



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



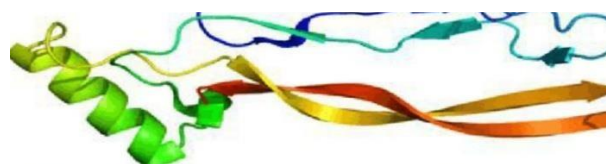
Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο παράγων GDF-1 και η σημασία του στην διάγνωση

GRADUATE THESIS

The factor GDF-1 and its importance in diagnosis



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ (ΤΩΝ)/NAME OF STUDENTS

Σιμπέλ Δεμερτζή

Sibel Demertzi

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Πέτρος Καρκαλούσος

Petros Karkalousos

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2022



Faculty of Health and Caring Professions
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

The factor GDF-1 and its importance in diagnosis

Sibel Demertzi

62117096

MI17096@uniwa.gr, sibeldemertzi22@gmail.com

FIRST SUPERVISOR

Petros Karkalousos

SECOND SUPERVISOR

Maria Trapali

THIRD SUPERVISOR

Christina Fountzoula

AIGALEO 2022

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Σιμπέλ Δεμερτζή του Μεμέτ, με αριθμό μητρώου 62117096 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτητή

Υπογραφή φοιτητή

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας και επίκουρος καθηγητής Πέτρος Καρκαλούσος για την συνεργασία του μαζί μου και για την πολύτιμη βοήθεια του στην εκπόνηση της εργασίας μου.

Επίσης ευχαριστώ τις καθηγήτριες της τριμελούς επιτροπής μου Μαρία Τράπαλη που είναι Λέκτορας ΔΕΠ και την επίκουρη καθηγήτρια Χριστίνα Φούντζουλα που δέχτηκαν να είναι μέλη της τριμελούς επιτροπής μου καθώς και για τις παρατηρήσεις και τις συμβουλές που με καθοδήγησαν στην διαμόρφωση και ολοκλήρωση αυτού του κειμένου.

Αφιέρωσεις

Αφιερώνω στην οικογένεια μου.

Περίληψη

Την δεκαετία του 1950 ανακαλύφθηκε ότι το γονίδιο GDF-1 αποτελείται από DNA και ότι αντιπροσωπεύει μια συγκεκριμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, η οποία θα καθορίσει την αλληλουχία αμινοξέων της αντίστοιχης παραγόμενης πρωτεΐνης που ονομάζεται παράγων GDF-1. Η σχέση μεταξύ μιας αλληλουχίας του γονιδίου και της αλληλουχίας της αντίστοιχης πρωτεΐνης καλείται «γενετικός κώδικας» («genetic code»). Επομένως ο παράγων GDF-1 πρόκειται για μια πρόσφατη μελετημένη πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο GDF1 και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 7 στον ομόλογο ποντικό. Ανήκει στην υπερικογένεια του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα βήτα (TGF-beta), που παίζει ρόλο στο αριστερό-δεξιό μοτίβο και στην επαγωγή του μεσοδέρματος κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Βρίσκεται στον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό και τα περιφερικά νεύρα των εμβρύων. Σηματοδοτεί μέσω τριών διαφορετικών οδών σηματοδότησης με σημαντικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε κάθε οδό και με υποδοχείς τύπου I και II με ενεργότητα κινάσης τυροσίνης, όπου εναλλακτικά οι υποδοχείς ονομάζονται ACTRI και ACTRII. Η πρώτη οδός είναι η κύρια οδός και ονομάζεται κύρια οδός μετάδοσης σήματος JAK/STAT μέσω SMAD πρωτεϊνών, η οποία εκτός από τον παράγοντα ακολουθούν αυτή την οδό όλα τα μέλη της υπερικογένειας TGF-beta. Η δεύτερη οδός ονομάζεται εναλλακτική οδός MAPK/ERK και συμμετέχουν οι πρωτεΐνες EGF-CEK. Ενώ η τρίτη οδός είναι η κομβική σηματοδότηση, αφού σε αυτήν συμμετέχει κυρίως η Nodal όπου λειτουργεί και σαν συνυποδοχέας για τον παράγοντα. Αντίθετα οι μόνιμες και οι ημιμόνιμες αλλαγές στην φυσιολογική δομή και δραστηριότητα του γονιδίου GDF-1, άρα και στην μη αντιστρεπτή λειτουργία του γενετικού κώδικα και της παραγόμενης πρωτεΐνης προκαλεί σοβαρές καρδιακές ανωμαλίες (με κυρίαρχο την τετραλογία Fallot και την μετάθεση των μεγάλων αρτηριών) και ασύμμετρη οργανογένεση, όπου τα όργανα δεν κατατάσσονται στην φυσιολογική τους δομή και διατάσσονται αντίστροφα στον αριστερό-δεξιό άξονα. Στην συνέχεια ακολουθούν οι μελέτες από διάσημους ερευνητές για την σημασία του γονιδίου GDF-1 ως γονίδιο καταστολής στην θεραπεία του καρκίνου και στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης των οδών σήματος. Τέλος, αναλύονται οι μοριακές τεχνικές ενός εργαστήριου έρευνας για την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του παράγοντα GDF-1.

Abstract

In the 1950s it was discovered that the GDF-1 gene is made up of DNA and that it represents a specific polypeptide chain, which will determine the amino acid sequence of the corresponding produced protein called GDF-1 factor. The relationship between a sequence of the gene and the sequence of the corresponding protein is called the genetic code. Thus GDF-1 is a recently studied protein that in humans is encoded by the GDF-1 gene and is located on chromosome 19 in humans and chromosome 7 in the homologous mouse. It belongs to the superfamily of the transformative growth factor beta (TGF-beta), which plays a role in the left-right pattern and in the induction of the mesoderm during embryonic development. It is found in the brain, spinal cord and peripheral nerves of fetuses. It signals through three different signaling pathways with important proteins involved in each pathway and with type I and II receptors with tyrosine kinase activity, where the receptors are alternatively termed ACTRI and ACTRII. The first pathway is the major pathway and is called the JAK / STAT signal transduction pathway via SMAD proteins. which in addition to the factor all members of the TGF-beta superfamily follow this path. The second pathway is called the MAPK / ERK alternative pathway and involves the EGF-CEK proteins. While the third way is the key signalization, in which mainly Nodal participates, where it also acts as a co-receptor for the factor. In contrast, permanent and semi-permanent changes in the physiological structure and activity of the GDF-1 gene, and therefore in the irreversible function of the genetic code and the protein produced, cause severe heart abnormalities (predominantly Fallot tetralogy and large arterial displacement), and where the organs are not classified in their normal structure and are arranged inversely on the left-right axis. Following are the studies by famous researchers on the importance of the GDF-1 gene as a repression gene in the treatment of cancer and heart remodeling after myocardial infarction through negative feedback of signal pathways. Finally, the molecular techniques of a research laboratory for and quantitative detection of the factor.

Περιεχόμενα

Ο παράγων GDF-1 και η σημασία του στην διάγνωση	I
Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας	III
Ευχαριστίες	IV
Αφιερώσεις	V
Περίληψη	VI
Abstract	VII
Συντομογραφίες	IX
Πρόλογος	1
Πηγές Εικόνων	3
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	4
Κεφάλαιο 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ	4
Κεφάλαιο 2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΝΤΑ	5
2.1. Λειτουργία του παράγοντος GDF-1	7
2.2. Η γονιδιακή ρύθμιση στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη	8
2.3. Χρωμόσωμα 19	10
Κεφάλαιο 3. ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TGF-B	12
3.1. Υποδοχείς TGF-B	14
Κεφάλαιο 4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΝΤΑ GDF-1	16
4. 1 Ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω Smad πρωτεϊνών	17
4.2 Εναλλακτική οδός σηματοδότησεως Mark/erk	20
4.3 Κομβική σηματοδότηση nodal	21
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	24
Κεφάλαιο 5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΝΤΑ GDF-1	24
5.1. Ασύμμετρη ετεροταξία	25
5.2. Καρδιακές ανωμαλίες	27
5.2.1 Τετραλογία Fallot	28
5.3. Καρκίνος	31
5.4. Ολοπροσεγκεφαλία	33
5. 5. Μεταφορά των μεγάλων αρτηριών	34
Κεφάλαιο 6. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΝΤΑ GDF-1 ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	38
6. 1. Θεραπεία καρκίνου στομάχου	38
6.2. Καρδιοπροστατευτικός ρόλος του αυξητικού/διαφοροποιητικού παράγοντα 1 στη μεταεμφραγματική αναδιαμόρφωση και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας	43
Κεφάλαιο 7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	46
7. 1. Elisa	46
7. 2. Sds Page	48
7.3. Pcr	51
Συμπεράσματα	53

Συντομογραφίες

Συντομογραφία	Αγγλική ορολογία	Ελληνική ορολογία
GDF-1	Growth Differentiation factor-1	Παράγοντας αναπτυξιακής διαφοροποίησης-1
TGF-beta	Transforming growth factor-beta	Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 4
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Αγγελιοφόρο ριβονουκλεϊκό οξύ
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic acid	Συμπληρωματικό δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
tRNA	Transfer ribonucleic acid	Μεταφορικό ριβονουκλεϊκό οξύ
ORF	Open reading frame	Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης
ATG	Anti-thymocyte globulin	Αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη
GDF3	Growth differentiation factor 3	Παράγοντας αναπτυξιακής διαφοροποίησης 3
GDF9	Growth differentiation factor 9	Παράγοντας αναπτυξιακής διαφοροποίησης 9
LEFTYA	Left-right determination factor A	Αριστερά-δεξιά προσδιορισμού παράγοντα A
LEFTYB	Left-right determination factor B	Αριστερά-δεξιά προσδιορισμού παράγοντα B
AMY	Anti-mulerian hormone	Γλυκοπρωτεϊνική ορμόνη
MH1	Mad Homology domain 1	Ομολογία 1 Mad
Ebaf	Endometrial Bleeding Associated factor	Παράγοντας ενδομήτριας αιμορραγίας
Leftb	Left-right asymmetry	Ασυμμετρία αριστερά-δεξιά
Pitx2	Paired –like homeodomain transcription factor 2	Μεταγραφικός παράγοντας 2
AGS	Altered Gene Sets	Αλλοιωμένα σύνολα γονιδίων
STAT	Signal transducer and activator Transcription protein	Μετατροπέα σήματος και του ενεργοποιητή της μεταγραφής
SMADS	Mother against decapentaplegic homologs	Ομολογία κατά του δεκαπενταπληγικού ομόλογου
RNA	Rimonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
BMP15	Bone morphogenetic protein 15	Μορφογενετική πρωτεΐνη των οστών 15
GH	Growth hormone	Αυξητική ορμόνη
CDK8	Cyclin Dependent kinase 8	Κυκλινοεξαρτώμενη κινάση 8
GSK3	Glycogen synthase kinase 3 beta	Γλυκογόνο συνθάση κινάση 3 βήτα
MARK	Mitogen –activated protein kinase	Μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση

ERK	Extracellular signal –regulated kinases	Εξωκυτταρικές κινάσες που ρυθμίζονται με σήμα
MEK	mitogen activated protein kinase	Μιτογόνο κινάση
ALK	Anaplastic Lymphoma kinase	Κινάση αναπλαστικού λεμφώματος
SARA	Smad anchor for receptor activation	Συμπαράγοντας Smad
CHD	Coronary heart disease	Στεφανιαία νόσος
AKT	Protein Kinase B	Πρωτεϊνική κινάση Β
GRP78	Binding immunoglobulin protein	Πρωτεΐνη δέσμευσης ανοσοσφαιρίνης
BNIP3	Interacting protein 3	Γονίδιο αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης 3
EGF	Epidermal growth factor	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
CDX2	Caudal Type Homeobox 2	Παράγοντας μεταγραφής ομοιόμορφων
CHF2	Checkpoint with Forkhead and Ring Finger Domains	Γονίδιο με σημείο ελέγχου τομείς δαχτυλιδιού
qRT-PCR	Real Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase chain reaction	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	Ανοσοπροσοφορητικός προσδιορισμός συνδεδεμένη με ένζυμο
dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates	Δεοξυριβονουκλεοτίδια
GDF15	Growth differentiation factor 15	Παράγοντας ανάπτυξης και διαφοροποίησης 15
BMPs	Bone Morphogenetic proteins	Μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών
Pol II	RNA polymerase II	Πολυμεράση II
TGA	Transposition of Great Arteries	Μετάθεση μεγάλων αρτηριών

Πρόλογος

Στη παρούσα διπλωματική εργασία περιγράφεται αναλυτικά η δράση και η επίδραση του παράγοντα GDF-1 που ανιχνεύεται στο νευρικό σύστημα εμβρύων αλλά και ενήλικων. Πρόκειται για μια πρόσφατη μελετημένη πρωτεΐνη της υπερικογένειας TGF-1, όπου στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το κάτω ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου GDF-1 και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19q13 (LeeandNotes 1990). Αρχικά είχε απομονωθεί από έμβρυο ποντικού 8^{ης} ημέρας και παίζει κρίσιμο ρόλο κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του εμβρύου, η οποία συμβάλει κυρίως στην ρύθμιση της αριστερής-δεξιάς διαμόρφωσης του ποντικού και στον έλεγχο της ανάπτυξης των μεσοδερμικών προδρόμων. Κατά συνέπεια η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη μεταφράζεται από ένα δισιστρονικό mRNA, το οποίο κωδικοποιεί επίσης την κεραμική συνθάση 1, όπου ρυθμίζει τον μεταβολισμό και την μυελοποίηση με μηχανισμό δράσης που απαιτούν τη ρύθμιση των σημάτων SMAD2/3 και STAT (Barc, etal. 2019). Επιπλέον δίνεται έμφαση και στα άλλα μέλη της υπερικογένειας των προσδεμάτων TGF-β που μέσω αυτών σηματοδοτεί ο παράγων με πιο γνωστά το Nodal, Activin, Vg1 με χρήση υποδοχέων τύπου 1 και μεταγραφικοί παράγοντες SMAD 2/3 (WeissandAttisane 2013). Η ανάλυση Genomic Southern έδειξε ότι ο GDF-1 μπορεί να διατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό ανάμεσα στα είδη και ότι έχει δραστηριότητα κυτοκίνης, άρα χρησιμεύει ως μοριακός αγγελιοφόρος μεταξύ κυττάρων (CRiderandMulloy 2010). Εν μέρη η αρχική διακοπή της συμμετρίας η οποία συμβαίνει στον κοιλιακό κόμβο του εμβρύου λόγω ελαττωμάτων στο γονίδιο GDF-1 παρουσιάζει ασύμμετρη μορφογένεση σπλαχνικών οργάνων από δεξιά προς τα αριστερά και μια σειρά ετεροταξίας που περιλαμβάνει δυσπλασίες της καρδιάς με κυρίαρχο την τετραλογία Fallot και την δυσλειτουργία κύριων αιμοφόρων αγγείων (Kaasinen, etal. 2010). Είναι ευρύτατα διαδεδομένη η άποψη ότι το γονίδιο GDF-1 έχει περιγραφεί ως γονίδιο καταστολής όγκων στα γαστρικά κύτταρα αντισταθμίζοντας την ογκογένεση και διεγείροντας την οδό σηματοδότησης SMAD (Yank, etal. 2015). Ακόμα οι διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στον παράγοντα GDF-1 στην καρδιά θεωρούν ότι είναι ένας νέος μεσολαβητής που προστατεύει την ανάπτυξη της καρδιάς μετά από έμφραγμα μέσω της αρνητικής ρύθμισης των οδών σηματοδότησης MEK-ERK1/2 και SMAD (Bao, etal. 2015). Συνεπώς θα μελετηθεί η σημασία του παράγοντα στη διάγνωση όπου έχει διερευνηθεί μέσα από διάφορες έρευνες και έχει αποδειχθεί ότι αντιπροσωπεύει το μοναδικό διαλυτό παράγοντα, για αυτό το λόγο θα καθιστά την προσβάσιμη πρωτεΐνη σε μελλοντικές μελέτες και χρήση σε πολλούς θεραπευτικούς στόχους διάφορων ειδών καρκίνων και καρδιακών ανωμαλιών (Zeng, etal. 2017). Στο τέλος θα αναλυθούν οι διάφορες εργαστηριακές τεχνικές προσδιορισμού του παράγοντα με κυρίαρχα την

ανοσοιστοχημική ανάλυση, την ανοσοκλιδίωση:είναι η ηλεκτροφόρηση και διαχωρισμός ανάλογα με το μοριακό βάρος, PCRπραγματικού χρόνου Taqman, SDS-PAGE με ασυνεχές ηλεκτροφορητικό σύστημα και ELISA:είναι βιοχημική μέθοδος σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος.

Πηγές Εικόνων

Εικόνα1. Ο παράγων GDF-1/ https://www.creative-diagnostics.com/GDF-family.htm	6
Εικόνα 2. Δομή και οργάνωση του γονιδίου /Atlas of Genetics and Cytogenenesis.....	9
Εικόνα3.Chromosome 19 - ISCN 2009 1 /Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. 11	
Εικόνα4. Υπεροικογένεια TGF-beta	13
Εικόνα 5. Υποδοχείς I και II.....	16
Εικόνα6. Σηματοδότηση μέσω SMAD πρωτεϊνών	19
Εικόνα 7. Εναλλακτική Σηματοδότηση με MARK/ERK οδός.....	21
Εικόνα8. Κομβική σηματοδότηση NODAL.....	24
Εικόνα 9. Τετραλογία Fallot.....	31
Εικόνα10 Cripto 1 /Nodal/GDF-1	33
Εικόνα11 Μετάθεση μεγάλων αρτηριών	37
Εικόνα 12. Μελέτη για την σημασία του παράγοντα GDF-1 στον καρκίνο στομάχου	43
Εικόνα13. GDF-1ως καρδιοπροστατευτικός ρόλος	46
Εικόνα14. ELISA.....	48
Εικόνα15. SDS PAGE.....	51
Εικόνα16. Real Time PCR.....	53

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

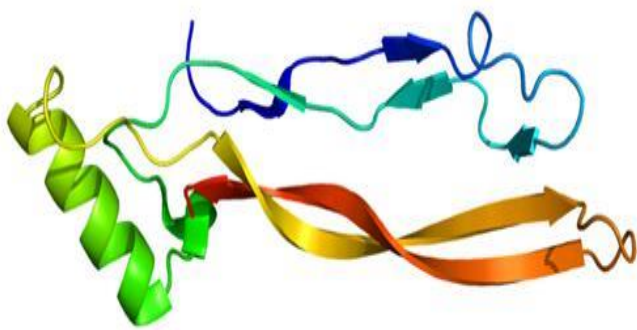
Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δυο δεκαετιών, η γενετική ανάλυση, η μοριακή βιολογία καθώς και η γονιδιωματική έχουν δείξει ότι παρά την ποικιλία στο μέγεθος και στο σχήμα των ενηλικών ζώων και των φυτών, οι πολυκύτταροι οργανισμοί μοιράζονται πολλά κοινά γονίδια, γενετικά μονοπάτια και μοριακούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς όπου και ελέγχουν τα αναπτυξιακά γεγονότα από το ζυγωτό έως το ενήλικο άτομο. Ως εκ τούτου στις αρχές της δεκαετίας του 1950είχεαπασχολήσει τους μοριακούς βιολόγους και είχε επικρατήσει η άποψη ότι το «κεντρικό δόγμα» ήταν ο «γενετικός κώδικας» (genetic code), δηλαδή η οδός μέσω της οποίας συνδεόταν η σχέση μεταξύ μεταγραφώματος και του πρωτεϊνώματος, επομένως καθοριζόταν πως μια αλληλουχία νουκλεοτιδίων ενός mRNA θα μεταφραστεί σε αλληλουχία αμινοξέων μιας πρωτεΐνης και οι γενετικές πληροφορίες θα ρέουν από τα γονίδια προς τις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια ακολούθησαν μελέτες από γνωστούς επιστήμονες για την λειτουργία του γονιδίου GDF-1 και την κωδικοποίηση από αυτό το γονίδιο ως τελικό προϊόν, του παράγοντα GDF-1. Συχνά χρησιμοποιούσαν ως πρότυπο οργανισμό (οργανισμός «μοντέλο», model organism)για τον άνθρωπο, τον ποντικό επειδή το γονιδίωμα του είναι παρόμοιο με το ανθρώπινο γονιδίωμα και περιέχει πολλά ταυτόσημα γονίδια. Επισήμαιναν ότι απαραίτητο είναι κυρίως να χρησιμοποιούμε ένα ειδικό τύπο κυττάρου ποντικού, το εμβρυικό βλαστικό κύτταρο (embryonic stem cell, EScell), διότι αντίθετα από τα περισσότερα κύτταρα του ποντικού, τα κύτταρα ES είναι παντοδύναμα (totipotent), διότι δεν έχουν δεσμευτεί σε μια μοναδική αναπτυξιακή οδό και μπορούν να αποδώσουν όλους τους τύπους διαφοροποιημένων κυττάρων. Επιπλέον την δεκαετία του 1960 ο ερευνητής Sydney Brenner πραγματοποίησε μελέτες για την ανάπτυξη πολυκύτταρων οργανισμών με μικροσκοπικό νηματώδη σκουλήκι *C. elegans*, η οποία χρησιμοποιείται επίσης και σήμερα για την μελέτη ορισμένων γονιδίων και πρωτεϊνών κατά την ανάπτυξη. Αρχικά ανακαλύφθηκε μέσα από τις μελέτες ότι ο παράγων είναι το ισοδύναμο του βατράχου, του ζέβρα και του νεοσσού Vg1. Το GDF-1 εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο και ενήλικο νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα στους νευρώνες του εγκεφαλικού φλοιού και του ιππόκαμπου. Απαιτείται κατά την εμβρυογένεση για την ανάπτυξη της ασυμμετρίας του αριστερού/δεξιού άξονα, της ασυμμετρίας του πρόσθιου/οπίσθιου άξονα και της νωτιαίας χορδής. Συνεργάζεται με το Nodal και το GDF-3 σε αυτές τις δραστηριότητες και ενισχύει τη βιοδραστικότητα των κόμβων μέσω του σχηματισμού ενός μη ομοιοπολικού ετεροδιμερούς GDF-1-Nodal(W.BurtandS.Law 1994). Ο παράγων GDF-1 αρχικά είχε απομονωθεί

από μια βιβλιοθήκη συμπληρωματικού DNA (Cdna) ενός εμβρύου ποντικού, όπου πρόκειται για ένα αντίγραφο ενός mRNA. Όποτε η σύγκριση της αλληλουχίας cDNA με την αλληλουχία του DNA σκιαγραφεί τη θέση αντιστοιχίου γονιδίου και αποκαλύπτει τα ορία εξονίων –ιντρονίων και την διαφορική κωδικοποίηση του γονιδίου GDF-1 όπου αποκάλυψαν ότι προσδίδουν μια πρωτεΐνη που ονόμασαν παράγοντα ανάπτυξης και διαφοροποίησης GDF-1 και προσδιόρισαν ότι δίνει την δυνατότητα σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό κατά την ανάπτυξη για την διαμόρφωση αριστερής-δεξιάς πλευράς και στην επαγωγή του μεσοδέρματος. Η πρωτεΐνη αυτή προσδιορίστηκε περαιτέρω μέσα από διαφορές μελέτες που έγιναν και σημείωσαν την αλληλεπίδραση του με διαφορετικές ρυθμιστικές μεταγραφικές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης μαζί με τον παράγοντα και διάφορους ενδοκυττάρια οδούς σηματοδότησης και κομβική σηματοδότηση με υποδοχείς τύπου I και II όπου βρισκόταν κυρίως στο νευρικό σύστημα εμβρύων αλλά και ενηλίκων (C.OpazoandZavala, PhylogeneticevidenceforindependentoriginsofGDF1 andGDF3 genesinanuransandmammals 2018).

Κεφάλαιο 2. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΩΝ

Η γενετική πληροφορία όπου είναι αποθηκευμένη στο DNA του γονιδιώματος με τη μορφή ενός κώδικα, ονομάζεται «γενετικός κώδικας» και η αλληλουχία των διαδοχικών βάσεων που υπάρχει στο κώδικα αυτό καθορίζει την ακολουθία των αμινοξέων του παραγόμενου πολυπεπτιδίου. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του παράγοντα GDF-1 που ανήκει στην υπερικογενεία των αυξητικών παραγόντων μεταμόρφωσης προβλέπει μια πρωτεΐνη 372 αμινοξέων με μοριακό βάρος 39.475 και ένα ζεύγος υπολειμμάτων αργινίνης στις θέσεις 236-237, που είναι πιθανό να αντιπροσωπεύει μια θέση για πρωτεολυτική επεξεργασία. Το Ο-άκρο που ακολουθεί την υποτιθέμενη διφασική θέση διάσπασης δείχνει σημαντική ομολογία με τα άλλα γνωστά μέλη της υπερικογενείας TGF-beta. Έχει δομή ομοδιμερές οπότε και συνδέεται με δισουλφίδιο όπου συμπεριλαμβάνει επίσης 7 υπολείμματα κυστείνης με χαρακτηριστική απόσταση μεταξύ τους. Αρχικά, το RNA συντίθεται με εκμαγείο το DNA μέσω μια διαδικασίας γνωστή ως μεταγραφή με την II πολυμεράση (Pol II) (LeeandNotes 1990). Η έναρξη της μεταγραφής βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητών και εξειδικευμένων πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην οδό σηματοδότησης και ονομάζονται μεταγραφικοί παράγοντες SMAD 2/3. Η μεταγραφή του γονιδίου διαβάζεται με κατεύθυνση 3 προς 5 και συνεχίζεται κατά μήκος των ιντρονίων και των εξονίων και επεκτείνεται μετά τη θέση του χρωμοσώματος 19 που αντιστοιχεί στο άκρο 3'' του ώριμου mRNA. Το RNA που φέρει την κωδικοποιημένη πληροφορία καλείται αγγελιοφόρο RNA (mRNA) και μεταφέρεται στη συνέχεια από

τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα (C.Hsia, etal. 2000). Εκεί η αλληλουχία του RNA αποκωδικοποιείται ή μεταφράζεται, καθορίζοντας την ακολουθία των αμινοξέων της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η διαδικασία της μετάφρασης συντελείται στα ριβοσώματα, που είναι κυτταροπλασματικά υπερμοριακά σύμπλοκα και έχουν θέσεις πρόσδεσης για όλα τα αλληλεπιδρώντα μόρια που συμμετέχουν στην πρωτεινοσύνθεση, συμπεριλαμβανομένου του mRNA και επιπλέον ενός τρίτου τύπου RNA που ονομάζεται μεταφορικό RNA (transferRNA ή tRNA) και αποτελεί τον μοριακό σύνδεσμο μεταξύ της αλληλουχίας των βάσεων mRNA και της αντίστοιχης αμινοξικής ακολουθίας της πρωτεΐνης. Επίσης η μετάφραση του ώριμου mRNA αρχίζει πάντοτε από το κωδικόνιο της μεθειονίνης και για αυτό η μεθειονίνη είναι πάντα το πρώτο (αμινοτελικό) αμινοξύ κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας ώσπου και θα απομακρύνθει πριν ολοκληρωθεί η σύνθεση της πρωτεΐνης. Το κωδικόνιο της μεθειονίνης συμβάλει επίσης και στο καθορισμό του πλαισίου ανάγνωσης του mRNA που βάσει αυτά προκύπτει ότι ο παράγων GDF-1 αναγνωρίζεται από το κάτω ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Έτσι προκύπτει ότι η μετάφραση του ώριμου mRNA σε πρωτεΐνη πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα με τη συμμετοχή διαφόρων μορίων tRNA, τα οποία είναι ειδικό για ένα αμινοξύ της ακόλουθη πρωτεΐνης ξεχωριστά. Ακόμα μελέτες έχουν δείξει ότι πρωτεινοσύνθεση συντελείται από το αμινοτελικό προς το καρβοξυτελικό άκρο που αντιστοιχεί στη μετάφραση του mRNA με κατεύθυνση 5 προς 3 και στο τέλος η μετάφραση τερματίζεται όταν στο ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης συναντά και ένα κωδικόνιο λήξης (SoderstromandEbendal 1999).



Εικόνα1. Ο παράγων GDF-1/<https://www.creative-diagnostics.com/GDF-family.htm>

2.1. Λειτουργία του παράγοντος GDF-1

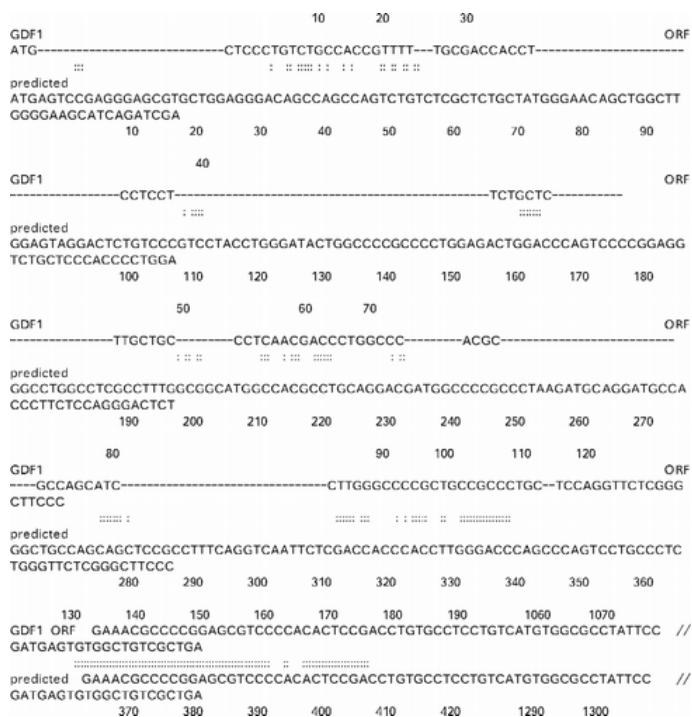
Ο παράγων GDF-1 συμβάλει κυρίως στην ρύθμιση και σχηματισμό άξονα συμμετρίας και στην επαγωγή του μεσοδέρματος. Έτσι η δημιουργία άξονα συμμετρίας κατά την εμβρυική ανάπτυξη διαιρείται σε δυο στάδια, στον σχεδιασμό του άξονα και στον καθορισμό της πολικότητας του (T.Rankin, etal. 2000). Η εμβρυογένεση αρχίζει με τη γονιμοποίηση, η οποία αποτελεί το έναυσμα για το σχηματισμό ενός αδιαπέραστου φλοιού σε μήκος 50μm και σε πλάτος 30μm. Το κέλυφος αυτό που δημιουργείται προστατεύει το αναπτυσσόμενο έμβρυο αλλά και συμμετέχει έμμεσα στο σχηματισμό των κυτταρικών γραμμών, αφού περιορίζει τις θέσεις που μπορούν να καταλάβουν τα βλαστομερίδια. Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση ο μητρικός προπυρήνας συμπληρώνει τη μείωση I και μείωση II. Κατά την ίδια χρονική περίοδο γίνεται ανακατανομή των κυτταροσκελετικών στοιχείων όπου παρατηρείται κυτταροπλασματική ροή και περισφίξεις στον φλοιό. Οι δυο απλοειδικοί προπυρήνες μεταναστεύουν στο κέντρο του ωαρίου και εκεί διαλύονται οι πυρηνικές μεμβράνες και έτσι με την βοήθεια των κεντρομεριδίων του αρσενικού γαμέτη δημιουργείται η άτρακτος κατά τον πρόσθιο οπίσθιο άξονα συμμετρίας. Πριν από τη μίτωση το εμπρόσθιο κεντρίδιο μεταναστεύει προς τα πίσω, έτσι η θέση και ο προσανατολισμός της ατράκτου είναι τέτοιος που οδηγεί σε ασύμμετρη διαίρεση. Η πρώτη διαίρεση είναι ασύμμετρη και παράγει ένα μεγάλο πρόσθιο βλαστομερίδιο (AB) και ένα μικρότερο οπίσθιο. Το βλαστομερίδιο AB διαιρείται πρώιμα και μεταναστεύει κατά μήκος του κύριου άξονα του εμβρύου όπου παράγει δυο βλαστομερίδια παρόμοιου μεγέθους, ενώ το P1 διαιρείται κατά τον προσθοπίσθιο άξονα και δημιουργεί ένα μεγάλο πρόσθιο βλαστομερίδιο (EMS) και ένα μικρότερο οπίσθιο (P2). Το περίβλημα του εμβρύου περιορίζει τις κινήσεις των τεσσάρων αυτών βλαστομεριδίων. Η επέκταση της ατράκτου του κυττάρου P1 ωθεί τα θυγατρικά κύτταρα AB να περιστραφούν γύρω από τον προσθοπίσθιο άξονα συμμετρίας διότι παράγει ένα πρόσθιο θυγατρικό κύτταρο (AB.a) και ένα οπίσθιο ραχιαίο κύτταρο (AB.b). Το βλαστομερίδιο EMS κατόπιν καταλαμβάνει κοιλιακή θέση και το βλαστομερίδιο P2 μια πιο πρόσθια θέση. Εάν όμως το κέλυφος και η βιτελλινική μεμβράνη αφαιρεθούν πριν από τις διαιρέσεις αυτές, τότε το αποτελούμενο από τέσσερα κύτταρα εμβρύου παίρνει ένα συμμετρικό σχήμα σε μορφή T με το βλαστομερίδιο EM να είναι σε επαφή και με το AB και με το P1. Μετά τις πρώτες δυο διαιρέσεις ο προσθοπίσθιος και ο ραχιαίος κοιλιακός άξονας έχουν καθοριστεί και επομένως εκ των πραγμάτων, οι δυο αυτοί άξονες καθορίζουν τις συμμετρίες του εμβρύου. Κατόπιν το AB.a και Ab.P διαιρούνται συμμετρικά κατά μήκος του άξονα δεξιάς-αριστερής συμμετρίας με τα κύτταρα στο αριστερό μέρος να καταλαμβάνουν ελαφρά πιο εμπρόσθια θέση και σε σχέση με τα κύτταρα στη δεξιά πλευρά. Ενώ κατά την επαγωγή

μεσοδέρματος ακολουθεί η διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης με την οποία ένα κύτταρο μετατρέπεται σε ένα πιο εξειδικευμένο. Αυτό πραγματοποιείται μέσω γονιδιακής ρύθμισης και ενεργοποίησης του γονιδίου GDF-1 για την παραγωγή μιας πρωτεΐνης GDF-1. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, τα κύτταρα συνθέτουν συγκεκριμένες ποσότητες πρωτεϊνών όπως συγκεκριμένα και του παράγοντα GDF-1. Η έκφραση του παράγοντα GDF-1 και η πορεία της εξειδίκευσης των κυττάρων στον άνθρωπο ξεκινά ήδη από τη δέκατη μέρα της οντογένεσης, όπου τα πρώτα κύτταρα που δημιουργούνται είναι τα βλαστομερή. Τα βλαστομερή σχηματίζουν τρεις βλαστικές στιβάδες, οι οποίες είναι το εξώδερμα, το ενδόδερμα και το μεσόδερμα από όπου θα προκύψουν τελικά οι τέσσερις μεγάλες κυτταρικές ομάδες, οι οποίες είναι τα επιθηλιακά κύτταρα, τα μυϊκά κύτταρα, τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα του συνδετικού ιστού.

2.2. Η γονιδιακή ρύθμιση στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη

Αρχικά ως γονίδιο GDF-1 ορίζουμε μια αλληλουχία DNA στο γονιδίωμα, η οποία απαιτείται για την παράγωγή ενός λειτουργικού πολυπεπτιδίου κατά την εμβρυική ανάπτυξη, που ονομάζεται παράγων ανάπτυξης και διαφοροποίησης (GDF-1). Ωστόσο το γονίδιο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 7 στον ποντικό αφού περιέχει τις απαραίτητες ρυθμιστικές αλληλουχίες. Οι παρεμβαλλόμενες αυτές αλληλουχίες στο GDF-1 είναι τα ιντρόνια που μεταγράφονται αρχικά σε RNA μέσα στον πυρήνα, αλλά δεν υπάρχουν στο ώριμο mRNA, στο κυτταρόπλασμα και συνεπώς δεν εκπροσωπούνται στο τελικό πρωτεϊνικό προϊόν. Εφόσον, τα ιντρόνια εναλλάσσονται με τα εξόνια, που είναι τμήματα του γονιδίου που καθορίζουν την αμινοξική ακολουθία της παραγόμενης πρωτεΐνης και με συγκεκριμένες πλευρικές αλληλουχίες που περιέχουν τις μη μεταφραζόμενες 5 και 3 περιοχές (A.Wall, etal. 2000). Το GDF-1 περιλαμβάνει κώδικες αλληλουχίες και παρακείμενες αλληλουχίες που είναι απαραίτητες για τη σωστή έκφραση του, δηλαδή για την παράγωγή ενός λειτουργικού μορίου mRNA σε σωστή ποσότητα, τοποθεσία και χρονική στιγμή κατά την διάρκεια της ανάπτυξης. Οι παρακείμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες παρέχουν τα μοριακά σήματα για την έναρξη και λήξη της σύνθεσης του μεταγραφόμενου mRNA. Στο άκρο 5 του γονιδίου βρίσκεται η περιοχή του υποκινητή, που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες για τον έλεγχο της ορθής έναρξης της μεταγραφής και ρύθμιση γονιδιακής έκφρασης. Ένω στο άκρο 3 του υπάρχει μια μη μεταφραζόμενη περιοχή που περιέχει ένα σήμα για την προσθήκη μιας σειράς από αδενοσίνες (Poly-A) στο άκρο του ώριμου mRNA. Η μεταγραφή διαβάζεται με κατεύθυνση 3 προς 5 με χρήση πολυμεράσης II του RNA. Ενώ η μετάφραση του mRNA σε GDF-1

πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα με την συμμετοχή διαφόρων μορίων tRNA, κάθε ένα από τα οποία είναι ειδικό για ένα αμινοξύ. Επίσης η μετάφραση του ώριμου mRNA αρχίζει πάντοτε από το κωδικόνιο της μεθειονίνης και για αυτό αποτελεί πάντα το πρώτο (αμινοτελικό) αμινοξύ κάθε πολυπεπτιδικής αλυσίδας, αν και συνήθως απομακρύνεται πριν την σύνθεση της πρωτεΐνης. Οι μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την ανάπτυξη είναι πρωτεΐνες SMAD 2/3 που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου GDF-1 (Satou, etal. 2008). Το γονίδιο περιέχει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frames, ORF) που αποτελείται από μια σειρά κωδικονίων τα οποία καθορίζουν την αμινοξική αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης. Το ORF ξεκινά με ένα κωδικόνιο έναρξης ATG και καταλήγει σε ένα κωδικόνιο τερματισμού (TAA, TAG ή TGA). Εν μέρη το κωδικόνιο της μεθειονίνης (κωδικόνιο έναρξης καθορίζει το πλαίσιο ανάγνωσης του mRNA και έτσι προκύπτει ότι ο GDF-1 αναγνωρίζεται από το κάτω ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και καταλήγει σε μια τριπλέτα τερματισμού με κωδικόνιο λήξης όπου σηματοδοτεί στον τερματισμό της μετάφρασης (Zhang, etal. 2008). Επομένως η ανάλυση περιπλέκεται στο γεγονός ότι κάθε αλληλουχία DNA έχει έξι πλαίσια ανάγνωσης (reading frames), τρία στη μια κατεύθυνση και τρία στην αντίθετη κατεύθυνση στο συμπληρωματικό κλώνο.



Εικόνα 2. Δομή και οργάνωση του γονιδίου /Atlas of Genetics and Cytogenesis

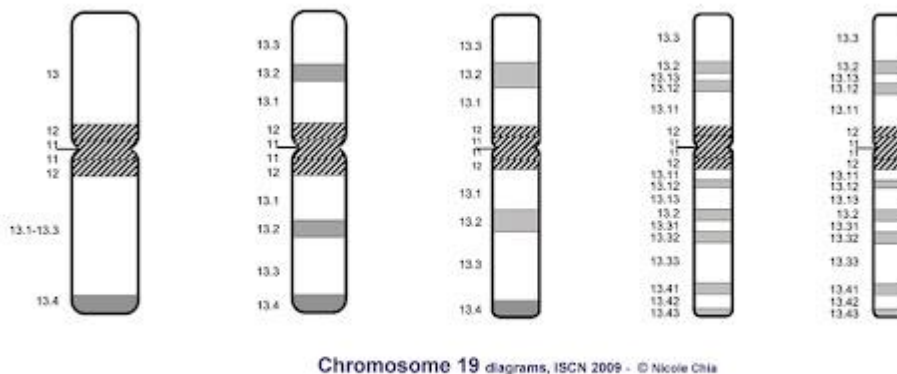
2.3. Χρωμόσωμα 19

Το γονιδίωμα που βρίσκεται στον πυρήνα των σωματικών κυττάρων του ανθρώπου αποτελείται από 46 χρωμοσώματα, οργανωμένα σε 23 ζεύγη. Από αυτά τα 22 ζεύγη χρωμοσωμάτων είναι όμοια στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα οπού ονομάζονται αυτοσωματικά και αριθμούνται με βάση το μέγεθος τους από το μεγαλύτερο στο μικρότερο. Ωστόσο το χρωμόσωμα 19 αποτελεί ένα από τα 23 ζεύγη αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων στον άνθρωπο και υπάρχει συνήθως σε 2 αντίγραφα (Crimwood, etal. 2004). Το ζεύγος του χρωμοσώματος 19 ονομάζεται ομόλογο χρωμόσωμα και κληρονομείται το ένα από τη μητέρα και το άλλο από το πατέρα και περιέχει μια ποικιλία γνωστών γονιδίων. Η μορφή που παρουσιάζει είναι μια συνεχή διπλή έλικα, δηλαδή ένα μακρύ γραμμικό δίκλωνο μόριο και εκτείνεται σε περισσότερα από 58, 6 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων. Το 23^ο ζεύγος αποτελείται από 2 φυλετικά χρωμοσώματα (XX για γυναίκα και XY για άνδρες).

Σε κάθε κύτταρο το γονιδιωματικό σχηματίζει συμπλόκα με διαφορές κατηγορίες χρωμοσωματικών πρωτεϊνών και πακετάρεται ως χρωματίνη, οπού κατανέμεται σε όλο τον πυρήνα έχοντας μια σχετικά ομοιογενή εμφάνιση. Στην περίπτωση όμως της κυτταρικής διαίρεσης η χρωματίνη συμπυκνώνεται

σχηματίζοντας δομές ορατές με το μικροσκόπιο, τα χρωμοσώματα. Έτσι τα χρωμοσώματα είναι ορατά ως διακριτές δομές μόνο σε διαιρούμενα κύτταρα, παρόλο που διατηρούν την ακεραιότητα τους κατά το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ δυο κυτταρικών διαιρέσεων (μεσόφαση). Στη χρωματίνη, το μόριο του χρωμοσώματος συνδέεται με μια οικογένεια βασικών πρωτεϊνών που ονομάζονται ιστόνες και μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, τις μη-ιστόνες, οι οποίες παρόλο που δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως φαίνεται ότι συμβάλλουν σημαντικά στη δημιουργία ενός κατάλληλου περιβάλλοντος για τη φυσιολογική συμπεριφορά των χρωμοσωμάτων και τη σωστή γονιδιακή έκφραση των γονιδίων που περιέχονται στο χρωμόσωμα (Fujii, etal. 1986). Υπάρχουν 5 κύριοι τύποι ιστονών που παίζουν σημαντικό ρόλο στο σωστό πακετάρισμα της χρωματίνης, από αυτές 2 αντίγραφα των 4 ιστονών (H2A, H2B, H3, H4) σχηματίζουν έναν οκταμελή πυρήνα, γύρω από τον όποιον περιελίσσεται ένα τμήμα της διπλής έλικας και στη συνέχεια αυτό περιελίσσεται σε διπλό βρόγχο.

Ακολουθεί ένα βραχύ τμήμα διαστημικού και στη συνέχεια ακολουθεί το σύμπλοκο DNA και ιστόνων όπου έχει ως αποτέλεσμα η δομή της χρωματίνης να μοιάζει με κομπολόγιο. Το σύμπλοκο αυτό που αποτελείται από πυρήνα ιστονών και DNA που περιελίσσεται γύρω από αυτόν ονομάζεται νουκλεόσωμα και αποτελεί την βασική μονάδα της χρωματίνης. Η πέμπτη ιστόνη H1 που σε άκρη του νουκλεοσώματος συνδέεται με το DNA. Συνήθως το χρωμόσωμα περνά από δυο διαδοχικές φάσεις γνωστές ως φάσεις συμπύκνωσης και αποσυμπύκνωσης.

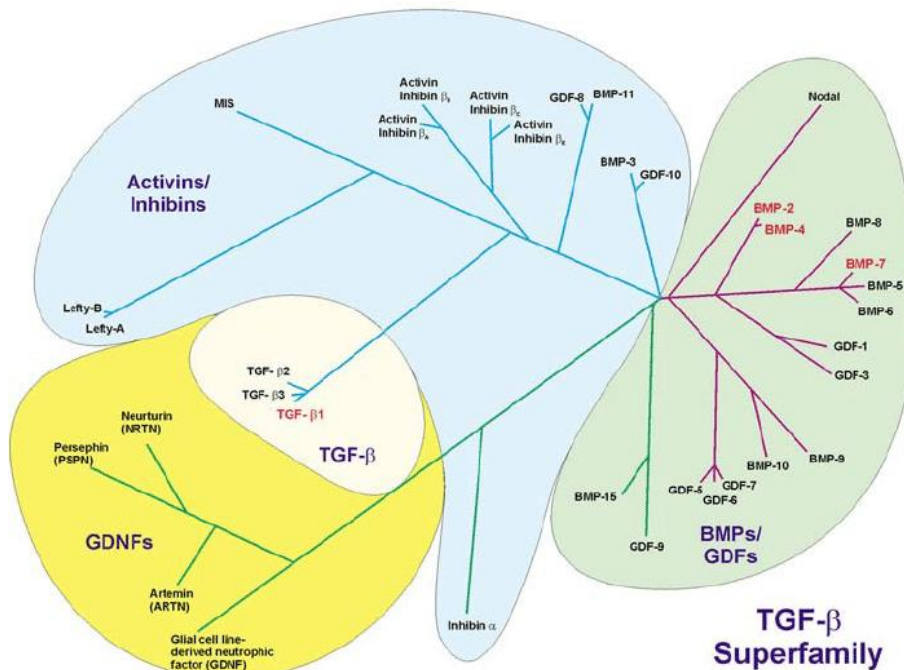


Εικόνα3. Chromosome 19 - ISCN 2009 1 /Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

Κεφάλαιο 3. ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TGF-β

Για πρώτη φορά περιεγράφηκε το 1983 και ονομάστηκε υπεροικογένεια από το πρώτο μέλος που βρέθηκε μέσα από διαφορές έρευνες. Αυτή η υπεροικογένεια αποτελεί μια μεγάλη οικογένεια από ρυθμιστικές πρωτεΐνες που προέρχονται από τα αντίστοιχα τους γονίδια. Τα μέλη που περιέχουν αποτελούν μια ομάδα κυτταροκινών που επάγουν την δράση τους μετά από την πρόσδεση σε υποδοχείς τύπου I και II που έχουν δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης (DAandR 1998). Οι συνδέτες υπεροικογένειας TGF-β λειτουργούν ως διμερή που συνδέονται με δισουλφίδιο και η ώριμη περιοχή των προσδεμάτων σχηματίζει έναν κόμβο κυστίνης, που σταθεροποιείται από τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ έξι αυστηρά διατηρημένων υπολειμμάτων κυστεΐνης. Έτσι, είναι μέλη της λεγόμενης οικογένειας κόμπο κυστίνη το οποίο περιέχει επίσης άλλες ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες όπως ο αυξητικός παράγοντας των νεύρων, παράγοντα ανάπτυξης που προέρχεται από αιμοπετάλια και χορειακή γοναδοτροπίνη. Όλοι οι συνδέτες της υπεροικογένειας TGF-β (εκτός του GDF3, GDF9 και BMP15) χρησιμοποιούν μια επιπλέον διατηρημένη κυστεΐνη για να σχηματίσουν έναν διαμοριακό δισουλφιδικό δεσμό που σταθεροποιεί το διμερές. Αν και οι περισσότεροι συνδέτες φαίνεται να δρουν ως ομοδιμερή, έχει επίσης αποδειχθεί ότι υπάρχουν και οι ετεροδιμερή συνδέτες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα όπως η ακτιβίνη που είναι ετεροδιμερή και ετεροδιμερή που σχηματίζονται μεταξύ BMP15 και GDF9 και μεταξύ NODAL και GDF-1. Επιπλέον, στα ψάρια ζέβρα, τα BMP2 και BMP7 σχηματίζουν υποχρεωτικά ετεροδιμερή που απαιτούνται για τη σηματοδότηση στο πρώιμο έμβρυο (Savage-Dunn 2005). Οι συνδέτες υπεροικογένειας TGF-β συντίθενται όλοι ως πρόδρομοι, με μεγάλο προτομέα και ώριμη περιοχή. Ο διμερισμός θεωρείται ότι συμβαίνει ενδοκυτταρικά και εξαρτάται από την παρουσία του προτομέα. Η διάσπαση της ώριμης περιοχής από την προτομή στη συνέχεια μεσολαβείται από πρωτεάσες της οικογένειας της προπρωτεϊνικής κονβερτάσης που μοιάζει με σουμπιλισίνη (SPC). Μερικοί από τους συνδέτες έχουν πολλαπλές θέσεις διάσπασης και πρόσφατα δεδομένα υποδηλώνουν ότι για το BMP4 αυτές οι διασπάσεις πρέπει να είναι διαδοχικές και όχι ταυτόχρονες προκειμένου να διατηρηθεί η λειτουργία του συνδέτη. Οι ίδιοι οι TGF-β, καθώς και το GDF8 και το στενά συνδεδεμένο GDF-11, εκκρίνονται ως λανθάνουσες μορφές που εξακολουθούν να είναι μη ομοιοπολικά συνδεδεμένες με τα προπεπτίδια τους. Στην περίπτωση των TGF-β, το λανθάνον πρόσδεμα σχηματίζει ένα συνδεδεμένο με δισουλφίδιο σύμπλοκο με LTBP (λανθάνουσες πρωτεΐνες δέσμησης TGF-β), οι οποίες συνδέονται με την εξωκυτταρική μήτρα μέσω αλληλεπιδράσεων με ινιμπριλλίνες. Αυτό ρυθμίζει τη διάχυση, την αποθήκευση, την παρουσίαση και την απελευθέρωση των ενεργών TGF-β. Απαιτείται ένα

πραιτέρω βήμα ενεργοποίησης για την απελευθέρωση του ενεργού συνδετήρα. Στην περίπτωση του TGF-β1 και του TGF-β3, αυτό περιλαμβάνει τη σύνδεση των ιντεγκρινών α_vβ₆ ή α_vβ₈ σε μοτίβα RGD στους προτομείς των προσδεμάτων, αλλά και άλλους μηχανισμούς που περιλαμβάνουν πρωτεάσες, θρομβοσπονδίνη 1, αντιδραστικά είδη οξυγόνου και χαμηλό pH, μπορούν επίσης να ενεργοποιήσουν τον TGF-β (M.Kingsley 1994).



Εικόνα4. Υπεροικογένεια TGF-beta

https://www.researchgate.net/figure/The-TGF-beta-superfamily-Based-on-their-structural-features-the-35-mammalian-members-of_fig1_26253524

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί και περιγράφει λεπτομερώς 40 εκκρινόμενες διμερείς πρωτεΐνες που κατατάσσονται σε 5 κύριες υποοικογένειες όπου κωδικοποιούνται από 23 διακριτούς τύπους γονίδιων με χρήση υποδοχέων τύπου I και II.

- 1) BMPs (Bone Morphogenetic Proteins): Αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά την δεκαετία του 1960 και πρόκειται για πολυλειτουργικοί αυξητικοί παράγοντες που συμβάλλουν κυρίως στην μορφογένεση των οστών με διακριτά λειτουργικά 20 μέλη .
- 2) GDFs: Γνωστά 9 μέλη που συμμετέχουν κατά την ανάπτυξη και διαφοροποίηση του εμβρύου.
- 3) Activin/Inhibin: Οι ακτιβίνες ανακαλύφθηκαν το 1986 και είναι διμερείς γλυκοπρωτείνες όπου προκύπτουν από την συναρμολόγηση δυο βήτα υποομάδων με γνωστά 3 μέλη

activins (A, AB, B). Ενώ οι ινχιμπίνες έγιναν γνωστές το 1923 και προκύπτει ότι είναι γονιδιακή ορμόνη που ασκεί μια ειδική αρνητική δράση ανατροφοδότησης στην έκκριση της FSH από τα γοναδοτροπικά κύτταρα της υπόφυσης με πιο γνωστά τα 2 μέλη inhibins (A, B).

- 4) TGF-beta: Η οικογένεια των κυτοκινών TGF-beta είναι πανταχού παρούσα, πολυλειτουργική και απαραίτητη για την επιβίωση. Παίζουν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη και την φλεγμονή και την αποκατάσταση και την ανοσία του ξενιστή. Οι ισομορφές TGF-βήτα θηλαστικού (TGF-beta 1, βήτα 2 και βήτα 3) εκκρίνονται ως λανθάνοντες πρόδρομοι και έχουν πολλαπλούς υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας από τους οποίους τουλάχιστον δύο μεσολαβούν στη μεταγωγή σήματος. Τα αυτοκρινικά και παρακρινικά αποτελέσματα των TGF-beta μπορούν να τροποποιηθούν από την εξωκυτταρική μήτρα, τα γειτονικά κύτταρα και άλλες κυτοκίνες. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 3 γνωστά μέλη με επικρατέστερο και συχνό το TGF-β1.
- 5) Nodal, LEFTYA, LEFTYB, Anti-Müllerian Hormone (AMH): όπου έχουν διπλή η ανασταλτική δράση έναντι άλλων μελών της υπερικογένειας.

Τα μέλη αυτά συνήθως συμμετέχουν σε διαφόρους κύκλους κατά τη ρύθμιση βιολογικών διεργασιών, στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση, ομοιόσταση ιστών, απόπτωση και σύνθεση και αποικοδόμηση στοιχείων εξοκυτταρικού στρώματος.

3.1. Υποδοχείς TGF-B

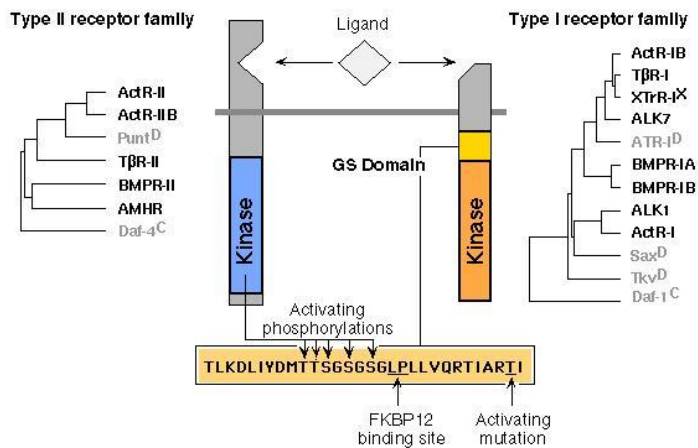
Η υπερικογένεια του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα βήτα των διμερών πολυπεπτιδικών αυξητικών παραγόντων ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση και παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη και στην ανοσολογική απόκριση. Η μοριακή κλωνοποίηση των τριών αυτών τύπων υποδοχέων είναι υψηλά συγγενή μεταξύ τους και παρέχουν πληροφορίες για τους ελάχιστα κατανοητούς μηχανισμούς δράσης μεταξύ τους. Οι υποδοχείς τύπου I και τύπου II έχουν έντονη δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης και δράση κινάσης τυροσίνης όπου μπορεί να ετεροολιγομερίζονται για να μεταφέρουν τα κατάλληλα σήματα. Υπάρχει και ο υποδοχέας τύπου III όπου ρυθμίζει τη σύνδεση των προσδεμάτων στο σύμπλοκο σηματοδότησης των υποδοχέων τύπου I και II (VanderArk, Cao and Li 2018). Οι προσδέτες συνδέονται αρχικά ως διμερή με τον τύπο II υποδοχέα και αυτός με τη σειρά του προσελκύει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I φωσφοριώνοντας τον στο ενδομεμβρανικό τμήμα της ενδοκυττάριας επικράτειας του, ενεργοποιώντας τη δράση κινάσης της συγκεκριμένης περιοχής.

Ο παράγων GDF-1 δεν μπορεί να περάσει από την κυτταρική μεμβράνη. Επομένως, για να μπορέσει να λειτουργήσουν οι κυτταρικές διαδικασίες κατά την εμβρυική ανάπτυξη, θα πρέπει να υπάρχει τρόπος να μεταφέρεται το μήνυμά τους μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Αυτό γενικά εκτελείται από διαμεμβρανικούς υποδοχείς, οι οποίοι έχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα ικανό να αναγνωρίσει τον παράγοντα και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα που μεταφέρει τη δραστηριότητα σε ενδοκυτταρικές οδούς μεταγωγής σήματος. Η δέσμευση της πρωτεΐνης με μέλη της οικογένειας των υποδοχέων συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη G (GPCR) οδηγεί σε διάσπαση του GDP από τις G-πρωτεΐνες, επιτρέποντας τη σύνδεση της GTP με μια α-περιοχή της υπομονάδας G-πρωτεΐνης που οδηγεί στην παραγωγή δεύτερου αγγελιοφόρου. Οι GPCR εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος ενός μεγάλου αριθμού ορμονών, όπως οι βιογενείς αμίνες και οι πεπτιδικές και πρωτεϊνικές ορμόνες. Η δέσμευση του συνδέτη σε υποδοχείς συνδεδεμένους με κινάση οδηγεί συνήθως σε πολυμερισμό των υποδοχέων, ακολουθούμενη από ενεργοποίηση των υποδοχέων με αμοιβαία φωσφορυλίωση σε υπολείματα σερίνης/θρεονίνης ή τυροσίνης και επακόλουθη φωσφορυλίωση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που μπορούν να μεταφέρουν το ορμονικό μήνυμα στον πυρήνα ή άλλους στόχους (DerjynckandBudi 2019). Παραδείγματα αυτής της ομάδας είναι οι υποδοχείς για την ινσουλίνη, η αυξητική ορμόνη (GH) και τα μέλη της οικογένειας αυξητικών παραγόντων TGFβ. Η είσοδος του συνδέτη μπορεί να ενισχύσει τη δράση της ορμόνης με τη συνέχιση της δράσης του υποδοχέα μετά την ενσωμάτωση στα ενδοσώματα ή εναλλακτικά να τερματίσει τη σηματοδότηση με λυσοσωμική αποικοδόμηση του συμπλέγματος τελικό προϊόν -υποδοχέα. Τέλος, η δραστηριότητα των υποδοχέων μπορεί να επηρεαστεί από τη δράση συνθετικών ή ενδογενών αγωνιστών και ανταγωνιστών.

Ιστορικά, έχει επικρατήσει οι τύπου II υποδοχείς να ονομάζονται και ALKS (Activin receptor-like-kinases), εξυπηρετώντας έτσι την ανάγκη αντίστοιχης προσδετών και υποδοχέων μεταξύ τους. Οι υποδοχείς τύπου I έχουν παρόμοια δομή με τους υποδοχείς τύπου II, καθώς φέρουν μια περιοχή εξωκυττάρια που περιέχει την επικράτεια σύνδεσης του προσδέτη, μια διαμεμβρανική περιοχή και μια ενδοκυττάρια περιοχή με δράση κινάσης. Στους υποδοχείς I υπάρχει ένα τμήμα με 30 αμινοξικά κατάλοιπα πλούσιο σε σερίνη, θρεονίνη και γλυκίνη μεταξύ διαμεμβρανικής και ενδοκυττάριας περιοχής. Έτσι το τμήμα αυτό περιέχει μια χαρακτηριστική ακολουθία SGSGSG και για αυτό το λόγο ονομάζεται GSeπικράτεια και αποτελεί τη θέση φωσφορυλίωσης του υποδοχέα τύπου I από τους υποδοχείς τύπου II. Η φωσφορυλίωση της περιοχής της GS οδηγεί στην απελευθέρωση του ενεργού κέντρου πρόσδεσης του, με αποτέλεσμα να ενεργοποιήσει την δράση κινάσης του υποδοχέα τύπου I (N.Khalil 2015). Ο διμερής προσδέτης TGFβ αρχικά προσδέεται

στον υποδοχέα τύπου II και σε αυτή τη μορφή αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα τύπου I. Ο υποδοχέας τύπου I διαθέτει μια περιοχή η οποία φωσφορυλιώνεται ύστερα από την πρόσδεση του TGFβ και δημιουργείται σύμπλοκο μεταξύ TGFβ και υποδοχέα τύπου II όπου έχει δράση σερίνης/θρεονίνης και φωσφορυλιώνουν τον υποδοχέα τύπου I και αυτός με τη σειρά του θα φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη SMAD2/3, όπου αυτή με τη σειρά του θα συνδεθεί με τη SMAD4 και θα εισέλθουν στον πυρήνα όπου θα αρχίσουν την μεταγραφή του γονιδίου στόχου (R.Derynck 1994). Η φωσφορυλίωση του υποδοχέα I γίνεται σε μία περιοχή που βρίσκεται λίγο κάτω από την πλασματική μεμβράνη και είναι πλούσια σε γλυκίνη και σερίνη.

TGF-β Receptors I & II



Εικόνα 5. Υποδοχείς I και II

https://jkweb.berkeley.edu/external/pdb/2001/tgf_beta_R1/tgfbri.html

Κεφάλαιο 4. ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ GDF-1

Η σηματοδότηση της υπερικογένειας αλλά και του παράγοντα GDF-1 γίνεται κυρίως με υποδοχείς τύπου I και με τρεις διαφορετικούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς με χρήση πρωτεϊνών όπως η κυρία οδός σηματοδότησης με SMAD πρωτεΐνες, η εναλλακτική οδός με ECF-CEK πρωτεΐνες και η Nodal όπου διεγείρει την κομβική σηματοδότηση. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται αναλυτικά οι τρεις οδοί σηματοδότησης.

4. 1 Ενδοκυττάρια σηματοδότηση μέσω Smad πρωτεϊνών

Τα SMADs περιλαμβάνουν μια οικογένεια δομικά παρόμοιων πρωτεϊνών που είναι οι κύριοι μετατροπείς σήματος για υποδοχείς της υπεροικογένειας του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα (TGF-β), οι οποίοι είναι κρίσιμα σημαντικοί για τη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και ανάπτυξης. Η συντομογραφία αναφέρεται στις ομολογίες των γονιδίων *Caenorhabditis elegans* SMA («μικρός» φαινότυπος σκουληκιού) και της οικογένειας MAD («Mothers Against Decapentaplegic») γονιδίων στο *Drosophila* (Miyasawa and Miyazono 2017).

Το πρώτο μέλος της οικογένειας των SMAD ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στην *Drosophila melanogaster*. Πρόκειται για μια ομάδα ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταγωγή σήματος των προσδέτων της υπεροικογένειας TGF-β και ενεργοποιούν την μεταγραφή των αντίστοιχων γονιδίων. Τα SMAD έχουν μήκος περίπου μεταξύ 400 και 500 αμινοξέων και αποτελούνται από δύο σφαιρικές περιοχές στο αμινο και καρβοξυ άκρο, που συνδέονται με μια περιοχή συνδέτη. Αυτές οι σφαιρικές περιοχές είναι εξαιρετικά διατηρημένες στα R-SMADs και Co-SMADs και ονομάζονται Mad ομολογία 1 (MH1) στο N-άκρο και MH2 στο C-άκρο. Ο τομέας MH2 διατηρείται επίσης στο I-SMADs. Η περιοχή MH1 εμπλέκεται κυρίως στη δέσμευση του DNA, ενώ η MH2 είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με άλλα SMADs και επίσης για την αναγνώριση μεταγραφικών συνενεργοποιητών και συν-κατασταλτών (Attisano and Hoetlich 2001). Τα R-SMADs και SMAD4 αλληλεπιδρούν με πολλά μοτίβα DNA μέσω του τομέα MH1. Αυτά τα μοτίβα περιλαμβάνουν το CAGAC και την παραλλαγή του CAGCC, καθώς και τη συναινετική ακολουθία 5 bp GGC (GC) | (CG). Τα φωσφορυλιωμένα με υποδοχέα R-SMADs μπορούν να σχηματίσουν ομοτριμερή, καθώς και ετεοτριμερή με SMAD4 in vitro, μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των περιοχών MH2. Τα τριμερή ενός μορίου SMAD4 και δύο μορίων R-SMAD με φωσφορυλιωμένα υποδοχέα πιστεύεται ότι είναι οι κυρίαρχοι τελεστές της μεταγραφικής ρύθμισης του TGF-β. Η περιοχή σύνδεσης μεταξύ MH1 και MH2 δεν είναι απλώς ένας σύνδεσμος, αλλά παίζει επίσης ρόλο στη λειτουργία και τη ρύθμιση της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, τα R-SMADs φωσφορυλιώνονται στον πυρήνα στην περιοχή συνδέτη από τα CDK8 και 9, και αυτές οι φωσφορυλίωσεις ρυθμίζουν την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών SMAD με μεταγραφικούς ενεργοποιητές και καταστολείς. Επιπλέον, μετά από αυτό το βήμα φωσφορυλίωσης, ο συνδέτης υφίσταται έναν δεύτερο γύρο φωσφορυλίωσης από το GSK3, επισημαίνοντας τα SMADs για την αναγνώρισή τους από λιγάσες ουβικιτίνης και στόχευσή τους για αποικοδόμηση που προκαλείται από πρωτεάσωμα. Οι ενεργοποιητές μεταγραφής και οι λιγάσες ουβικιτίνης περιέχουν και τα δύο ζεύγη τις ίδιες περιοχές. Αυτές οι περιοχές αλληλεπιδρούν με το μοτίβο PY που υπάρχει στον

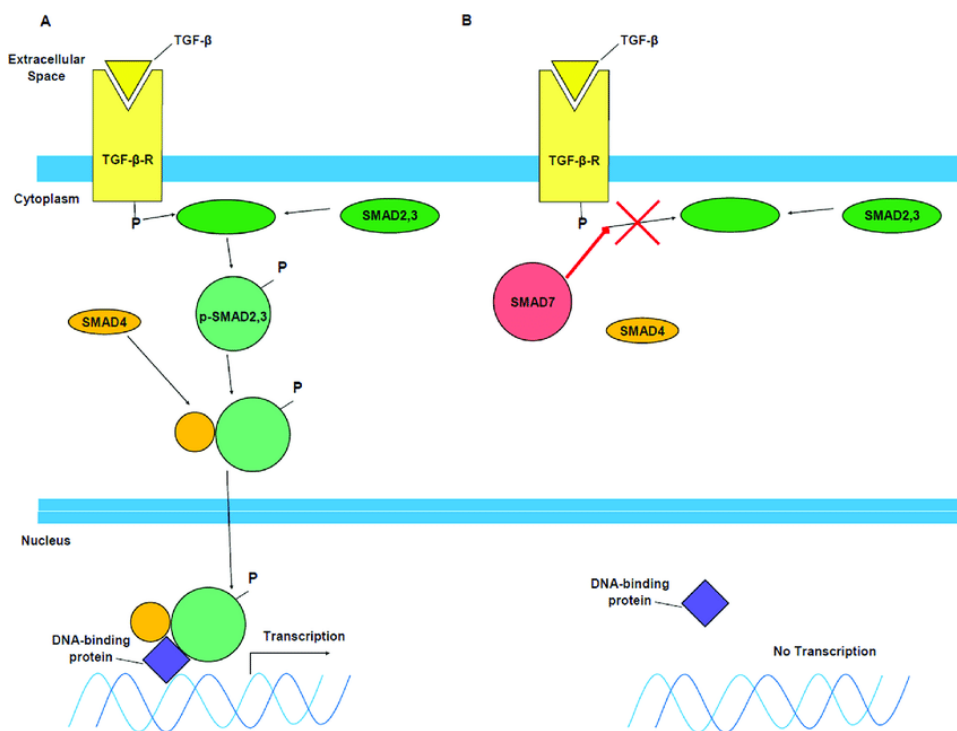
συνδέτη R-SMAD, καθώς και με τα φωσφορυλιωμένα υπολείμματα που βρίσκονται κοντά στο μοτίβο. Πράγματι, τα διαφορετικά πρότυπα φωσφορυλίωσης που δημιουργούνται από τα CDK8/9 και GSK3 καθορίζουν τις συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις είτε με ενεργοποιητές μεταγραφής είτε με λιγάσες ουβικιτίνης. Αξιοσημείωτα, η περιοχή συνδέτη έχει την υψηλότερη συγκέντρωση διαφορών αμινοξέων μεταξύ των μεταζωαρίων, αν και οι θέσεις φωσφορυλίωσης και το μοτίβο PY διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό.

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες και βρέθηκαν 3 κατηγορίες SMAD πρωτεϊνών:

1. Οι receptor SMADs (R-smads): όπου περιλαμβάνουν κυρίως τις SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 και SMAD8/9,
2. Οι common SMADs (Co-SMADs): οι οποίες περιλαμβάνουν μονό την SMAD4 και αλληλεπιδρά με τις άλλες πρωτεΐνες της άλλης κατηγορίας και συμμετέχει στη σηματοδότηση της υπερικογένειας TGF-B,
3. Οι Inhibitory antagonistic SMADs (I-SMADs): που περιλαμβάνουν κυρίως την SMAD6 και SMAD7 και συμμετέχουν στη σηματοδότηση και μπλοκάρει τις άλλες πρωτεΐνες των κατηγοριών, R-smads και Co-smads ώστε να μην αλληλεπιδρούν στη σηματοδότηση.

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει, έχουν αναγνωριστεί ότι οι R-smads και οι Co-smads περιέχουν στα N και C τελικά άκρα της πρωτεΐνης GDF-1 περιοχές που ονομάζονται Mad Homology domains (MH1 και MH2). Η MH1 περιοχή είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση σε συγκεκριμένες ακολουθίες και η MH2 για την αλληλεπίδραση του παράγοντα GDF-1 με τους υποδοχείς I και ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Επομένως, η σηματοδότηση διάμεσου των πρωτεϊνών ακολουθεί την διαδικασία σύνδεσης τύπου II και ενεργοποίηση του υποδοχέα τύπου I που είναι απαραίτητη για την μεταγωγή του σήματος του παράγοντα, όπου με την σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το C- τελικό άκρο των πρωτεϊνών. Ακολουθεί η σύνδεση με SMAD 4 και σχηματίζει σύμπλοκο μέσα στον πυρήνα όπου και ενεργοποιεί τον μεταγραφικό της ρόλο κατά την διαδικασία μεταγραφής του γονιδίου (Li 2014). Η σηματοδότηση μέσω των πρωτεϊνών μεταδίδει άμεσα τα σήματα από τους υποδοχείς της υπερικογένειας στον πυρήνα ρυθμίζοντας την έκφραση πλήθους γονιδίων ανάλογα με το κυτταρικό περιβάλλον. Επομένως η μεταγωγή σήματος μέσω SMAD είναι ενδοκυττάρια οδός και μεταφράζει το αντίστοιχο γονίδιο στην σωστή θέση και στον κατάλληλο χρόνο. Οι συνδέτες TGF-B δεσμεύουν υποδοχείς που αποτελούνται από κινάσες σερίνης/θρεονίνης τύπου I και τύπου II, οι οποίοι χρησιμεύουν για τη διάδοση του σήματος

ενδοκυτταρικά. Η δέσμευση συνδέτη σταθεροποιεί ένα σύμπλεγμα υποδοχέα που αποτελείται από δύο υποδοχείς τύπου I και δύο υποδοχείς τύπου II. Οι υποδοχείς τύπου II μπορούν στη συνέχεια να φωσφορυλιώνουν τους υποδοχείς τύπου I σε θέσεις στην περιοχή GS, που βρίσκονται N-τερματικά στην περιοχή κινάσης τύπου I. Αυτό το συμβάν φωσφορυλίωσης ενεργοποιεί τους υποδοχείς τύπου I, καθιστώντας τους ικανούς να διαδώσουν περαιτέρω το σήμα TGF-B μέσω SMADs. Οι υποδοχείς τύπου I φωσφορυλιώνουν τα R-SMADs σε δύο C-τερματικές σερίνες, οι οποίες είναι διατεταγμένες σε ένα μοτίβο SSXS. Τα SMADs εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια από πρωτεΐνες SMAD anchor for receptor activation (SARA), τοποθετώντας τα κοντά σε κινάσες υποδοχέα τύπου I για να διευκολυνθεί η φωσφορυλίωση. Η φωσφορυλίωση του R-SMAD το κάνει να αποσυνδεθεί από το SARA, εκθέτοντας μια αλληλουχία πυρηνικής εισαγωγής, καθώς και προωθώντας τη συσχέτισή του με ένα Co-SMAD (Hill 2016). Αυτό το σύμπλεγμα SMAD εντοπίζεται στη συνέχεια στον πυρήνα, όπου είναι σε θέση να δεσμεύσει τα γονίδια-στόχους τους, με τη βοήθεια άλλων σχετικών πρωτεϊνών.



Εικόνα6. Σηματοδότηση μέσω SMAD πρωτεϊνών

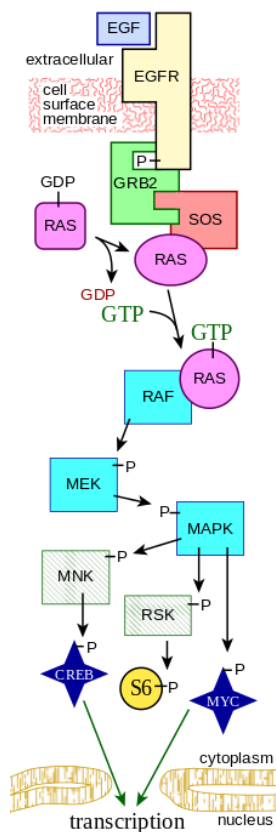
https://www.researchgate.net/figure/Hypothesized-simplified-role-of-SMAD-proteins-in-TGF-b-signaling-in-inflammatory_fig1_323001263

4.2 Εναλλακτική οδός σηματοδότησεως Mark/erk

Η οδός MAPK/ERK (επίσης γνωστή ως οδός Ras-Raf-MEK-ERK) είναι μια αλυσίδα πρωτεϊνών στο κύτταρο που επικοινωνεί ένα σήμα από έναν υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου το DNA στον πυρήνα του κυττάρου. Το σήμα ξεκινά όταν ένα μόριο σηματοδότησης συνδέεται με τον υποδοχέα στην επιφάνεια του κυττάρου και τελειώνει όταν το DNA στον πυρήνα εκφράζει μια πρωτεΐνη και παράγει κάποια αλλαγή στο κύτταρο, όπως κυτταρική διαίρεση. Η οδός περιλαμβάνει πολλές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης της MAPK όπου αρχικά ενεργοποιούνται από πρωτεϊνικές κινάσες, που αρχικά ονομάζονταν ERK, οι οποίες επικοινωνούν προσθέτοντας φωσφορικές ομάδες και φωσφορυλιώνοντας σε μια γειτονική πρωτεΐνη, η οποία δρα ως «on» ή «διακόπτης απενεργοποίησης» (Pan, et al. 2018).

Η διέγερση υποδοχέων αυξητικών παραγόντων οδηγεί στην ενεργοποίηση της μικρής πρωτεΐνης που δεσμεύει GTPRas, η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεϊνική κινάση Raf. Η ενεργοποιημένη Raf με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τη MEK, μια κινάση πρωτεϊνικής φύσεως με διπλή ειδικότητα που ενεργοποιεί την ERK φωσφορυλιώνοντας θρεονίνες και τυροσίνες. Στη συνέχεια η ERK με τη σειρά της φωσφορυλιώνει διάφορες πυρηνικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Εκτός από την ERK, τα κύτταρα θηλαστικών διαθέτουν τις κινάσες MAP JNK και p38. Η ενεργοποίηση των κινάσων JNK και p38 προκαλείται από την υποοικογένεια της Rho, οι οποίες πυροδοτούν τις καταρακτικές πρωτεϊνικών κινάσων και με αυτόν τον τρόπο οδηγούν στην ενεργοποίηση της ERK. Η ενεργοποιημένη ERK μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου φωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα Elk-1. Ο Elk-1, σε συμπλοκό με τον παράγοντα απόκρισης στον ορο (SRF), προσδέεται στο στοιχείο απόκρισης στον ορό (SRE). Η φωσφορυλίωση ενεργοποιεί τον θετικό μεταγραφικό παράγοντα Elk-1, προκαλώντας την επαγωγή των πρώιμων γονιδίων (R.T 2013). Η οδός EGFR-ERK/MARK (υποδοχέας επιδερμικού αυξητικού παράγοντα εξωκυτταρικά ρυθμιζόμενη κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο πρωτεΐνη κινάση) που διεγείρεται από EGF είναι κρίσιμη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αλλά ο χρονικός διαχωρισμός μεταξύ σήματος και απόκρισης κρύβει το σήμα -σχέση ανταπόκρισης σε προηγούμενη έρευνα. Το 2013, οι Albeck και οι συνεργάτες του παρείχαν βασικά πειραματικά στοιχεία για να καλύψει αυτό το κενό γνώσης. Μέτρησαν την ισχύ και τη δυναμική του σήματος με διέγερση EGF σε σταθερή κατάσταση, στην οποία η σηματοδότηση και η έξοδος μπορούν εύκολα

να συσχετιστούν (Lavoie, CagnonandTherrien 2020). Χαρτογράφησαν περαιτέρω τη σχέση σήματος-απόκρισης σε όλο το πλήρες δυναμικό εύρος της διαδρομής. Χρησιμοποιώντας ανίχνευση ανοσοφθορισμού υψηλής περιεκτικότητας (HCIF) φωσφορυλιωμένων βιοαισθητήρων ERK (pERK) και ζωντανών κυττάρων FRET, παρακολούθησαν την έξοδο της οδού ERK τόσο σε ζωντανά κύτταρα όσο και σε σταθερά κύτταρα. Για να συνδέσουν περαιτέρω τα ποσοτικά χαρακτηριστικά της σηματοδότησης ERK με τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού, καθιέρωσαν μια σειρά από συνθήκες σταθερής κατάστασης χρησιμοποιώντας μια σειρά συγκεντρώσεων EGF εφαρμόζοντας EGF με διαφορετικές συγκεντρώσεις.



Εικόνα 7. Εναλλακτική Σηματοδότηση με MARK/ERK οδός
https://en.wikipedia.org/wiki/MAPK/ERK_pathway#/media/File:MAPKpathway_diagram.svg

4.3 Κομβική σηματοδότηση nodal

Η πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη περιλαμβάνει το Nodal, το οποίο σχετίζεται με τη διαμόρφωση αριστερά-δεξιά του εμβρυϊκού άξονα. Οι μελέτες έχουν υποστηρίξει μια αλληλεπίδραση μεταξύ Nodal και GDF-1 σε αυτό το μοτίβο (Andersson, etal. 2007). Αυτό βασίζεται στο εύρημα ότι σοβαρές ανωμαλίες, όπως η απουσία νωτιαίας χορδής και προχορδικής πλάκας, δυσμορφία του πρόσθιου εντέρου και των οργανωτικών κέντρων, που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της πρόσθιας

κεφαλής και των κλαδικών τόξων, εμφανίστηκαν στο GDF-1 (-/-)/ Κομβικά (+/-) μεταλλάγματα, αλλά δεν παρατηρήθηκαν ανωμαλίες σε μεμονωμένες μεταλλάξεις GDF-1 (-/-) ή Nodal (+/-). Α), επίσης το FoxA2 (Forkhead box transcription factor A2) και το Goosecoid ανακαλύφθηκαν πως ρυθμίζονται προς τα κάτω στην πρώτη σειρά των διπλών μεταλλαγμένων εμβρύων. Ωστόσο, το Nodal στοιχείο στον κόμβο του Hensen λειτουργούσε ανεξάρτητα από το GDF-1. Η διήθηση των επιβλαστικών κυττάρων στην πρόσθια πρωτόγονη ράβδωση διαφοροποιείται πράγματι στο αξονικό μεσοενδόδερμα. Τα επιβλαστικά κύτταρα δημιουργούνται από τον κόμβο του Hensen προς τα εμπρός ως μεσοδερμικό συστατικό που εμπλέκεται στην επαγωγή της νευρικής πλάκας στο υποθετικό νευροεκτόδερμα. Αυτό θα υποδηλώνει τότε ότι ο παράγων GDF-1 δεν απαιτείται με το Nodal στη διαμόρφωση της νευρικής πλάκας. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι η νευροεκδερμική επαγωγή λαμβάνει χώρα από την αντιπροσώπευση του υποκείμενου μεσοενδόδερμου, το οποίο εκφράζει το Goosecoid. Στη συνέχεια, η έκφραση της χήνας εξαπλώνεται σταδιακά στο εξωδερμικό στρώμα (Fuerer, Nostro and B. Constum 2014). Έτσι, παρόλο που το Nodal φαινομενικά λειτουργεί ανεξάρτητα από τον παράγοντα GDF-1, η μεταφορά του παράγοντα μεταγραφής θα μπορούσε να λαμβάνει χώρα στη διαδικασία της επαγωγής. Από την άλλη πλευρά, μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες. Εδώ, οι ερευνητές για να επιδεικνύουν μια γενετική αλληλεπίδραση μεταξύ GDF-1 και Nodal κατά την ανάπτυξη του πρόσθιου άξονα περιέγραψαν τις μεταλλάξεις GDF-1^{-/-};Nodal^{+/-} όπου εμφάνισαν αρκετές ανωμαλίες που δεν υπήρχαν σε μεμονωμένα μεταλλάξεις GDF-1^{-/-} ή Nodal^{+/-}, συμπεριλαμβανομένης της απουσίας νωτιαίας χορδής και της προχορδιακής πλάκας και δυσμορφίας του πρόσθιου εντέρου. Τα οργανωτικά κέντρα που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της πρόσθιας κεφαλής και των κλαδικών τόξων, αντίστοιχα παρουσίαζαν ότι σε περίπτωση συμφωνίας με αυτά τα ελλείμματα, τα μεταλλαγμένα έμβρυα GDF-1^{-/-};Nodal^{+/-} εμφάνισαν έναν αριθμό ανωμαλιών της μέσης αξονικής γραμμής, συμπεριλαμβανομένης της ολοπροεγκεφαλίας, της πρόσθιας αποκοπής της κεφαλής, της σχισμής του χείλους, της συντηγμένης ρινικής κοιλότητας και της έλλειψης γνάθων και γλώσσας.

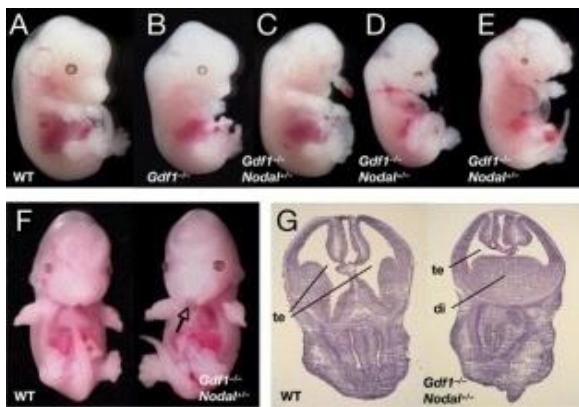
Η απουσία αυτών των ελαττωμάτων σε μεμονωμένα μεταλλάξεις έδειξε μια συνεργική αλληλεπίδραση μεταξύ Nodal και GDF-1 στον κόμβο, από την οποία προέρχεται το αξονικό μεσοενδόδερμα που δημιουργεί τη νωτιαία χορδή, την προχορδική πλάκα και το ενδόδερμα του πρόσθιου εντέρου και όπου οι δύο παράγοντες συνεκφράζονται. Αυτή η ιδέα υποστηρίχθηκε από μια σοβαρή προς τα κάτω ρύθμιση του FoxA2 και του goosecoid στην πρόσθια πρωτόγονη ράβδωση των διπλών μεταλλαγμένων εμβρύων. Σε αντίθεση με εκείνη στο μεσόδερμα της πλάγιας

πλάκας, η κομβική έκφραση στον κόμβο ήταν ανεξάρτητη από το GDF-1, υποδεικνύοντας ότι και οι δύο παράγοντες δρουν παράλληλα για να ελέγξουν την ανάπτυξη μεσενδερματικών προδρόμων. Πειράματα ανασύστασης υποδοχέα έδειξαν ότι το GDF-1, όπως και το Nodal, μπορεί να σηματοδοτήσει μέσω των υποδοχέων τύπου I ALK4 και ALK7.

Ωστόσο, η ανάλυση των μεταλλαγμένων ενώσεων έδειξε ότι η ALK4, αλλά όχι η ALK7, ήταν υπεύθυνος για τις επιδράσεις του GDF-1 και του Nodal κατά την ανάπτυξη του πρόσθιου άξονα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το GDF-1 και το Nodal συγκλίνουν στο ALK4 στην πρόσθια πρωτόγονη ράβδωση για να ελέγξουν το σχηματισμό οργανωτικών κέντρων που είναι απαραίτητα για την κανονική ανάπτυξη του πρόσθιου εγκεφάλου και του κλαδικού τόξου. Τις τελευταίες δεκαετίες, η κατανόησή μας για το εμβρυϊκό γονίδιο Cripto-1 έχει προχωρήσει σημαντικά μέσω βιοχημικών, κυτταρικής βιολογίας και μελετών σε ζώα. Στην πραγματικότητα, το Cripto-1 ρυθμίζει τη σηματοδότηση των μελών της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα-β μετασχηματισμού, συμπεριλαμβανομένων των Nodal, GDF-1/-3, Activin και TGF-β1, ενεργοποιεί την οδό c-src/MAPK/Πρωτεϊνικής Κινάσης B (AKT) σε οδούς που εξαρτάται από το Glypican-1 και το GRP78, και αλληλεπιδράσεις με erbB4, Wnt/β-κατενίνη, Notch, Caveolin-1 και Apelin/υποτιθέμενη πρωτεΐνη υποδοχέα που σχετίζονται με τις οδούς του υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης (APJ). Αυτό το άρθρο παρέχει μια ενημερωμένη έρευνα των διαφόρων οδών σηματοδότησης που διαμορφώνονται από το Cripto-1 με εστίαση στις μηχανιστικές ιδέες για την κατανόησή μας για τη βιολογική λειτουργία του Cripto-1 στα ευκαρυωτικά κύτταρα (Strizzi, et al. 2011). Το GDF-1 (συντελεστής ανάπτυξης/διαφοροποίησης 1), ένα μέλος που σχετίζεται με το Vg1 της υπεροικογένειας του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-βήτα, απαιτείται για το μοτίβο αριστερά-δεξιά στο ποντίκι, αλλά η ακριβής λειτουργία του GDF-1 έχει παραμείνει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Σε αντίθεση με προηγούμενες παρατηρήσεις, τώρα δείχνουμε ότι το ίδιο το GDF-1 δεν είναι ένας αποτελεσματικός συνδετήρας αλλά μάλλον λειτουργεί ως συνδεσμικός παράγοντας για το Nodal. Το GDF-1 αλληλεπιδρά άμεσα με το Nodal και έτσι αυξάνει σημαντικά τη συγκεκριμένη δραστηριότητά του. Η έκφραση GDF-1 στον κόμβο βρέθηκε απαραίτητη και επαρκής για την έναρξη της ασύμμετρης κομβικής έκφρασης στην πλάγια πλάκα των εμβρύων ποντικού.

Η συνέκφραση του GDF-1 με το Nodal σε έμβρυα βατράχου αύξησε το εύρος του σήματος Nodal. Η εισαγωγή μόνο του Nodal στην πλευρική πλάκα των εμβρύων ποντικού GDF-1 νοκ-άουτ δεν προκάλεσε έκφραση Lefty1 στη μέση γραμμή, λαμβάνοντας υπόψη ότι η εισαγωγή τόσο του Nodal όσο και του GDF-1 έγινε, δείχνοντας ότι το GDF-1 απαιτείται για κομβική σηματοδότηση μεγάλης εμβέλειας από την πλευρική πλάκα έως τη μέση γραμμή. Αυτά τα αποτελέσματα

υποδηλώνουν ότι το GDF-1 ρυθμίζει τη δραστηριότητα και το εύρος σηματοδότησης του Nodal μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης. Η διαδρομή σηματοδότησης NODAL παίζει βασικό ρόλο στην προδιαγραφή του άξονα αριστερά-δεξιά (LR). Το NODAL είναι μέλος της οικογένειας αναπτυξιακών ρυθμιστών TGFβ. Το NODAL, το LEFTY1/LEFTY2 και το GDF-1 δρουν ως συνδέτες για έναν μεμβρανικό υποδοχέα πολλαπλών υπομονάδων που αποτελείται από ACVR1B/ACVR2A/ACVR2B, CFC1 και TDGF1, ο οποίος ελέγχει, μέσω παραγόντων μεταγραφής, όπως γονιδιακά αποτελέσματα FOXH1 και ZIC3. Η οδός μεταγωγής σήματος nodal αντιπροσωπεύει ένα παράδειγμα πολυπαραγοντικής κληρονομικότητας της CHD με κυρίαρχο την Τετραλογία Fallot.



Εικόνα8. Κομβική σηματοδότηση NODAL

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160606000807>

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ GDF-1

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τα αδιαφοροποίητα πρόδρομα κύτταρα οργανώνονται σε πολύπλοκες δομές, οι οποίες εντοπίζονται στους λειτουργικούς ιστούς του ενήλικα. Η σύνθετη αυτή διεργασία απαιτεί την ολοκληρωμένη διαχείριση για τα κύτταρα έτσι ώστε να επιτευχθεί μια φυσιολογική ανάπτυξη. Ο παράγοντας ανάπτυξης / διαφοροποίησης-1 (GDF-1, κωδικοποιημένος από το GDF-1) είναι ένα μέλος της οικογένειας TGF-β άγνωστης λειτουργίας που αρχικά απομονώθηκε από μια βιβλιοθήκη cDNA εμβρύου πρώιμου ποντικού και εκφράζεται ειδικά στο νευρικό σύστημα σε έμβρυα τελευταίου σταδίου και ενήλικα ποντίκια. Για να εξεταστεί η βιολογική λειτουργία και η παθοφυσιολογία του παράγοντα GDF-1, οι ερευνητές δημιούργησαν μια γραμμή ποντικού που φέρει στοχευόμενη μετάλλαξη στο GDF-1 (Hiroschi 2010). Τα ποντίκια GDF-1 - / - εμφάνισαν ένα φάσμα ελαττωμάτων που σχετίζονται με το σχηματισμό αριστερού-δεξιού άξονα, συμπεριλαμβανομένου του σπλαγχνικού τόπου αντίστροφα, του δεξιού

πνευμονικού ισομερισμού και μιας σειράς καρδιακών ανωμαλιών με πιο συχνό την τετραλογία Fallot. Στα περισσότερα έμβρυα GDF-1 - /-, η έκφραση του Ebf1 (πρώην αριστερά-1) στην αριστερή πλευρά της πλάκας δαπέδου και το Leftb (πρώην αριστερά-2), το οζίδιο και το Pitx2 στο μεσοδερμικό αριστερό πλευρικό πιάτο απουσίαζαν, υποδηλώνοντας ότι το GDF-1 ενεργεί πριν από αυτά τα γονίδια είτε άμεσα είτε έμμεσα για να ενεργοποιήσει την έκφρασή τους (C. Orazo, Kuraku, et al. 2019). Τα ευρήματά έδειξαν ότι το GDF-1 δρα νωρίς στην πορεία της γονιδιακής ενεργοποίησης που οδηγεί στις διαταραχές αυτών των σηματοδοτικών οδών με αποτέλεσμα να συμβάλει στην καθιέρωση ασυμετρίας αριστεράς-δεξιάς και διαφόρων μορφών καρδιακών ανωμαλιών.

5.1. Ασύμετρη ετεροταξία

Η ετεροταξία ορίζεται ως μια ανωμαλία όπου τα εσωτερικά θωρακοκοιλιακά όργανα εμφανίζουν ανώμαλη διάταξη κατά μήκος του αριστερού-δεξιού άξονα του σώματος. Αυτός ο γενικός όρος περιλαμβάνει ασθενείς με μεγάλη ποικιλία πολύ σύνθετων καρδιακών αλλοιώσεων ως κύριο αίτιο τον παράγοντα GDF-1 (Shiraishi and Ichikawa 2012). Οι ασθενείς με ετεροταξία μπορούν να στρωματοποιηθούν στα υποσύνολα του συνδρόμου ασπλάνιας και του συνδρόμου πολυπλασίας ή στα υποσύνολα ετεροταξίας με ισομερισμό των δεξιών κολπικών προσαρτημάτων και ετεροταξία με ισομερισμό των αριστερών κολπικών εξαρτημάτων. Η θεραπεία ασθενών με ισομερισμό καθορίζεται από τη φύση και τη σοβαρότητα των σχετικών καρδιακών και εξωκαρδιακών αλλοιώσεων. Οι περισσότερες καρδιακές επεμβάσεις για ασθενείς με ισομερισμό είναι καταπραϋντικής φύσης, καθώς η φυσιολογική ανατομία σπάνια επιτυγχάνεται και τα ποσοστά θνησιμότητας παραμένουν υψηλά για ασθενείς με σύνδρομο ετεροταξίας. Οι ασθενείς με αριστερό ισομερισμό γενικά έχουν λιγότερο σοβαρές καρδιακές δυσπλασίες από εκείνους με δεξιό ισομερισμό και, ως εκ τούτου, περισσότερες πιθανότητες δικοιλιακής επιδιόρθωσης. Για σχεδόν όλους τους ασθενείς με δεξιό ισομερισμό και για πολλούς με αριστερό ισομερισμό, η δικοιλιακή επιδιόρθωση δεν θα είναι εφικτή και όλα τα πρωτόκολλα παρηγορητικής διαδικασίας στη συνέχεια πραγματοποιούν διαδικασίες πριν από την επισκευή τύπου Fontan.

Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ιατρική διαχείριση και οι βελτιώσεις στις χειρουργικές τεχνικές είχαν ως αποτέλεσμα βελτιωμένη επιβίωση για αυτούς τους ασθενείς και τα χειρουργικά αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα με αυτά με κυκλοφορία Fontan ανεξάρτητα από την παρουσία ή απουσία ετεροταξίας (Levin 2004). Είναι επίσης γνωστό ως «site solitus» όπου στο κανονικό σώμα, τα εσωτερικά όργανα είναι διατεταγμένα σε διαφορετικά σχήματα στη δεξιά και την αριστερή

πλευρά, και δεν αντικατοπτρίζουν εικόνες μεταξύ τους. Επομένως, εάν η ασυμμετρία των θωρακικών και κοιλιακών οργάνων είναι η συνήθης ή φυσιολογική κατάσταση, το σύνδρομο της σπλαχνικής ετεροταξίας περιλαμβάνει ασθενείς με ασυνήθιστο βαθμό συμμετρίας ορισμένων από τα θωρακικά και κοιλιακά όργανα, και τα κολπικά εξαρτήματα στην καρδιά. Αυτός ο γενικός όρος περιλαμβάνει ασθενείς με μεγάλη ποικιλία πολύ σύνθετων καρδιακών αλλοιώσεων.

Οι ασθενείς με ετεροταξία μπορούν να στρωματοποιηθούν στα υποσύνολα του συνδρόμου ασπλάνιας και του συνδρόμου πολυπλασίας ή στα υποσύνολα ετεροταξίας με ισομερισμό των δεξιών κολπικών προσαρτημάτων και ετεροταξία με ισομερισμό των αριστερών κολπικών εξαρτημάτων. Η μελέτη που επικράτησε ήταν μεταξύ των ασθενών που είχαν διαγνωστεί με ισομερή αριστερά κολπικά εξαρτήματα, τα δύο τρίτα είχαν απλούστερες μορφές καρδιακής νόσου που ήταν ενδεχομένως κατάλληλες για δισκοιλιακή αποκατάσταση. Οι υπόλοιποι ασθενείς είχαν σύνθετη κυανοτική καρδιακή νόσο, που συχνά συσχετίστηκε με μια μονοκοιλιακή κολποκοιλιακή σύνδεση. Μερικά βρέφη με αριστερό ισομερισμό παρουσίαζαν κυάνωση λόγω του συνδυασμού της κοινής κατάστασης ανάμιξης και της απόφραξης της πνευμονικής οδού εκροής. Όσον αφορά τον αριστερό ισομερισμό, πολλά βρέφη με περίπλοκη νόσο και ισομερή αριστερά εξαρτήματα παρουσίαζαν με καρδιακή ανεπάρκεια λόγω της αριστερής προς τα δεξιά μετατόπιση χωρίς πνευμονική απόφραξη, και συχνά εμφανίζονται με απόφραξη της οδού εκροής της αριστερής κοιλίας. Στον αριστερό ισομερισμό, ο αληθινός ρυθμός κόλπων είναι λιγότερο συχνός, όπως θα μπορούσε να αναμένεται από τη γνωστή υποπλασία του κόλπου σε ασθενείς με ισομερή αριστερά προσαρτήματα.

Σε πολλούς ασθενείς, σημειώθηκε προοδευτική επιβράδυνση του ρυθμού με την προχωρημένη ηλικία, οδηγώντας στην ανάγκη τοποθέτησης μόνιμου βηματοδότη (W.Belmont, et al. 2009). Η θεραπεία ασθενών με ισομερισμό πρέπει να προσδιορίζεται από τη φύση και τη σοβαρότητα των σχετικών καρδιακών και εξωκαρδιακών αλλοιώσεων. Οι περισσότερες καρδιακές επεμβάσεις για ασθενείς με ισομερισμό είναι καταπραϊντικής φύσης, καθώς η φυσιολογική ανατομία σπάνια επιτυγχάνεται. Δεν προκαλεί έκπληξη, λοιπόν, ότι τα ποσοστά θνησιμότητας παραμένουν υψηλά για ασθενείς με σύνδρομο ετεροταξίας. Παράγοντες που έχουν ιστορικά συσχετιστεί με αυξημένο λειτουργικό κίνδυνο περιλαμβάνουν ανωμαλίες της συστηματικής φλεβικής σύνδεσης, μια μερική ή ολική ανωμαλία πνευμονικής φλεβικής σύνδεσης, μια κοινή κολποκοιλιακή βαλβίδα που είναι ανίκανη και μια μορφολογική δεξιά κοιλία που υποστηρίζει τη συστηματική κυκλοφορία. Οι ασθενείς με αριστερό ισομερισμό γενικά έχουν λιγότερο σοβαρές καρδιακές δυσπλασίες από εκείνους με δεξιό ισομερισμό και, ως εκ τούτου, περισσότερες

πιθανότητες δικοιλιακής επιδιόρθωσης. Περίπου τα δύο τρίτα των ασθενών με αριστερό ισομερισμό έχουν ανατομία κατάλληλη για δικοιλιακή αποκατάσταση. Συνήθως, αυτοί οι ασθενείς έχουν κολποκοιλιακά διαφραγματικά ελαττώματα, με ανωμαλίες συστηματικής και πνευμονικής φλεβικής επιστροφής, αλλά με ταυτόχρονες κοιλιακές-αρτηριακές συνδέσεις. Η επιδιόρθωση επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας τυποποιημένες τεχνικές με κατάλληλη ανατροπή της ανώμαλης φλεβικής επιστροφής. Ωστόσο, μετά από δικοιλιακή επισκευή, είναι σύνηθες να συναντάμε προοδευτική παλινδρόμηση της βαλβίδας, ιδιαίτερα στην αριστερή κολποκοιλιακή βαλβίδα. Αυτό συχνά οδηγεί στην ανάγκη για επανεγχείρηση, όπως και η υποτροπιάζουσα υποαορτική στένωση, η οποία είναι πιο συχνή σε άτομα με αριστερό ισομερισμό από ό, τι στη ρύθμιση της συνήθους κολπικής διάταξης (Zhu, W.BelmontandM.Ware 2005).

Για σχεδόν όλους τους ασθενείς με δεξιό ισομερισμό, και για πολλούς με αριστερό ισομερισμό, η δικοιλιακή επισκευή δεν θα είναι εφικτή και όλα τα πρωτόκολλα παρηγορητικής διαδικασίας πραγματοποιούν διαδικασίες για μια επισκευή τύπου Fontan. Οι πιο σύνθετες δυσπλασίες που σχετίζονται με τον ισότοπο *ambiguus*, όπως ο κοινός κόλπος με απλές κοιλίες ή μη ισορροπημένες κοιλίες, και οι σύνθετες δυσπλασίες που σχετίζονται με τη διασταυρούμενη σχέση AV και τη βαριά βαλβίδα AV που βρίσκονται στο περιθώριο έχουν λιγότερες επιλογές για επιτυχή χειρουργική διόρθωση.

5.2. Καρδιακές ανωμαλίες

Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στον αυξητικό παράγοντα διαφοροποίησης-1(*GDF-1*) σχετίζονται με συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες στον άνθρωπο. Οι συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες (ΣΝ) είναι από τις πιο κοινές συγγενείς ανωμαλίες στον άνθρωπο (επίπτωση 8–10 ανά 1.000 γεννήσεις ζωντανών). Αν και η αιτιολογία τους είναι συχνά ελάχιστα κατανοητή, οι περισσότερες θεωρείται ότι προέρχονται από πολυπαραγοντικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένων περιβαλλοντικών και γενετικών συστατικών, καθώς και από λιγότερο κοινές συνδρομικές μορφές (M.Dykes 2018). Οι ερευνητές υπόθεσαν ότι οι διαταραχές στο μοτίβο αριστερά-δεξιά θα μπορούσαν να συμβάλουν στην παθογένεση επιλεγμένων καρδιακών ελαττωμάτων παρεμβαίνοντας στα εξωτερικά σημάδια που οδηγούν στη σωστή θηλιά και αναδιαμόρφωση αγγείων της φυσιολογικά ασύμμετρα αναπτυγμένης καρδιάς και αγγείων. Εδώ, ακολουθεί η μελέτη από τους ερευνητές ότι οι ετερόζυγες μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στο ανθρώπινο *GDF-1*γονίδιο συμβάλλει σε καρδιακά ελαττώματα που κυμαίνονται από την τετραλογία του Fallot έως τη μεταφορά των μεγάλων αρτηριών και ότι η μειωμένη σηματοδότηση

του TGF-β παρέχει ένα πλαίσιο για την κατανόηση της παθογένειάς τους. Αυτά τα ευρήματα εμπλέκουν διαταραχές της οδού σηματοδότησης TGF-β στην πρόκληση μιας κύριας υποκατηγορίας ανθρώπινων ΣΝ (Desgrange, Le-CarrecandM.Meilhac 2018). Τα συγγενή καρδιακά ελαττώματα (ΣΝ) αποτελούν κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας στα ανθρώπινα νεογνά. Οι πρόσφατες πρόοδοι στην κατανόησή μας για τη μοριακή βάση του εμβρυικού μοτίβου της αναπτυσσόμενης καρδιάς υπόσχονται πολλά για την αποσαφήνιση των υποκείμενων μηχανισμών ορισμένων από αυτές τις καρδιακές δυσπλασίες. Ενωσιολογικά, αυτά τα CHD μπορεί να προκληθούν από εγγενώς ελαττωματικά μοτίβα στους αναπτυσσόμενους καρδιακούς ιστούς ή, εναλλακτικά, από εσφαλμένο μοτίβο λόγω της αποτυχίας των διδακτικών εξωτερικών ενδείξεων κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής διαμόρφωσης. Η διαμόρφωση της καρδιάς αλλάζει προς τα δεξιά σε σπονδυλωτά έμβρυα, και αυτό αντιπροσωπεύει την πρώτη ορισθείσα μοριακή καταρράκτη που διέπουν ασύμμετρη έκφραση γονιδίων-όπως *Κομβικό* και *NODAL*, *Leftyb* (*LEFTY1* και *LEFTY2*), και *Pitx2* στο μεσόδερμα της αριστερής πλευρικής πλάκας. Αυτοί οι ασύμμετροι παράγοντες παρέχουν πληροφορίες θέσης αριστερά-δεξιά (LR) σε αναπτυσσόμενα όργανα, όπως οι πνεύμονες, η καρδιά, το έντερο και ο εγκέφαλος (P.Jacobs, etal. 2007). Επιπλέον, οι CHDs παρατηρούνται συνήθως στο πολυοργανικό παθολογικό φάσμα των ανθρώπινων πλευρικών ελαττωμάτων, μερικά από τα οποία μπορούν να εξηγηθούν με εξασθενημένη σηματοδότηση TGF-β. Επιπλέον, τα σήματα TGF-β, όπως τα *Nodal* και *GDF-1*, έχουν αποδειχθεί ότι είναι απαραίτητα για τη δημιουργία και τη διατήρηση των ασύμμετρων ενδείξεων που επηρεάζουν τη μορφογένεση των οργάνων. Οι συνδέτες TGF-β λειτουργούν σε διάφορους ρόλους κατά την ανάπτυξη, συμπεριλαμβανομένης της επαγωγής μεσενδόδερμα και του προσδιορισμού των αξόνων του σώματος (E.J.Bedard, M.HaahinaandM.Ware 2011). Το *GDF-1* σχετίζεται δομικά και λειτουργικά ομόλογο με το *Xenopus Vg1* και ανήκει στην υποκατηγορία που μοιάζει με ακτιβίνη των μορίων σηματοδότησης TGF-β (*activin/Nodal/Vg1*). Η μεταγωγή σήματος από αυτήν την υποοικογένεια καταλήγει σε φωσφορυλίωση με τη μεσολάβηση υποδοχέα του ρυθμιζόμενου από υποδοχέα R-SMAD2 (SMAD2) ή R-SMAD3 (SMAD3) και στη συναρμολόγηση συμπλεγμάτων R-SMAD4 (SMAD4) μαζί με παράγοντες μεταγραφής, όπως *FoxH1* (FOXH1), σε γονίδια στόχους.

5.2.1 Τετραλογία Fallot

Η τετραλογία του Fallot είναι η πιο συνηθισμένη μορφή κυανωμένης συγγενής καρδιακής νόσου που σχετίζεται με τον παράγοντα και μία από τις πρώτες που επιδιορθώνονται επιτυχώς από συγγενείς χειρουργούς καρδιών. Από τις πρώτες διαδικασίες στη δεκαετία του 1950, οι εξελίξεις

στη διάγνωση, η περιεγχειρητική και χειρουργική θεραπεία και η μετεγχειρητική φροντίδα ήταν τέτοιες που σχεδόν όλοι όσοι γεννήθηκαν με τετραλογία του Fallot μπορούν τώρα να περιμένουν να επιβιώσουν μέχρι την ενηλικίωση (Aritz, D.WebbandN.Redington 2009). Η εκπληκτική βελτίωση των αποτελεσμάτων για τα μωρά που γεννιούνται με συγγενείς καρδιακές παθήσεις γενικά - και για εκείνα με τετραλογία του Fallot ειδικότερα - είναι μια από τις ιστορίες επιτυχίας της σύγχρονης ιατρικής. Πράγματι, σε πολλές χώρες οι ενήλικες με τετραλογία του Fallot ξεπερνούν τα παιδιά. Κατά συνέπεια, έχουν προκύψει νέα ζητήματα, που κυμαίνονται από τις μέχρι τώρα απρόβλεπτες ιατρικές επιπλοκές έως τα ζητήματα κατάρτισης για τους φροντιστές και την κατανομή πόρων για αυτόν τον πληθυσμό επιζώντων. Ως εκ τούτου, η εξέλιξη της θεραπείας, η αναγνώριση των καθυστερημένων επιπλοκών, η έρευνα σχετικά με τους μηχανισμούς και τις θεραπείες της νόσου - με ανατροφοδότηση σχετικά με τις αλλαγές στη φροντίδα των προσβεβλημένων παιδιών που γεννιούνται σήμερα - είναι πρότυπα για τα οποία η έγκαιρη συζήτηση για την οργάνωση της φροντίδας αυτών που επηρεάζονται από συγγενείς καρδιακές παθήσεις το έμβρυο στους ηλικιωμένους μπορεί να βασιστεί.

Εδώ, οι ερευνητές εστιάζουν σε νέες εξελίξεις στην κατανόηση των αιτιών, της διάγνωσης, της πρώιμης θεραπείας και των καθυστερημένων αποτελεσμάτων της τετραλογίας του Fallot, δίνοντας έμφαση στη συνέχεια της πολυεπιστημονικής φροντίδας που είναι απαραίτητη για την καλύτερη δυνατή δια βίου θεραπεία του 1% του πληθυσμού που γεννήθηκε με συγγενείς καρδιακές παθήσεις (E.DowningandY.Kim 2015). Η τετραλογία του Fallot είναι μια συγγενής καρδιακή δυσπλασία που συνίσταται σε μια μεσοκοιλιακή επικοινωνία, επίσης γνωστή ως ένα κοιλιακό διαφραγματικό ελάττωμα, απόφραξη του σωλήνα εκροής δεξιάς κοιλίας, παράκαμψη του κοιλιακού διαφράγματος από την αορτική ρίζα και υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας. Η εμβρυολογική βάση του συνδυασμού των βλαβών είναι η απόκλιση της κεφαλής του antero-cerhalad του αναπτυσσόμενου κοιλιακού διαφράγματος ή το ινώδες υπόλοιπό του σε περίπτωση που αυτό το διάφραγμα δεν μυοποιηθεί. Τέτοια απόκλιση, ωστόσο, μπορεί να βρεθεί απουσία υποπνευμονικής απόφραξης, όπως στο λεγόμενο Eisenmenger κοιλιακό διαφραγματικό ελάττωμα(Gao, etal. 2019). Επομένως, για να παραχθούν τα χαρακτηριστικά της τετραλογίας του Fallot, είναι επίσης απαραίτητο να υπάρξει μη φυσιολογική μορφολογία των ηπατικών διαταραχών που περιβάλλουν την υποπνευμονική οδό εκροής.

Ο συνδυασμός του αποκλίνοντος διαφράγματος εξόδου και των υπερτροφικών ηπατικών διαταραχών παράγουν τη χαρακτηριστική απόφραξη της δεξιάς κοιλίας από την τετραλογία του Fallot. Η απόκλιση του μυϊκού διαφράγματος εξόδου είναι επίσης υπεύθυνη για τη δημιουργία

ελικοειδούς διαφράγματος τύπου κοιλίας και έχει ως αποτέλεσμα την παράκαμψη της αορτής. Η σχετιζόμενη υπερτροφία του μυοκαρδίου της δεξιάς κοιλίας είναι η αιμοδυναμική συνέπεια των ανατομικών βλαβών που δημιουργούνται από το αποκλίνον διάφραγμα εξόδου. Η απόκλιση του antero-cephalad του διαφράγματος εξόδου, σε συνδυασμό με μια ανώμαλη σχέση με τους ηπατομετρικούς δοσολογίες, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της υποπνευμονικής οδού εκροής. Η αποφρακτική μυϊκή υποπνευμονική περιοχή που δημιουργείται έτσι είναι μια δυναμική οντότητα. Ο βαθμός στένωσης που δημιουργείται μπορεί να επιδεινωθεί από κατεχολαμίνες ή από κατάσταση χαμηλού ενδοαγγειακού όγκου, προδιαθέτοντας τους ασθενείς σε ξαφνικά και οξέα επεισόδια αποκορεσμού γνωστά ως υπερκυανωτικά ξόρκια. Αυτή η βλάβη βρίσκεται στο πιο σοβαρό άκρο του φάσματος της απόκλισης του antero-cephalad του διαφράγματος εξόδου(Karkera, etal. 2007). Περιστασιακά, ωστόσο, η πνευμονική βαλβίδα επηρεάζεται μεμονωμένα, είναι αδιάτρητη και όχι στενωτική. Σε περίπου τους μισούς ασθενείς με πνευμονική ατερία, οι δεξιές και οι αριστερές πνευμονικές αρτηρίες συρρέουν, ενώ το αίμα στις πνευμονικές αρτηρίες ρέει μέσω του επίμονα αρτηριακού αγωγού. Στο άλλο μισό, η πνευμονική αρτηριακή παροχή είναι πολυεστιακή. Σε αυτούς τους ασθενείς, εάν οι πνευμονικές αρτηρίες είναι συρρέουσες ή συνεχείς, η παροχή αίματος πιθανότατα θα προέρχεται μόνο από πολλαπλές αορτο-πνευμονικές παράπλευρες αρτηρίες. Εάν οι πνευμονικές αρτηρίες είναι ασυνεχείς ή απουσιάζουν, η παροχή αίματος στους πνεύμονες θα προέρχεται από πολλαπλές παράπλευρες αρτηρίες ή από συνδυασμό παράπλευρων αρτηριών και αρτηριακού αγωγού(Shineboarne, V.BabuandS.Calvalno 2006). Είναι ένας γενικός κανόνας ότι ένα πνευμονικό τμήμα δεν θα τροφοδοτείται τόσο από έναν αρτηριακό πόρο όσο και από μια παράπλευρη αρτηρία.

Σε περιπτώσεις σύνθετης παροχής αίματος στους πνεύμονες, είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί το ποσοστό του πνευμονικού παρεγχύματος που παρέχεται από τις ενδοπερικαρδιακές πνευμονικές αρτηρίες σε αντίθεση με εκείνα τα μέρη που παρέχονται αποκλειστικά από τις παράπλευρες αρτηρίες. Λόγω της μετατόπισης του μη ευθυγραμμισμένου διαφράγματος εξόδου στη δεξιά κοιλία, η αορτική ρίζα, αναγκαστικά, υπερισχύει του μυϊκού κοιλιακού διαφράγματος. Στη ρύθμιση της σημαντικής υποπνευμονικής απόφραξης, η διακλάδωση κατά την ενδοκοιλιακή επικοινωνία είναι κυρίως από τα δεξιά προς τα αριστερά, η οποία προάγει την αποβολή του αποξυγονωμένου αίματος στη συστηματική κυκλοφορία. Το χρόνιο φορτίο όγκου που διατηρείται από την υπερισχύουσα αορτή εμπλέκεται στη διαστολή της ρίζας της αορτής που σημειώνεται σε ενήλικες με τετραλογία του Fallot.

Children with Tetralogy of Fallot exhibit bluish skin during episodes of crying or feeding.



Εικόνα 9. Τετραλογία Fallot

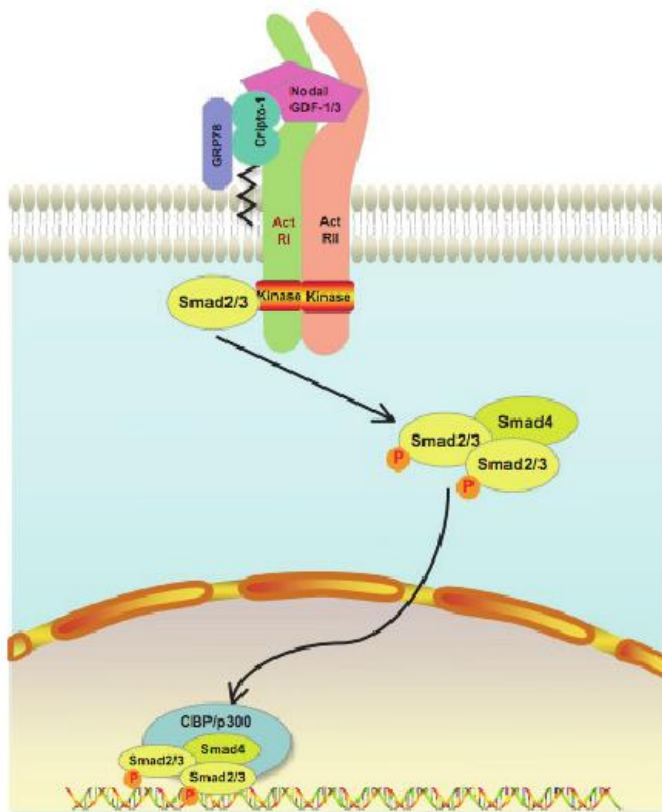
<https://www.xn--mxaafdcskbbdjf5cbbqjk8acaf.gr/2019/01/05/%CE%B7-%CF%84%CE%B5%CF%84%CF%81%CE%B1%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%B9%CE%B1-%CF%84%CE%BF%CF%85-fallot/>

5.3. Καρκίνος

Τις τελευταίες δεκαετίες, η κατανόησή μας για τον παράγοντα GDF-1 και η συσχέτιση του με τοεμβρυϊκό γονίδιο Cripto-1 έχει προχωρήσει σημαντικά μέσω βιοχημικών, κυτταρικής βιολογίας και μελετών σε ζώα. Το Cripto-1 εκτελεί βασικές λειτουργίες κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, ενώ εξαφανίζεται δραματικά στους ενήλικους ιστούς, εκτός πιθανώς στα βλαστοκύτταρα ιστού ενηλίκου. Το Cripto-1 εκφράζεται εκ νέου σε ανθρώπινους όγκους προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την εισβολή, τη μετάβαση του επιθηλίου στο μεσεγχυματικό και την αγγειογένεση του όγκου. Αυτή η ποικιλία των βιολογικών επιδράσεων εξαρτάται από την αλληλεπίδραση του Cripto-1 με μια εκτεταμένη σειρά μορίων σηματοδότησης. Στην πραγματικότητα, το Cripto-1 ρυθμίζει τη σηματοδότηση των μελών της οικογένειας του αυξητικού παράγοντα-β μετασχηματισμού, συμπεριλαμβανομένων των Nodal, GDF-1/-3, Activin και TGF-β1, ενεργοποιεί την οδό c-src/MAPK/Πρωτεϊνικής Κινάσης Β (AKT) σε τρόπους που εξαρτάται από το Glypican-1 και το GRP78, και αλληλεπιδράσεις με erbB4, Wnt/β-κατενίνη, Notch, Caveolin-1 και Apelin/υποτιθέμενη πρωτεΐνη υποδοχέα που σχετίζονται με τις οδούς του υποδοχέα τύπου I της αγγειοτενσίνης (APJ) (BiancoandS.Salomon 2010). Αυτό το άρθρο παρέχει μια ενημερωμένη έρευνα των διαφόρων οδών σηματοδότησης που διαμορφώνονται από το Cripto-1 με εστίαση στις μηχανιστικές ιδέες για την κατανόησή μας για τη βιολογική λειτουργία του Cripto-1 στα

ευκαρυωτικά κύτταρα. Είναι όλο και πιο προφανές ότι γονίδια που είναι γνωστό ότι έχουν κρίσιμους ρόλους κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, ιδιαίτερα κατά την ανανέωση των βλαστοκυττάρων, την πολυδυναμικότητα και την επιβίωση, εκφράζονται επίσης κατά την ανάπτυξη του καρκίνου. Από αυτή την άποψη, η ογκογένεση μπορεί να θεωρηθεί ως η ανακεφαλαίωση της εμβρυογένεσης με ακατάλληλο χρονικό και χωρικό τρόπο. Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας-Cripto-1/FRL1/κρυπτική οικογένεια πρωτεϊνών αποτελείται από εξωκυτταρικές και σχετιζόμενες με τα κύτταρα πρωτεΐνες που έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλά είδη σπονδυλωτών. Κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυογένεσης, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας-Cripto-1/FRL1/κρυπτικές πρωτεΐνες διαδραματίζουν υποχρεωτικό ρόλο ως συνυποδοχείς για την υποοικογένεια πρωτεϊνών μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-βήτα, η οποία περιλαμβάνει το Nodal. Το Cripto-1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως συνδέτης μέσω μιας οδού σηματοδότησης ανεξάρτητης Nodal/Alk4 που περιλαμβάνει τη δέσμευση στο glypican-1 και την επακόλουθη ενεργοποίηση μέσω src της κινάσης φωσφοϊνοσιτόλη-3/Akt και της ενεργοποιημένης από ras/μιτογόνο πρωτεΐνη κινάσης ενδοκυτταρική μονοπάτια (Hiroko, etal. 2021). Η έκφραση του Cripto-1 είναι αυξημένη σε αρκετούς ανθρώπινους καρκίνους και η υπερέκφρασή του σχετίζεται με την ανάπτυξη μαστικών όγκων σε ποντίκια. Εδώ, εξετάζουμε τον ρόλο του Cripto-1 κατά την εμβρυογένεση, τη μετανάστευση κυττάρων, την εισβολή και την αγγειογένεση και πώς αυτές οι δραστηριότητες μπορεί να σχετίζονται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την ογκογένεση. Συζητούμε επίσης εν συντομία στοιχεία που υποδηλώνουν ότι το Cripto-1 μπορεί να εμπλέκεται στη συντήρηση των βλαστοκυττάρων, κυτταρική μετανάστευση, εισβολή και αγγειογένεση και πώς αυτές οι δραστηριότητες μπορεί να σχετίζονται με τον κυτταρικό μετασχηματισμό και την ογκογένεση (Liu, etal. 2017). Η Cripto είναι μια μικρή πρωτεΐνη σηματοδότησης αγκυρωμένη στο GPI που ρυθμίζει την κυτταρική επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση κατά τη διάρκεια φυσιολογικών αναπτυξιακών διεργασιών και ογκογένεσης.

Το Cripto λειτουργεί ως υποχρεωτικός συν-υποδοχέας για τους συνδέτες TGF-β Nodal, GDF-1 και GDF3 αλλά εξασθενεί τη σηματοδότηση άλλων όπως η ακτιβίνη-A, η ακτιβίνη-B και ο TGF-β1 (Bianco, etal. 2010). Οι διαλυτές, εκκρινόμενες μορφές του Cripto ενεργοποιούν επίσης τα μονοπάτια Src, ras/raf/MAPK και PI3K/Akt μέσω ενός μηχανισμού που παραμένει σε μεγάλο βαθμό ασαφής. Αυτή η ανασκόπηση περιγράφει τους βιολογικούς ρόλους και τους μηχανισμούς σηματοδότησης του Cripto, υπογραμμίζοντας την αναγνώρισή μας της ρυθμιζόμενης πρωτεΐνης 78 kDa με γλυκόζη (GRP78) ως υποδοχέα/συν-παράγοντα στην επιφάνεια των κυττάρων που απαιτείται για τη σηματοδότηση Cripto μέσω των οδών TGF-β και Src/MAPK/PI3K.



Εικόνα10 Cripto 1 /Nodal/GDF-1

https://www.researchgate.net/figure/Cripto-1-Nodal-dependent-signaling-pathway-Cripto-1-is-a-co-receptor-for-Nodal-GDF-1_fig2_221916557

5.4. Ολοπροσεγκεφαλία

Το Nodal και ο παράγων GDF-1 είναι μέλος της κατηγορίας TGF- β των εκκρινόμενων μορίων σηματοδότησης που εμπλέκονται στη δημιουργία του άξονα AP και στη δημιουργία του μεσοδερμίου και του οριστικού ενδόδερμου. Εμπλέκονται επίσης σε μια δοσοεξαρτώμενη προδιαγραφή της μοίρας των κυττάρων της μέσης γραμμής πρόδρομων κυττάρων στην πρόσθια πρωτόγονη ράβδωση. Αυτά τα κύτταρα θα σχηματίσουν τελικά την προχορδική πλάκα, τη νοτόχορδα και την πλάκα δαπέδου. Η επακόλουθη πρόσθια μετανάστευση αυτών των αξονικών μεσενδόδερμων κυττάρων, με τη σειρά της, επηρεάζει τη διαμόρφωση του αναπτυσσόμενου κεντρικού νευρικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του πρόσθιου εγκεφάλου. Ολοπροσεγκεφαλία (HPE) θεωρείται η κατάσταση της προσθεγκεφάλου ανάπτυξης, δεδομένου ότι, εν απουσία της μέσης γραμμής σημάτων σχηματομόρφωσης από το prechordal πλάκα κέντρο σηματοδότησης, η μελλοντική προσθεγκεφάλου αποτυγχάνει να διαιρέσει σωστά σε αριστερό και δεξιό ημισφαίριο και στις αντίστοιχες υποφλοιώδεις δομές (Guerer, NostroandB.Constam 2014).

Επιπλέον, η αξονική μέση γραμμή χωρίζει το έμβρυο σε διαμερίσματα αριστερά-δεξιά που μπορούν να αναπτύξουν διαφορετικές μοριακές ιδιότητες για να επηρεάσουν την ασύμμετρη οργανογένεση. Ως εκ τούτου, οι παράγοντες που μοιάζουν με κομβικό σχήμα είναι κρίσιμοι τόσο για την ανάπτυξη των δομών της μέσης γραμμής όσο και για την προδιαγραφή οργάνων αριστερά-δεξιά. Μόλις ο οργανωτής (ή ο κόμβος, στο ποντίκι) αναπτυχθεί στο περιφερικό άκρο της πρωτόγονης ράβδου, ασύμμετρα σήματα (συμπεριλαμβανομένων των σημάτων που εξαρτώνται από *Nodal* και *GDF-1*) μεταδίδονται στη συνέχεια στο μεσόδερμα της αριστερής πλευρικής πλάκας, με αποτέλεσμα σε έναν καταρράκτη των ασυμμέτρων εκφραζόμενων γονιδίων όπως *κομβική σηματοδότηση*, *Lefty2* και κατάντη οδό τελεστή *Pitx2* (Aykul, et al. 2015). Ενώ η ασύμμετρη έκφραση του *Nodal* στην αριστερή πλευρά είναι παροδική, η συνεχιζόμενη ασύμμετρη έκφραση της ισομορφής *Pitx2c* είναι σημαντική για την ανάπτυξη της καρδιάς και άλλων οργάνων με παρόμοια ασύμμετρα σχέδια. Τα κομβικά σήματα προκαλούν την έκφραση του ίδιου του *Nodal* μέσω ενός αυτορυθμιστικού βρόχου. Αυτά τα σήματα διεγείρουν ταυτόχρονα ανταγωνιστές Κομβικό του (οι *Lefty* γονίδια) και, ως εκ τούτου, τη δημιουργία ενός περίπλοκο μηχανισμό για τον έλεγχο του αποτελεσματικού επιπέδου έκφρασης Κομβικό]. Μια τέτοια αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης *Nodal* είναι σημαντική, καθώς η αποτελεσματική ισχύς ή η διάρκεια των *Nodal* σημάτων έχει άμεση επίδραση στην κυτταρική απόκριση. Τα κομβικά σήματα/TGF-β είναι επίσης απαραίτητα για τον προσδιορισμό του δευτερογενούς καρδιακού πεδίου. Το δευτερεύον πεδίο καρδιά παρέχει μία πηγή του εμφράγματος προδρόμων κυττάρων στον κοιλιακό φαρυγγική μεσόδερμα ότι, με τη σειρά του, συμβάλλει άμεσα στην ανάπτυξη της καρδιακής οδού εκροής ή *conotruncus* (EconomouandHILL 2019). Ως εκ τούτου, η εξασθενημένη σηματοδότηση του *Nodal* μονοπατιού και του παράγοντος *GDF-1* που έχουν εμπλακεί σε φαινότυπους κυκλωπίας, κраниοπροσωπικής, καρδιαγγειακής σε ποντίκια και σε άλλα συστήματα μοντέλων μπορεί εύλογα να επεκταθεί σε παρόμοιους φαινότυπους στον άνθρωπο.

5. 5. Μεταφορά των μεγάλων αρτηριών

Η μετάθεση των μεγάλων αρτηριών (TGA), που αναφέρεται επίσης ως πλήρης μετάθεση, είναι μια συγγενής καρδιακή δυσπλασία που χαρακτηρίζεται από κολποκοιλιακή συμφωνία και κοιλιοαρτηριακή (VA) ασυμφωνία. Η επίπτωση υπολογίζεται σε 1 στις 3. 500-5.000 γεννήσεις ζωντανών γεννήσεων, με αναλογία αρσενικών προς γυναίκες 1, 5 έως 3, 2:1. Στο 50% των περιπτώσεων, η ασυμφωνία VA είναι μεμονωμένο εύρημα. Στο 10% των περιπτώσεων, το TGA σχετίζεται με μη καρδιακές δυσπλασίες. Η συσχέτιση με άλλες καρδιακές δυσπλασίες όπως το

ελάττωμα του κοιλιακού διαφράγματος (VSD) και η απόφραξη της οδού εκροής της αριστερής κοιλίας είναι συχνή και υπαγορεύει το χρόνο και την κλινική εικόνα, η οποία συνίσταται σε κυάνωση με ή χωρίς συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια.

Η έναρξη και η σοβαρότητα εξαρτώνται από ανατομικές και λειτουργικές παραλλαγές που επηρεάζουν τον βαθμό ανάμειξης μεταξύ των δύο κυκλοφοριών. Εάν δεν υπάρχουν αποφρακτικές αλλοιώσεις και υπάρχει μεγάλο VSD, η κυάνωση μπορεί να παραμείνει απαρατήρητη και να γίνει αντιληπτή μόνο κατά τη διάρκεια επεισοδίων κλάματος ή διέγερσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις επικρατούν σημάδια συμφορητικής καρδιακής ανεπάρκειας (Ge, etal. 2012). Η ακριβής αιτιολογία παραμένει άγνωστη. Ορισμένοι σχετικοί παράγοντες κινδύνου (σακχαρώδης διαβήτης κύησης, έκθεση της μητέρας σε τρωκτικοκτόνα και ζιζανιοκτόνα, μητρική χρήση αντιεπιληπτικών φαρμάκων) έχουν υποτεθεί. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του παράγοντα-1 διαφοροποίησης ανάπτυξης, στο γονίδιο πρωτεΐνης-2 που σχετίζεται με τον υποδοχέα της θυρεοειδικής ορμόνης και στο γονίδιο που κωδικοποιεί την κρυπτική πρωτεΐνη έχουν αποδειχθεί ότι εμπλέκονται σε ασύμφωνες συνδέσεις VA, αλλά εξηγούν μόνο μια μικρή μειοψηφία περιπτώσεων TGA. Η διάγνωση επιβεβαιώνεται με υπερηχοκαρδιογράφημα, το οποίο παρέχει επίσης τις μορφολογικές λεπτομέρειες που απαιτούνται για τη μελλοντική χειρουργική αντιμετώπιση. Η προγεννητική διάγνωση με ηχοκαρδιογράφημα εμβρύου είναι δυνατή και επιθυμητή, καθώς μπορεί να βελτιώσει την πρώιμη νεογνική αντιμετώπιση και να μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει άλλες αιτίες κεντρικής νεογνικής κυάνωσης. Συνήθως απαιτείται ανακουφιστική θεραπεία με προσταγλανδίνη E1 και κολπική διαφραγματοτομή με μπαλόνι αμέσως μετά τη γέννηση. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση.

Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροπρόθεσμη επιβίωση είναι περίπου 90% στην ηλικία των 15 ετών. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν, καθώς μπορεί να βελτιώσει την πρώιμη νεογνική διαχείριση και να μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει άλλες αιτίες κεντρικής νεογνικής κυάνωσης. Συνήθως απαιτείται ανακουφιστική θεραπεία με προσταγλανδίνη E1 και κολπική διαφραγματοτομή με μπαλόνι αμέσως μετά τη γέννηση. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene

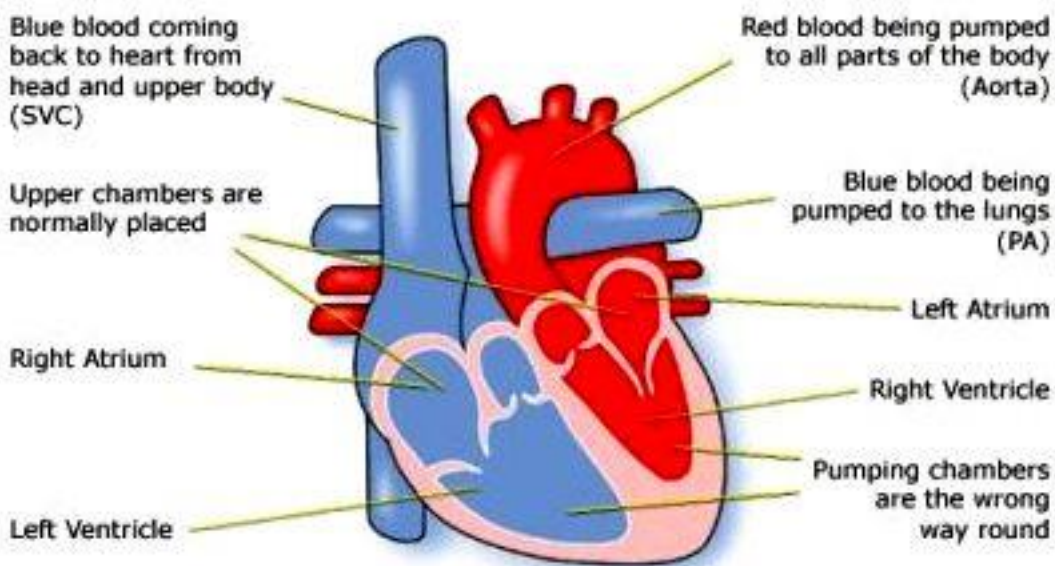
είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση. Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροπρόθεσμη επιβίωση είναι περίπου 90% στην ηλικία των 15 ετών. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν, καθώς μπορεί να βελτιώσει την πρώιμη νεογνική διαχείριση και να μειώσει τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει άλλες αιτίες κεντρικής νεογνικής κυάνωσης. Συνήθως απαιτείται ανακουφιστική θεραπεία με προσταγλανδίνη E1 και κολπική διαφραγματοτομή με μπαλόνι αμέσως μετά τη γέννηση. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση.

Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροπρόθεσμη επιβίωση είναι περίπου 90% στην ηλικία των 15 ετών. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει άλλες αιτίες κεντρικής νεογνικής κυάνωσης. Συνήθως απαιτείται ανακουφιστική θεραπεία με προσταγλανδίνη E1 και κολπική διαφραγματοτομή με μπαλόνι αμέσως μετά τη γέννηση. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση. Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροχρόνια επιβίωση είναι περίπου 90% στα 15 έτη. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν. Η διαφορική διάγνωση περιλαμβάνει άλλες αιτίες κεντρικής νεογνικής κυάνωσης. Συνήθως απαιτείται ανακουφιστική θεραπεία με προσταγλανδίνη E1 και κολπική διαφραγματοτομή με μπαλόνι αμέσως μετά τη γέννηση. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση. Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροχρόνια επιβίωση είναι περίπου 90% στα 15 έτη. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε

αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση.

Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροχρόνια επιβίωση είναι περίπου 90% στα 15 έτη. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν. Η χειρουργική διόρθωση πραγματοποιείται σε μεταγενέστερο στάδιο. Συνήθως, η επέμβαση αρτηριακού διακόπτη Jatene είναι η διαδικασία επιλογής. Όποτε αυτή η επέμβαση δεν είναι εφικτή, θα πρέπει να εφαρμόζεται επαρκής εναλλακτική χειρουργική προσέγγιση. Με την εμφάνιση νεότερων και βελτιωμένων χειρουργικών τεχνικών και μετεγχειρητικής εντατικής θεραπείας, η μακροχρόνια επιβίωση είναι περίπου 90% στα 15 έτη. Ωστόσο, η απόδοση της άσκησης, η γνωστική λειτουργία και η ποιότητα ζωής μπορεί να επηρεαστούν.

Congenitally Corrected Transposition



Εικόνα11 Μετάθεση μεγάλων αρτηριών

<https://www.xn--mxaafdcskbbdjf5cbbqjk8acaf.gr/2020/01/14/%CE%B7-%CE%BC%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B8%CE%B5%CF%83%CE%B7-%CF%84%CF%89%CE%BD-%CE%BC%CE%B5%CE%B3%CE%B1%CE%BB%CF%89%CE%BD-%CE%B1%CF%81%CF%84%CE%B7%CF%81%CE%B9%CF%89%CE%BD-%CE%B1%CE%B3%CE%B3%CE%B5%CE%B9/>

Κεφάλαιο 6. Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ GDF-1 ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

6. 1. Θεραπεία καρκίνου στομάχου

Ο καρκίνος του στομάχου είναι από τις πιο θανατηφόρες κακοήθειες σε όλο τον κόσμο. Όπως αναφέρθηκε στις τελευταίες παγκόσμιες στατιστικές για τον καρκίνο, τόσο τα ποσοστά εμφάνισης όσο και η θνησιμότητα του καρκίνου του στομάχου ανακαλύφθηκαν ότι κατατάσσονται στα πέντε κορυφαία όλων των καρκίνων, με σχεδόν 1 εκατομμύριο νέες περιπτώσεις και σχεδόν 750. 000 θανάτους που καταγράφονται ετησίως (Yank, etal. 2015). Αυτό το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης συνοδεύεται από κακή πρόγνωση λόγω της έλλειψης αποτελεσματικής θεραπείας. Ιστολογικά, οι περισσότεροι όγκοι του στομάχου (> 90%) είναι αδenoκαρκίνωμα, τα οποία μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, η διάχυτη μορφή που απαντάται συχνά σε νεαρά άτομα και ο εντερικός τύπος που συχνά διαγιγνώσκεται σε ηλικιωμένα άτομα. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα του καρκίνου του στομάχου δεν περιορίζεται σε διαφοροποίηση ιστού, αλλά εκτείνεται πέρα από το κυτταρικό επίπεδο σε γονιδιωματική σύνθεση και μεταγραφικό έλεγχο. Είναι απολύτως αποδεδειγμένο ότι το γονιδίωμα του καρκίνου υπόκειται σε μεταγραφική απορρύθμιση που προκαλείται από μη φυσιολογικές επιγενετικές αλλαγές και την εξασθενημένη μεταγραφή γονιδίου. Προηγουμένως, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια προσέγγιση σε όλο το γονιδίωμα για να χαρακτηρίσουν εκτενώς τα πρότυπα μεθυλίωσης γονιδίων σε 240 γαστρικούς καρκίνους και έδειξαν ότι η ειδική για τον όγκο υπέρ- και υπομεθυλίωση ήταν ευρέως διαδεδομένη σε 11.740 CpG θέσεις που αντιστοιχούσαν σε 8541 γονίδια. Σημειωτέο, το 1653 των ταυτοποιημένων CpGs παρουσίασε σημαντική συσχέτιση cis-μεθυλίωσης / έκφρασης, και ένα υποσύνολο όγκου εμφάνισε φαινότυπο μεθυλιωτή CpG island.

Αυτή η μελέτη, μαζί με μια άλλη συμπληρωματική έκθεση, επιβεβαίωσε ότι μια συγκεκριμένη ομάδα υποψήφιων γονιδίων (BNIP3, CDX1, CHFR, MGMT, MLH1 και ούτω καθεξής) ενεργοποιούνται κατά λάθος ή σιωπούν με μεθυλίωση σε όγκους του στομάχου. Αυτή η μεταγραφική διαταραχή έχει κλινική σημασία, καθώς η συσσώρευση παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης DNA έχει συσχετιστεί με αντοχή στα φάρμακα, χειρότερη επιβίωση σε νεαρούς ασθενείς και αυξημένο κίνδυνο καρκίνου (γνωστό ως επιγενετικό πεδίο για καρκινοποίηση) σε πολυκεντρικές κοόρτες. Διακριτές από τις γονιδιωματικές μεταλλάξεις, οι οποίες είναι μόνιμης φύσης, οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι αναστρέψιμες στοχεύοντας τα υπεύθυνα ένζυμα (Manel 2002). Αυτό το μοναδικό χαρακτηριστικό έχει προκαλέσει τεράστιο ενδιαφέρον για την πιθανή εφαρμογή του επιγενετικού φαρμάκου, όπως η εγκεκριμένη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-αζα-dC), σε ασθενείς με καρκίνο του στομάχου. Αυτή η ιδέα υποστηρίζεται

από πολλαπλές ενδείξεις in vitro ότι το 5-aza-dC μπορεί να αυξήσει σημαντικά τη χημειοθεραπεία και τη ραδιοευαισθησία διαφορετικών κυτταρικών καρκινικών κυττάρων του φαινοτύπου μεθυλιωτή CpG, 5, 10, 11 και μια πρόσφατη in vivo μελέτη που αναφέρει τη χημειοπροληπτική δράση του καρκίνου επίδραση του 5-aza-dC σε γερβίλους μολυσμένους με καρκινογόνο στομάχου *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)¹².

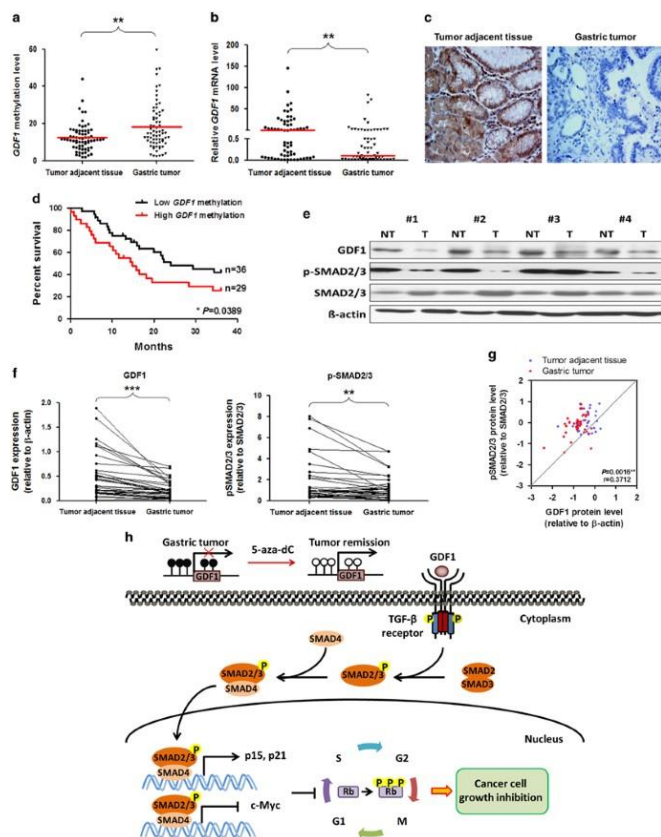
Ωστόσο, οι μηχανιστικές δράσεις του 5-aza-dC στην καρκινογένεση του στομάχου παρέμειναν ανεπαρκώς κατανοητές, αμφισβητώντας τη θεραπευτική αξία του επιγενετικού φαρμάκου σε αυτό ασθένεια. Για να αποσαφηνίσουμε τις επιγενετικώς αλλοιωμένες μοριακές οδούς στον καρκίνο του στομάχου, έχουμε προηγουμένως υιοθετήσει διαφορετικές προσεγγίσεις και ταυτοποιήσαμε με επιτυχία έναν αριθμό τελεστών που ρυθμίζονται από μεθυλίωση DNA όπως το FBP1, 13 RNF18014 και το PAX515 σε καρκινικά κύτταρα του στομάχου. Συγκεκριμένα, πρόσφατα οι ερευνητές ανακάλυψαν τα γονίδια που είναι συνήθως υπερμεθυλιωμένα και σιωπηλά σε γαστρικούς όγκους ποντικού και ανθρώπου που έχουν μολυνθεί από *H. pylori* και ανακαλύψαν ότι το FOXD3 είναι ένας επιγενετικώς ρυθμισμένος στόχος με προγνωστική σημασία και διεγερτικό ρόλο στη μεταγραφή των προαποπτωτικών γονιδίων CYFIP2 και RARB,¹⁶ Στην τρέχουσα μελέτη, εξετάστηκε άμεσα η in vivo επίδραση του 5-aza-dC στο μοντέλο ποντικού καρκίνου N-νιτροζο-N-μεθουρία (MNU). Ανακαλύφθηκε ότι ο παράγοντας ανάπτυξης / διαφοροποίησης 1 (GDF-1) είναι ένα επιγενετικώς τροποποιημένο γονίδιο που σχετίζεται με την επίπτωση του όγκου και ανακάλυψαν ότι ο GDF-1 έχει τόσο λειτουργική όσο και κλινική σημασία στον καρκίνο του στομάχου του ανθρώπου. Τα συλλογικά δεδομένα εδώ ενισχύουν τη σημασία του επιγενετικού ελέγχου στην καρκινογένεση του στομάχου και υποστηρίζουν την ιδέα ότι η στόχευση της μεθυλίωσης του DNA είναι μια πιθανή θεραπευτική επιλογή για τον καρκίνο του στομάχου. Η ανάλυση μεθυλίωσης DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα αναγνωρίζει το GDF-1 ως ένα νέο επιγενετικώς ρυθμισμένο γονίδιο στον καρκίνο του γαστρικού ποντικού. Με βάση την ανασταλτική επίδραση του 5-aza-dC στην μεθυλτρανσφεράση του DNA, η οποία μπορεί να καταργήσει τη μεταγραφή γονιδίων μέσω υπερμεθυλίωσης προαγωγέα, υποθέσαν ότι η επακόλουθη έκφραση γονιδίων άγριου τύπου είναι ο κύριος παράγοντας που ευθύνεται για την καταστολή του όγκου. Για τον εντοπισμό των βασικών υποκινητών-υπερμεθυλιωμένων γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου του στομάχου σε κλίμακα ευρείας γονιδιώματος, οι επιστημόνες πραγματοποίησαν ανάλυση MethylCap-microarray¹⁶ στους γαστρικούς ιστούς που συλλέχθηκαν από ποντικούς που δεν είχαν υποβληθεί σε θεραπεία, MNU και 5-αζα-dC-cotreated ποντίκια. Χρησιμοποιώντας συστοιχίες προαγωγέα που καλύπτουν ~ 19.000 καλά καθορισμένα

γονίδια ποντικού, 10 επαναλαμβανόμενα υπερμεθυλιωμένα γονίδια ταυτοποιήθηκαν σε πολλαπλούς όγκους αλλά όχι σε φυσιολογικούς γαστρικούς ιστούς. Για να εξεταστεί εάν μια τέτοια υπερμεθυλίωση προαγωγέα συσχετίζεται με τη σίγαση των γονιδίων, τα επίπεδα μεταγραφής αυτών των 10 γονιδίων αξιολογήθηκαν με qRT-PCR στους ίδιους ιστούς.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το GDF-1, το οποίο κωδικοποιεί έναν διεγερτικό συνδετήρα που ανήκει στην υπερικογένεια του μετασχηματιστικού αυξητικού παράγοντα-β (TGF-β), εμφάνισε την πιο τεράστια μείωση του ρυθμού στους όγκους σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες και δείγματα που έλαβαν 5-αζα-dC, ενώ άλλα υποψήφια γονίδια δεν εμφάνισαν ειδική κατά του όγκου κατάλυση υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι το GDF-1 είναι ένας σημαντικός επιγενετικά σιωπηλός στόχος στον καρκίνο του στομάχου. Για να χαρακτηριστεί το πρότυπο μεθυλίωσης DNA ειδικά στον προαγωγό GDF-1, αναλύθηκε η αναλογία ποσό συχνά το μεθυλιωμένο DNA συνδέεται με τους μεμονωμένους ανιχνευτές του MethylCap-microarray κοντά στην τοποθεσία έναρξης της μεταγραφής GDF-1. Βρέθηκε ότι δύο συγκεκριμένες περιοχές εντός ενός νησιού CpG (<2 kb από την τοποθεσία έναρξης της μεταγραφής) εμπλουτίστηκαν σημαντικά από ανιχνευτές συστοιχίας σε όγκους που προκαλούνται από MNU, αλλά όχι στους αντίστοιχους φυσιολογικούς ή 5-αζα-dC που γειτονιάζουν με όγκο -επεξεργασμένοι ιστοί. Για επικύρωση των δεδομένων που βασίζονται σε συστοιχία, το επίπεδο μεθυλίωσης του προαγωγέα του GDF-1 σε αυτούς τους ιστούς επανεξετάστηκε με ποσοτική PCR (qPCR) MethylCap και ποσοτική ειδική μεθυλίωση PCR. Τα αποτελέσματα ήταν πολύ συνεπή ότι το GDF-1 εμφάνισε υπερμεθυλίωση στις ταυτοποιημένες περιοχές προαγωγού, συνοδευόμενο από σημαντικά μειωμένη μεταγραφή με ανεξάρτητο qRT-PCR ($P < 0,05$) σε όγκους σε σύγκριση με άλλα δείγματα. Επιπλέον, εφαρμόστηκε ανοσοϊστοχημική χρώση για να εξεταστεί η έκφραση του GDF-1 και τους πιθανούς στόχους του στη σηματοδότηση SMAD, φωσφορυλιωμένο (p) -SMAD2 / 3, στους ίδιους γαστρικούς ιστούς. Βρήκαν ότι η επιθηλιακή χρώση τόσο του GDF-1 όσο και του p-SMAD2 / 3 μειώθηκε προφανώς σε όγκους σε σχέση με άλλους μάρτυρες. Αυτά τα συλλογικά ευρήματα έδειξαν ότι ένας εξαρτώμενος από υπερμεθυλίωση σιγασμός εξαρτάται από το GDF-1 στον καρκίνο του γαστρικού ποντικού και το ισχυρό αποτέλεσμα του 5-aza-dC στην αναστροφή της μεταγραφής GDF-1 μέσω απομεθυλίωσης DNA. Για να διερευνηθούν εάν το GDF-1 υποβλήθηκε σε επιγενετική σιωπή στον καρκίνο του γαστρικού ανθρώπου, ερευνήθηκαν οι καταστάσεις της μεθυλίωσης του υποκινητή του GDF-1 σε δύο φυσιολογικούς ανθρώπινους στομαχικούς ιστούς (N1 και N2). Μελετήθηκαν μία συνεχής φυσιολογική ανθρώπινη γαστρική κυτταρική σειρά (GES1), όπου περαιτέρω υφίσταται γενετικό μετασχηματισμό και η ανάπτυξη αυτής της κυτταρικής σειράς

καθίσταται απεριόριστη και οκτώ ανθρώπινα γαστρικά καρκινικά κύτταρα με γραμμές (AGS, KATO III, MKN1, MKN28, MKN45, N87, SNU1 και SNU16). Παρόμοιο με το γονιδίωμα του ποντικού, το ανθρώπινο GDF-1 περιέχει επίσης ένα νησί CpG στην περιοχή προαγωγού του, από το οποίο τα επίπεδα μεθυλίωσης αξιολογήθηκαν με συνδυασμένη ανάλυση περιορισμού θειώδους άλατος (COBRA) και διυθρόπυρη αλληλουχία. Στην ανίχνευση COBRA, υπερμεθυλιωμένοι τόποι ήταν παρόντες στον προαγωγό GDF-1 στην πλειονότητα των κυτταρικών σειρών καρκίνου του στομάχου (5 από τις 8, συμπεριλαμβανομένων των AGS, KATO III, MKN28, N87 και SNU1), ενώ δεν ανιχνεύθηκε μεθυλίωση προαγωγέα GDF-1 και στα τρία φυσιολογικά αντίστοιχα (N1, N2 και GES1). Ταυτόχρονα, η υψηλής ανάλυση πυροσυστατική ταυτοποίησε συχνές μεθυλιωμένες θέσεις CpG στον προαγωγό GDF-1 στις ίδιες κυτταρικές σειρές καρκίνου του στομάχου, αλλά καμία από τις κανονικές μάρτυρες. Για επιβεβαίωση, πραγματοποιήθηκε επίσης πυροσβεστικός προσδιορισμός σε άλλη περιοχή προαγωγού εντός του νησιού CpG (-431 έως 30330 bp πριν από την τοποθεσία έναρξης της μεταγραφής και τα αποτελέσματα ήταν συνεπή ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης GDF-1 σε ορισμένες κυτταρικές σειρές καρκίνου του γαστρικού ήταν σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με αυτό των κανονικών μαρτύρων. Επιπλέον, τόσο η ανάλυση qRT-PCR όσο και η ανάλυση στυπώματος Western χρησιμοποιώντας ένα ειδικό αντίσωμα κατέδειξαν μειωμένη ρύθμιση της έκφρασης GDF-1 σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές ανθρώπινου καρκίνου του γαστρικού καρκίνου σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα GES1, στην οποία σημειώθηκε μια πολύ σημαντική συσχέτιση μεταξύ του GDF-1 mRNA και των εκφράσεων πρωτεΐνης ($r = 0,976$, $P < 0,0001$). Στη συνέχεια δοκιμάστηκε η λειτουργική επίδραση του 5-aza-dC στην έκφραση GDF-1 σε μοντέλα ανθρώπινων κυττάρων. Η αγωγή με 5-αζα-dC μείωσε ουσιαστικά τη μεθυλίωση του προαγωγέα GDF-1 και συνέχισε ταυτόχρονα την παραγωγή μεταγραφής GDF-1 ($P < 0,05$) σε κύτταρα καρκίνου του γαστρικού καρκίνου KATO III, N87 και SNU1. Επιπλέον, η εξαρτώμενη από 5-αζα-dC επαγωγή του GDF-1 παραλληλίστηκε με την ανύψωση του p-SMAD2 / 3, αλλά όχι των συνολικών μορφών τους, στα ίδια κύτταρα. Σύμφωνα με τα δεδομένα στο μοντέλο ποντικού, αυτά τα ευρήματα δείχνουν σαφώς τον διεγερτικό ρόλο του 5-aza-dC στην έκφραση του GDF-1 μέσω απομεθυλίωσης προαγωγέα σε καρκινικά κύτταρα του γαστρικού συστήματος. Για να διερευνήσουμε την πιθανή ρύθμιση του GDF-1 με πρόσθετους επιγενετικούς μηχανισμούς, επεξεργαστήκαμε τα σιγασμένα με GDF-1 κύτταρα MKN45 και SNU16 με έναν αναστολέα αποακετυλάσης ιστόνης, τριχοστατίνη A (TSA) και έναν αναστολέα μεθυλίωσης ιστόνης, 3-δεαζανεπλονοκίνη A (DZNep), επιπλέον 5-αζα-dC. Αν και η θεραπεία με TSA μόνη της και σε συνδυασμό με 5-αζα-dC προκάλεσε σημαντικά έκφραση GDF-1 σε κύτταρα MKN45 και SNU16, αντίστοιχα, δεν μπορούσε να παρατηρηθεί προφανές

αποτέλεσμα ενίσχυσης από το DZNeP. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η αποακετυλίωση ιστόνης και η μεθυλίωση του DNA μπορούν συνεργατικά να σιγήσουν την έκφραση του GDF-1 σε ορισμένα καρκινικά κύτταρα του στομάχου. Έχοντας διαπιστώσει την παρεκκλίνουσα επιγενετική σίγαση του GDF-1 στον καρκίνο του στομάχου, εξετάσαμε στη συνέχεια τη λειτουργική επίδραση του GDF-1 στην ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν τέσσερα μοντέλα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων στομάχου ότι χρησιμοποιήθηκαν AGS και N87 κύτταρα με παρούσα GDF-1 για προσδιορισμούς υπερέκφρασης GDF-1, ενώ κύτταρα GES1 και MKN1 με άφθονο GDF-1 χρησιμοποιήθηκαν για GDF-1-knockdown πειράματα. Η επιτυχής αύξηση και μείωση του GDF-1 σε αυτά τα μοντέλα κυττάρων επιβεβαιώθηκε με qRT-PCR και Western blot. Εν συνεχεία ταυτοποιήσαμε ότι η έκτοπη έκφραση του GDF-1, αλλά όχι ο έλεγχος του άδειου φορέα, παρεμπόδισε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των AGS και N87 κυττάρων τόσο σε δοκιμές σχηματισμού MTS όσο και σε αποικίες. Αντίθετα, η κατάλυση GDF-1 προκάλεσε αποτελεσματικά την ανάπτυξη κυττάρων GES1 και MKN1 υπό παρόμοιες πειραματικές συνθήκες ($P < 0,01$), από τα οποία τα αποτελέσματα ήταν αναπαραγώγιμα χρησιμοποιώντας ένα ανεξάρτητο GDF-1 και ένα ειδικό RNA που παρεμβάλλει. Για να εκτιμήσουμε εάν τέτοια εξαρτώμενα από GDF-1 αποτελέσματα οφείλονται σε αλλοιωμένη κυτταρική διαίρεση, αξιολογήσαμε τα προφίλ κυτταρικού κύκλου των τεσσάρων μορφομετατροπένων κυτταρικών μοντέλων με ταξινομητή ενεργοποιημένου με φθορισμό κυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο υπερεκφρασμένος GDF-1 αύξησε μετρίως τον πληθυσμό των κυττάρων G1 τόσο στα κύτταρα AGS όσο και στα N87 ($P < 0,01$), ενώ η απώλεια του GDF-1 προκάλεσε προφανώς τη μετάβαση φάσης G1 σε S στα κύτταρα GES1 και MKN1 ($P < 0,05$). Συνολικά, το GDF-1 δρα για να καταστέλλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων *in vitro* προκαλώντας το σημείο ελέγχου του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1.



Εικόνα 12. Μελέτη για την σημασία του παράγοντα GDF-1 στον καρκίνο στομάχου
<https://www.nature.com/articles/onc2015276>

6.2. Καρδιοπροστατευτικός ρόλος του αυξητικού/διαφοροποιητικού παράγοντα 1 στη μεταεμφραγματική αναδιαμόρφωση και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας

Το GDF-1 εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένης της καρδιάς. Ωστόσο, ο λειτουργικός ρόλος του GDF-1 στην επαγόμενη από έμφραγμα του μυοκαρδίου (MI) καρδιακή αναδιαμόρφωση και δυσλειτουργία δεν είναι γνωστός. Έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες κέρδους-λειτουργίας και απώλειας-λειτουργίας χρησιμοποιώντας ειδικά για την καρδιά *GDF-1* διαγονιδιακά (TG) και νοκ-άουτ (KO) ποντίκια για να προσδιορίσουν τον ρόλο του GDF-1 στην παθογένεση της λειτουργικής και αρχιτεκτονικής καρδιακής αναδιαμόρφωσης μετά από MI, η οποία προκλήθηκε από χειρουργική απολίνωση της αριστερής πρόσθιας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας. Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι η υπερέκφραση του GDF-1 στην καρδιά προκαλεί σημαντική μείωση της θνησιμότητας που προέρχεται από τον έμφραγμα μετά τον έμφραγμα και

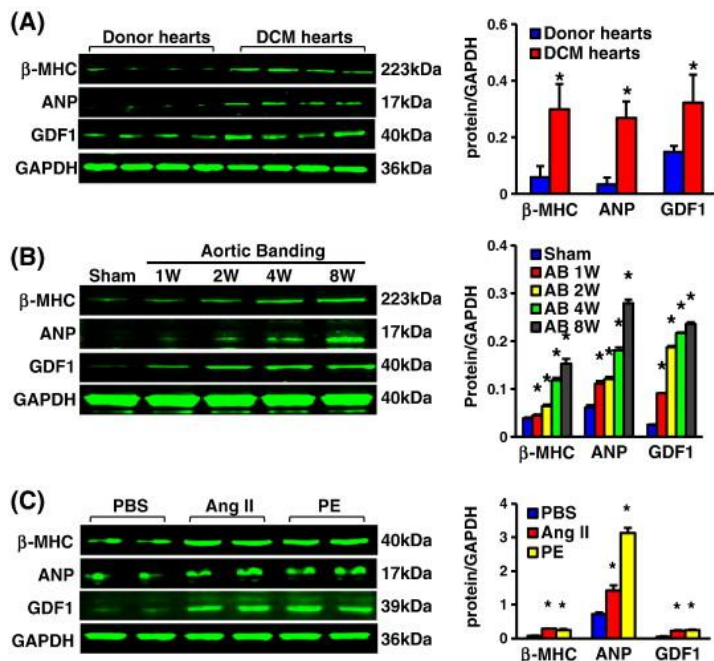
οδηγεί σε εξασθενημένη επέκταση του μεγέθους του εμφράγματος, διάταση της αριστερής κοιλίας(LV) και καρδιακή δυσλειτουργία, 1 εβδομάδα και 4 εβδομάδες μετά τον τραυματισμό του εμφράγματος.

Σε σύγκριση με τα ζώα ελέγχου, η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων, η φλεγμονή, η υπερτροφία και η διάμεση ίνωση μειώθηκαν σημαντικά στους ποντικούς *GDF-1-TG* μετά από MI. Αντίθετα, η ανεπάρκεια *GDF-1* επιδείνωσε πολύ την παθολογική καρδιακή απόκριση αναδιαμόρφωσης μετά το έμφραγμα. Περαιτέρω ανάλυση του *in vitro* και *in vivo* συμβάντα σηματοδότησης έδειξαν ότι ο ευεργετικός ρόλος του *GDF-1* στην επαγόμενη από MI καρδιακή δυσλειτουργία και στην αναδιαμόρφωση της LV συσχετίστηκε με την αναστολή των μη κανονικών (MEK-ERK1/2) και των κανονικών (SMAD) καταρράκτες σηματοδότησης.

Συνολικά, τα δεδομένα που είχαν μελετήσει αποκαλύψαν ότι το *GDF-1* στην καρδιά είναι ένας νέος μεσολαβητής που προστατεύει από την ανάπτυξη καρδιακής αναδιαμόρφωσης μετά το έμφραγμα μέσω αρνητικής ρύθμισης των οδών σηματοδότησης MEK-ERK1/2 και SMAD. Έτσι, το *GDF-1* μπορεί να χρησιμεύσει ως πολύτιμος θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία του MI. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη ορίζει τον ρόλο του *GDF-1* στην καρδιακή αναδιαμόρφωση ως απόκριση στην υπερφόρτωση πίεσης. Ο μοριακός μηχανισμός για τον προστατευτικό ρόλο του *GDF-1* στην ανάπτυξη της καρδιακής αναδιαμόρφωσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αναστολή των οδών σηματοδότησης MEK-ERK1/2 και SMAD. Οι παρατηρήσεις μας μπορεί να βοηθήσουν στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για τη θεραπεία της καρδιακής αναδιαμόρφωσης και της καρδιακής ανεπάρκειας. Η χρόνια υπερφόρτωση πίεσης είναι μια παθολογική κατάσταση που εμφανίζεται σε ασθενείς με υπέρταση ή στένωση της αορτικής βαλβίδας. Στην αρχή της υπερφόρτωσης πίεσης, η καρδιά ανταποκρίνεται στο στρες με ομόκεντρη υπερτροφία. Όταν παραταθεί, αυτή η αντισταθμιστική διαδικασία μπορεί να εξελιχθεί σε έκκεντρη υπερτροφία και να κορυφωθεί σε δυσλειτουργία του μυοκαρδίου και καρδιακή ανεπάρκεια. Το ζωικό μοντέλο εγκάρσιας αορτικής συστολής (TAC), το οποίο μιμείται την ανθρώπινη κατάσταση υπερφόρτωσης πίεσης, χρησιμοποιήθηκε εκτενώς για τη διερεύνηση με χωρικό και χρονικό τρόπο των μοριακών καθοριστικών παραγόντων που εμπλέκονται σε αυτή την παθολογία]. Είναι σημαντικό ότι η προσέγγιση TAC επιτρέπει σε κάποιον να μελετήσει την εξέλιξη της νόσου από την προσαρμοστική υπερτροφία στην καρδιακή ανεπάρκεια, προσδιορίζοντας τις οδούς σηματοδότησης που εμπλέκονται σε αυτή τη μετάβαση. Τα ποντίκια TAC εμφάνισαν αύξηση στη φωσφορυλίωση του ERK στην πρώτη φάση της διέγερσης υπερφόρτωσης πίεσης, όταν διατηρείται η συσταλτική λειτουργία, ενώ το P-ERK μειώθηκε τη στιγμή της λειτουργικής αντιστάθμισης, όταν

εμφανίζεται η ίνωση και η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων. Έτσι, το ERK διεγείρεται κατά την πρώιμη προσαρμοστική ομόκεντρη υπερτροφία και η ενεργοποίησή του μειώνεται κατά την όψιμη επιβλαβή έκκεντρη υπερτροφία. Σε καρδιακά μυοκύτταρα υπό υπερφόρτωση πίεσης, το ERK ενεργοποιείται ως απόκριση στους υποδοχείς συζευγμένους με πρωτεΐνη G (GPCRs). Ειδικότερα, η β-αρρεστίνη, η οποία δεσμεύει ειδικά τους GPCR και αποκλείει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G κατάντη, μεσολαβεί στη διασταύρωση των GPCR με τη μονάδα RAS-RAF-MEK-ERK. Επιπλέον, η β-αρρεστίνη διευκολύνει τη μετενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR). Διαγονιδιακά ποντίκια με καρδιακή ειδική έκφραση μιας κυρίαρχης αρνητικής μορφής RAF-1 (DN-RAF) ευαισθητοποιήθηκαν σε παθολογικές επιδράσεις υπερφόρτωσης πίεσης. Τα ποντίκια DN-RAF που υποβλήθηκαν σε TAC δεν ανέπτυξαν προσαρμοστική υπερτροφία και εμφάνισαν αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας.

Είναι σημαντικό ότι η απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων ενισχύθηκε, υποδεικνύοντας ότι η απουσία του RAF-1 μπλοκάρει τόσο την υπερτροφική όσο και τη σηματοδότηση επιβίωσης. Σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα, έδειξε ότι το διαγονιδιακό μοντέλο του συστατικά ενεργοποιημένου ERK στα καρδιομυοκύτταρα ανέπτυξε προσαρμοστική υπερτροφία με αυξημένη συστατική λειτουργία της κοιλίας υπό υπερφόρτωση πίεσης. Τα διαγονιδιακά ποντίκια ERK παρουσίασαν επίσης ισχυρή μείωση στη συσσώρευση ίνωσης. Κατά συνέπεια, τα ποντίκια που υπερέκφραζαν το DUSP6, τη συγκεκριμένη φωσφατάση του ERK, ευαισθητοποιήθηκαν στην εξέλιξη της καρδιακής ανεπάρκειας όταν υποβλήθηκαν σε μακροχρόνια TAC. Συνολικά, αυτές οι επιστημονικές αναφορές υποδεικνύουν ότι η προς τα κάτω ρύθμιση του ERK εμπλέκεται στη μετάβαση από την αντιρροπούμενη υπερτροφία σε δυσπροσαρμοστική υπερτροφική καρδιακή ανεπάρκεια κατά την υπερφόρτωση πίεσης και ότι η ERK απαιτείται για την πρόληψη της έκκεντρης ανάπτυξης στο πλαίσιο της υπερφόρτωσης πίεσης. Πράγματι, η διέγερση αυτής της οδού θα μπορούσε να είναι μια θεραπευτική στρατηγική για τη διατήρηση της καρδιακής απόδοσης κατά τη διάρκεια αυτής της παθολογικής αιμοδυναμικής κατάστασης.



Εικόνα13. GDF-1ως καρδιοπροστατευτικός ρόλος

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443913003438>

Κεφάλαιο 7. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

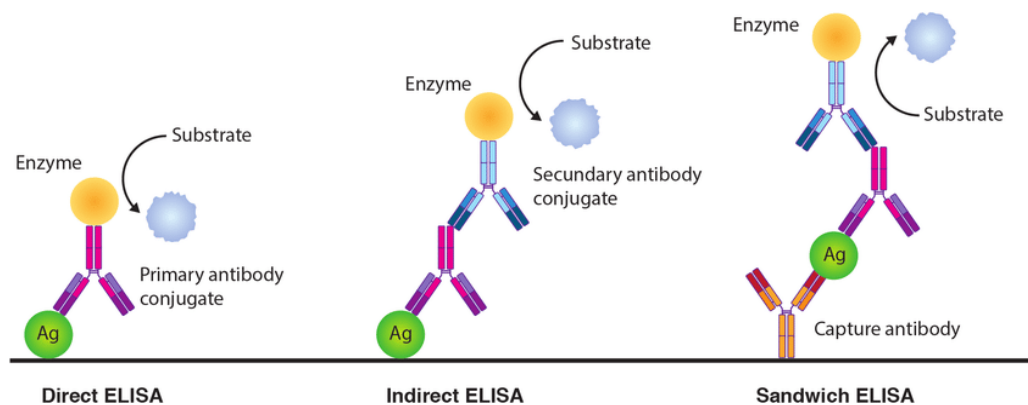
7. 1. Elisa

Η τεχνική του ανοσοπροσοφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο (ELISA) είναι το κυρίαρχο πρότυπο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαλυτών πρωτεϊνών και παρέχει γρήγορα και συνεπή αποτελέσματα που είναι εύκολο να αναλυθούν. Οι συνδεδεμένες με ένζυμο ανοσοπροσοφητικές δοκιμασίες (ELISAs) είναι δοκιμασίες που βασίζονται σε πλάκες για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε ένα σύνθετο μείγμα. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός της ειδικής για τον στόχο πρωτεΐνης σε μια ELISA σάντουιτς επιτυγχάνεται με τη χρήση εξαιρετικά εξειδικευμένων αντισωμάτων που ακινητοποιεί την πρωτεΐνη στόχο (αντιγόνο) στο τρυβλίο και ανιχνεύει έμμεσα την παρουσία της πρωτεΐνης στόχου (Aydin 2015). Αυτός ο τύπος δοκιμασίας σύλληψης ονομάζεται προσδιορισμός σάντουιτς επειδή η αναλυόμενη ουσία που μετράται δεσμεύεται μεταξύ δύο πρωταρχικών αντισωμάτων, καθένα από τα οποία ανιχνεύει διαφορετικό επίτοπο του αντιγόνου – το αντίσωμα σύλληψης και το αντίσωμα ανίχνευσης. Επομένως πρόκειται για μια ανοσολογική ανάλυση που χρησιμοποιείται συνήθως για τη μέτρηση αντισωμάτων, αντιγόνων, πρωτεϊνών και γλυκοπρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες οι οποίες πρέπει να είναι ειδικές απορροφητικές πλάκες (π. χ. πλακίδια NUNC Immuno) για να διασφαλιστεί ότι το αντίσωμα ή το αντιγόνο κολλάει

στην επιφάνεια. Κάθε ELISA μετρά ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και τα κιτ για μια ποικιλία αντιγόνων είναι ευρέως διαθέσιμα. Για την ανίχνευση του παράγοντα GDF-1 συχνά χρησιμοποιούμε την τεχνική που είναι γνωστό ως ELISA σάντουιτς (F.Clark, M.ListerandBar-Joseph 1986), εδώ δύο σετ αντισωμάτων χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση εκκρινόμενων προϊόντων.

Η μέθοδος είναι σταδιακά με τη σειρά που φαίνεται:

- 1) Το 1ο βήμα είναι η επίστρωση της πλάκας ELISA με αντίσωμα σύλληψης, τυχόν περίσσεια, μη δεσμευμένο αντίσωμα στη συνέχεια πλένεται από την πλάκα. Το αντίσωμα σύλληψης είναι ένα αντίσωμα που δημιουργείται ενάντια στο αντιγόνο που ενδιαφέρει.
1. Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα (π.χ. ούρα, ορός ή υπερκείμενο υγρό κυττάρων). Οποιοδήποτε αντιγόνο βρεθεί στο δείγμα θα συνδεθεί με το αντίσωμα σύλληψης που ήδη επικαλύπτει την πλάκα. Τα δείγματα προστίθενται συνήθως εις διπλούν ή εις τριπλούν (για να επιτραπεί στατιστική ανάλυση) και σε διάφορες συγκεντρώσεις για να διασφαλιστεί ότι εμπίπτει στα επίπεδα ανίχνευσης της ανάλυσης. Και πάλι, τυχόν περίσσεια δείγματος πλένεται από την πλάκα.
2. Στο βήμα 3, προστίθεται αντίσωμα ανίχνευσης. Αυτό το αντίσωμα επισημαίνεται με ένα ένζυμο, συνήθως υπεροξειδάση ραπανάκι ή αλκαλική φωσφατάση. Το αντίσωμα ανίχνευσης συνδέεται με οποιοδήποτε αντιγόνο-στόχο που είναι ήδη συνδεδεμένο στην πλάκα. Τέλος, προστίθεται ένα υπόστρωμα στο πιάτο. Οι δοκιμασίες ELISA είναι συνήθως **χρωμογόνες** χρησιμοποιώντας μια αντίδραση που μετατρέπει το υπόστρωμα (π.χ. TMB ή ABTS) σε έγχρωμο προϊόν το οποίο μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας συσκευή ανάγνωσης πλακών.
3. Στο τέλος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης αντιγόνου σε ένα δείγμα απαιτεί την παραγωγή μιας **τυπικής καμπύλης** χρησιμοποιώντας αντιγόνα γνωστής συγκέντρωσης. Η συγκέντρωση του αντιγόνου σε ένα δείγμα μπορεί στη συνέχεια να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την οπτική πυκνότητα (OD).



Εικόνα14. ELISA

https://www.researchgate.net/figure/ELISA-assays-Direct-ELISA-mostly-used-for-antigen-detection-Indirect-ELISA-mainly-used_fig3_320265684

7. 2. Sds Page

Το SDS-PAGE (ηλεκτροφόρηση γέλης δωδεκυλοθειικού νατρίου-πολυακρυλαμιδίου) πρόκειται για ένα ασυνεχές ηλεκτροφορητικό σύστημα που αναπτύχθηκε από τον UlrichK_Laemmli_το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως ως μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών με μοριακές μάζες συνήθως μεταξύ 5 και 250 kDa. Η συνδυασμένη χρήση δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS, επίσης γνωστό ως λαυρυλοθειικό νάτριο) και γέλης πολυακρυλαμιδίου επιτρέπει την εξάλειψη της επίδρασης της δομής και του φορτίου και οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται αποκλειστικά με βάση τις διαφορές στο μοριακό τους βάρος. Το SDS-PAGE σε συνδυασμό με μια χρώση πρωτεΐνης χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για τον γρήγορο και ακριβή διαχωρισμό και την επακόλουθη ανάλυση των πρωτεϊνών (ReisingerandEichackerProf.Dr. 2007). Έχει συγκριτικά χαμηλό κόστος οργάνων και αντιδραστηρίων και είναι μια εύχρηστη μέθοδος. Λόγω της χαμηλής του επέκτασης, χρησιμοποιείται κυρίως για αναλυτικούς σκοπούς και λιγότερο για προπαρασκευαστικούς σκοπούς, ειδικά όταν πρόκειται να απομονωθούν μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης.

Η μέθοδος SDS-PAGE αποτελείται από τα εξής βήματα (J.Simpson 2006)

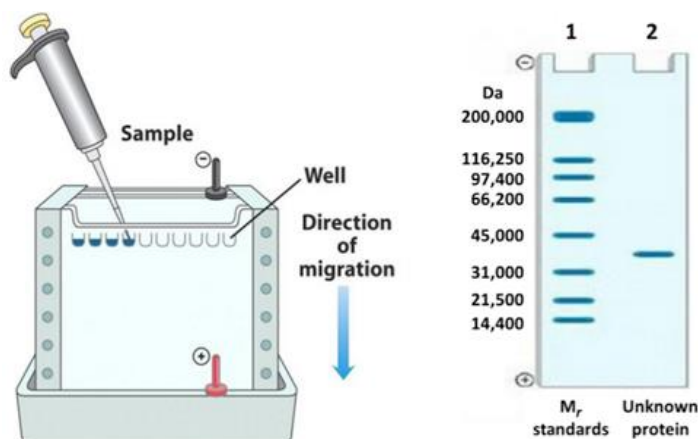
- 2) Παραγωγή γέλης: Τα πηκτώματα παρασκευάζονται έως και μία ημέρα πριν από την ηλεκτροφόρηση, έτσι ώστε η διάχυση να μην οδηγεί σε ανάμειξη των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το πήκτωμα παράγεται με ριζικό πολυμερισμό σε ένα καλούπι που αποτελείται από δύο σφραγισμένες γυάλινες πλάκες με διαχωριστικά μεταξύ των γυάλινων πλακών. Σε μια τυπική ρύθμιση μίνι-τζελ, οι διαχωριστές έχουν πάχος 0,75 mm ή 1,5 mm, το οποίο καθορίζει την ικανότητα φόρτωσης της γέλης. Για το διάλυμα γέλης, το ακρυλαμίδιο

αναμιγνύεται ως σχηματιστής γέλης (συνήθως 4% V/V στο πήκτωμα στοίβαξης και 10-12% στο διαχωριστικό πήκτωμα), μεθυλενοδισακρυλαμίδιο ως παράγοντας σταυροειδούς σύνδεσης, ρυθμιστικό γέλης στοίβαξης ή διαχωρισμού, νερό και SDS. Με την προσθήκη του καταλύτη TEMED και του ριζικού εκκινητή υπερθειικού αμμωνίου (APS) ο πολυμερισμός ξεκινά.

- 3) Προετοιμασία δείγματος: Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας του δείγματος, το ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος, και επομένως το SDS, προστίθεται σε περίσσεια στις πρωτεΐνες και το δείγμα στη συνέχεια θερμαίνεται στους 95 °C για πέντε λεπτά ή εναλλακτικά στους 70 °C για δέκα λεπτά. Η θέρμανση διαταράσσει τις δευτερογενείς και τριτοταγείς δομές της πρωτεΐνης διαταράσσοντας τους δεσμούς υδρογόνου και τεντώνοντας τα μόρια. Προαιρετικά, οιδισουλφιδικές γέφυρες που υπάρχουν και στον παράγοντα μπορούν να διασπαστούν με αναγωγή. Για το σκοπό αυτό, η μείωση των θειολών όπως η β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME, 5% κατ' όγκο) προστίθενται στο ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος. Μετά την ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου, κάθε δείγμα διοχετεύεται με πιπέτα στο δικό του φρεάτιο στο πήκτωμα, το οποίο προηγουμένως είχε βυθιστεί σε ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
- 4) Ηλεκτροφόρηση: Για διαχωρισμό, τα μετουσιωμένα δείγματα φορτώνονται σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, το οποίο τοποθετείται σε ένα ρυθμιστικό ηλεκτροφόρησης με κατάλληλους ηλεκτρολύτες. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται μια τάση (συνήθως γύρω στα 100 V, 10-20 V ανά cm μήκος γέλης), η οποία προκαλεί μια μετανάστευση αρνητικά φορτισμένων μορίων μέσω της γέλης προς την κατεύθυνση της θετικά φορτισμένης ανόδου. Το τζέλ λειτουργεί σαν κόσκινο και έτσι οι μικρές πρωτεΐνες μεταναστεύουν σχετικά εύκολα μέσω του πλέγματος της γέλης, ενώ οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες είναι πιο πιθανό να διατηρηθούν και ως εκ τούτου μεταναστεύουν πιο αργά μέσω της γέλης, επιτρέποντας έτσι τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών κατά μοριακό μέγεθος. Η ηλεκτροφόρηση διαρκεί από μισή ώρα έως αρκετές ώρες ανάλογα με την τάση και το μήκος της γέλης που χρησιμοποιείται.
- 5) Χρώση: Στο τέλος του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού, όλες οι πρωτεΐνες ταξινομούνται κατά μέγεθος και στη συνέχεια μπορούν να αναλυθούν με άλλες μεθόδους, π. χ. χρώση πρωτεϊνών όπως χρώση Coomassie (πιο συνηθισμένη και εύκολη στη χρήση), χρώση αργύρου (υψηλότερη ευαισθησία), φθορίζουσες κηλίδες όπως η χρώση επιοκκονόνη και πορτοκαλί χρώση SYPRO, και ανοσολογική ανίχνευση όπως το Western Blot. Οι φθορίζουσες βαφές έχουν μια συγκριτικά υψηλότερη γραμμικότητα μεταξύ της ποσότητας

πρωτεΐνης και της έντασης χρώματος περίπου τριών τάξεων μεγέθους πάνω από το όριο ανίχνευσης, δηλαδή η ποσότητα της πρωτεΐνης μπορεί να εκτιμηθεί με την ένταση του χρώματος. Κατά τη χρήση της φθορίζουσας πρωτεϊνικής χρωστικής τριχλωροαιθανόλης, παραλείπεται μια επακόλουθη χρώση πρωτεΐνης εάν προστεθεί στο διάλυμα γέλης και η γέλη ακτινοβοληθεί με υπεριώδες φως μετά την ηλεκτροφόρηση.

- 6) Ανάλυση: Η χρώση πρωτεΐνης στο πήκτωμα δημιουργεί ένα τεκμηριωμένο σχέδιο ζωνών των διαφόρων πρωτεϊνών. Ενώ οι γλυκοπρωτεΐνες έχουν διαφορετικά επίπεδα γλυκοσυλιώσεων και μοριακού βάρους και προσροφούν το SDS πιο ανομοιόμορφα στις γλυκοσυλιώσεις, με αποτέλεσμα ευρύτερες και θολές ζώνες. Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται πιο κοντά στην διαμεμβρανική περιοχή, συχνά αποτελούνται από τα πιο υδρόφοβα αμινοξέα, έχουν χαμηλότερη διαλυτότητα σε υδατικά διαλύματα, όπου τείνουν να δεσμεύουν λιπίδια και τείνουν να καθιζάνουν σε υδατικά διαλύματα λόγω των υδρόφοβων επιδράσεων, σε περίπτωση όπου δεν υπάρχουν επαρκείς ποσότητες απορρυπαντικού. Αυτή η κατακρήμνιση εκδηλώνεται για πρωτεΐνες μεμβράνης σε SDS-PAGE σε «ουρά» πάνω από τη ζώνη της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης. Σε αυτή την περίπτωση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί περισσότερο SDS (με χρήση περισσότερο ή περισσότερο συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος δείγματος) και η ποσότητα πρωτεΐνης στην εφαρμογή του δείγματος μπορεί να μειωθεί. Μια υπερφόρτωση της γέλης με μια διαλυτή πρωτεΐνη δημιουργεί μια ημικυκλική ζώνη αυτής της πρωτεΐνης (π. χ. στη λωρίδα δείκτη της εικόνας στα 66 kDa), επιτρέποντας την κάλυψη άλλων πρωτεϊνών με παρόμοιο μοριακό βάρος. Μια χαμηλή αντίθεση (όπως στη λωρίδα δείκτη της εικόνας) μεταξύ των ζωνών εντός μιας λωρίδας υποδηλώνει είτε την παρουσία πολλών πρωτεϊνών (χαμηλή καθαρότητα) είτε, εάν χρησιμοποιείτε καθαρές πρωτεΐνες και μια χαμηλή αντίθεση εμφανίζεται μόνο κάτω από τη μία ζώνη, υποδηλώνει πρωτεολυτική αποικοδόμηση της πρωτεΐνης. Η τεκμηρίωση του σχεδίου ζωνών γίνεται συνήθως με φωτογράφιση ή σάρωση.



Εικόνα15. SDS PAGE

<https://www.creative-proteomics.com/pronalyse/sds-page-service.html>

7.3. Pcr

Η εμφάνιση της PCR σε πραγματικό χρόνο και της PCR αντίστροφης μεταγραφής σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR σε πραγματικό χρόνο) έχει αλλάξει δραματικά το πεδίο μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης. Η PCR πραγματικού χρόνου είναι η τεχνική συλλογής δεδομένων καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας PCR όπως συμβαίνει, συνδυάζοντας έτσι την ενίσχυση και την ανίχνευση σε ένα μόνο βήμα. Αυτό επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας μια ποικιλία διαφορετικών φθορίζουσών χημικών ουσιών που συσχετίζουν τη συγκέντρωση του προϊόντος PCR με την ένταση του φθορισμού (N.Southard 2013). Οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το χρονικό σημείο (ή τον κύκλο PCR) όπου ανιχνεύεται για πρώτη φορά η ενίσχυση στόχου. Αυτή η τιμή αναφέρεται συνήθως ως κατώφλι κύκλου (C_t), ο χρόνος κατά τον οποίο η ένταση φθορισμού είναι μεγαλύτερη από τον φθορισμό υποβάθρου. Κατά συνέπεια, όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του DNA στόχου στο υλικό έναρξης, τόσο πιο γρήγορα θα εμφανιστεί σημαντική αύξηση στο φθορίζον σήμα, αποδίδοντας χαμηλότερο C_t . Σε αντίθεση με την PCR τελικού σημείου (συμβατική PCR), η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την παρακολούθηση του επιθυμητού προϊόντος σε οποιοδήποτε σημείο της διαδικασίας ενίσχυσης με μέτρηση του φθορισμού (σε πραγματικό χρόνο, η μέτρηση του επιπέδου του γίνεται σε ένα δεδομένο όριο). Μια κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος ποσοτικοποίησης του DNA με PCR πραγματικού χρόνου βασίζεται στη γραφική παράσταση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων σε μια λογαριθμική κλίμακα. Ένα όριο για την ανίχνευση του φθορισμού που βασίζεται στο DNA ορίζεται 3-5 φορές της τυπικής απόκλισης του θορύβου σήματος πάνω από το φόντο. Ο αριθμός των κύκλων στους οποίους ο φθορισμός υπερβαίνει το όριο ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (C_t) ή σύμφωνα με τις οδηγίες MIQE, κύκλος

ποσοτικοποίησης. Η διαδικασία PCR γενικά αποτελείται από μια σειρά από αλλαγές θερμοκρασίας που επαναλαμβάνονται 25-50 φορές.

Αυτοί οι κύκλοι συνήθως αποτελούνται από τρία στάδια (F.C. Hawkins and C. Guest 2017):

- 1) το πρώτο, στους 95°C περίπου, επιτρέπει τον διαχωρισμό της διπλής αλυσίδας του νουκλεϊκού οξέος,
- 2) Το δεύτερο, σε θερμοκρασία περίπου 50–60°C, επιτρέπει τη σύνδεση των εκκινητών με το πρότυπο DNA.
- 3) το τρίτο, μεταξύ 68-72°C, διευκολύνει τον πολυμερισμό πραγματοποιείται από την πολυμεράση DNA.

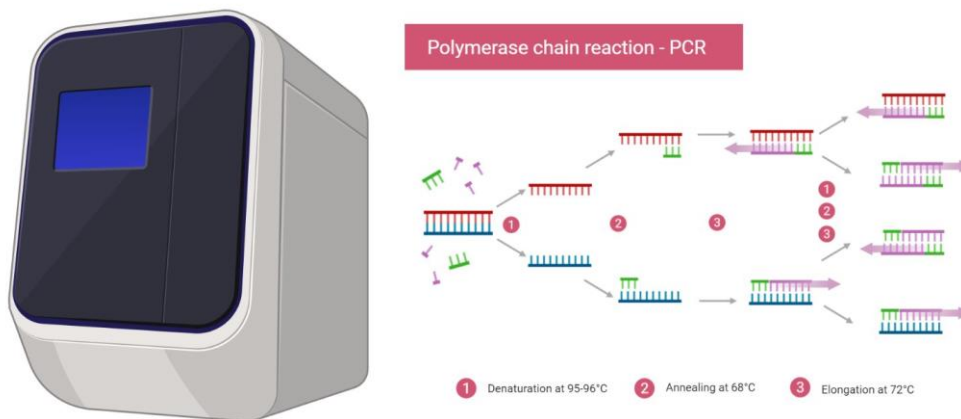
Λόγω του μικρού μεγέθους των θραυσμάτων, το τελευταίο βήμα συνήθως παραλείπεται σε αυτόν τον τύπο PCR, καθώς το ένζυμο είναι σε θέση να αντιγράψει το αμπλικόνιο του DNA κατά τη διάρκεια της αλλαγής μεταξύ του σταδίου ευθυγράμμισης και του σταδίου μετουσίωσης.

Επιπλέον, στην PCR τεσσάρων σταδίων ο φθορισμός μετράται κατά τη διάρκεια σύντομων φάσεων θερμοκρασίας που διαρκούν μόνο λίγα δευτερόλεπτα σε κάθε κύκλο, με θερμοκρασία, για παράδειγμα, 80°C, προκειμένου να μειωθεί το σήμα που προκαλείται από την παρουσία διμερών εκκινητών όταν χρησιμοποιείται μια μη ειδική βαφή. Οι θερμοκρασίες και οι χρονισμοί που χρησιμοποιούνται για κάθε κύκλο εξαρτώνται από μια μεγάλη ποικιλία παραμέτρων, όπως: το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA, τη συγκέντρωση δισθενών ιόντων και το δεοξυριβονουκλεοτίδιο τριφωσφορικά (dNTPs) στην αντίδραση και τη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών, Μια χρωστική που δεσμεύει DNA συνδέεται με όλο το δίκλωνο (ds) DNA στην PCR, αυξάνοντας την κβαντική απόδοση φθορισμού της βαφής. Επομένως, μια αύξηση του προϊόντος DNA κατά τη διάρκεια της PCR οδηγεί σε αύξηση της έντασης φθορισμού που μετράται σε κάθε κύκλο. Ωστόσο, οι βαφές dsDNA όπως το SYBR Green θα συνδεθούν με όλα τα προϊόντα dsDNA PCR, συμπεριλαμβανομένων των μη ειδικών προϊόντων PCR (όπως το Primer dimer). Αυτό μπορεί ενδεχομένως να επηρεάσει ή να αποτρέψει την ακριβή παρακολούθηση της επιδιωκόμενης αλληλουχίας στόχου. Σε πραγματικό χρόνο PCR με βαφές dsDNA η αντίδραση παρασκευάζεται ως συνήθως, με την προσθήκη φθορίζουσας χρωστικής dsDNA. Στη συνέχεια, η αντίδραση εκτελείται σε ένα όργανο PCR σε πραγματικό χρόνο και μετά από κάθε κύκλο, η ένταση του φθορισμού μετράται με έναν ανιχνευτή. η χρωστική φθορίζει μόνο όταν συνδέεται με το dsDNA (δηλ. το προϊόν PCR).

Αυτή η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι χρειάζεται μόνο ένα ζεύγος εκκινητών για την εκτέλεση της ενίσχυσης, γεγονός που διατηρεί το κόστος χαμηλό. πολλαπλές αλληλουχίες στόχου

μπορούν να παρακολουθούνται σε ένα σωλήνα χρησιμοποιώντας διαφορετικούς τύπους βαφών. Σε αντίθεση με την PCR τελικού σημείου (συμβατική PCR), η PCR πραγματικού χρόνου επιτρέπει την παρακολούθηση του επιθυμητού προϊόντος σε οποιοδήποτε σημείο της διαδικασίας ενίσχυσης με μέτρηση του φθορισμού (σε πραγματικό χρόνο, η μέτρηση του επιπέδου του γίνεται σε ένα δεδομένο όριο). Μια κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος ποσοτικοποίησης του DNA με PCR πραγματικού χρόνου βασίζεται στη γραφική παράσταση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων σε μια λογαριθμική κλίμακα. Ένα όριο για την ανίχνευση του φθορισμού που βασίζεται στο DNA ορίζεται 3-5 φορές της τυπικής απόκλισης του θορύβου σήματος πάνω από το φόντο. Ο αριθμός των κύκλων στους οποίους ο φθορισμός υπερβαίνει το όριο ονομάζεται κύκλος κατωφλίου (C_t) ή, σύμφωνα με τις οδηγίες MIQE, κύκλος ποσοτικοποίησης (C_q).

Real Time PCR / quantitative PCR (qPCR)



Εικόνα16. Real Time PCR

<https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>

Συμπεράσματα

Μέσα από διαφορές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για το γονίδιο GDF-1 και της παραγόμενης πρωτεΐνης GDF-1 συμπεραίνουμε ότι ο παράγων αποτελεί τον κύριο εξωκυτταρικό παράγοντα που μεσολαβεί σε γεγονότα διαφοροποίησης των κυττάρων κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, που μπορεί να διαλυθεί και αποτελεί την κύρια προσβάσιμη πρωτεΐνη για τις μελλοντικές μελέτες. Ανήκει στην υπερικογένεια αυξητικών παραγόντων και βρίσκεται κυρίως στον νευρικό σύστημα εμβρύων αλλά και ενήλικων. Είναι χρήσιμο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη κατά την διαμόρφωση του αριστερού –δεξιού άξονα και στην επαγωγή του μεσοδέρματος, όπου έχει δράση αυξητικής διαφοροποίησης και κυτοκίνης. Η δράση του εξαρτάται από τους υποδοχείς

τύπου II όπου φωσφορυλιώνονται και αποτελούν τους υποδοχείς I με δράση κινάσης τυροσίνης /θρεονινης και με τρεις ενισχυτικούς οδούς σηματοδότησης με κυρίαρχο την σηματοδότηση μέσω SMAD πρωτεϊνών. Το βασικό σχέδιο σώματος όλων των σπονδυλωτών βασίζεται στην δημιουργία των αξόνων πρόσθιο-οπίσθιο, ραχιαίο-κοιλιακό και αριστερό-δεξιό άξονα κατά την ανάπτυξη με την συμμετοχή και του συνυποδοχέα Nodal. Οι γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο GDF-1 και Nodal αλλά και δυσμορφία της παραγομένης πρωτεΐνης GDF-1 αποτελούν την κύρια αιτία για την ασύμμετρη κατανομή των οργάνων στον αριστερό –δεξιό άξονα, την ασύμμετρη μορφογένεση του προσθίου –οπίσθιου εγκέφαλου με αποτέλεσμα την ολοπροσεγκεφαλία και μια ποικιλία καρδιακών ανωμαλιών, με κυρίαρχο την μετάθεση των μεγάλων αρτηριών και την τετραλογία Fallot. Οι ερευνητές έχουν ανακαλύψει ότι συνυπάρχει επίσης μια αναπτυξιακή πρωτεΐνη Cripto-1 όπου προάγει την ογκογένεση αλλά κατά την διάρκεια της ανάπτυξης υπάρχει ως υποχρεωτικός συνυποδοχέας για τον μετασχηματισμό των προσδεμάτων της υπερικογένειας TGF-β όπου συμπεριλαμβάνεται και ο παράγων. Η σημασία του παράγοντα GDF-1 αποτελεί την πολύτιμη θεραπεία για διάγνωση στον καρκίνο του στομάχου, όπου μπλοκάρει τους οδούς σηματοδότησης που συμμετέχουν, κυρίως μέσω SMAD πρωτεϊνών και είναι χρήσιμο για την επιλογή του κατάλληλου φαρμάκου και θεραπείας. Επίσης εξακολουθεί να είναι σημαντικό στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης των σημάτων SMAD και MEK-ERK1/2.

Αναφορές

- Andersson, O., Reissman, E., Jornwall, H., & Ibanez, K. (2007, Mar 27). Synergistic interaction between Gdf1 and Nodal during anterior axis development. *Dev Biol*, σσ. 370-381.
- Apitz, C., Webb, G., & Redington, A. (2009, October 24). Tetralogy of Fallot. *Lancet*, σσ. 657-677.
- Attisano, L., & Hoetlich, S. (2001, aug 2). The Smads G. *Genome Biol*, σσ. 3010-3015.
- Aydin, S. (2015, October 12). A short history and types of ELISA and our laboratory experience with peptide protein analyses using ELISA. *Peptides*, σσ. 4-15.
- Aykul, S., Ni, W., Mutata, W., & Hackert, E. (2015, January 20). Human Cerberus Prevents Nodal Receptor Binding and Inhibits Nodal Signaling and Suppresses Nodal Mediated Phenotypes. *Journal Pone*, σσ. 67-75.
- Bao, M. W., Xiaoxiong Lia, C., Wan, N., Wan, F., Li, H., Zhang, X. J., και συν. (2015, February 26). Cardioprotective role of growth /differentiation factor 1. *The journal of pathology*, σ. 13.
- Barc, B., Sullivan, E., Papakotsi, V., Cote, A., Toran, P., Walker, S., και συν. (2019, november 13). GDF1 Regulation of ceramide metabolism restores effective hematopoiesis in myelodysplastic syndrome.

Myelodysplastic Syndromes Basic and translational studies , σ. 1700.

Bedard, J., Haahina, A., & Ware, S. (2011, Aug 27). Identification of a Novel ZIC3 Isoform and Mutation Screening in Patients with Heterotaxy and Congenital Heart Disease. *Journal OPS* , σσ. 50-65.

Bianco, C., Rangel, M., Castro, N., Nagaoka, T., & all, e. (2010, Aug 2). Role of Cripto-1 in Stem Cell Maintenance and Malignant Progression. *The American Journal of Pathology* , σσ. 545-560.

Bunton, T., Rankin, C., Lawler, A., & Lee, S. J. (2000, May 15). Regulation of left right patterning in mice by growth differentiation factor 1. *Nature genetics* , σσ. 262-265.

Burt, D., & Law, A. (1994, February 11). Evolution of the transforming growth factor beta superfamily. *Progress in Growth factor Research* , σσ. 99-118.

C Hsia, E., Koniaris, L., Zimmers, T., Sebaid, S., Huynh, C., & Lee, S. J. (2000, December 25). Characterization of Growth-Differentiation Factor 1 is a Transforming Growth Factor β Superfamily Member Induced following Liver Injury. *Molecular and Cellular Biology* , σσ. 536-685.

C Rider, C., & Mulloy, B. (2010, November 23). Bone morphoemetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochemical Journal* , σσ. 1-12.

Clark, D., & Coker, R. (1998, Mar 1). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* , σσ. 822-900.

Clark, M., Lister, R., & Bar Joseph, M. (1986, April 5). ELISA techniques. *Methods in Enzymology* , σσ. 742-766.

Crimwood, J., Olsen, A., Terry, A., Gordon, L., & et, a. (2004, April 1). The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature* , σσ. 529-535.

Derynck, R. (1994, December 19). TGF beta receptor mediated signaling. *Trends Biochem Sci* , σσ. 548-553.

Derynck, R., & Budi, E. (2019, February 26). Specificity versatility and control of TGF- β family signaling. *Sci Signal* , σσ. 305-345.

Desgrange, A., Meilhac, S., & Le Carrec, J. (2018, November 22). Left right asymmetry in heart development and disease and forming the right loop. *Development* , σσ. 145-167.

Dykes, L. (2018, May 11). Left Right Patterning and evolution and Cardiac Development. *Cardiovasc Dev Dis* , σσ. 52-72.

E Downing, T., & Y Kim, Y. (2015, Aug 29). Tetralogy of Fallot: General Principles of Management. *Cardiol Clin* , σσ. 531-541.

Economou, A., & Hill, C. (2019, Nov 28). Temporal dynamics in the formation and interpretation of Nodal and BMP morphogen gradients. *Curr Top Dev Biol* , σσ. 363-389.

Fuerer, C., Constam, D., & Nostro, C. (2014, Jun 20). Nodal Gdf1 heterodimers with bound prodomains enable serum-independent nodal signaling and endoderm differentiation. *J Biol C* , σσ. 17854-17871.

Fujii, D., Derynck, R., Francke, U., & Bridenssen, J. (1986, May 11). Transforming growth factor β gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. *Somatic cell and Molecular genetics* , σσ. 281-288.

Gao, X., Zheng, P., Yang, L., Luio, H., Zhang, C., & all, e. (2019, Jun 17). Association of functional variant in GDF1 promoter with risk of congenital heart disease and its regulation by Nkx2.5. *Clin Sci* , σσ. 1281-1295.

Guerer, C., Nostro, C., & Constam, D. (2014, Jun 20). Nodal Gdf1 heterodimers with bound prodomains enable serum independent nodal signaling and endoderm differentiation. *J Biol Chem* , σσ. 36-45.

Hawkins, S., & Guest, P. (2017, October 14). Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol* , σσ. 125-133.

Hill, C. (2016, October 3). Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol* , σσ. 234-255.

Hiroko, I., Hassan, C., Seno, M., Afify, S., & Salomon, D. (2021, May 20). Cripto-1 as a Potential Target of Cancer Stem Cells for Immunotherapy. *MDPI* , σσ. 556-575.

Hiroshi, H. (2010, February 11). Chapter 4.2 - Molecular Mechanisms of Left-Right Development. *Academic Press* , σσ. 297-306.

Jacobs, J., Anderson, R., Weinberg, P., Walters, H., & et, a. (2007, September 17). The nomenclature definition and classification of cardiac structures in the setting of heterotaxy. *Cardiol Young* , σσ. 1-28.

Jinrong, X., Zeng, J., Chen, L., Chengbiao, S., Ming, L., & Huang, S. (2017, November 12). Correlation among ST-Z and adiponectin growth differentiation factor-15 and senile heart failure. *The Journal of Practical Medicine* , σσ. 3891-3894.

Kaasinen, E., Aittomaki, K., Eronen, M., Vahteristo, P., Karhu, A., Mecklin, J., και συν. (2010, July 15). Recessively inherited right atrial isomerism caused by mutations in growth/differentiation factor 1(GDF1). *Human Molecular Genetics* , σσ. 2747-2753.

Khalil, N. (2015, December 1). TGF-beta from latent to active. *Microbes Infect* , σσ. 1255-1263.

Kingsley, D. (1994, November 28). The TGF beta superfamily is new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms. *Genes and Developmental* , σσ. 133-146.

Krueger, C., Ge, W., Weichman, A., Varghose, T., & all, e. (2012, Jul 2). Displacement and strain estimation for evaluation of arterial wall stiffness using a familial hypercholesterolemia swine model of atherosclerosis. *Medical Physics* , σσ. 4483-4492.

Lavoie, H., Cagnon, J., & Therrien, M. (2020, June 23). ERK signalling is a master regulator of cell behaviour life and fate. *nature* , σσ. 607-632.

Levin, M. (2004, Jul 1). The embryonic origins of left-right asymmetry. *Crit Kev Oral Biol Med* , σσ. 197-206.

Li, Q. (2014, December 30). Inhibitory SMADs potential regulators of ovarian function. *Biol Reprod* , σσ. 165-180.

Liu, Y., Qin, Z., Yang, K., Liu, R., & Xu, Y. (2017, January 17). Cripto-1 promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer via Wnt/ β -catenin signaling. *Oncology Reports* , σσ. 1521-1528.

Manel, E. (2002, April 15). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome . *Human Molecular genetics* , σσ. 50-59.

Miyasawa, K., & Miyazono, K. (2017, Mar 1). Regulation of TGF- β Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* , σσ. 989-1006.

Monopatra, B., Towmin, J., Belmont, J., & Ware, S. (2009, May 19). Molecular genetics of heterotaxy syndromes. *Curr Opin Cardiol* , σσ. 216-220.

Notes, A., & Lee, S. (1990, Jul 1). Identification of a Novel Member (GDF-1) of the Transforming Growth Factor beta Superfamily. *Molecular Endocrinology* , σσ. 1034-1040.

Opazo, J., & Zavala, K. (2018, September 11). Phylogenetic evidence for independent origins of GDF1 and GDF3 genes in anurans and mammals. *Scientific reports* , σσ. 433-441.

Opazo, J., Kuraku, S., Zavalsa, K., TolozaVilalobos, J., & Hoffman, F. (2019, Jul 21). Evolution of nodal and nodal-related genes and the putative composition of the heterodimers that trigger the nodal pathway in vertebrates. *Evol Dev* , σσ. 205-217.

Pan, Y., Cheung, S. T., Hung Man, J., Kang, W., & all, e. (2018, Jun 4). Granulin epithelin precursor promotes colorectal carcinogenesis by activating MARK/ERK pathway. *J Transl Med* , σσ. 1530-1537.

Reinsberg, T. (2013, February 11). The MAPK (ERK) Pathway. *Journal List* , σσ. 96-108.

Reisinger, V., & Eichacker, A. (2007, September 24). How to Analyze Protein Complexes by 2D Blue Native SDS-PAGE. *Proteomics* , σσ. 6-16.

Roessler, E., Karkera, J., Lee, S., Banejee Basu, S., Mez, J., Ourpenskaia, M., και συν. (2007, November 17). Loss of function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans. *AM S Ham Geneol* , σσ. 987-994.

Salomon, D., & Bianco, C. (2010, November 13). Targeting the embryonic gene Cripto-1 in cancer and beyond. *PMC Lams* , σσ. 545-567.

Satou, Y., Wata, S., Sasakura, Y., & Satoh, N. (2008, September 5). Regulatory genes in the ancestral chordate genomes. *Springer Link* , σσ. 715-721.

Savage Dunn, C. (2005, September 9). TGF-beta signaling. *WORMBOOK* , σσ. 1-12.

Shineboarne, E., V Babu, S., & Calvalno, J. (2006, Sep 15). Tetralogy of Fallot is from fetus to adulh. *Heart* , σσ. 1353-1359.

Shiraishi, I., & Ichikawa, H. (2012, Mar 19). Human Heterotaxy Syndrome. *Circulation Journal* , σσ. 2066-2075.

Simpson, R. (2006, November 28). SDS-PAGE of proteins. *Cold Spring Halt Protoc* , σσ. 56-68.

Soderstrom, S., & Ebendal, T. (1999, May 21). Localized expression of BMP and GDF mRNA in the rodent brain. *Science of Neyroscience research* , σσ. 482-492.

Southard, J. (2013, December 23). Protein analysis using real time PCR instrumentation: incorporation in an integrated inquiry based project. *Biochem Mol Biol Educ* , σσ. 142-151.

Strizzi, L., Margaryan, N., Seftior, E., Abbot, D., Seftor, R., Postovit, M., και συν. (2011, September 19). Emerging Roles of Nodal and Cripto 1 From Embryogenesis to Breast Cancer Progression. *Breast Dis* , σσ. 91-

103.

Vander Ark, A., Cao, J., & Li, X. (2018, Sep 7). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell Signal* , σσ. 578-615.

Wall, N., Craig, E., Labosky, P., & Kessler, D. (2000, November 15). Mesendoderm Induction and Reversal of Left–Right Pattern by Mouse Gdf1 and a Vg1-Related Gene. *Developmental Biology* , σσ. 495-509.

Weiss, A., & Attisane, L. (2013, November 18). The TGF beta superfamily signaling pathway. *Developmental Bioloji 2* , σσ. 47-67.

Yank, W., Kank, W., Mok, M., Li, M., & et, a. (2015, July 27). Epigenetic silencing of GDF1 disrupts SMAD signaling to reinforce gastric cancer development. *Oncojene* , σσ. 2133-2144.

Zhang, Z., Alpert, D., Francis, R., Chatterjee, B., Yu, Q., & Tansey, T. (2008, December 05). Massively parallel sequencing identifies the gene Megf8 with ENU induced mutation causing heterotaxy. *PNAS* , σσ. 2000-2123.

Zhu, L., Belmont, J., & Stephanie, W. (2005, October 26). Genetics of human heterotaxias. *nature european journal of human genetics* , σσ. 17-25.

