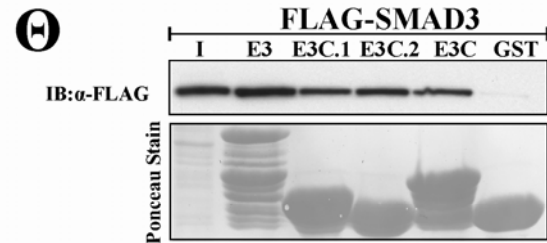
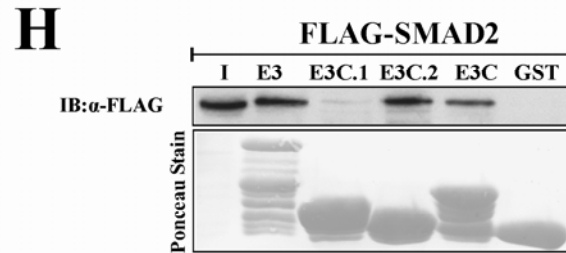
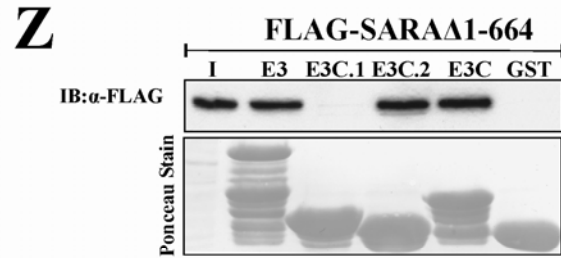
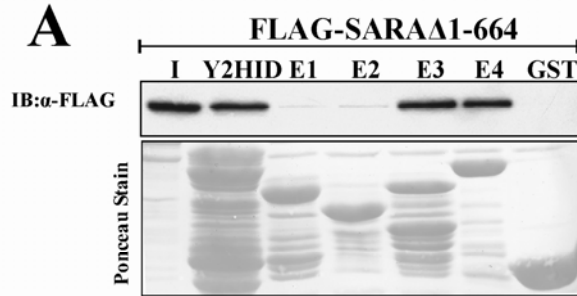
PDZ καθώς και τα τελευταία 25 αμινοξέα της περιοχής Y2HID (σχήμα 3.10). Καθώς η περιοχή Y2HID (1081-1265aa) της ERBIN περιλαμβάνει την περιοχή SID (1172-1282aa), η οποία έχει δειχθεί από προηγούμενη πρόσφατη μελέτη ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες SMAD2 και SMAD3 [168], χρησιμοποιήσαμε επίσης τις κατασκευές FLAG-SMAD2, FLAG-SMAD3, myc-SMAD1 και myc-SMAD4 στη δοκιμασία καταθύθισης (σχήμα 3.11B-E). Οι περιοχές E3 και E4 της ERBIN συγκαταβύθισαν τη SARAΔ1-664 (σχήμα 3.11A) και τη SMAD2 (σχήμα 3.11B), ενώ η SMAD3 συγκαταβυθίστηκε κυρίως με την περιοχή E3 (σχήμα 3.11Γ). Η myc-SMAD1 συγκαταβυθίστηκε ασθενικά με την περιοχή E3 (σχήμα 3.11E), ενώ η SMAD4 συγκαταβυθίστηκε, επίσης ασθενικά, με την περιοχή E1 (σχήμα 3.11Δ). Συνολικά, τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι οι πρωτεΐνες SARA, SMAD2 και SMAD3 αλληλεπιδρούν με την ίδια περιοχή της ERBIN η οποία εκτείνεται μεταξύ των αμινοξέων 1208 μέχρι 1265.

Προκειμένου να καθορίσουμε περαιτέρω την ελάχιστη απαραίτητη περιοχή για τις αλληλεπιδράσεις με τη SARA, τη SMAD2 και τη SMAD3 με την ERBIN, δημιουργήσαμε τρεις επιπρόσθετες κατασκευές της ERBIN, την E3C (1208-1265aa), την E3C.1 (1208-1240aa) και την E3C.2 (1241-1265aa) (σχήμα 3.10). Ενώ η SARAΔ1-664 και η SMAD2 συγκαταβυθίσαν την κατασκευή E3C.2 (σχήμα 3.11Z και H), η SMAD3 συγκαταβυθίσε τόσο την E3C.1 όσο και την E3C.2 (σχήμα 3.11Θ). Όπως αναμενόταν, η SARAΔ1-664, η SMAD2 και η SMAD3 συγκαταβυθίστηκαν και με τη μεγαλύτερη κατασκευή E3C (σχήμα 3.11Z-Θ). Επιβεβαιώνοντας τα παραπάνω πειράματα, η SARAΔ1-664, η SMAD2 και η SMAD3 συγκαταβυθίσαν την περιοχή E4 (1240-1371) (σχήμα 3.11Z), ενώ καμία από αυτές δε συγκαταβυθίσε την περιοχή E5 (σχήμα 3.11I), η οποία προέρχεται από την κατασκευή E4, αλλά της λείπει η περιοχή 1240-1262aa (σχήμα 3.10).

Συμπερασματικά, η SARA και η SMAD2 αλληλεπιδρούν με την ERBIN μεταξύ των αμινοξέων 1241 και 1265, ενώ η SMAD3 δεσμεύεται στην ERBIN στα αμινοξέα 1208 μέχρι 1265. Συγκεντρωτικά, τα δεδομένα αυτά καθιερώνουν για πρώτη φορά την περιοχή της ERBIN (1208-1265aa) υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες SARA, SMAD2 και SMAD3. Την περιοχή αυτήν την ονομάσαμε περιοχή σύνδεσης με τη SARA και τις SMAD πρωτεΐνες, (SARA and SMAD Interaction Domain, SSID).



Σχήμα 3.10: Δομική οργάνωση της πρωτεΐνης ERBIN με βάση τους τομείς της και οι κατασκευές που δημιουργήθηκαν για να εξετάσουμε την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες SARA και SMAD1/2/3/4 (βλέπε σχήμα 3.11). Η αλληλεπίδραση ή η μη-αλληλεπίδραση κάθε κατασκευής με τη SARA και τις SMADs 1-4 απεικονίζεται με σταυρό και πούλα αντίστοιχα. SSID, SARA and SMAD Interacting Domain; LRR, Leucine Rich Repeat; PDZ, PSD-95, Dlg, and ZO-1; nd, not done



Σχήμα 3.11: Χαρτογράφηση των περιοχών της ERBIN που αλληλεπιδρούν με τις SARA και SMAD1/2/3/4. (A) Κύτταρα HEK 293 μολύνθηκαν με τον αδενοϊό που εκφράζει την κατασκευή FLAG-SARAΔ1-664. Τα κυτταρικά λύματα επωάστηκαν με GST-Y2HID, GST-E1, GST-E2, GST-E3, και GST-E4, ενώ ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη GST. Τα σύμπλοκα, αφού πλύθηκαν, αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Για την ανοσοαποτύπωση που ακολούθησε χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα α-FLAG. Το κατώτερο πάνελ σε κάθε περίπτωση δείχνει τη χρώση των GST πρωτεϊνών με το αντιδραστήριο ronceau. Το σύμβολο I (input) αντιπροσωπεύει το 10% του ολικού κυτταρικού εκχυλίσματος. (B) Κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν προσωρινά με την κατασκευή FLAG-SMAD2. Τα κυτταρικά λύματα υπέστησαν την ίδια επεξεργασία όπως στην περίπτωση (A). (Γ) Κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν προσωρινά με την κατασκευή FLAG-SMAD3. Η επεξεργασία είναι ίδια με την περίπτωση (A). (Δ) Κύτταρα HEK διαμολύνθηκαν προσωρινά με την κατασκευή myc-SMAD4. Τα κυτταρικά λύματα επεξεργάστηκαν όπως στην περίπτωση (A), ενώ για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα α-myc (E) Κύτταρα HEK 293 cells διαμολύνθηκαν προσωρινά με την κατασκευή myc-SMAD1. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επεξεργάστηκαν όπως στην περίπτωση (A). (Z). Κύτταρα HEK 293 μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει την FLAG-SARAΔ1-664, και τα κυτταρικά λύματα επωάστηκαν με τις πρωτεΐνες GST-E3, GST-E3C, GST-E3C.1, GST-E3C.2 και GST ως μάρτυρα. Τα σύμπλοκα, αφού πλύθηκαν, αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-FLAG. (H) Κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν προσωρινά με FLAG-SMAD2. Τα κυτταρικά λύματα υπέστησαν την ίδια επεξεργασία όπως στην περίπτωση (Z). (Θ) Κύτταρα HEK 293 διαμολύνθηκαν προσωρινά με την κατασκευή FLAG-SMAD3. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υπέστησαν την ίδια επεξεργασία όπως στην περίπτωση (Z). (I) Κυτταρικά λύματα HEK 293 που υπερεκφράζουν την κατασκευή FLAG-SARAΔ1-664, FLAG-SMAD2 ή FLAG-SMAD3 επωάστηκαν με GST-E4 και GST-E5 ή μόνο με την πρωτεΐνη-μάρτυρα GST. Ακολούθησε η ίδια πειραματική διαδικασία όπως στη περίπτωση (A). (K) Διάγραμμα κατά PONDR (Predictor Of Naturally Disordered Regions, PONDR) της περιοχής SSID. Τα κατάλοιπα με τιμή κατά PONDR μεγαλύτερη από 0.5 αναμένεται να μην έχουν συγκεκριμένη τριτοταγή δομή και τα κατάλοιπα με τιμή μικρότερη από 0.5 προβλέπεται να υιοθετούν κάποιας μορφής διαμόρφωση. Τιμές κοντά στο 1 είναι ισχυρές ενδείξεις για τη μη ύπαρξη τριτοταγούς δομής.

Το γεγονός ότι η ίδια μικρή περιοχή της πρωτεΐνης ERBIN είναι υπεύθυνη για τις αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες SARA, SMAD2 και SMAD3 μας παρακίνησε να αναλύσουμε περαιτέρω και σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια την αμινοξική αλληλουχία της περιοχής SSID. Η αλληλουχία SSID είναι ασυνήθιστα πλούσια σε κατάλοιπα που προάγουν δομική αταξία, ειδικά τα αμινοξέα προλίνη (Pro) και γλουταμίνη (Gln), ενώ είναι “φτωχή” σε αμινοξέα που προάγουν δομική τάξη (Trp, Ile, Cys, Val). Πράγματι, η περαιτέρω ανάλυση με διάφορα σχετικά προγράμματα βιοπληροφορικής, έδωσε μια πειστική πρόβλεψη της έλλειψης συγκεκριμένης τριτοταγούς δομής για τον τομέα SSID. Ειδικότερα, το μικρό τμήμα 1246-1257aa, αναμένεται να είναι α-έλικα και αποτελεί μια

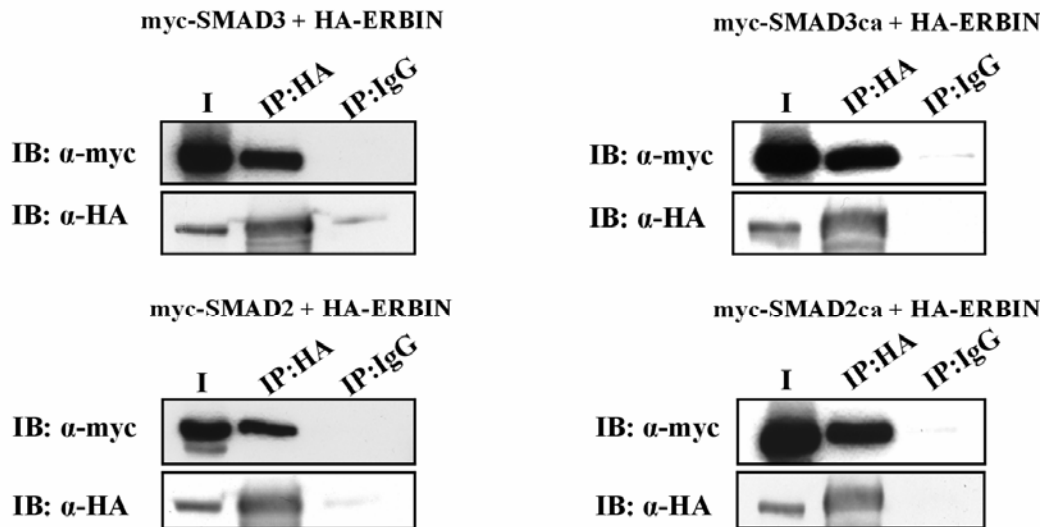
“εξαιρέση” στην προβλεπόμενη έλλειψη συγκεκριμένης τριτοταγούς δομής (σχήμα 3.11K). Επιπλέον, το τμήμα 1246-1257aa μπορεί να ταξινομηθεί ως α -MoRF (Molecular Recognition Feature, γνωστά ακόμη και ως Molecular Recognition Element MoRE). Τα MoRFs είναι μικρές και με χαλαρή τριτοταγή δομή πρωτεϊνικές περιοχές οι οποίες εμπεριέχονται μέσα σε μεγαλύτερες και χωρίς συγκεκριμένη δομή πρωτεϊνικές περιοχές. Με τη σύνδεση της αλληλεπιδρώσας πρωτεΐνης στην περιοχή MoRF η ευρύτερη αδόμητη περιοχή υφίσταται μετάβαση σε κατάσταση δομικής τάξης (disorder-to-order transition) [169].

3.6 Οι πρωτεΐνες SMAD2/3 και η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρούν με την ERBIN ανεξάρτητα η μια της άλλης και έτσι ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στην περιοχή SSID της ERBIN.

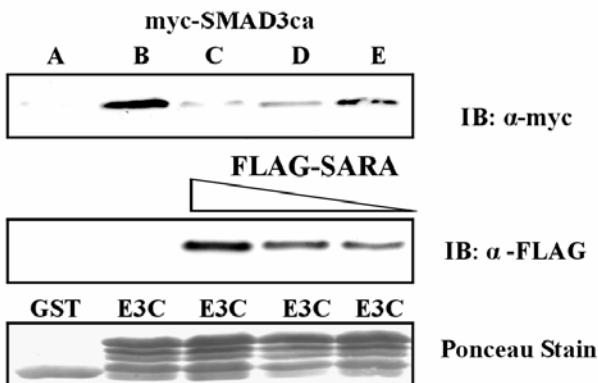
Οι πρωτεΐνες SARA και ERBIN φαίνεται να δεσμεύονται άμεσα η μια στην άλλη επειδή αλληλεπιδρούν στο σύστημα των δύο υβριδίων. Αντίθετα, η πρόσδεση της ERBIN στις SMAD2/3 μπορεί να είναι έμμεση μέσω της αμοιβαίας σύνδεσης στη SARA. Προκειμένου να διαλευκάνουμε το σημείο αυτό, μελετήσαμε αν η ERBIN θα μπορούσε να αλληλεπιδρά με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2/3 πρωτεϊνών, μορφές με τις οποίες δεν αλληλεπιδρά η SARA [51]. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοκαταβύθισης, ελέγξαμε την αλληλεπίδραση της HA-ERBIN με τις σημασμένες, με τον επίτοπο myc, μορφές είτε του φυσικού τύπου SMAD2/3 είτε των μόνιμα ενεργών μορφών τους (SMAD2/3ca). Στις μορφές αυτές, το μοτίβο SSMS στο καρβοξυτελικό άκρο των πρωτεϊνών μεταλλάχθηκε σε EDME και EDVE, αντιστοίχως, με αποτέλεσμα οι μορφές αυτές να μιμούνται τη φωσφορυλιωμένη μορφή των SMAD2/3 πρωτεϊνών [46, 153]. Τόσο οι μη-φωσφορυλιωμένες όσο και οι συνεχώς ενεργές μορφές των SMAD2 και SMAD3 δεσμεύονται στην ERBIN στον ίδιο βαθμό (σχήμα 3.12A) που σημαίνει ότι η σύνδεση των SMAD2/3 είναι ανεξάρτητη της σύνδεσής τους στη SARA.

Με βάση τα δεδομένα ότι α) οι SMAD2/3 πρωτεΐνες και η SARA μπορούν να δεσμεύονται ανεξάρτητα η μια από την άλλη στην ERBIN, και β) οι SMAD2/3 πρωτεΐνες και η SARA δεσμεύονται στην περιοχή SSID της ERBIN, υποθέσαμε ότι η αλληλεπίδραση των SMAD2/3 και της SARA στην ERBIN μπορεί να είναι ανταγωνιστική και αμοιβαία αλληλοαποκλειόμενη. Όντως, η έκφραση αυξανόμενων ποσοτήτων της FLAG-SARA μειώνει δραματικά την ποσότητα της myc-SMAD2ca (σχήμα 3.12Γ) και της myc-SMAD3ca (σχήμα 3.12B) που καταβυθίζεται με την κατασκευή E3C της πρωτεΐνης ERBIN (SSID, 1208-1265aa). Συμπερασματικά, οι SMAD2/3 πρωτεΐνες και η SARA αλληλεπιδρούν με την ERBIN ανεξάρτητα η μια από την άλλη και έτσι ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στην περιοχή SSID της ERBIN.

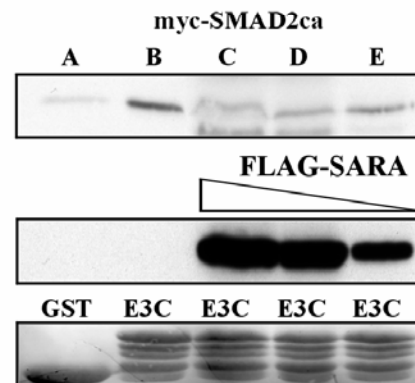
A



B



Γ



Σχήμα 3.12: Η ERBIN αλληλεπιδρά τόσο με τις φωσφορυλιωμένες όσο και με τις μη-φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2/3 πρωτεϊνών ενώ η πρωτεΐνη SARA και οι SMAD2/3 ανταγωνίζονται για τη σύνδεση στην ERBIN (A) Κύτταρα HEK 293 συνδιαμολύνθηκαν προσωρινά με τις πρωτεΐνες myc-SMAD3 και HA-ERBIN, myc-SMAD2 και HA-ERBIN, myc-SMAD3ca και HA-ERBIN ή τις myc-SMAD2ca και HA-ERBIN. Αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA (α-HA) ή αντίσωμα μάρτυρα IgG επίμονος, χρησιμοποιήθηκαν για πειράματα ανοσοκαταβύθισης και στη συνέχεια ακολούθησε ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc (α-myc). Προκειμένου να ελεγχθεί η ανοσοκαταβύθιση της HA-ERBIN οι μεμβράνες στη συνέχεια επώαστηκαν εκ νέου με αντίσωμα έναντι του επιτόπου HA. (B) Η πρωτεΐνη SARA ανταγωνίζεται με τις πρωτεΐνες SMAD2 και SMAD3 για τη σύνδεση στην πρωτεΐνη ERBIN. Λύματα από κύτταρα HEK 293 τα οποία υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη myc-SMAD3ca επώαστηκαν με GST-E3C πρωτεΐνη (εκφρασμένη σε βακτήρια), διαδρομή B. Τα σύμπλοκα, αφού πρώτα πλύθηκαν, επώαστηκαν με αυξανόμενα ποσά της χιμαιρικής πρωτεΐνης FLAG-SARA, διαδρομές C, D, E. Τα σύμπλοκα στη συνέχεια πλύθηκαν και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα α-FLAG προκειμένου να ανιχνεύσουμε την FLAG-SARA, και αντίσωμα α-myc για την ανίχνευση της myc-SMAD3ca. Διαδρομή A, λύματα από κύτταρα HEK 293 τα οποία υπερεκφράζουν τη χιμαιρική πρωτεΐνη myc-SMAD3ca επώαστηκαν με GST (Γ) Το παραπάνω πείραμα (βλέπε B) επαναλήφθηκε με τον ίδιο τρόπο χρησιμοποιώντας την πρωτεΐνη myc-SMAD2ca.

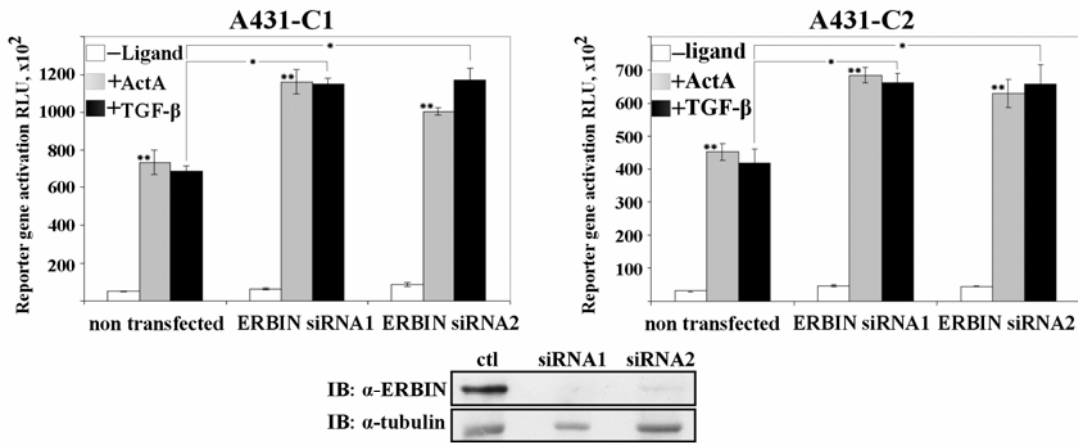
3.7 Η πρωτεΐνη SARA ή το πολυπεπτίδιο ERBID αντιστρέφει την ανασταλτική επίδραση της πρωτεΐνης ERBIN στις μεταγραφικές αποκρίσεις του TGFβ και της Ακτιβίνης A

Επειδή η ERBIN δεσμεύεται τόσο στη SARA όσο και στις SMAD2/3 πρωτεΐνες μελετήσαμε το ρόλο των αλληλεπιδράσεων αυτών στη μεταγωγή του σήματος τόσο από τον TGFβ όσο και από την Ακτιβίνη A αποσιωπώντας το γονίδιο της ERBIN. Αρχικά, δημιουργήθηκαν σταθερές κυτταρικές σειρές από καρκινικά επιθηλιακά κύτταρα A431 τα οποία εξέφραζαν δύο γονίδια αναφοράς. Το ένα αποτελούμενο από τον υποκινητή (CAGA)₁₂-luc SBE (ανταποκρίνεται σε TGFβ/Ακτιβίνη A) και το άλλο αποτελούμενο από τη σταθερά εκφραζόμενη λουσιφεράση από το κοράλλι Renilla (Renilla luciferase gene, HSV TK) για ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων των τιμών CAGA-luc. Οι κυτταρικές αυτές σειρές ελέγχθηκαν για την ικανότητα μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου αναφοράς και την ισχύ έκφρασης της λουσιφεράσης Renilla. Στη συνέχεια, οι κυτταρικές σειρές ελέγχθηκαν με τη χρήση συγκεκριμένων siRNAs που στοχεύουν σε γονίδια/πρωτεΐνες με γνωστή από τη βιβλιογραφία δράση στα μονοπάτια του TGFβ και της

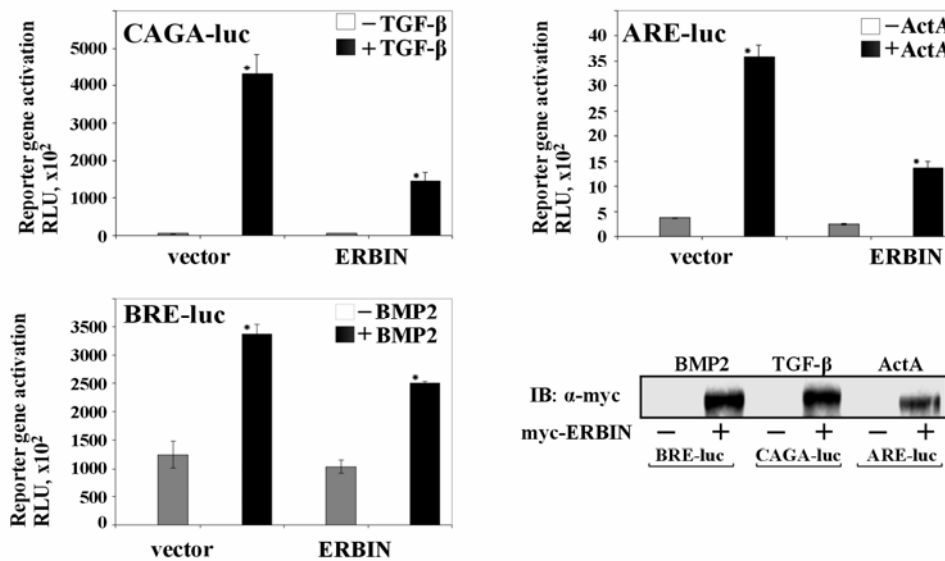
Ακτιβίνης Α. Με βάση την ανταπόκριση στους ελέγχους αυτούς επιλέχθηκαν δύο κλώνοι για τα πειράματα γονιδιακής αποσιώπησης της ERBIN.

Η γονιδιακή αποσιώπηση της ERBIN από δυο διαφορετικά siRNA προκάλεσε, και στους δυο A431 κλώνους, στατιστικά σημαντική αύξηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης του γονιδίου CAGA-luc, τόσο από τον TGFβ, όσο και από την Ακτιβίνη Α (σχήμα 3.13A). Φυσικά, και στους δύο κλώνους, η γονιδιακή αποσιώπηση οδήγησε σε δραματική μείωση των επιπέδων της πρωτεΐνης ERBIN (σχήμα 3.13A). Αντίθετα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ERBIN, σε κύτταρα HEK 293, ανέστειλε σημαντικά τη μεταγραφή των γονιδίων αναφοράς CAGA-luc, που ανταποκρίνεται στον TGFβ/Ακτιβίνη Α μέσω της SMAD3, και ARE-luc, που ανταποκρίνεται στην Ακτιβίνη Α μέσω της πρωτεΐνης SMAD2 και σε συνεργασία με τον μεταγραφικό παράγοντα FAST (σχήμα 3.13B). Η μεταγραφή του γονιδίου αναφοράς BRE-luc, που ενεργοποιείται από τις BMP πρωτεΐνες μέσω των πρωτεϊνών SMAD1 και SMAD5, επηρέαστηκε αρνητικά σε μικρότερο βαθμό, αν και η αναστολή αυτή ήταν στατιστικά σημαντική (σχήμα 3.13B). Πιθανώς, η ασθενής αλληλεπίδραση της ERBIN με τη SMAD1 (σχήμα 3.11E) να είναι υπεύθυνη για την αναστολή αυτή. Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματα αυτά φανερώνουν ότι η ERBIN διαδραματίζει ανασταλτικό ρόλο στις μεταγραφικές αποκρίσεις του κυττάρου από τον TGFβ και την Ακτιβίνη Α, αλλά και σε κάποιο βαθμό από τις BMP πρωτεΐνες.

A



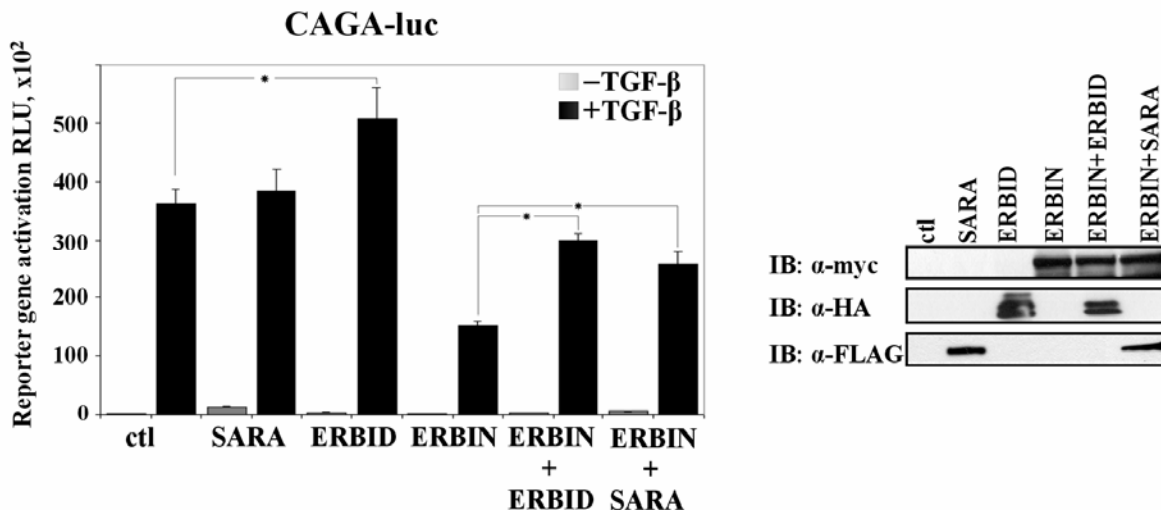
B



Σχήμα 3.13: Η ERBIN είναι αρνητικός ρυθμιστής της μεταγωγής σήματος τόσο από την Ακτιβίνη A όσο και από τον TGFβ. (A) Διο κλώνιοι καρκινικών επιθηλιακών κύτταρων A431 (C1 και C2), που εκφράζουν το γονίδιο αναφοράς (CAGA)₁₂-luc, διαμολύνθηκαν με δυο siRNA έναντι της πρωτεΐνης ERBIN. Τα κύτταρα αφού υπέστησαν στέρηση ορού στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν είτε με Ακτιβίνη A είτε με TGFβ. Τα επίπεδα της λουσιφεράσης (Firefly και Renilla) μετρήθηκαν ύστερα από 16 h. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή ± της τυπικής απόκλισης πειραμάτων που επαναλήφθηκαν τρεις φορές και είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0,001$). Ακολούθησε ανάλυση ανοσοαποτύπωσης χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης ERBIN. Η πρωτεΐνη τουμπουλίνη χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ελέγχου για την ίση ποσότητα ολικής πρωτεΐνης που φορτώθηκε στην ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. (B). Κύτταρα HEK 293 συνδιαμολύνθηκαν με myc-ERBIN (ή φορέα μάρτυρα), SBE-luc και β-

gal ή *myc-ERBIN* (ή φορέα μάρτυρα), *ARE-luc*, *FAST-1*, και *β-gal* ή *myc-ERBIN* (ή φορέα μάρτυρα), *BRE-luc* και *β-gal*. Τα κύτταρα αφού υπέστησαν στέρωση ορού, επήχθησαν είτε με *TGFβ*, είτε με *Ακτιβίνη Α* είτε με *BMP-2* για 16 h και μετέπειτα μετρήθηκαν η *firefly* λουσιφεράση και η *β-gal*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή ± της τυπικής απόκλισης πειραμάτων που επαναλήφθηκαν τρεις φορές και είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0,001$). Για να ελεγχθεί η έκφραση της *myc-ERBIN* στα κυτταρικά λύματα, τα τελευταία, αφού ηλεκτροφορήθηκαν, εξετάστηκαν με ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του επίτοπου *myc* (α -*myc*).

Σε σχέση με τα παραπάνω, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η υπερέκφραση τόσο της πρωτεΐνης *SARA* όσο και του τομέα *ERBID* (*SARA-1ΔSBDΔPP1*) αντιστρέφει την αρνητική επίδραση της υπερέκφρασης της *ERBIN* στην από τον *TGFβ* επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του *CAGA-luc* (σχήμα 3.14). Επιπλέον, η υπερέκφραση του πολυπεπτιδίου *ERBID* είναι ικανή να αυξήσει τη μεταγραφική ενεργότητα του *TGFβ*, ακόμη και χωρίς να υπερεκφραστεί η πρωτεΐνη *ERBIN* (σχήμα 3.14). Φαίνεται λοιπόν ότι ο ανταγωνισμός της *SARA* (μέσω της περιοχής *ERBID*) με τις *SMAD2/3* για σύνδεση με την *ERBIN* (στην περιοχή *SSID*) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αποκρίσεις του κυττάρου στη δράση από τον *TGFβ* και την *Ακτιβίνη Α*.



Σχήμα 3.14: Η *SARA* ή το πολυπεπτιδίο *ERBID* (*HA-SARA-1ΔSBDΔPP1*) ανταγωνίζονται την ανασταλτική δράση της *ERBIN* στη μεταγραφική δραστηριότητα των *TGFβ* και *Ακτιβίνη Α*. Κύτταρα *HEK 293* συνδιαμολύνθηκαν είτε με *SBE-luc*, και *β-gal* και *ERBID* (*HA-SARA-1ΔSBDΔPP1*) ή με *ERBIN* ή με συνδυασμό της *ERBIN/ERBID* και *ERBIN/SARA*. Υστερα από στέρωση ορού στα κύτταρα *HEK 293* προστέθηκε *TGFβ* για 16h και μετρήθηκαν τόσο η *firefly* λουσιφεράση (*LUC*) όσο και η *β-γαλακτοσιδάση* (*β-gal*). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση πειραμάτων που επαναλήφθηκαν τρεις φορές και είναι στατιστικά σημαντικά ($p < 0,001$). Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των πρωτεϊνών *myc-ERBIN*, *HA-ERBID* και *FLAG-SARA* ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με α -*myc*, α -*HA* και α -*FLAG* αντίσωμα, αντίστοιχα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η πρωτεΐνη ERBIN

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιώντας το σύστημα των δύο υβριδίων (yeast two-hybrid system), έγινε προσπάθεια προκειμένου να ανευρεθούν καινούργιες πρωτεΐνες που δυνητικά αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη SARA. Ανάμεσα στις τριάντα δυο πρωτεΐνες που βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη SARA συγκαταλέγονταν και η πρωτεΐνη ERBIN. Η αλληλεπίδραση της SARA με την ERBIN επιβεβαιώθηκε διεξοδικά χρησιμοποιώντας την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης και τη μέθοδο της πρωτεϊνικής καταβύθισης. Η πρωτεΐνη ERBIN είναι μέλος της οικογένειας LAP (LAP family, LRR και PDZ) [130]. Τα μέλη της οικογένειας LAP περιέχουν στο αμινοτελικό άκρο τους 16 επαναλήψεις πλούσιες στο αμινοξύ λευκίνη και από μια μέχρι και τέσσερις επαναλήψεις του τομέα PDZ (PSD-95/DLG/ZO-1, PDZ) στο καρβοξυτελικό άκρο τους.

Στα μέλη της οικογένειας αυτής, εκτός από την ERBIN, συγκαταλέγονται η LET-413 (*Caenorhabditis elegans*), η Scribble (*Drosophila melanogaster*) καθώς και η Densin-180, η hScribble και η Lano στα θηλαστικά. Όλες οι παραπάνω πρωτεΐνες κατά κύριο λόγο θεωρούνται ως πρωτεΐνες-συνδέτες που εμπλέκονται στην κυτταρική πολικότητα και στη μεμβρανική στόχευση υποδοχέων [170]. Όντως, η πρωτεΐνη ERBIN εντοπίζεται βασοπλευρικά και αλληλεπιδρά, μέσω της περιοχής PDZ, με τον υποδοχέα ERBB2 της οικογένειας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor family, EGFR). Η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τη βασοπλευρική εντόπιση του ERBB2 σε πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα [116]. Επιπλέον, η ERBIN αλληλεπιδρά, μέσω του τομέα LRR, με την πρωτεΐνη-ικρίωμα (scaffold protein) Sur-8. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλόκου των πρωτεϊνών Sur-8-Ras-Raf με συνέπεια την αναστολή της ενεργοποίησης της κινάσης ERK [141, 171].

Επιπλέον, η πρωτεΐνη ERBIN διαδραματίζει ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ εξαιτίας της αλληλεπίδρασής της τόσο με τις φωσφορυλιωμένες όσο και με τις μη φωσφορυλιωμένες SMAD2/3 πρωτεΐνες [127, 168]. Έτσι, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης ERBIN αναστέλλει την από τον TGFβ εξαρτώμενη μεταγραφή, ενώ από την άλλη πλευρά η αποσιώπηση του γονιδίου της ERBIN με τη

χρήση siRNA ενεργοποιεί τις μεταγραφικές αποκρίσεις του μονοπατιού. Επιπρόσθετα, αν και η υπερέκφραση της ERBIN δεν έχει κανένα επακόλουθο στη φωσφορυλίωση των SMAD2/3 που επάγεται από τον TGFβ, εντούτοις η μετατόπιση-μετακίνηση στον πυρήνα των πρωτεϊνών SMAD2/3 μειώνεται δραστικά. Με βάση τα παραπάνω έχει προταθεί ότι η ERBIN δρα αποτρέποντας τις SMAD2/3 να αλληλεπιδράσουν με την πρωτεΐνη SMAD4 και επομένως παρεμποδίζει τη μετατόπισή τους στον πυρήνα του κυττάρου με κύριο αποτέλεσμα την αναστολή του μονοπατιού TGFβ [168].

Με βάση τα παραπάνω, θεωρήσαμε ότι η ERBIN είχε ενδιαφέρουσες ιδιότητες και αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το ρόλο της αλληλεπίδρασής της με τη SARA στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ/Ακτιβίνη Α (βλέπε και εισαγωγή 1.5).

4.2 Η SARA στρατολογεί την ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα

Η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά ισχυρά με το μεμβρανικό λιπίδιο PI(3)P, μέσω της περιοχής FYVE (Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1, and EEA1), με αποτέλεσμα να εντοπίζεται κυρίως στα πρώιμα ενδοσώματα [93]. Με αυτόν τον τρόπο, η αλληλεπίδραση της ERBIN με τη SARA θα μπορούσε να οδηγήσει στην εντόπιση της ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα. Πράγματι, όταν κυτταρικές μεμβράνες από ανθρώπινο πλακούντα φυγοκεντρήθηκαν σε βαθμίδωση σουκρόζης, η ERBIN βρέθηκε, εκτός από τα κλάσματα της κυτταρικής μεμβράνης, και στα κλάσματα της SARA και της EEA1, δύο πρωτεΐνες που τεκμηριωμένα εντοπίζονται στα πρώιμα ενδοσώματα [51, 167]. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη ERBIN συνεντοπίζεται με τη SARA στα πρώιμα ενδοσώματα σε κύτταρα NIH3T3, όπως έδειξαν πειράματα έμμεσου ανοσοφθορισμού. Η συνεντόπιση της ERBIN με τη SARA στα πρώιμα ενδοσώματα είναι εμφανής μόνο μετά από υπερέκφραση της SARA, πιθανότατα διότι η ποσότητα της πρωτεΐνης ERBIN η οποία στρατολογείται στα πρώιμα ενδοσώματα από τα ενδογενή επίπεδα της πρωτεΐνης SARA είναι ανεπαρκής προκειμένου να ανιχνευθεί από το όχι αρκούντως ευαίσθητο αντίσωμα έναντι της ενδογενούς ERBIN. Επομένως, τα πειράματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ERBIN εκτός από την πλασματική μεμβράνη [116], εντοπίζεται και στα πρώιμα ενδοσώματα. Αν και δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία αναφορικά με την εντόπιση της ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα, εντούτοις, υπάρχουν ορισμένες αναφορές που κάνουν

λόγο για εντόπισή της σε κυστίδια και στικτή χρώση. Ειδικότερα, σε καρκινικά κύτταρα προερχόμενα από βασικό κυτταρικό καρκίνωμα (Basal Cell Carcinoma, BCC) έχουν παρατηρηθεί μεμονωμένα θετικά στην πρωτεΐνη ERBIN κυτταροπλασματικά κυστίδια, για τα οποία έχει προταθεί ότι πρόκειται για κυστίδια ενδοκυττάρωσης [147]. Επιπρόσθετα, στικτή χρώση για την πρωτεΐνη ERBIN έχει παρατηρηθεί με ανοσοφθορισμό σε εγγύς δενδριτικά κύτταρα [142].

Έτσι, η κυτταρική περιοχή στην οποία λαμβάνει χώρα η αλληλεπίδραση της ERBIN με την πρωτεΐνη SARA, με βάση τα παραπάνω, πρέπει να είναι το πρώιμο ενδόσωμα. Βέβαια, δε μπορεί να αποκλειστεί το ενδεχόμενο ότι ένας μικρός τουλάχιστον βαθμός συνεντοπισμού συμβαίνει στο επίπεδο της πλασματικής μεμβράνης καθώς από βιβλιογραφικές αναφορές έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του TGFβ στην πλασματική μεμβράνη [51, 172, 173] και βεβαίως η ERBIN εντοπίζεται επίσης στην πλασματική μεμβράνη [116].

4.3 Μοριακή χαρτογράφηση των αλληλεπιδράσεων της ERBIN με τη SARA και τις SMAD2/3 πρωτεΐνες

Στην προσπάθειά μας να βρούμε την ακριβή περιοχή, πάνω στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης SARA, με την οποία συνδέεται η ERBIN δημιουργήσαμε τρεις αλληλεπικαλυπτόμενες πλασμιδιακές κατασκευές του καρβόξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης SARA, δηλαδή της περιοχής που χρησιμοποιήθηκε ως δόλωμα στη σάρωση των δύο υβριδίων. Από τις τρεις κατασκευές μόνο η μια, η κατασκευή που περιείχε και την περιοχή SBD, αλληλεπιδράσε με την ERBIN. Σε πειράματα καταβύθισης που ακολούθησαν διαπιστώσαμε ότι η περιοχή SBD δε συμμετέχει στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο πρωτεϊνών, αλλά η περιοχή αλληλεπίδρασης βρίσκεται καθοδικά του SBD [174] και του PP1BD [81] και απαρτίζεται από 197 αμινοξέα (730-926aa). Ανατρέχοντας στη διεθνή βιβλιογραφία προκειμένου να αναζητήσουμε πληροφορίες για τη εν λόγω περιοχή διαπιστώσαμε ότι αναφερόμασταν σε μια μη χαρακτηρισμένη περιοχή. Επομένως, θεωρήσαμε σκόπιμο τόσο για τις ανάγκες της παρούσης μελέτης, όσο και της διεθνούς βιβλιογραφίας να ονομάσουμε την περιοχή αυτή ERBID (ERBIN Interacting Domain, ERBID).

Για την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού δράσης της πρωτεΐνης ERBIN στο μονοπάτι του TGFβ θεωρήσαμε απαραίτητο να χαρτογραφήσουμε επίσης την αμινοξική περιοχή της ERBIN που είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τη SARA. Για το λόγο αυτό δημιουργήσαμε, αρχικά, τρεις αλληλεπικαλυπτόμενες κατασκευές που καλύπτουν την περιοχή Y2HID που βρέθηκε στη σύρωση των δύο υβριδίων. Επειδή για την περιοχή αυτή δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα από δομική άποψη, ο σχεδιασμός των κατασκευών πραγματοποιήθηκε με τη συμβολή προγραμμάτων βιοπληροφορικής, όπως ο δικτυακός τόπος Predict Protein (<http://www.predictprotein.org/>) που χρησιμοποιήθηκε για την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής [77, 159]. Σύμφωνα με τα πειράματα καταβύθισης και ανοσοκατακρήμνισης βρήκαμε ότι μια περιοχή 25 αμινοξέων στο καρβόξυτελικό άκρο της ERBIN (1241-1265aa) είναι ικανή για να αλληλεπιδράσει με τη SARA. Επειδή τα 25 αμινοξέα που βρήκαμε ότι αλληλεπιδρούν με τη SARA περιλαμβάνονται σε μια ευρύτερη περιοχή που αποτελείται από 110 αμινοξέα (1172-1282aa), η οποία πρόσφατα έχειδειχτεί ότι αλληλεπιδρά με τις SMAD2 και SMAD3 πρωτεΐνες [127, 168], αποφασίσαμε να καθορίσουμε περαιτέρω την περιοχή αλληλεπίδρασης των SMAD2/3 πάνω στην ERBIN. Ο σχεδιασμός των κατασκευών πραγματοποιήθηκε εκ νέου με τη συμβολή προγραμμάτων βιοπληροφορικής (βλ. παραπάνω). Προς μεγάλη μας έκπληξη, η περιοχή της ERBIN με την οποία αλληλεπιδρούν τόσο η SARA όσο και η SMAD2 είναι πανομοιότυπη. Έτσι, η περιοχή αυτή αντιστοιχεί στα αμινοξέα 1241-1265aa. Η περιοχή αλληλεπίδρασης της ERBIN με τη SMAD3 περιλαμβάνει μια μεγαλύτερη περιοχή (1208-1265aa) από αυτή με τη SMAD2. Μια πιθανή εξήγηση για την παραπάνω παρατήρηση είναι η ανάγκη επιπροσθέτων ηλεκτροστατικών επαφών ανάμεσα στην αργινίνη R279 της περιοχής MH2 της SMAD3 και του γλουταμικού E1321 της περιοχής PDZ της ERBIN για την ενίσχυση της αλληλεπίδρασης SMAD3-ERBIN, όπως έχει πρόσφατα προταθεί από μια θεωρητική μελέτη που βασίστηκε στην τεχνική προσομοίωσης μοριακής δυναμικής (molecular dynamics simulations) [175]. Την περιοχή (1208 και 1265aa) που συνδέεται τόσο με τη SARA όσο και με τις SMAD2 και SMAD3 την ονομάσαμε ως περιοχή αλληλεπίδρασης με τη SARA και τις SMAD (SARA and SMAD Interaction Domain, SSID).

Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ίδια, χωρίς συγκεκριμένη τριτοταγή δομή, μικρή περιοχή της ERBIN (SSID) μπορεί να δεσμεύεται τόσο στην πρωτεΐνη SARA όσο και στις SMAD2/3. Ωστόσο, δεν προκαλεί τόση μεγάλη έκπληξη αν αναλογιστούμε ότι πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλές πρωτεΐνες και πρωτεϊνικές περιοχές παρουσιάζουν εγγενή δομική ευελιξία με μεγάλη προσαρμοστική ικανότητα (intrinsically unstructured proteins, IDPs) [176-181]. Οι ευέλικτες αυτές περιοχές έχουν έλλειψη σταθερής τρισδιάστατης δομής, αλλά υιοθετούν μια πολύ καλά καθορισμένη διαμόρφωση όταν αλληλεπιδρούν με μια πρωτεΐνη-στόχο. Η διαμόρφωση αυτή δεν έχει σχέση με την επαγόμενη προσαρμογή (induced fit), η οποία παρατηρείται κατά τη σύνδεση ενζύμου-υποστρώματος. Οι IDPs μπορούν να προβλεφθούν με μεγάλη ακρίβεια από την αλληλουχία της πρωτεΐνης με τη χρήση ποικίλων υπολογιστικών προγραμμάτων μερικά από τα οποία είναι τα εξής: PONDR, FoldIndex, DisEMBL, GLOBPLOT 2 και DISOPRED2 [160, 163, 165, 180, 182]. Έτσι, βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι η παρουσία πρωτεϊνών με παρόμοια χαρακτηριστικά, στα διάφορα πρωτεώματα είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε ανώτερους οργανισμούς, ανερχόμενη σήμερα στο 2% των αρχαίων, 4% των ευβακτηρίων, 33% των ευκαρυωτικών και 70% των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε μονοπάτια μεταγωγής σήματος [165].

Η χρησιμοποίηση IDP πρωτεϊνών στα μονοπάτια της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ/Ακτιβίνη A δεν είναι κάτι το πρωτόγνωρο. Η περιοχή MH2 των πρωτεϊνών SMAD2/3 αλληλεπιδρά με πληθώρα άλλων πρωτεϊνών, μη σχετιζομένων μεταξύ τους σε αμινοξική αλληλουχία και δομή, από υποδοχείς/πρωτεΐνες που είναι αγκυροβολημένες στην κυτταρική μεμβράνη μέχρι μεταγραφικούς παράγοντες. Πράγματι, βιοφυσική (X-κρυσταλλογραφία και πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR) και βιοπληροφορική ανάλυση έχουν προτείνει ότι τουλάχιστον κάποιες από τις αλληλεπιδράσεις αυτές, περιλαμβανομένης αυτής με τη SARA, πραγματοποιούνται από έναν αριθμό υδρόφοβών περιοχών οι οποίες κατανέμονται σε όλη την επιφάνεια του τομέα MH2 και είναι ικανές να αναγνωρίζουν περιοχές πρωτεϊνών που χαρακτηρίζονται από μεγάλη δομική ευελιξία [45, 183]. Ειδικότερα, η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με τις SMAD2/3 μέσω της δομικά ευέλικτης περιοχής SBD (SMAD Binding Domain, SBD), η οποία έρχεται σε επαφή με εκτεταμένες υδρόφοβες περιοχές της περιοχής MH2 και αναδιπλώνεται καθώς συνδέεται με αυτήν. Η παρούσα διατριβή προσθέτει την ERBIN στις κομβικές πρωτεΐνες, η οποία

αλληλεπιδρά με τη SARA και τις SMAD2/3 πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας την ευέλικτη SSID περιοχή.

4.4 Οι ισομορφές της ERBIN και η περιοχή SSID

Στους περισσότερους ανθρώπινους ιστούς, υπάρχουν αρκετές ισομορφές της ERBIN, οι οποίες είναι προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος και πιο συχνά διαφέρουν στην περιοχή ανοδικά ή μέσα στην περιοχή PDZ [115]. Έτσι, από την ισομορφή 7 της πρωτεΐνης ERBIN (ERBIN-v7, Δ1212-1280aa) εκτός από τα τρία πρώτα αμινοξέα απουσιάζει όλο το υπόλοιπο μέρος της περιοχής SSID (1208-1265aa). Με βάση τώρα τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας, η ERBIN-v7 αναμένεται να μην είναι ικανή για αλληλεπίδραση με τις SMAD2/3 πρωτεΐνες. Πράγματι, σε πρόσφατη εργασία, η ισομορφή 7 της ERBIN, δεν αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη SMAD3 [168]. Η παραπάνω παρατήρηση είναι πολύ σημαντική γιατί φαίνεται ότι οι διαφορετικές ισομορφές έχουν και διαφορετικές δυνατότητες να ρυθμίζουν τη μεταγωγή του σήματος από τον TGFβ. Είναι επομένως πολύ πιθανό ότι η διαφορετική έκφραση των ισομορφών της ERBIN μπορεί να συμβάλλει στη διαφορετική δραστηριότητα που παρουσιάζει ο TGFβ σε διαφορετικά είδη κυττάρων ή σε διαφορετικούς ιστούς.

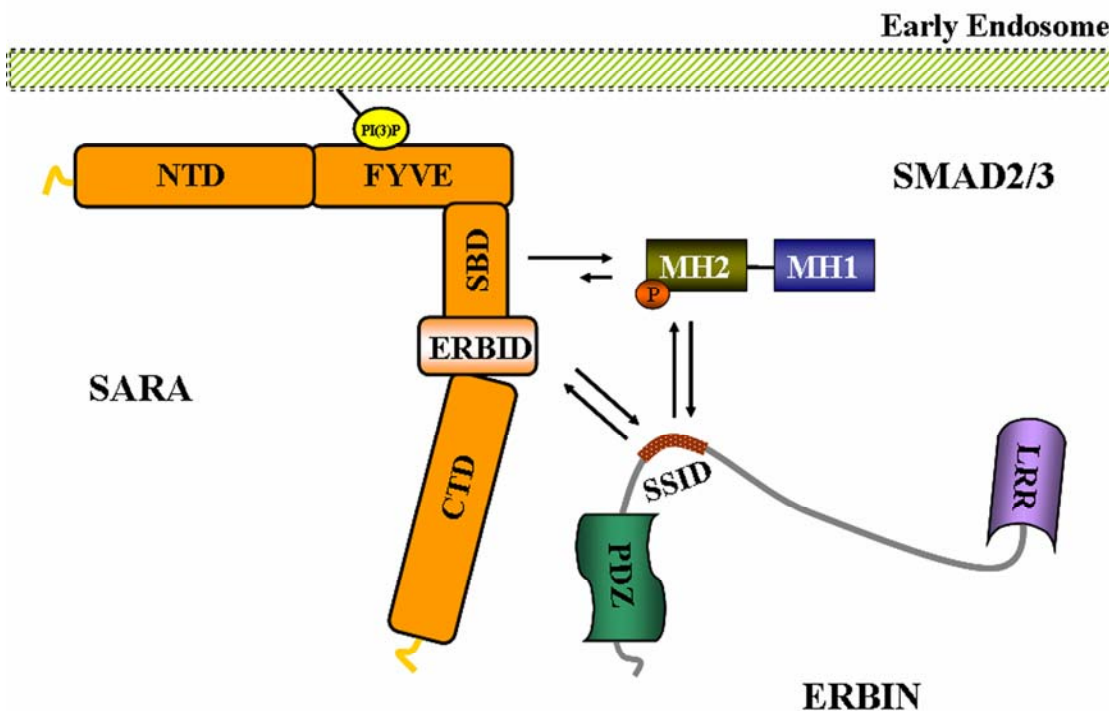
4.5 Η προτεινόμενη λειτουργία της ERBIN στη μεταγωγή του σήματος από TGFβ/Ακτιβίνη Α

Η παρούσα εργασία προσθέτει ένα απροσδόκητο στοιχείο στο μοντέλο της κυτταροπλασματικής συγκράτησης (retention) [168], σύμφωνα με το οποίο η ERBIN συνδέεται με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2/SMAD3, με συνέπεια οι τελευταίες να μην μπορούν να δημιουργήσουν ολιγομερή με τη SMAD4, και με αυτόν τον τρόπο να αναστέλλεται η μετακίνηση τους στον πυρήνα του κυττάρου. Το τελικό συνεπακόλουθο είναι η παρεμπόδιση της από τον TGFβ και της Ακτιβίνης Α εξαρτώμενης μεταγραφικής ενεργοποίησης. Η παρούσα μελέτη παρέχει αποδείξεις ότι η SARA διαδραματίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση της ERBIN με τις SMAD2/3 πρωτεΐνες. Πράγματι, δείξαμε ότι η SARA και οι SMAD2/3 πρωτεΐνες δεσμεύονται στην ERBIN ανεξάρτητα η μια από την άλλη και έτσι ανταγωνίζονται για τη σύνδεση στην περιοχή SSID της ERBIN.

Τα παραπάνω αποτελέσματα προτείνουν ότι οι αποκρίσεις ενός κυττάρου στον TGFβ/Ακτιβίνη Α μπορούν να ρυθμιστούν από τις σχετικές συγκεντρώσεις των SMAD2/3, της SARA και της ERBIN, καθώς επίσης και από τις σταθερές σύνδεσης. Έτσι, ένα κύτταρο με υψηλή αναλογία ERBIN/SARA αναμένεται να εξουδετερώνει την από τον TGFβ ενεργοποίηση των P-SMAD2/3, και επομένως να αναστέλλει τη μετατόπιση τους στον πυρήνα και την μεταγραφική ενεργότητα όπως έχει πρόσφατα δημοσιευτεί [168]. Από την άλλη πλευρά, ένα κύτταρο με υψηλό λόγο συγκέντρωσης SARA/ERBIN αναμένεται να ανταγωνίζεται την ικανότητα που έχει η ERBIN να "συγκρατεί" τις SMAD2/3 στο κυτταρόπλασμα. Μετά τη φωσφορυλίωση των SMAD2/3, υψηλά επίπεδα της SARA μπορεί να είναι ικανά να μεγιστοποιούν τη μετατόπιση των P-SMAD2/3 στον πυρήνα ανταγωνιζόμενα τη σύνδεση τους στην περιοχή SSID της ERBIN (σχήμα 4.1). Πράγματι, η υπερέκφραση του πεπτιδίου ERBIN σε HEK 293 κύτταρα, όχι μόνο αυξάνει τις μεταγραφικές αποκρίσεις στον TGFβ, αλλά επίσης αντιστρέφει την αρνητική επίδραση της υπερέκφρασης της ERBIN στην από τον TGFβ επαγόμενη μεταγραφική απόκριση του υποκινητή CAGA-luc. Παρομοίως, η υπερέκφραση της SARA επίσης αντιστρέφει την αναστολή που προκαλεί η υπερέκφραση της ERBIN στην από τον TGFβ επαγόμενη μεταγραφική ενεργοποίηση του CAGA-luc. Ο συνεντοπισμός της SARA και της ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα προτείνει ότι οι παραπάνω ρυθμίσεις μπορεί να λαμβάνουν χώρα, τουλάχιστον εν μέρει, σε αυτό το κυτταρικό διαμέρισμα.

Σε μια πολύ πρόσφατη μελέτη, η υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης ERBIN στα επιθηλιακά κύτταρα βρέθηκε να είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει τη διαφορική απόκριση στον TGFβ σε αντιδιαστολή με τα ινοβλαστικά κύτταρα στα οποία τα επίπεδα της ERBIN είναι πολύ χαμηλά. Ειδικότερα, στα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία έχουν αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης ERBIN, η τελευταία σχηματίζει ετεροδιμερές με την πρωτεΐνη MERLIN [71]. Στην ετεροδιμερική της μορφή η MERLIN προστατεύεται από την PAK2-εξαρτώμενη φωσφορυλίωση με συνεπακόλουθο να συνεχίζει να έχει ογκοκατασταλτική δραστηριότητα [71]. Επειδή ο TGFβ ενεργοποιεί την PAK2 κινάση, το τελικό αποτέλεσμα είναι ότι ο TGFβ έχει αντιμιτωτική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα. Αντίθετα, στα μεσεγχυματικά κύτταρα, όπου τα επίπεδα της ERBIN είναι χαμηλά, δε δημιουργείται το ετεροδιμερές ERBIN/MERLIN, με αποτέλεσμα η MERLIN να

φωσφορυλιώνεται από την PAK2 και να αναστέλλεται η ογκοκατασταλτική της δραστηριότητα. Η απενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής δράσης της MERLIN επιτρέπει στους ινοβλάστες να πολλαπλασιάζονται ανεξέλεγκτα ύστερα από χορήγηση TGFβ [71]. Επομένως, το επίπεδο της ERBIN σε μια δεδομένη κυτταρική σειρά καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την έκβαση της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ ρυθμίζοντας την ανταπόκριση τόσο στην ενεργοποίηση των SMAD2/3 [168] όσο και στο SMAD-ανεξάρτητο μονοπάτι της PAK2 [71]. Η παρούσα εργασία δείχνει ότι ο ρυθμιστικός ρόλος των επιπέδων έκφρασης της ERBIN στην SMAD2/3-εξαρτώμενη μεταγραφή επηρεάζεται από τα επίπεδα της SARA όντας μέρος μιας περισσότερο πολύπλοκης διασύνδεσης μεταξύ των συγκεντρώσεων της SARA, των SMAD2/3 και της ERBIN και των σταθερών διάστασης των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων.



Σχήμα 4.1: Προτεινόμενη λειτουργία της πρωτεΐνης ERBIN στη μεταγωγή του σήματος από TGFβ/Ακτιβίνη A. Η εντόπιση της ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία της πρωτεΐνης SARA στο παραπάνω κυτταρικό διαμέρισμα. Η πρωτεΐνη SARA ανταγωνίζεται τις SMAD2/3 για τη δέσμευση στην ERBIN. Επειδή η ERBIN δεσμεύει και συγκρατεί τις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2/3 στο κυτταρόπλασμα (διαμέσου σύνδεσης στην περιοχή SSID) και επομένως αναστέλλει την SMAD2/3-εξαρτώμενη μεταγραφή, η υπερέκφραση της SARA

ή του πεπτιδίου ERBID αντιστρέφει την ανασταλτική δράση της ERBIN στην από τις SMAD2/3-εξαρτώμενη μεταγραφή. Έτσι, η SARA α) διασφαλίζει την ορθή παρουσίαση των SMAD2/3 για φωσφορυλίωση από τους υποδοχείς TGFβ/Ακτιβίνη Α και β) διευκολύνει τη μετακίνηση των φωσφορυλιωμένων SMAD2/3 στον πυρήνα δρώντας ανταγωνιστικά ως προς την κυτταροπλασματική συγκράτηση των φωσφορυλιωμένων SMAD πρωτεϊνών που προκαλείται από την παρουσία της ERBIN. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η απόκριση των κυττάρων στον TGFβ/Ακτιβίνη Α μπορεί να ρυθμίζεται από μια περισσότερο πολύπλοκη διασύνδεση μεταξύ των συγκεντρώσεων της SARA, της ERBIN και των SMAD2/3 πρωτεϊνών, καθώς επίσης και των σταθερών διάστασης των αλληλεπιδράσεών τους. SBD, SMAD-binding domain; FYVE, Fab1, YotB, Vac1p, and EEA1; SSID, SARA and SMAD Interacting Domain; ERBID, ERBIN Binding Domain; LRR, Leucine Rich Repeat; MH1, MAD homology 1; MH2, MAD homology 2; PDZ, PSD-95, Dlg, and ZO-1; PI(3)P, Phosphatidylinositol (3) phosphate; CTD, COOH-terminal domain; NTD, NH2-terminal domain.

4.6 ERBIN και TGFβ/Ακτιβίνη Α-Προοπτικές και προκλήσεις

Φαίνεται λοιπόν ότι οι συγκεντρώσεις της SARA, των SMAD2/3 και της ERBIN, αλλά και της σχετικής συγγενειας των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ/Ακτιβίνη Α. Είναι λοιπόν εξαιρετικά σημαντικό να ποσοτικοποιηθούν οι σταθερές διάστασης των συμπλόκων μεταξύ της SARA, της ERBIN και των SMAD2/3 με διάφορες τεχνικές όπως η θερμιδομετρία ισόθερμης τιτλοδότησης (ITC, Isothermal titration calorimetry) και η φασματοσκοπία συσχετισμού φθορισμού (FCS, Fluorescence Correlation Spectroscopy). Επιπλέον, εξίσου σημαντικό είναι να διερευνηθούν οι μηχανισμοί ρύθμισης των επιπέδων τους στα κύτταρα. Για παράδειγμα, η ERBIN επάγεται τόσο από προφλεγμονώδη ερεθίσματα διαμέσου του παράγοντα νέκρωσης των όγκων TNFα (tumor necrosis factor alpha) [140] όσο και από την υπερέκφραση της πρωτεΐνης BRCA1 [184]. Υπερέκφραση της ERBIN παρατηρείται επίσης κατά τη διάρκεια της καρκινογένεσης, όπως έχει αναφερθεί να συμβαίνει στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας [185], αλλά και σε *in vitro* μοντέλα τόσο του καρκίνου του παχέος εντέρου όσο και του γλοιοβλαστώματος (glioblastoma) [186]. Προφανώς, η υπερέκφραση της ERBIN στον καρκίνο οδηγεί στην αναστολή της αντιμτωτικής δράσης του TGFβ συμμετέχοντας στη διαδικασία της κακοήθους εξαλλαγής. Περαιτέρω μελέτες αναφορικά με τη ρύθμιση των

επιπέδων της ERBIN, αλλά και της SARA, για την οποία ουσιαστικά δεν υπάρχει σχετική βιβλιογραφία, θα βοηθήσουν στην περαιτέρω κατανόηση των μηχανισμών ρύθμισης της μεταγωγής του σήματος από τον TGFβ/Ακτιβίνη A, αλλά και του ρόλου τους στη παθογένεση ασθενειών του ανθρώπου, όπως ο καρκίνος.

Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι πολλά κατάλοιπα μέσα ή και πολύ κοντά στην περιοχή SSID μπορούν δυνητικά να φωσφορυλιωθούν, όπως προβλέπει και το πρόγραμμα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιεί τον αλγόριθμο DEPP (<http://www.pondr.com/pondr-tut2.html>). Πράγματι, η φωσφορυλίωση της SSID περιοχής σε κατάλοιπα τυροσίνης έχει επιβεβαιωθεί πειραματικά [187] σε ένα μεγάλης κλίμακας πείραμα φώσφο-πρωτεομικής ανάλυσης, όπου χρησιμοποιήθηκαν ένας πολύ μεγάλος αριθμός όγκων τόσο από μικροκυτταρικό όσο και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC, non-small cell lung cancer). Το αναδυόμενο ερώτημα είναι αν η φωσφορυλίωση στην περιοχή SSID μπορεί με κάποιο τρόπο να ρυθμίζει τη συγγένεια της με τη SARA ή και τη σύνδεση με τις SMAD2/3 πρωτεΐνες. Ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της περιοχής SSID στη ρύθμιση της συγγένειας της αλληλεπίδρασης της ERBIN με τη SARA και τις SMAD2/3 πρωτεΐνες χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

5.1 Επιλογή χρήσιμων ιστοσελίδων

1. <http://au.expasy.org/>
2. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>
3. <http://heal-l.physics.auth.gr/cgi-bin/alphabetical=greek&letter=D>
4. <http://www.mblab.gla.ac.uk/~julian/Dict.html>
5. www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/Protein/index.html
6. <http://smart.embl-heidelberg.de/>
7. <http://www.cbs.dtu.dk/databases/PhosphoBase/predict/predform.php>
8. <http://bind.ca/Action?pg=3001&identifier=bindid&idsearch=178285>
9. http://www.biocarta.com/pathfiles/h_RacCycDPathway.asp
10. <http://www.ebi.ac.uk/>
11. <http://www.whfreeman.com/lodish4e>
12. <http://www.fermentas.com/>
13. <http://pawsonlab.mshri.on.ca>
14. <http://dis.embl.de/>
15. <http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>
16. <http://www.pondr.com/pondr-tut2.html>
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

5.2 Επιλογή χρήσιμων βιβλίων

1. Λεξικό της νέας ελληνικής γλώσσας (Γ.Μπαμπινιώτη)
2. «Αγγλοελληνική Ορολογία Βιοχημείας, Μοριακής Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας» της Ελληνικής Βιοχημικής & Βιοφυσικής Εταιρείας και της Ελληνικής Εταιρείας Βιοτεχνολογίας.
3. *Elsevier's Dictionary of Medicine and Biology: in English, Greek, German, Italian and Latin*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ TGFβ/ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α ΚΑΙ ΠΡΩΙΜΑ ΕΝΔΟΣΩΜΑΤΑ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ SARA

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΣΦΛΩΜΟΥ

Μέλη της οικογένειας TGFβ/Ακτιβίνης Α μετάγουν σήματα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχέων τύπου I και II με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης. Ο συνεχώς ενεργός υποδοχέας τύπου II φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τους διαμεσολαβητές SMAD2 και SMAD3. Οι τελευταίοι συνδέονται με τη SMAD4 και το σύμπλοκο που δημιουργείται μετατοπίζεται στο πυρήνα του κυττάρου όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Η πρωτεΐνη SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή αφού στρατολογεί και παρουσιάζει τη SMAD2 και τη SMAD3 στους τύπου I υποδοχείς για φωσφορυλίωση. Η SARA όχι μόνο εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, αλλά και η περιοχή FYVE (Fab1, YOTB/ZK632.12, Yac1, και EEA1), μέσω της σύνδεσης της με το λιπίδιο PI(3)P που είναι εμπλουτισμένο στο διαμέρισμα αυτό, είναι αρκετή για τη στόχευσή της στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιώντας το σύστημα δύο υβριδίων, ταυτοποιήσαμε την ERBIN (ERBB2 Interacting Protein) ως μια πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με τη SARA. Η αλληλεπίδραση αυτή επιβεβαιώθηκε με βιοχημικές τεχνικές, όπως δοκιμασίες καταβύθισης, πειράματα ανοσοκατακρήμνισης και επίπλευση μεμβρανικών κλασμάτων σε βαθμίδωση σουκρόζης. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία, βρήκαμε ότι η υπερέκφραση της GFP-SARA είναι ικανή να στρατολογήσει την ERBIN στα πρώιμα ενδοσώματα, αφού οδήγησε σε σημαντικό βαθμό συνεντοπισμού μεταξύ των δυο πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, εστίασαμε την προσοχή μας στη μοριακή χαρτογράφηση, δηλαδή στην ανεύρεση των ελάχιστων πρωτεϊνικών περιοχών που είναι υπεύθυνες

για την αλληλεπίδραση. Για το σκοπό αυτό, δημιουργήσαμε αλληλεπικαλυπτόμενες πλασμιδιακές κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν σε μια σειρά πειραμάτων καταβύθισης από τα οποία προκύπτει ότι η πρωτεΐνη SARA αλληλεπιδρά με την ERBIN χρησιμοποιώντας μια περιοχή, την οποία την ονομάσαμε ERBID (ERBIN Binding Domain) και η οποία για πρώτη φορά ταυτοποιείται να αλληλεπιδρά με τη SARA. Από την άλλη πλευρά, η πρωτεΐνη ERBIN συνδέεται με τη SARA μέσω της ίδιας περιοχής (aa 1208-1265) με την οποία αλληλεπιδρούν επίσης οι R-SMADs (SMAD2 και SMAD3). Την παραπάνω περιοχή την ονομάσαμε SSID (SARA and SMAD Interacting Domain). Επιπλέον, διαλευκάναμε ότι η ERBIN μπορεί να αλληλεπιδρά όχι μόνο με τις μη-φωσφορυλιωμένες, αλλά και με τις φωσφορυλιωμένες μορφές των SMAD2/3 πρωτεϊνών, μορφές με τις οποίες δεν αλληλεπιδρά η SARA. Έτσι, η ERBIN είναι σε θέση να κατακρατεί τις φωσφορυλιωμένες SMAD2/3 στο κυτταρόπλασμα αναστέλλοντας τη μετακίνηση τους στον πυρήνα και τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων-στόχων.

Με βάση το γεγονός ότι η SARA και οι SMAD2/3 δεσμεύονται στην ίδια περιοχή της ERBIN, διερευνήσαμε αν αυτή η σύνδεση είναι ανταγωνιστική. Δείξαμε λοιπόν, ότι οι SMAD2/3 πρωτεΐνες και η SARA, που αλληλεπιδρούν με την ERBIN ανεξάρτητα η μια από την άλλη, ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στην περιοχή SSID της ERBIN. Σε συμφωνία, η υπερέκφραση της SARA ή του πολυπεπτιδίου ERBID αντιστρέφει την ανασταλτική επίδραση της ERBIN στην από τις πρωτεΐνες SMAD2/3-εξαρτώμενη μεταγραφή.

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προτείνουν ότι η SARA, εκτός από την παρουσίαση των SMAD2/3 για φωσφορυλίωση από τους υποδοχείς του TGFβ ή της Ακτιβίνης Α, διευκολύνει επίσης τη μετακίνηση των φωσφορυλιωμένων SMAD2/3 στον πυρήνα δρώντας ανταγωνιστικά ως προς την κατακράτηση στο κυτταρόπλασμα των φωσφορυλιωμένων SMAD2/3 πρωτεϊνών που προκαλεί η παρουσία της ERBIN. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η απόκριση των κυττάρων στον TGFβ ή την Ακτιβίνη Α μπορεί να ρυθμίζεται από μια πολύπλοκη διασύνδεση που εξαρτάται από τις σχετικές συγκεντρώσεις της SARA, της ERBIN και των SMAD2/3 πρωτεϊνών, καθώς επίσης και των σταθερών διάστασης των αλληλεπιδράσεών τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ-SUMMARY

SIGNAL TRANSDUCTION BY TGF β /ACTIVIN A AND EARLY ENDOSOMES: ROLE OF SARA PROTEIN

**DOCTORATE THESIS BY
GEORGE SFLOMOS**

Members of the TGF β /Activin A family transduce their signals via serine/threonine transmembrane receptors type I and II. Constitutively active type II receptors phosphorylate type I receptors, which in turn activate R-SMADs (SMAD2 and SMAD3) at their C-terminal SSXS motifs. The R-Smads, in turn, oligomerize with the common partner SMAD4 and translocate to the nucleus where they bind to the promoters of a large variety of target genes and regulate their expression in a positive or negative manner. SARA (SMAD Anchor for Receptor Activation) plays an important role in this process, recruiting SMAD2/3 to the vicinity of the receptor for phosphorylation. SARA harbours a FYVE domain (Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1, και EEA1), which targets the protein to the endocytic compartment via binding to PI(3)P, which is enriched in the early endosome.

In the present study, using yeast-two hybrid system, we identified ERBIN (ERBB2 Interacting Protein) as a novel SARA interacting protein. The interaction was confirmed using biochemical approaches, such as GST pull down assays, immunoprecipitation experiments and sucrose flotation experiments. Moreover, using confocal microscopy, we found that over-expression of GFP-SARA recruits ERBIN to the early endocytic compartment.

To define the domains of SARA and ERBIN responsible for the interaction, we generated a series of deletion mutants of both proteins and tested their interaction. To this end, we found that SARA interacts with ERBIN via a domain, which we called ERBID (ERBIN Binding Domain). ERBIN associated with SARA via a 57 aa domain. ERBIN was recently shown to bind and segregate phosphorylated SMAD2/3 in the cytoplasm, thereby inhibiting SMAD2/3-dependent

transcription. We further mapped the domain of ERBIN, which interacted with SMAD2/3 and found that SMAD2/3 and SARA bind to the same domain of ERBIN, an area we called SSID (SARA and SMAD Interacting Domain). Moreover, we found that ERBIN interacts with non-phosphorylated and phosphorylated SMAD2/3 proteins. Thus, ERBIN may retain phosphorylated SMAD2/3 in the cytoplasm inhibiting the translocation to the nucleus and regulating transcription of target genes.

Due to the fact that SARA and SMAD2/3 bind to the same domain of ERBIN, we addressed whether this binding was competitive. We showed that SARA and SMAD2/3 compete with each other for their binding to the SSID domain of ERBIN. In accordance, SARA or ERBIN overexpression, reverts the inhibitory effect of ERBIN on SMAD2/3 dependent translation.

In conclusion, we have identified ERBIN as a novel SARA-interacting protein that can be recruited by the latter to early endosomes, where SARA predominantly resides. SARA binds to ERBIN using a novel domain, which we have called ERBIN-Interacting Domain (ERBINID). ERBIN interacts with SARA via a domain that interacts also with SMAD2 and SMAD3 (aa 1208-1265, SSID). As a consequence, SARA competes with SMAD2/3 for binding to ERBIN. As ERBIN binds and segregates phosphorylated SMAD2/3 in the cytoplasm, thereby inhibiting SMAD2/3-dependent transcription, over-expression of SARA or ERBINID reverses the inhibitory effect of ERBIN on SMAD2/3-dependent transcription. Thus, SARA not only ensures proper presentation of SMAD2/3 for phosphorylation by TGF β /Activin A receptors, but also facilitates the nuclear transfer of phosphorylated SMAD2/3 by out-competing their cytoplasmic segregation by ERBIN. Our data suggest that the response of cells to TGF β /Activin A might be regulated by a complex interplay between the relative concentrations of SARA, ERBIN, and SMAD2/3, as well as their binding affinities.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Massague J. TGF-beta signal transduction. Annual review of biochemistry. 1998;67:753-91.
- [2] Todaro GJ, De Larco JE. Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. Cancer research. 1978 Nov;38(11 Pt 2):4147-54.
- [3] Anzano MA, Roberts AB, Smith JM, Sporn MB, De Larco JE. Sarcoma growth factor from conditioned medium of virally transformed cells is composed of both type alpha and type beta transforming growth factors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1983 Oct;80(20):6264-8.
- [4] Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1981 Sep;78(9):5339-43.
- [5] Massague J. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. J Biol Chem. 1990 Dec 15;265(35):21393-6.
- [6] Roberts AB, Sporn MB. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF-beta. Am Rev Respir Dis. 1989;140(4):1126-8.
- [7] Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. Nature reviews. 2007 Dec;8(12):970-82.
- [8] ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. Nature reviews. 2007 Nov;8(11):857-69.
- [9] Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. Genes & development. 2005 Dec 1;19(23):2783-810.
- [10] Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.
- [11] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell. 2003 Jun 13;113(6):685-700.
- [12] Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, et al. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. Nature. 1985;316(6030):701-5.
- [13] de Martin R, Haendler B, Hofer-Warbinek R, Gaugitsch H, Wrann M, Schlusener H, et al. Complementary DNA for human glioblastoma-derived T cell suppressor factor, a novel member of the transforming growth factor-beta gene family. Embo J. 1987;6(12):3673-7.
- [14] Derynck R LP, Lee A, Wen D, Tamm J, Graycar JL, Rhee L, Mason AJ, Miller DA, Coffey RJ, et al. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. EMBO J. 1988 Dec 1;12(7):3737-43.
- [15] Jennings JC MS, Linkhart TA, Widstrom R, Baylink DJ. Comparison of the biological actions of TGF beta-1 and TGF beta-2: differential activity in endothelial cells. J Cell Physiol. 1988 1988;137(1):167-72.
- [16] de Caestecker M. The transforming growth factor-beta superfamily of receptors. Cytokine & growth factor reviews. 2004 Feb;15(1):1-11.

- [17] Sun PD, Davies DR. The cystine-knot growth-factor superfamily. Annual review of biophysics and biomolecular structure. 1995;24:269-91.
- [18] Vale W, Rivier J, Vaughan J, McClintock R, Corrigan A, Woo W, et al. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. Nature. 1986 Jun 19-25;321(6072):776-9.
- [19] Thomsen G, Woolf T, Whitman M, Sokol S, Vaughan J, Vale W, et al. Activins are expressed early in Xenopus embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. Cell. 1990 Nov 2;63(3):485-93.
- [20] Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. Nature. 1986 Jun 19-25;321(6072):779-82.
- [21] Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. Cell. 1992 Feb 21;68(4):673-82.
- [22] Petraglia F, Vaughan J, Vale W. Inhibin and activin modulate the release of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone from cultured human placental cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989 Jul;86(13):5114-7.
- [23] Schultz-Cherry S, Ribeiro S, Gentry L, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. The Journal of biological chemistry. 1994 Oct 28;269(43):26775-82.
- [24] Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, et al. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. Cell. 1998 Jun 26;93(7):1159-70.
- [25] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.
- [26] Laiho M, Weis FM, Boyd FT, Ignatz RA, Massague J. Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II. The Journal of biological chemistry. 1991 May 15;266(14):9108-12.
- [27] ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling; 2004.
- [28] Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. EMBO J. 2000;19(8):1745-54.
- [29] Mathews LS, Vale WW. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. Cell. 1991 Jun 14;65(6):973-82.
- [30] Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massague J. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. Cell. 1992 Jan 10;68(1):97-108.
- [31] Tsuchida K, Mathews LS, Vale WW. Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Dec 1;90(23):11242-6.

- [32] Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M, Wrana JL. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Oct 2;273(40):25628-36.
- [33] Attisano L, Wrana JL, Montalvo E, Massague J. Activation of signalling by the activin receptor complex. *Molecular and cellular biology*. 1996 Mar;16(3):1066-73.
- [34] Wrana JL, Carcamo J, Attisano L, Cheifetz S, Zentella A, Lopez-Casillas F, et al. The type II TGF-beta receptor signals diverse responses in cooperation with the type I receptor. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1992;57:81-6.
- [35] Whitman M. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes & development*. 1998 Aug 15;12(16):2445-62.
- [36] Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cellular signalling*. 2002 Dec;14(12):977-88.
- [37] Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *Journal of cell science*. 2001 Dec;114(Pt 24):4359-69.
- [38] Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massague J. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature*. 1997 Jul 3;388(6637):82-7.
- [39] Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*. 1997 Jul 17;388(6639):304-8.
- [40] Pierreux CE, Nicolas FJ, Hill CS. Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Molecular and cellular biology*. 2000 Dec;20(23):9041-54.
- [41] Kurisaki A, Kose S, Yoneda Y, Heldin CH, Moustakas A. Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Molecular biology of the cell*. 2001 Apr;12(4):1079-91.
- [42] Xiao Z, Liu X, Lodish HF. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Aug 4;275(31):23425-8.
- [43] Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature*. 1996 Oct 31;383(6603):832-6.
- [44] Chen X, Weisberg E, Fridmacher V, Watanabe M, Naco G, Whitman M. Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature*. 1997 Sep 4;389(6646):85-9.
- [45] Wu G, Chen YG, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, et al. Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science (New York, NY)*. 2000 Jan 7;287(5450):92-7.
- [46] Liu F, Hata A, Baker JC, Doody J, Carcamo J, Harland RM, et al. A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature*. 1996 Jun 13;381(6583):620-3.
- [47] Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massague J. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes & development*. 1999 Apr 1;13(7):804-16.

- [48] Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*. 2000 Dec;6(6):1365-75.
- [49] 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. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Apr 20;276(16):12477-80.
- [50] de Caestecker MP, Yahata T, Wang D, Parks WT, Huang S, Hill CS, et al. The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jan 21;275(3):2115-22.
- [51] Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell*. 1998 Dec 11;95(6):779-91.
- [52] Dong C, Li Z, Alvarez R, Jr., Feng XH, Goldschmidt-Clermont PJ. Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity. *Molecular cell*. 2000 Jan;5(1):27-34.
- [53] Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K. Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May 25;276(21):17871-7.
- [54] Schmierer B, Hill CS. Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads. *Molecular and cellular biology*. 2005 Nov;25(22):9845-58.
- [55] Xu L, Kang Y, Col S, Massague J. Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Molecular cell*. 2002 Aug;10(2):271-82.
- [56] Jayaraman L, Massague J. Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Dec 29;275(52):40710-7.
- [57] Randall RA, Howell M, Page CS, Daly A, Bates PA, Hill CS. Recognition of phosphorylated-Smad2-containing complexes by a novel Smad interaction motif. *Molecular and cellular biology*. 2004 Feb;24(3):1106-21.
- [58] Wu JW, Hu M, Chai J, Seoane J, Huse M, Li C, et al. Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Molecular cell*. 2001 Dec;8(6):1277-89.
- [59] Wicks SJ, Haros K, Maillard M, Song L, Cohen RE, Dijke PT, et al. The deubiquitinating enzyme UCH37 interacts with Smads and regulates TGF-beta signalling. *Oncogene*. 2005 Dec 1;24(54):8080-4.
- [60] Simonsson M, Heldin CH, Ericsson J, Gronroos E. The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Jun 10;280(23):21797-803.
- [61] Kume S, Haneda M, Kanasaki K, Sugimoto T, Araki S, Isshiki K, et al. SIRT1 inhibits transforming growth factor beta-induced apoptosis in glomerular mesangial cells via Smad7 deacetylation. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Jan 5;282(1):151-8.
- [62] Kang JS, Saunier EF, Akhurst RJ, Derynck R. The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nature cell biology*. 2008 Jun;10(6):654-64.

- [63] Koinuma D, Shinozaki M, Komuro A, Goto K, Saitoh M, Hanyu A, et al. Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *The EMBO journal*. 2003 Dec 15;22(24):6458-70.
- [64] Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov;3(11):807-21.
- [65] Rahimi RA, Leof EB. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *Journal of cellular biochemistry*. 2007 Oct 15;102(3):593-608.
- [66] Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science (New York, NY)*. 2005 Mar 11;307(5715):1603-9.
- [67] Lee MK, Pardoux C, Hall MC, Lee PS, Warburton D, Qing J, et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *The EMBO journal*. 2007 Sep 5;26(17):3957-67.
- [68] Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Molecular cell*. 2008 Sep 26;31(6):918-24.
- [69] Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N, et al. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature cell biology*. 2008 Oct;10(10):1199-207.
- [70] Wilkes MC, Murphy SJ, Garamszegi N, Leof EB. Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Molecular and cellular biology*. 2003 Dec;23(23):8878-89.
- [71] Wilkes MC, Repellin CE, Hong M, Bracamonte M, Penheiter SG, Borg JP, et al. Erbin and the NF2 tumor suppressor Merlin cooperatively regulate cell-type-specific activation of PAK2 by TGF-beta. *Developmental cell*. 2009 Mar;16(3):433-44.
- [72] Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Sep 27;271(39):24048-54.
- [73] Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*. 1998 Jul 30;394(6692):432-3.
- [74] Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, et al. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*. 1998 Jul 30;394(6692):494-8.
- [75] Kutateladze TG, Ogburn KD, Watson WT, de Beer T, Emr SD, Burd CG, et al. Phosphatidylinositol 3-phosphate recognition by the FYVE domain. *Molecular cell*. 1999 Jun;3(6):805-11.
- [76] Mao Y, Nickitenko A, Duan X, Lloyd TE, Wu MN, Bellen H, et al. Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell*. 2000 Feb 18;100(4):447-56.
- [77] Patki V, Virbasius J, Lane WS, Toh BH, Shpetner HS, Corvera S. Identification of an early endosomal protein regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Jul 8;94(14):7326-30.

- [78] Komada M, Soriano P. Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes & development*. 1999 Jun 1;13(11):1475-85.
- [79] Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, et al. GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *The Journal of cell biology*. 2004 Jan 19;164(2):291-300.
- [80] Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Developmental cell*. 2009 Mar;16(3):329-43.
- [81] Bennett D, Alphey L. PP1 binds Sara and negatively regulates Dpp signaling in *Drosophila melanogaster*. *Nature genetics*. 2002 Aug;31(4):419-23.
- [82] Bokel C, Schwabedissen A, Entchev E, Renaud O, Gonzalez-Gaitan M. Sara endosomes and the maintenance of Dpp signaling levels across mitosis. *Science (New York, NY)*. 2006 Nov 17;314(5802):1135-9.
- [83] Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nature reviews*. 2001 Oct;2(10):721-30.
- [84] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews*. 2001 Feb;2(2):107-17.
- [85] Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *The EMBO journal*. 1994 Sep 15;13(18):4269-77.
- [86] Baass PC, Di Guglielmo GM, Authier F, Posner BI, Bergeron JJ. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends in cell biology*. 1995 Dec;5(12):465-70.
- [87] Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Current opinion in cell biology*. 2004 Aug;16(4):400-6.
- [88] Wiley HS, Burke PM. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2001 Jan;2(1):12-8.
- [89] Zwaagstra JC, Kassam Z, O'Connor-Mccourt MD. Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors: cooperativity between the types I, II, and III receptors and modulation at the cell surface. *Experimental cell research*. 1999 Nov 1;252(2):352-62.
- [90] Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology*. 2003 May;5(5):410-21.
- [91] Hayes S, Chawla A, Corvera S. TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *The Journal of cell biology*. 2002 Sep 30;158(7):1239-49.
- [92] Itoh F, Divecha N, Brocks L, Oomen L, Janssen H, Calafat J, et al. The FYVE domain in Smad anchor for receptor activation (SARA) is sufficient for localization of SARA in early endosomes and regulates TGF-beta/Smad signalling. *Genes Cells*. 2002 Mar;7(3):321-31.
- [93] Panopoulou E, Gillooly DJ, Wrana JL, Zerial M, Stenmark H, Murphy C, et al. Early endosomal regulation of Smad-dependent signaling in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002 May 17;277(20):18046-52.

- [94] Hu Y, Chuang JZ, Xu K, McGraw TG, Sung CH. SARA, a FYVE domain protein, affects Rab5-mediated endocytosis. *Journal of cell science*. 2002 Dec 15;115(Pt 24):4755-63.
- [95] Lin HK, Bergmann S, Pandolfi PP. Cytoplasmic PML function in TGF-beta signalling. *Nature*. 2004 Sep 9;431(7005):205-11.
- [96] Le Roy C, Wrana JL. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nature reviews*. 2005 Feb;6(2):112-26.
- [97] Topper JN, Cai J, Qiu Y, Anderson KR, Xu YY, Deeds JD, et al. Vascular MADs: two novel MAD-related genes selectively inducible by flow in human vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 Aug 19;94(17):9314-9.
- [98] Itoh S, Landstrom M, Hermansson A, Itoh F, Heldin CH, Heldin NE, et al. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Oct 30;273(44):29195-201.
- [99] Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature*. 1997 Oct 9;389(6651):631-5.
- [100] Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes & development*. 1998 Jan 15;12(2):186-97.
- [101] Lin X, Liang YY, Sun B, Liang M, Shi Y, Brunicardi FC, et al. Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription. *Molecular and cellular biology*. 2003 Dec;23(24):9081-93.
- [102] Zhang Y, Chang C, Gehling DJ, Hemmati-Brivanlou A, Derynck R. Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Jan 30;98(3):974-9.
- [103] Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Current opinion in cell biology*. 2007 Apr;19(2):176-84.
- [104] Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*. 2004 Mar 15;23(11):2071-8.
- [105] Gronroos E, Hellman U, Heldin CH, Ericsson J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Molecular cell*. 2002 Sep;10(3):483-93.
- [106] Bennett D, Szoor B, Gross S, Vereshchagina N, Alpey L. Ectopic expression of inhibitors of protein phosphatase type 1 (PP1) can be used to analyze roles of PP1 in *Drosophila* development. *Genetics*. 2003 May;164(1):235-45.
- [107] 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Aug 30;102(35):12437-42.
- [108] Lin F, Morrison JM, Wu W, Worman HJ. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Human molecular genetics*. 2005 Feb 1;14(3):437-45.
- [109] Pan D, Estevez-Salmeron LD, Stroschein SL, Zhu X, He J, Zhou S, et al. The integral inner nuclear membrane protein MAN1 physically interacts with the R-Smad

- proteins to repress signaling by the transforming growth factor- β superfamily of cytokines. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Apr 22;280(16):15992-6001.
- [110] Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF- β signalling through a direct interaction with Smad3. *Nature cell biology*. 2004 Apr;6(4):358-65.
- [111] He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell*. 2006 Jun 2;125(5):929-41.
- [112] Massague J, Gomis RR. The logic of TGF β signaling. *FEBS letters*. 2006 May 22;580(12):2811-20.
- [113] Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Itoh F, Itoh S, Heldin CH, ten Dijke P. Smad7 and protein phosphatase 1 α are critical determinants in the duration of TGF- β /ALK1 signaling in endothelial cells. *BMC cell biology*. 2006;7:16.
- [114] Sammar M, Stricker S, Schwabe GC, Sieber C, Hartung A, Hanke M, et al. Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2. *Genes Cells*. 2004 Dec;9(12):1227-38.
- [115] Favre B, Fontao L, Koster J, Shafaatian R, Jaunin F, Saurat JH, et al. The hemidesmosomal protein bullous pemphigoid antigen 1 and the integrin β 4 subunit bind to ERBIN. Molecular cloning of multiple alternative splice variants of ERBIN and analysis of their tissue expression. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Aug 31;276(35):32427-36.
- [116] Borg JP, Marchetto S, Le Bivic A, Ollendorff V, Jaulin-Bastard F, Saito H, et al. ERBIN: a basolateral PDZ protein that interacts with the mammalian ERBB2/HER2 receptor. *Nature cell biology*. 2000 Jul;2(7):407-14.
- [117] Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1-29.
- [118] Bilder D, Birnbaum D, Borg JP, Bryant P, Huigbretse J, Jansen E, et al. Collective nomenclature for LAP proteins. *Nature cell biology*. 2000 Jul;2(7):E114.
- [119] Legouis R, Jaulin-Bastard F, Schott S, Navarro C, Borg JP, Labouesse M. Basolateral targeting by leucine-rich repeat domains in epithelial cells. *EMBO Rep*. 2003 Nov;4(11):1096-102.
- [120] Roche JP, Packard MC, Moeckel-Cole S, Budnik V. Regulation of synaptic plasticity and synaptic vesicle dynamics by the PDZ protein Scribble. *J Neurosci*. 2002 Aug 1;22(15):6471-9.
- [121] Phillips HM, Rhee HJ, Murdoch JN, Hildreth V, Peat JD, Anderson RH, et al. Disruption of planar cell polarity signaling results in congenital heart defects and cardiomyopathy attributable to early cardiomyocyte disorganization. *Circulation research*. 2007 Jul 20;101(2):137-45.
- [122] Montcouquiol M, Kelley MW. Planar and vertical signals control cellular differentiation and patterning in the mammalian cochlea. *J Neurosci*. 2003 Oct 15;23(28):9469-78.
- [123] Lahuna O, Quellari M, Achard C, Nola S, Meduri G, Navarro C, et al. Thyrotropin receptor trafficking relies on the hScrib- β PIX-GIT1-ARF6 pathway. *The EMBO journal*. 2005 Apr 6;24(7):1364-74.

- [124] Takizawa S, Nagasaka K, Nakagawa S, Yano T, Nakagawa K, Yasugi T, et al. Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli. *Genes Cells*. 2006 Apr;11(4):453-64.
- [125] Audebert S, Navarro C, Nourry C, Chasserot-Golaz S, Lecine P, Bellaiche Y, et al. Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Curr Biol*. 2004 Jun 8;14(11):987-95.
- [126] Walikonis RS, Oguni A, Khorosheva EM, Jeng CJ, Asuncion FJ, Kennedy MB. Densin-180 forms a ternary complex with the (alpha)-subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and (alpha)-actinin. *J Neurosci*. 2001 Jan 15;21(2):423-33.
- [127] Warner DR, Pisano MM, Roberts EA, Greene RM. Identification of three novel Smad binding proteins involved in cell polarity. *FEBS letters*. 2003 Mar 27;539(1-3):167-73.
- [128] Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol*. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2021-36.
- [129] Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 2001;12(1):27-36.
- [130] Santoni MJ, Pontarotti P, Birnbaum D, Borg JP. The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet*. 2002 Oct;18(10):494-7.
- [131] Grimson MJ, Coates JC, Reynolds JP, Shipman M, Blanton RL, Harwood AJ. Adherens junctions and beta-catenin-mediated cell signalling in a non-metazoan organism. *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):727-31.
- [132] Holland PW. Gene duplication: past, present and future. *Seminars in cell & developmental biology*. 1999 Oct;10(5):541-7.
- [133] Bilder D, Perrimon N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature*. 2000 Feb 10;403(6770):676-80.
- [134] Huang YZ, Wang Q, Xiong WC, Mei L. Erbin is a protein concentrated at postsynaptic membranes that interacts with PSD-95. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jun 1;276(22):19318-26.
- [135] Ohno H, Hirabayashi S, Iizuka T, Ohnishi H, Fujita T, Hata Y. Localization of p0071-interacting proteins, plakophilin-related armadillo-repeat protein-interacting protein (PAPIN) and ERBIN, in epithelial cells. *Oncogene*. 2002 Oct 10;21(46):7042-9.
- [136] Laura RP, Witt AS, Held HA, Gerstner R, Deshayes K, Koehler MF, et al. The Erbin PDZ domain binds with high affinity and specificity to the carboxyl termini of delta-catenin and ARVCF. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Apr 12;277(15):12906-14.
- [137] Jaulin-Bastard F, Arsanto JP, Le Bivic A, Navarro C, Vely F, Saito H, et al. Interaction between Erbin and a Catenin-related protein in epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jan 25;277(4):2869-75.
- [138] Izawa I, Nishizawa M, Tomono Y, Ohtakara K, Takahashi T, Inagaki M. ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells*. 2002 May;7(5):475-85.

- [139] Rangwala R, Banine F, Borg JP, Sherman LS. Erbin regulates mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and MAP kinase-dependent interactions between Merlin and adherens junction protein complexes in Schwann cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Mar 25;280(12):11790-7.
- [140] McDonald C, Chen FF, Ollendorff V, Ogura Y, Marchetto S, Lecine P, et al. A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Dec 2;280(48):40301-9.
- [141] Dai P, Xiong WC, Mei L. Erbin inhibits RAF activation by disrupting the sur-8-Ras-Raf complex. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Jan 13;281(2):927-33.
- [142] Calin-Jageman I, Yu K, Hall RA, Mei L, Lee A. Erbin enhances voltage-dependent facilitation of Ca(v)1.3 Ca²⁺ channels through relief of an autoinhibitory domain in the Ca(v)1.3 alpha1 subunit. *J Neurosci*. 2007 Feb 7;27(6):1374-85.
- [143] Tao Y, Dai P, Liu Y, Marchetto S, Xiong WC, Borg JP, et al. Erbin regulates NRG1 signaling and myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 May 20.
- [144] Liu N, Zhang J, Zhang J, Liu S, Liu Y, Zheng D. Erbin regulated sensitivity of MCF-7 breast cancer cells to TRAIL via ErbB2/AKT/NF- κ B pathway. *Journal of biochemistry*. 2008 Mar 3.
- [145] Arikath J, Israely I, Tao Y, Mei L, Liu X, Reichardt LF. Erbin controls dendritic morphogenesis by regulating localization of delta-catenin. *J Neurosci*. 2008 Jul 9;28(28):7047-56.
- [146] Kolch W. Erbin: sorting out ErbB2 receptors or giving Ras a break? *Sci STKE*. 2003 Sep 9;2003(199):pe37.
- [147] Lebeau S, Masouye I, Berti M, Augsburg E, Saurat JH, Borradori L, et al. Comparative analysis of the expression of ERBIN and Erb-B2 in normal human skin and cutaneous carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005 Jun;152(6):1248-55.
- [148] Izawa I, Nishizawa M, Hayashi Y, Inagaki M. Palmitoylation of ERBIN is required for its plasma membrane localization. *Genes Cells*. 2008 Jul;13(7):691-701.
- [149] Smotrys JE, Linder ME. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annual review of biochemistry*. 2004;73:559-87.
- [150] Linder ME, Deschenes RJ. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nature reviews*. 2007 Jan;8(1):74-84.
- [151] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*. 1973 Nov;52(11):2745-56.
- [152] He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Mar 3;95(5):2509-14.
- [153] Oft M, Akhurst RJ, Balmain A. Metastasis is driven by sequential elevation of H-ras and Smad2 levels. *Nature cell biology*. 2002 Jul;4(7):487-94.
- [154] Harrington AE, Morris-Triggs SA, Ruotolo BT, Robinson CV, Ohnuma S, Hyvonen M. Structural basis for the inhibition of activin signalling by follistatin. *The EMBO journal*. 2006 Mar 8;25(5):1035-45.

- [155] Bar-Peled M, Raikhel NV. A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Analytical biochemistry*. 1996 Oct 1;241(1):140-2.
- [156] Rain JC, Selig L, De Reuse H, Battaglia V, Reverdy C, Simon S, et al. The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2001 Jan 11;409(6817):211-5.
- [157] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 1985 Oct;150(1):76-85.
- [158] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976 May 7;72:248-54.
- [159] Rost B, Yachdav G, Liu J. The PredictProtein server. *Nucleic acids research*. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W321-6.
- [160] Romero P, Obradovic Z, Li X, Garner EC, Brown CJ, Dunker AK. Sequence complexity of disordered protein. *Proteins*. 2001 Jan 1;42(1):38-48.
- [161] Romero, Obradovic, Dunker K. Sequence Data Analysis for Long Disordered Regions Prediction in the Calcineurin Family. *Genome informatics*. 1997;8:110-24.
- [162] Yang ZR, Thomson R, McNeil P, Esnouf RM. RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005 Aug 15;21(16):3369-76.
- [163] Linding R, Jensen LJ, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. Protein disorder prediction: implications for structural proteomics. *Structure*. 2003 Nov;11(11):1453-9.
- [164] Dosztanyi Z, Csizmok V, Tompa P, Simon I. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005 Aug 15;21(16):3433-4.
- [165] Ward JJ, Sodhi JS, McGuffin LJ, Buxton BF, Jones DT. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life. *Journal of molecular biology*. 2004 Mar 26;337(3):635-45.
- [166] Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nature reviews*. 2001 Feb;2(2):127-37.
- [167] Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, et al. EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *The Journal of biological chemistry*. 1995 Jun 2;270(22):13503-11.
- [168] Dai F, Chang C, Lin X, Dai P, Mei L, Feng XH. Erbin inhibits TGF{beta} signaling through a novel Smad-interacting domain. *Molecular and cellular biology*. 2007 Jun 25.
- [169] Cheng Y, Oldfield CJ, Meng J, Romero P, Uversky VN, Dunker AK. Mining alpha-helix-forming molecular recognition features with cross species sequence alignments. *Biochemistry*. 2007 Nov 27;46(47):13468-77.
- [170] Bryant PJ, Huwe A. LAP proteins: what's up with epithelia? *Nature cell biology*. 2000 Aug;2(8):E141-3.

- [171] Huang YZ, Zang M, Xiong WC, Luo Z, Mei L. Erbin suppresses the MAP kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Jan 10;278(2):1108-14.
- [172] Di Guglielmo G, Le RC, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol*. 2003;5(5):410-21.
- [173] Luga V, McLean S, Le Roy C, O'Connor-McCourt M, Wrana JL, Di Guglielmo GM. The extracellular domain of the TGFbeta type II receptor regulates membrane raft partitioning. *The Biochemical journal*. 2009 Jul 1;421(1):119-31.
- [174] Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana J. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFβ receptor. *Cell*. 1998;95:779-91.
- [175] Deliot N, Chavent M, Nourry C, Lecine P, Arnaud C, Hermant A, et al. Biochemical studies and molecular dynamics simulations of Smad3-Erbin interaction identify a non-classical Erbin PDZ binding. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009 Jan 16;378(3):360-5.
- [176] Dyson HJ, Wright PE. Coupling of folding and binding for unstructured proteins. *Curr Opin Struct Biol*. 2002 Feb;12(1):54-60.
- [177] Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL. Function and structure of inherently disordered proteins. *Current opinion in structural biology*. 2008 Dec;18(6):756-64.
- [178] Tompa P. Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem Sci*. 2002 Oct;27(10):527-33.
- [179] Fink AL. Natively unfolded proteins. *Current opinion in structural biology*. 2005 Feb;15(1):35-41.
- [180] Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK. Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *J Mol Recognit*. 2005 Sep-Oct;18(5):343-84.
- [181] Wright PE, Dyson HJ. Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm. *J Mol Biol*. 1999 Oct 22;293(2):321-31.
- [182] Weathers EA, Paulaitis ME, Woolf TB, Hoh JH. Reduced amino acid alphabet is sufficient to accurately recognize intrinsically disordered protein. *FEBS letters*. 2004 Oct 22;576(3):348-52.
- [183] Chong PA, Ozdamar B, Wrana JL, Forman-Kay JD. Disorder in a target for the smad2 mad homology 2 domain and its implications for binding and specificity. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Sep 24;279(39):40707-14.
- [184] Atalay A, Crook T, Ozturk M, Yulug IG. Identification of genes induced by BRCA1 in breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 Dec 20;299(5):839-46.
- [185] Huang FY, Chiu PM, Tam KF, Kwok YK, Lau ET, Tang MH, et al. Semi-quantitative fluorescent PCR analysis identifies PRKAA1 on chromosome 5 as a potential candidate cancer gene of cervical cancer. *Gynecologic oncology*. 2006 Oct;103(1):219-25.
- [186] Dardousis K, Voolstra C, Roengvoraphoj M, Sekandarzad A, Mesghenna S, Winkler J, et al. Identification of Differentially Expressed Genes Involved in the Formation of Multicellular Tumor Spheroids by HT-29 Colon Carcinoma Cells. *Mol Ther*. 2007 Jan;15(1):94-102.

[187] Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 2007 Dec 14;131(6):1190-203.