



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**
UNIVERSITY OF WEST ATTICA

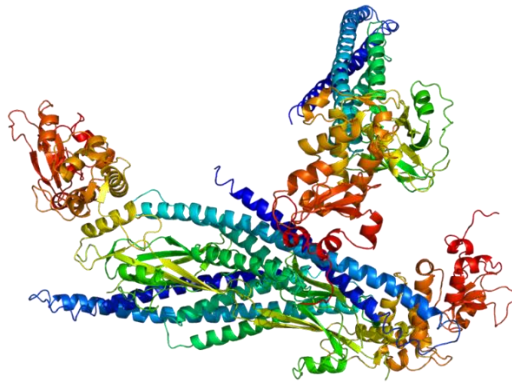


ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΠΡΟΝΟΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ

«Διερεύνηση μηχανισμών μεταγραφικής ρύθμισης»



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΒΑΣΣΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΑΜ: 62115038

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: ΓΙΑΝΝΟΥΛΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΤΙΤΛΟΣ: ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗ ΥΠΕΥΘΥΝΗ: ΚΑΤΣΑΝΤΩΝΗ ΕΛΕΝΗ

ΤΙΤΛΟΣ: ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Γ', ΚΕΝΤΡΟ ΒΑΣΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ,

ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ, 2021

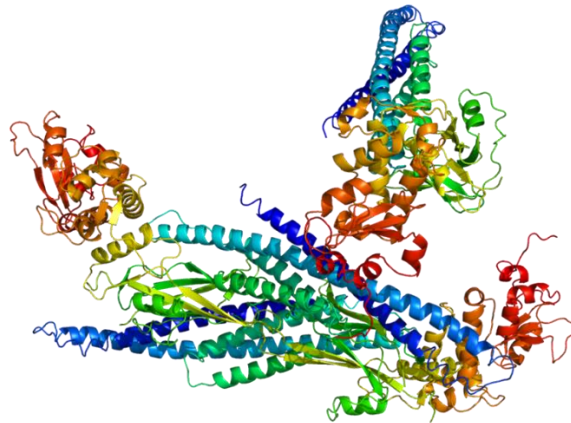


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**
UNIVERSITY OF WEST ATTICA



**FACULTY OF HEALTH AND CARE SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES
DIVISION: MEDICAL LABORATORIES**

“Investigation of transcriptional regulation mechanisms”



**DISSERTATION
VASSOU EVANGELIA
Candidate Number: 62115038**

**SUPERVISOR: GIANNOULAKI ELENI
TITLE: LECTURER
SCIENTIFIC DIRECTOR: KATSANTONI ELENI
TITLE: RESEARCHER C', BASIC RESEARCH CENTER,
BIOMEDICAL RESEARCH FOUNDATION OF THE ACADEMY OF ATHENS**

ATHENS, 2021

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γιαννουλάκη Ελένη

Μπελούκας Απόστολος

Βογιατζάκη Χρυσάνθη

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ω/η κάτωθι υπογεγραμμένος/η **Βάσσω Ευαγγελία** του **Ιωάννη**, με αριθμό μητρώου **62115038** φοιτητής/τρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής **Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας** του Τμήματος **Βιοϊατρικών Επιστημών** δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/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».

Ω/Η Δηλών/ούσα



ΠΡΟΛΟΓΟΣ – ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με θέμα «Διερεύνηση μηχανισμών μεταγραφικής ρύθμισης» εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Κας Κατσαντώνη στο κέντρο Βασικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών, Ακαδημίας Αθηνών, υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Κας Κατσαντώνη.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Ελένη Κατσαντώνη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την υπομονή που έκανε κατά την διάρκεια της υλοποίησης της εργασίας, καθώς και για την βοήθεια και καθοδήγηση στις πειραματικές διαδικασίες. Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ελένη Γιαννουλάκη για την δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την εργασία και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

Στην συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την διδακτορική φοιτήτρια Ειρήνη-Σοφία Φασουλή και τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Κωνσταντίνα Γιαβή, Αιμιλία Καφαλίδου και Χαρά Μακρή για την πολύτιμη βοήθειά τους και την στήριξη κατά την διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου, στις φίλες μου και στους φίλους που με στηρίζουν καθημερινά και συνέβαλαν με τον δικό τους τρόπο στην περάτωση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	9
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ABSTRACT	10
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
2.1 ΧΡΩΜΑΤΙΝΗ ΚΑΙ ΙΣΤΟΝΕΣ.....	12
2.2 ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ	13
2.2.1 Ενεργοποίηση και επιμήκυνση.....	14
2.2.2 Μεταγραφικοί παράγοντες.....	15
2.3 ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	15
2.3.1 Τύποι καρκίνων.....	16
2.3.2 Γονίδια καρκίνου.....	17
2.3.3 Πώς εξαπλώνεται ο καρκίνος;.....	17
2.3.4 Ιστολογικές αλλαγές που δεν είναι καρκινικές	17
2.4 STAT5	18
2.4.1 Δομή STAT5	19
2.4.2 Ενεργοποίηση του STAT5 – Μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT	20
2.4.3 STAT5 στον καρκίνο.....	22
I. Καρκίνος του μαστού.....	23
II. Καρκίνος του ήπατος ή Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ)	26
III. Καρκίνος του πνεύμονα	29
2.5 LSD1	31
2.5.1 Δράση της LSD1	31
2.5.3 Δομή της LSD1	32
2.5.4 LSD1 στον καρκίνο	33
I. Καρκίνος του μαστού.....	33
II. Καρκίνος του ήπατος ή Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ)	34
III. Καρκίνος του πνεύμονα	35
2.6 STAT5 ΚΑΙ LSD1	37
2.7 ΣΚΟΠΟΣ	38
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	39
3.1 ΥΛΙΚΑ.....	39
3.1.1 Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν	40
3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα και μάρτυρες μοριακών μεγεθών	40
3.1.3 Πήκτωμα αγαρόζης 1.2%.....	42
3.1.4 Τρυβλία με LB χαμηλής αλατότητας και άγαρ.....	42
3.1.5 Αντιδραστήρια minipreps	43
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	44
3.2.1 Αντιδράσεις των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (digestions) και ηλεκτροφόρηση	44
3.2.2 Αποφωσφορυλίωση φορέα pBud-neo	45
3.2.3 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	45
3.2.4 Αντίδραση λιγάσης (Σύνδεση διαφορετικών τμημάτων DNA, φορέα και ενθέματος)	46
3.2.5 Μετασηματισμός (transformation) σε ηλεκτροδεκτικά (electrocompetent) βακτηριακά στελέχη	46
3.2.6 Εμβολιασμός τρυβλίων και Υγρές βακτηριακές καλλιέργειες	47
3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής ποσότητας (Mini-preps).....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4.1 ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΣΥΜΠΛΕΓΜΑΤΑ ΤΩΝ STAT5 ΚΑΙ LSD1 ΣΕ ΣΥΜΠΑΓΕΙΣ ΚΑΡΚΙΝΟΥΣ.....	50

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	52
4.2.1 Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες των πλασμιδίων.....	52
4.2.2 DNA μετά τον έλεγχο καθαρότητας (<i>purified DNA</i>).....	52
4.2.3 Έλεγχος του DNA μετά την αντίδραση λιγάσης (<i>ligated DNA</i>).....	53
4.2.4 Έλεγχος των <i>minipreps</i>	53
4.3 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ.....	54
4.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΩΝ MINIPREPS.....	55
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	57
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	58
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

HKK: ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα
ΟΑΛ: οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία
ΟΜΑ: οξεία μυελοειδής λευχαιμία
ΧΑΛ: χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία
ΧΜΑ: χρόνια μυελοειδής λευχαιμία
AR: androgen receptor, υποδοχέας ανδρογόνων
Bio-LSD1: biotinylated LSD1, βιοτινυλιωμένο LSD1
Bp: base pair, ζεύγη βάσεων
CC domain: coiled-coil domain, περιοχή σπειροειδούς έλικας
CCl₄: carbon tetrachloride, τετραχλωράνθρακας
ChIP-seq: ChIP sequencing, αλληλούχιση ChIP
CIAP: calf intestinal alkaline phosphatase, αλκαλική φωσφατάση
COX-2: cyclooxygenase-2, κυκλοοξυγενάση 2
DBD: DNA-binding domain, περιοχή πρόσδεσης στο DNA
EGF: epidermal growth factor, επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
EGFR: epidermal growth factor receptor, υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα
EMT: epithelial to mesenchymal transition, μεσεγχυματική μετάβαση
EPO: erythropoietin, ερυθροποιητίνη
ER: estrogen receptor, υποδοχέας οιστρογόνων
EtBr: ethidium bromide, βρωμιούχο αιθίδιο
EtOH: ethanol, αιθανόλη
FAD: Flavin Adenine Dinucleotide, διουκλεοτίδιο φλαβίνης – αδενίνης
FGFR2: Fibroblast growth factor receptor 2, υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 2
GAS: gamma-interferon-activated sequence, ενεργοποιημένη αλληλουχία ιντερφερόνης-γ
GH: growth hormone, αυξητική ορμόνη
GHR: growth hormone receptor, υποδοχέας αυξητικής ορμόνης
HL: helical linker, ελικοειδής συνδέτης
IGF-1: insulin-like growth factor 1, ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας 1

ILs: interleukins, ιντερλευκίνες
ITGAV: Integrin Subunit Alpha V, ιντεγκρίνη α V
JAKs: Janus Kinases, κινάσες Janus
lncRNA: long non-coding RNA, μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs
LSD1: Lysine-Specific Demethylase 1, απομεθυλάση ειδική στη λυσίνη 1
MEF: mouse embryonic fibroblasts, εμβρυικοί ινοβλάστες ποντικού
MGF: Mammary Gland Factory, παράγοντας μαστικού αδένου
MPA: medroxyprogesterone acetate, οξική μεδροξυπρογεστερόνη
mRNA: messenger RNA, αγγελιοφόρο RNA
mTOR: mammalian target of rapamycin, στόχος της ραπαμυκίνης των θηλαστικών
ND: N-terminal domain, αμινοτελικό άκρο
NSCLC: non-small cell lung cancer, μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα
PRL: prolactin, προλακτίνη
p-STAT5: phosphorylated STAT5, φωσφορυλιωμένο STAT5
ROS: reactive oxygen species, αντιδραστικά είδη οξυγόνου
RNA-seq: RNA sequencing, αλληλούχιση RNA
rRNA: ribosomal RNA, ριβοσωμικό RNA
SH2: Src homology 2, Src ομολογία 2
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription, μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής
TAD: transactivation domain, περιοχή trans-ενεργοποίησης
TGF α : transforming growth factor alpha, αυξητικός παράγοντας άλφα
TGF β : transforming growth factor beta, αυξητικός παράγοντας βήτα
TNBC: triple-negative breast cancer, τριπλά αρνητικός καρκίνος του μαστού
TPO: thrombopoietin, θρομβοποιητίνη
tRNA: transfer RNA, μεταφορικό RNA
UV: ultraviolet, υπεριώδης ακτινοβολία

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – ABSTRACT

Η διαδικασία της μεταγραφής αποτελεί το πρώτο και κυριότερο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης, η οποία έχει ως τελικό σκοπό την παραγωγή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Οι παράγοντες STAT5 και LSD1 διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομαλή λειτουργία και ανάπτυξη των κυττάρων και έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Οι δύο υψηλά ομόλογες ισομορφές του παράγοντα STAT5, STAT5a και STAT5b, συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Παράλληλα, η πρωτεΐνη LSD1 συμμετέχει σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένων του διαχωρισμού χρωμοσωμάτων και της εμβρυικής ανάπτυξης, και επιπλέον, μπορεί να δράσει είτε ενεργοποιώντας είτε καταστέλλοντας τη μεταγραφική δραστηριότητα. Επιπρόσθετα, η LSD1 ταυτοποιήθηκε ως αλληλεπιδρών παράγοντας του STAT5 σε προ-B κύτταρα και μπορεί να αλληλεπιδράσει με το STAT5 είτε ενεργοποιώντας την μεταγραφική του δραστηριότητα είτε καταστέλλοντάς την. Οι παράγοντες STAT5 και LSD1 έχουν σημαντική δράση στην εξέλιξη του καρκινικού μετασχηματισμού σε πολλούς τύπους κακοηθειών εξαιτίας της παθολογικής ρύθμισής τους και μπορούν να λειτουργήσουν είτε ως ογκογονίδια είτε ως ογκοκαταστολείς κάτω υπό διαφορετικές. Στην συγκεκριμένη εργασία, αρχικά, μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης, καταγράφηκαν γονίδια στόχοι και πρωτεϊνικά συμπλέγματα των δύο παραγόντων, STAT5 και LSD1, σε τρεις συμπαγείς καρκίνους, του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα. Τέλος, κλωνοποιήθηκε το cDNA του παράγοντα LSD1 στον πλασμιδιακό φορέα pBud-neo για την μελλοντική έκφρασή του σε κύτταρα θηλαστικών για απομόνωση πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα αντιδράσεων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, σύνδεσης διαφορετικών τμημάτων DNA (του φορέα και του ενθέματος), μετασχηματισμού σε ηλεκτροδεκτικά βακτηριακά κύτταρα (DH5a) και απομόνωσης πλασμιδιακού DNA μικρής ποσότητας.

The process of transcription is the first step of gene expression whose ultimate goal is to produce a functional protein. The factors STAT5 and LSD1 play a crucial role in the proper cellular function and development and they regulate transcription. The two highly homologous isoforms of STAT5, STAT5a and STAT5b, are involved in cell proliferation, differentiation and apoptosis. LSD1 is involved in important biological processes, including chromosome segregation and embryonic development. Additionally, LSD1 can act either by activation or by suppression of the transcriptional activity. Furthermore, LSD1 has been identified as an interacting partner of STAT5 in pro-B cells and when it interacts with

STAT5, LSD1 can either activate or suppress its transcriptional activity. Both genes play a significant role in tumor progression in several tumor types, due to their abnormal regulation. They can act either as oncogenes or as tumor suppressors under different circumstances, depending on the type of tumor. In this study, various target genes and protein complexes of the above two factors, STAT5 and LSD1, were identified in the literature, in three solid cancers, breast, liver and lung cancer. Furthermore, the cDNA of *LSD1* was cloned into the plasmid vector pBud-neo for prospective expression in mammalian cells to isolate protein complexes. Experiments, including enzymatic nucleic acid digestions with restriction endonucleases, ligation of different DNA fragments (vector and insert), transformation into electrocompetent bacterial cells (DH5a) and isolation of small amount of plasmid DNA, were performed.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Χρωματίνη και Ιστόνες

Το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών κυττάρων εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα τους και οργανώνεται σε χρωμοσώματα. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο, υπάρχουν συνολικά 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων, 22 αυτοσωμικά και ένα φυλετικό (X και Y χρωμοσώματα), τα οποία αντιστοιχούν σε 46 χρωμοσώματα ανά κύτταρο. Το DNA ενός ευκαρυωτικού χρωμοσώματος βρίσκεται συμπυκνωμένο σε χρωματίνη δημιουργώντας ένα σύμπλοκο με πρωτεΐνες. Οι δύο βασικές ομάδες πρωτεϊνών που συνδέονται με το DNA είναι οι ιστόνες και οι μη ιστόνες. Οι ιστόνες αποτελούν μικρές, βασικές πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πλούσιες σε λυσίνη και αργινίνη. Ως μη ιστόνες αποκαλούνται όλες οι πρωτεΐνες που βρίσκονται συνδεδεμένες στην χρωματίνη εκτός των ιστονών και βρίσκονται σε μικρότερη αναλογία.

Το νουκλεόσωμα αποτελεί την βασική υπομονάδα του χρωμοσώματος στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η συμπύκνωση του ευκαρυωτικού γονιδιώματος ξεκινά με το περιτύλιγμα του DNA γύρω από τις ιστόνες για να σχηματίσουν τα νουκλεοσώματα. Γενικά, DNA μήκους περίπου 200 bp είναι τυλιγμένο γύρω από έναν πυρήνα νουκλεοσωμάτων που αποτελείται από ένα οκταμερές από δύο αντίγραφα καθεμίας από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4. Οι πυρηνικές ιστόνες οργανώνονται σε δύο υποσύμπλοκα ως εξής: οι H3 και H4 σχηματίζουν ένα σταθερό τετραμερές, ενώ οι H2A και H2B σχηματίζουν δύο διμερή. Επιπρόσθετες περιοχές των ιστονών, οι ουρές των ιστονών, προβάλλουν στην επιφάνεια και υπόκεινται σε περισσότερες αλλαγές, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση ή ουμπικουϊτίνωση. Οι πιο συχνόι στόχοι για αλλαγή είναι οι λυσίνες στις ουρές των ιστονών. Παρακάτω θα αναλυθούν αυτές οι τροποποιήσεις.

Ακετυλίωση, μεθυλίωση και ουμπικουϊτίνωση πραγματοποιούνται στην ελεύθερη έψιλον (ε) αμινομάδα της λυσίνης. Η ακετυλίωση εξουδετερώνει το θετικό φορτίο που υπάρχει υπό μορφή του NH₃ της ε-αμινομάδας. Αντίθετα, η μεθυλίωση της λυσίνης διατηρεί το θετικό φορτίο και η λυσίνη μπορεί να μονο-, δι- ή τριμεθυλωθεί. Η ουμπικουϊτίνωση αναφέρεται στην ομοιοπολική προσκόλληση ενός ή περισσότερων μονομερών ουμπικουϊτίνης στην ε-αμινομάδα της λυσίνης. Τέλος, φωσφορυλίωση συμβαίνει στην υδροξυλομάδα της σερίνης και της θρεονίνης με αποτέλεσμα να εισάγεται αρνητικό φορτίο υπό μορφή φωσφορικής ομάδας. Ακετυλίωση, μεθυλίωση και φωσφορυλίωση μπορεί να είναι παροδικές αλλαγές και έχουν την δυνατότητα να αλλάξουν

το φορτίο της πρωτεΐνης και συνεπώς, τις λειτουργικές ιδιότητες των οκταμερών, ενώ η ουμπικουΐτινωση είναι πιο δραστική αλλαγή.

Πολλά ένζυμα τροποποίησης έχουν ειδικές θέσεις-στόχους σε συγκεκριμένες ιστόνες, οι οποίες καθορίζουν τις διαφορετικές λειτουργικές καταστάσεις της χρωματίνης και ρυθμίζουν τη μεταγραφή, την αντιγραφή, την επιδιόρθωση και την συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Για παράδειγμα, η λυσίνη 9 της ιστόνης H3 (H3K9) είτε μεθυλιώνεται είτε ακετυλιώνεται, ενώ η H3K9 και η λυσίνη 4 της ιστόνης H3 (H3K4) ενεργοποιούν την μεταγραφή.

Υπάρχουν τρία κύρια επίπεδα οργάνωσης της χρωματίνης: τα νουκλεοσώματα που αποτελούν τις κύριες δομικές μονάδες της χρωματίνης, τα ινίδια χρωματίνης, τα οποία αποτελούνται από συστοιχίες νουκλεοσωμάτων επιτυγχάνοντας μεγαλύτερα επίπεδα συμπύκνωσης, και τέλος, τα υψηλά συμπυκνωμένα μεταφασικά χρωμοσώματα. Όσο πιο συσπειρωμένη είναι μια χρωμοσωμική περιοχή, τόσο μεγαλύτερη η πιθανότητα τα γονίδια που βρίσκονται στην περιοχή αυτή να είναι αδρανή. Οι περιοχές του γονιδιώματος που είναι εξαιρετικά συμπυκνωμένες ονομάζονται ετεροχρωματίνη και δεν είναι προσιτές από τα μεταγραφικά σύμπλοκα, εμποδίζοντας κατ' αυτό τον τρόπο την έκφραση των γονιδίων. Αντιθέτως, οι περιοχές όπου η χρωματίνη είναι λιγότερο συμπυκνωμένη αποτελούν την ευχρωματίνη. Αυτές οι δύο καταστάσεις αντιπροσωπεύουν την συμπύκνωση του γενετικού υλικού σε διαφορετικούς βαθμούς.

Για την απόκτηση πρόσβασης στο DNA από τους μεταγραφικούς παράγοντες και τον μεταγραφικό μηχανισμό με τις RNA πολυμεράσες, χρειάζεται η χρωματίνη να ξετυλιχθεί από τον πυρήνα ιστονών (open chromatin). Η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (chromatin remodeling) περιλαμβάνει μηχανισμούς κατά τους οποίους απελευθερώνονται τα οκταμερή ιστονών. Ως αποτέλεσμα, ο μεταγραφικός εξοπλισμός μπορεί να αποκτήσει πρόσβαση στον υποκινητή και να εγκαθιδρυθεί ένα σταθερό σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής.

2.2 Μεταγραφή

Η διαδικασία της μεταγραφής αποτελεί το πρώτο στάδιο της γονιδιακής έκφρασης και το κυριότερο του ελέγχου της με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μονόκλωνου πρωτογενούς μεταγράφου RNA προερχόμενο από το δίκλωνο DNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Παρουσιάζει, δηλαδή, ένα σημαντικό πρώτο βήμα στην γονιδιακή έκφραση, το οποίο οδηγεί

στην παραγωγή μιας λειτουργικής πρωτεΐνης. Σε μερικές περιπτώσεις, το RNA αποτελεί το τελικό προϊόν, το οποίο εξυπηρετεί σημαντικές κυτταρικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, το μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA) μεταφέρει τα αμινοξέα, τα οποία πρόκειται να ενσωματωθούν στα πολυπεπίδια κατά της διάρκειας της μετάφρασης, ενώ το ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA) συγκροτεί τα ριβοσώματα σε συνεργασία με τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες.

2.2.1 Ενεργοποίηση και επιμήκυνση

Σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η έναρξη της μεταγραφής απαιτεί το ένζυμο RNA πολυμεράση II, το οποίο προσδένεται στον υποκινητή (promoter), μια αλληλουχία στην μη-κωδική αλυσίδα του DNA. Για να προσδεθεί το ένζυμο στον υποκινητή, η χρωματίνη πρέπει να αποκτήσει ανοιχτή διαμόρφωση και τα οκταμερή των νουκλεοσωμάτων να έχουν απομακρυνθεί. Η RNA πολυμεράση II προωθεί την παραγωγή ενός πρόδρομου mRNA (pre-mRNA) για τις πρωτεΐνες, το οποίο μετά από ειδική επεξεργασία (ωρίμανση) του πρωτογενούς μεταγράφου, δημιουργείται ένα τελικό, ώριμο και λειτουργικό αγγελιοφόρο RNA (messenger RNA, mRNA). Άλλες αλληλουχίες DNA, γνωστές ως αλληλουχίες ενισχυτή (enhancer), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην μεταγραφή παρέχοντας σημεία πρόσδεσης για ρυθμιστικές πρωτεΐνες που επηρεάζουν την δραστηριότητα της RNA πολυμεράσης II. Η πρόσδεση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών σε έναν ενισχυτή προκαλεί αλλαγή στην δομή της χρωματίνης κάτι το οποίο προωθεί ή αναστέλλει την πολυμεράση και την πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων. Οι βασικοί μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι έχουν δημιουργήσει μια δομή στον υποκινητή, σχηματίζουν σύμπλοκο με την RNA πολυμεράση II στην θέση έναρξης.

Η έναρξη ακολουθείται από την επιμήκυνση (elongation), αφού έχουν απελευθερωθεί η RNA πολυμεράση II και οι μεταγραφικοί παράγοντες από τον υποκινητή. Η RNA πολυμεράση II κινείται κατά μήκος του DNA αποδιατάσσοντας την έλικα και συνθέτει την αλυσίδα του RNA. Στο τέλος, η μητρική αλυσίδα του DNA ζευγαρώνει με την αρχική συμπληρωματική της αλυσίδα, ενώ το mRNA απελευθερώνεται ως μονόκλωνη αλυσίδα. Όταν απελευθερωθεί το λειτουργικό mRNA από τον πυρήνα, μπορεί να μεταφραστεί στο κυτταρόπλασμα και ειδικότερα, μόλις συναντήσει κάποιο ριβόσωμα.

2.2.2 Μεταγραφικοί παράγοντες

Η ρύθμιση της μεταγραφής μπορεί να χαρακτηριστεί είτε αρνητική είτε θετική. Στην αρνητική ρύθμιση, μια κατασταλτική πρωτεΐνη δεσμεύεται σε έναν χειριστή (operator) και εμποδίζει την έκφραση του γονιδίου αναστέλλοντας την έναρξη της μεταγραφής. Αντίθετα, στον θετικό έλεγχο, μία ειδική πρωτεΐνη πρέπει να προσδεθεί στον υποκινητή για να καταστήσει δυνατή την έναρξη της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II.

Τόσο η μεταγραφή όσο και η ρύθμιση αυτής εξαρτώνται από συγκεκριμένες πρωτεΐνες, οι οποίες δεν αποτελούν οι ίδιες συστατικά της RNA πολυμεράσης, γνωστές ως μεταγραφικοί παράγοντες. Οι μεταγραφικοί παράγοντες προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες DNA, στις ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων, δημιουργώντας το σύμπλοκο έναρξης σε όλους τους υποκινητές της RNA πολυμεράσης II, και ελέγχουν την μεταγραφή. Χάρη στην στερεοδιαμόρφωσή τους, οι μεταγραφικοί παράγοντες δρουν είτε αναγνωρίζοντας αλληλουχίες στο DNA, την RNA πολυμεράση ή έναν άλλο παράγοντα, είτε δεσμευόμενες σε άλλες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στις διαδικασίες έναρξης της μεταγραφής.

Οι μεταγραφικοί παράγοντες ελέγχουν πολλά σημαντικά στάδια της κυτταρικής ανάπτυξης. Ως εκ τούτου, οργανισμοί με διαγραφή ενός γονιδίου των μεταγραφικών παραγόντων παρουσιάζουν σημαντικές ανωμαλίες στην οργάνωση και την ανάπτυξη.

2.3 Καρκίνος

Ο καρκίνος είναι μια γενετική πάθηση, η οποία προκαλείται από αλλαγές στα γονίδια που ελέγχουν τον τρόπο κατά τον οποίο τα κύτταρά μας λειτουργούν, ειδικά πώς αναπτύσσονται και διαιρούνται. Γενετικές αλλαγές μπορούν είτε να κληρονομηθούν είτε να προκύψουν από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τα χημικά, την υπεριώδη ακτινοβολία (ultraviolet, UV) ή το κάπνισμα.

Φυσιολογικά τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται για να δημιουργηθούν νέα κύτταρα, όταν ο οργανισμός τα χρειάζεται. Όταν τα κύτταρα ολοκληρώσουν την καθορισμένη διάρκεια ζωής τους ή τραυματιστούν, πεθαίνουν και νέα κύτταρα λαμβάνουν την θέση τους. Η διαδικασία αλλάζει στην περίπτωση του καρκίνου που αποτελεί την εξαίρεση. Σε όλους τους τύπους καρκίνου, μερικά κύτταρα ξεκινούν να διαιρούνται συνεχώς

και ανεξέλεγκτα με πιθανότητα εξάπλωσης στους γειτονικούς ιστούς. Τα κύτταρα αυτά μπορεί να σχηματίσουν έναν όγκο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε καρκινικός είτε καλοήθης. Ένας καρκινικός όγκος είναι κακοήθης, το οποίο σημαίνει ότι μπορεί να αναπτυχθεί και να εξαπλωθεί, σε αντίθεση με τον καλοήθη που αναπτύσσεται, αλλά δεν εξαπλώνεται.

2.3.1 Τύποι καρκίνων

Οι τύποι καρκίνου συνήθως λαμβάνουν την ονομασία τους από το όργανο ή τον ιστό από τον οποίο προέρχονται, ακόμα κι αν εξαπλωθούν σε άλλα μέρη του σώματος. Για παράδειγμα, ο καρκίνος, ο οποίος ξεκινάει στα κύτταρα των πνευμόνων και εξαπλώνεται στο ήπαρ, ονομάζεται καρκίνος του πνεύμονα. Υπάρχουν, επίσης, κάποιοι κλινικοί όροι που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν γενικούς τύπους καρκίνου.

Καρκίνωμα. Τα καρκινώματα είναι ο πιο συχνός τύπος καρκίνου. Σχηματίζονται από επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν το δέρμα και την επιφάνεια των εσωτερικών οργάνων και αδένων. Τα καρκινώματα συνήθως σχηματίζουν συμπαγείς όγκους, όπως καρκίνος του προστάτη, καρκίνος του μαστού και καρκίνος του παχέος εντέρου.

Σάρκωμα. Τα σαρκώματα είναι οι καρκίνοι που συναντώνται στα οστά και στους μαλακούς ιστούς. Μπορεί να αναπτυχθεί σε λίπος, μυς, νεύρα, τένοντες, αιμοφόρα αγγεία, λεμφικά αγγεία και χόνδρους.

Λευχαιμία. Οι καρκίνοι που σχετίζονται με το αιμοποιητικό σύστημα ονομάζονται λευχαιμίες, οι οποίοι δεν σχηματίζουν συμπαγείς καρκίνους. Αντιθέτως, μεγάλος αριθμός μη φυσιολογικών λευκών αιμοσφαιρίων συσσωρεύονται στο μυελό των οστών και το αίμα με συνέπεια τον υποσκελισμό των φυσιολογικών κυττάρων του αίματος. Ο χαμηλός αριθμός των φυσιολογικών αιμοσφαιρίων έχει ως αποτέλεσμα την δυσκολία του οργανισμού να οξυγονώσει τους ιστούς του, να ελέγξει μια αιμορραγία ή να καταπολεμήσει τυχόν λοιμώξεις. Οι τέσσερις τύποι λευχαιμίας είναι οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΟΛΛ), χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (ΧΛΛ), οξεία μυελοειδής λευχαιμία (ΟΜΛ) και χρόνια μυελοειδής λευχαιμία (ΧΜΛ)

Λέμφωμα. Το λέμφωμα ονομάζεται ο καρκίνος που ξεκινάει από τα λεμφοκύτταρα (T- ή B-κύτταρα). Μη φυσιολογικά λεμφοκύτταρα συσσωρεύονται στους λεμφικούς αδένες ή στα λεμφικά αγγεία, καθώς και σε άλλα όργανα, και «πολεμούν» τα λευκά αιμοσφαίρια, τα οποία ανήκουν στο ανοσοποιητικό σύστημα. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι λεμφώματος, το λέμφωμα Hodgkin και το λέμφωμα Non-Hodgkin.

2.3.2 Γονίδια καρκίνου

Διακρίνονται τρεις κατηγορίες μεταλλαγμένων γονιδίων που εμπλέκονται στην εμφάνιση του καρκίνου: τα *ογκογονίδια*, τα *ογκοκατασταλτικά γονίδια* και τα *γονίδια-μεταλλάκτες*. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα πρωτο-ογκογονίδια διεγείρουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, σε αντίθεση με τα ογκοκατασταλτικά που τον παρεμποδίζουν και τέλος, τα γονίδια-μεταλλάκτες συμμετέχουν σε σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου, όπως η αντιγραφή και η επιδιόρθωση του DNA.

Οι μεταλλαγμένες μορφές των πρωτο-ογκογονιδίων, τα ογκογονίδια (*oncogenes*), δρουν επάγοντας τον ανεξέλεγκτο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και βρίσκονται σε καρκινικά κύτταρα, όπου είτε είναι πιο ενεργά από τα φυσιολογικά είτε ενεργοποιούνται σε ακατάλληλες χρονικές στιγμές. Επιπλέον, όταν και τα δύο αλληλόμορφα ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου αδρανοποιηθούν, χάνουν την κατασταλτική τους ικανότητα και μπορεί να ξεκινήσει μη προγραμματισμένος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Τέλος, οι μεταλλαγές σε γονίδια-μεταλλάκτες υπονομεύουν τις φυσιολογικές διαδικασίες και αυξάνεται η συχνότητα αυθόρμητων μεταλλαγών των άλλων γονιδίων προκαλώντας προβληματική την διατήρηση της ακεραιότητας του γονιδιώματος του κυττάρου.

2.3.3 Πώς εξαπλώνεται ο καρκίνος;

Στην μετάσταση, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να διαφύγουν από τον αρχικό όγκο και να εισβάλουν μέσω του λεμφικού συστήματος ή του αίματος σε γειτονικούς ιστούς στο σώμα, όπου εξέρχονται από τα αγγεία και σχηματίζουν νέους επιπλέον όγκους. Ο μεταστατικός καρκίνος αποτελείται από τον ίδιο τύπο κυττάρων με τον αρχικό. Για παράδειγμα, ο καρκίνος του μαστού, ο οποίος εξαπλώνεται και σχηματίζει μεταστατικό όγκο στον πνεύμονα, ονομάζεται μεταστατικός καρκίνος του μαστού και όχι καρκίνος του πνεύμονα.

2.3.4 Ιστολογικές αλλαγές που δεν είναι καρκινικές

Δεν αποτελεί κάθε ιστολογική αλλαγή του οργανισμού καρκίνο. Η υπερπλασία και η δυσπλασία είναι παραδείγματα αλλαγών, οι οποίες δεν είναι καρκίνοι, αλλά πρέπει να παρακολουθούνται.

Η *υπερπλασία* προκύπτει όταν τα κύτταρα ενός ιστού διαιρούνται πιο γρήγορα από τα φυσιολογικά και επιπλέον κύτταρα συσσωρεύονται ή πολλαπλασιάζονται. Ωστόσο, τα

κύτταρα και κατ' επέκταση, ο ιστός φαίνονται φυσιολογικά στο μικροσκόπιο. Η υπερπλασία μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες ή καταστάσεις, όπως ορμονικές δυσλειτουργίες.

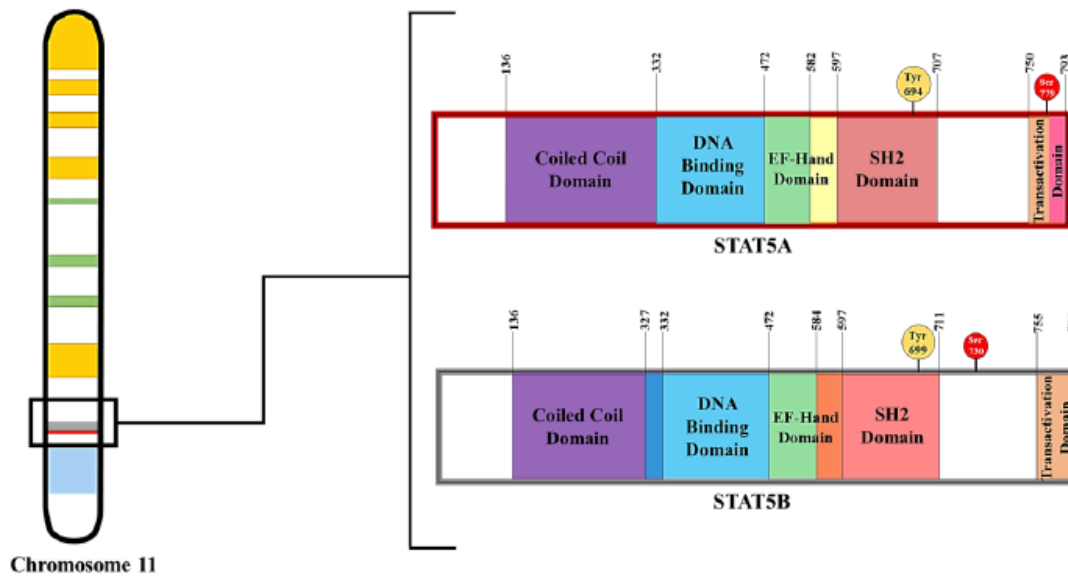
Η *δυσπλασία* είναι πιο σοβαρή κατάσταση από την υπερπλασία. Παρομοίως με την υπερπλασία, παρατηρείται συσσώρευση κυττάρων, αλλά στην δυσπλασία, τα κύτταρα δεν φαίνονται φυσιολογικά και υπάρχουν αλλαγές στην ιστολογική οργάνωση. Μερικοί τύποι δυσπλασίας υπόκεινται σε θεραπεία, παραδείγματος χάρη ένας δυσπλαστικό σπίλος, ο οποίος σχηματίζεται στο δέρμα και μπορεί να εξελιχθεί σε μελάνωμα.

2.4 STAT5

Το STAT5 ανακαλύφθηκε ως μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ρυθμίζει την γονιδιακή έκφραση μιας πρωτεΐνης του γάλακτος, της β-καζεΐνης, και την ανάπτυξη του μαστικού αδένου ως απόκριση στην προλακτίνη (Wakao et al., 1994). Η αρχική του ονομασία ήταν παράγοντας μαστικού αδένου (Mammary Gland Factor, MGF). Η ομολογία της αλληλουχίας και η ενεργοποίησή τους από την φωσφορυλίωση της τυροσίνης έδειξαν μια σχέση με την οικογένεια STAT και τελικά, οδήγησαν στην ανακάλυψη των δύο υψηλά ομόλογων ισομορφών, των STAT5a και STAT5b.

Οι μεταγωγείς σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (Signal Transducers and Activators of Transcription, STATs) αποτελούν μια οικογένεια πρωτεϊνών, η οποία απαρτίζεται από επτά μέλη, συγκεκριμένα τα STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b και STAT6. Λειτουργούν ως μεταγραφικοί παράγοντες, οι οποίοι ενεργοποιούνται κατά την φωσφορυλίωση από τις κινάσες Janus (Janus Kinases, JAKs) ως απόκριση της σηματοδότησης των κυτοκινών. Από τα επτά STATs, το STAT5a και το STAT5b έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο σε ποικίλες κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβάνοντας τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση των κυττάρων. Έχει παρατηρηθεί, ωστόσο, η παθολογική ρύθμιση του STAT5 σε συμπαγείς όγκους, όπως και σε ασθενείς με οξεία είτε χρόνια μυελογενής λευχαιμία.

2.4.1 Δομή STAT5



Εικόνα 1: Δομή του STAT5. Τα γονίδια του STAT5a και STAT5b στο χρωμόσωμα 11 και οι επιμέρους περιοχές.

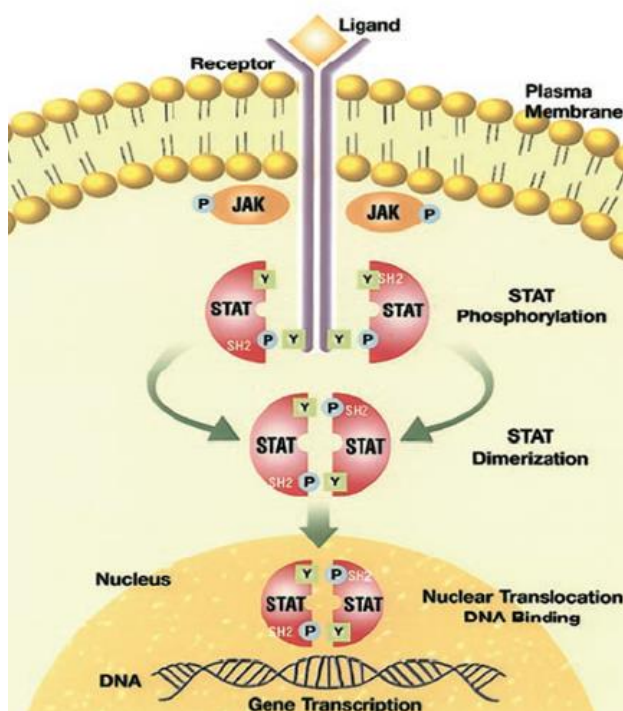
Όλα τα μέλη της οικογένειας STAT παρουσιάζουν την ίδια πρωτεϊνική δομή που αποτελείται από διάφορες περιοχές. Ένα ελικοειδές αμινοτελικό άκρο (helical N-terminal domain, ND) ακολουθείται από μια περιοχή σπειροειδούς έλικας (coiled-coin, CC, domain), μια περιοχή πρόσδεσης στο DNA (DNA-binding domain, DBD), έναν ελικοειδή συνδέτη (helical linker, HL), μία περιοχή SH2 (Src homology 2), μία περιοχή τυροσίνης και μία περιοχή trans-ενεργοποίησης (transactivation domain, TAD). Στην οικογένεια των STATs, η TAD αποτελεί την πιο αποκλίνουσα περιοχή.

Αναλυτικότερα, η περιοχή DBD, η οποία βρίσκεται στο κέντρο της πρωτεΐνης μαζί με την περιοχή HL, καθορίζει την ειδικότητα σύνδεσης του DNA μεταξύ των STATs. Μόνο τα διμερή STAT είναι ικανά να προσδέσουν DNA. Η περιοχή SH2 αναγνωρίζει φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης και ως εκ τούτου, μεσολαβεί των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνών STATs και συγκεκριμένων φωσφορυλιωμένων πρωτεϊνών, όπως υποδοχέων του αυξητικού παράγοντα ή μελών της οικογένειας JAK (JAK1, JAK2, JAK3 και Tyk2). Στο άκρο N-terminal, συγκεκριμένες αλληλουχίες μεσολαβούν στον ολιγομερισμό του STAT5 και η περιοχή CC εμπλέκεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Επιπλέον, βασικές περιοχές τυροσίνης (Tyr694 για STAT5a και Tyr699 για STAT5b) αντιπροσωπεύουν θέσεις φωσφορυλίωσης από ενεργοποιημένες κινάσες. Η φωσφορυλίωση σε αυτές τις θέσεις έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση άλλων STAT πρωτεϊνών από την περιοχή SH2 και οδηγεί στο διμερισμό του STAT και μετέπειτα, στην μετακίνησή του στον πυρήνα. Τέλος, οι περιοχές C-terminal, γνωστές και ως TAD, είναι

σημαντικές για την μεταγραφή των γονιδίων στόχων και περιέχουν κατάλοιπα τυροσίνης (Y) και σερίνης (S), τα οποία φωσφορυλιώνονται από ανοδικούς ενεργοποιητές.

Υπάρχουν δύο υψηλά ομόλογες πρωτεΐνες STAT5, οι STAT5a και STAT5b, οι οποίες μοιράζονται τουλάχιστον 90% δομική ομολογία, αλλά μεταγράφονται από ξεχωριστά γονίδια. Εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 17 στον άνθρωπο και στο χρωμόσωμα 11 στον ποντικό. Παρά τη μεγάλη ομοιότητά τους, λειτουργικές διαφορές υπάρχουν μεταξύ των STAT5a και STAT5b, συμπεριλαμβανομένων των διαφορών στις συγγένειες σύνδεσης του DNA. Το STAT5a αποτελείται από 793 αμινοξέα, ενώ το STAT5b αποτελείται από 786 αμινοξέα στους μύες και έχουν μοριακά βάρη 94 και 92 kDa, αντίστοιχα. Η πιο σημαντική διαφορά των δύο STAT5 είναι τα 20 αμινοξέα στην περιοχή trans-ενεργοποίησης. Τόσο το STAT5a όσο και το STAT5b ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση στα Tyr694 και Tyr699, αντίστοιχα, από το JAK2, το οποίο ενεργοποιείται με τη δέσμευση πολλών κυτοκινών και ορμονών, όπως της αυξητικής ορμόνης (growth hormone, GH), της ερυθροποιητίνης (erythropoietin, EPO), της προλακτίνης (prolactin, PRL) και αρκετών ιντερλευκινών (interleukins, ILs) στους υποδοχείς τους. Έχει αποδειχτεί πως το STAT5a εκφράζεται κυρίως στον μαστικό αδένα ρυθμίζοντας την γαλουχία μέσω της PRL, ενώ η έκφραση του STAT5b είναι μεγαλύτερη στα ηπατοκύτταρα, όπου ελέγχει την έκφραση των γονιδίων της GH.

2.4.2 Ενεργοποίηση του STAT5 – Μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT



Εικόνα 2: Μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT. Μόλις προσδεθεί ο συνδέτης στον υποδοχέα, ο υποδοχέας διμερίζεται επιτρέποντας στα JAKs να φωσφορυλιωθούν και έπειτα, στον υποδοχέα. Τα φωσφορυλιωμένα διμερή STATs εισέρχονται στον πυρήνα και προσκολλούνται στις περιοχές GAS, ώστε να ρυθμίσουν την μεταγραφή.

Το STAT5 μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω ποικίλων ομάδων κυτοκινών, αυξητικών παραγόντων και ορμονών. Το μονοπάτι JAK/STAT είναι ο κύριος μηχανισμός μετάδοσης ενός πλήθους σημάτων για την κυτταρική ανάπτυξη μέσω κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Η ενεργοποίηση του JAK οδηγεί στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση. Αυτές οι κυτταρικές διεργασίες είναι απαραίτητες για την αιμοποίηση, την ανοσοποίηση, την ανάπτυξη του μαστικού αδένου και της γαλουχίας, της λιπογένεσης, της ανάπτυξης της σεξουαλικής διμορφίας και άλλων διαδικασιών.

Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση ενός συνδέτη, όπως η ιντερλευκίνη (IL-2, -3, -5, -7, -9, και -15), η ερυθροποιητίνη ή η θρομβοποιητίνη (thrombopoietin, TPO), με τον συγγενή διαμεμβρανικό υποδοχέα του προκαλεί διμερισμό ή ολιγομερισμό του υποδοχέα με άμεσο αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των μελών της οικογένειας JAK που σχετίζονται με τον υποδοχέα μέσω διασταυρωμένης φωσφορυλίωσης (cross-phosphorylation). Παράλληλα, ελεύθερα μονομερή STAT5, τα οποία βρίσκονται στο κυτοσόλιο μέχρι να ενεργοποιηθούν, κατευθύνονται προς τον υποδοχέα και φωσφορυλιώνονται στα κατάλοιπα τυροσίνης από τις JAKs. Το STAT5 αναγνωρίζει τους φωσφορυλιωμένους υποδοχείς μέσω της περιοχής SH2. Έπειτα, το STAT5 διμερίζεται, μετατοπίζεται στον πυρήνα και αποκτά την ικανότητα δέσμευσης στα στοιχεία ενεργοποιημένης αλληλουχίας ιντερφερόνης- γ [gamma-interferon-activated sequence (GAS) element], στρατολογώντας συμπαράγοντες, ώστε να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει και να ρυθμίσει την μεταγραφή των γονιδίων στόχων του. Με αυτό τον τρόπο, το μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT διαμεσολαβεί στη μεταγραφική απόκριση μεταφράζοντας ένα εξωκυτταρικό σήμα.

Επιπρόσθετα, το STAT5 μπορεί να ρυθμιστεί από κάποιους αναστολείς, οι οποίοι ανήκουν στις οικογένειες των πρωτεϊνών SOCS (suppressors of cytokine signaling), PIAS (protein inhibitors of activated STAT) και PTPs (protein tyrosine phosphatases) επηρεάζοντας το μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT5. Οι φωσφατάσες τυροσίνης αντιστρέφουν τη δραστηριότητα των JAK. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη αυτών είναι η SHP-1, η οποία περιέχει δύο περιοχές SH2 και μπορεί να συνδεθεί είτε σε φωσφορυλιωμένους JAK είτε σε φωσφορυλιωμένους υποδοχείς για να διευκολύνει την αποφωσφορυλίωση αυτών των ενεργοποιημένων μορίων σηματοδότησης. Άλλες φωσφατάσες τυροσίνης, όπως το CD45, φαίνεται να έχουν ρόλο στη ρύθμιση της σηματοδότησης JAK/STAT μέσω ενός υποσυνόλου υποδοχέων.

Οι πρωτεΐνες SOCS είναι μια οικογένεια τουλάχιστον οκτώ μελών, οι οποίες περιέχουν μια περιοχή SH2 και ένα πλαίσιο SOCS στο άκρο C-terminus. Επιπλέον, μια μικρή ανασταλτική περιοχή κινάσης που βρίσκεται στο άκρο N-terminal στην περιοχή SH2 έχει αναγνωριστεί για τις SOCS1 και SOCS3. Οι SOCS έχουν αρνητική επίδραση στο μονοπάτι JAK/STAT: τα ενεργοποιημένα STAT διεγείρουν τη μεταγραφή των γονιδίων SOCS και οι προκύπτουσες πρωτεΐνες SOCS δεσμεύουν τις φωσφορυλιωμένες JAK και τους υποδοχείς τους για να απενεργοποιήσουν το μονοπάτι. Οι SOCS μπορούν να επηρεάσουν την αρνητική ρύθμιση με τρεις τρόπους. Πρώτον, δεσμεύοντας φωσφοτυροσίνη στους υποδοχείς, οι SOCS εμποδίζουν τη στρατολόγηση μετατροπέων σήματος, όπως τα STATs, στον υποδοχέα. Δεύτερον, οι πρωτεΐνες SOCS μπορούν να συνδεθούν απευθείας με τις JAKs ή στους υποδοχείς για να αναστείλουν συγκεκριμένα την δράση της κινάσης JAK. Τρίτον, οι SOCS αλληλεπιδρούν με το σύμπλοκο elongin BC και το cullin 2, διευκολύνοντας την ουμπικουϊτίωση των JAKs και, πιθανώς, των υποδοχέων. Η ουμπικουϊτίωση αυτών των στόχων μειώνει τη σταθερότητά τους στοχεύοντας τους σε πρωτεοσωμική αποδόμηση.

Η τρίτη κατηγορία αρνητικών ρυθμιστών είναι οι πρωτεΐνες PIAS: PIAS1, PIAS3, PIASx και PIASy. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν μία περιοχή Zn-binding RING-finger στο κεντρικό τμήμα, μία καλά διατηρημένη περιοχή SAP (SAF-A/Acinus/PIAS) στο άκρο N-terminus και μία λιγότερο καλά συντηρημένη καρβοξυλική περιοχή. Οι τελευταίες περιοχές εμπλέκονται στη δέσμευση της πρωτεΐνης στόχου. Οι πρωτεΐνες PIAS συνδέονται με ενεργοποιημένα διμερή STATs και διακόπτουν τον διμερισμό των STAT5 με αποτέλεσμα την αδυναμία μετατόπισής τους στον πυρήνα ώστε να προσδεθούν στις θέσεις GAS. Ο μηχανισμός, με τον οποίο δρουν οι πρωτεΐνες PIAS, παραμένει ασαφής μέχρι στιγμής.

2.4.3 STAT5 στον καρκίνο

Το STAT5 εμφανίζεται να είναι διαρκώς ενεργοποιημένο σε πολλούς ανθρώπινους καρκίνους επηρεάζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση των κυττάρων και την μετάσταση τους. Η αυξημένη ρύθμιση της οδού σηματοδότησης του STAT5 ενισχύει την ανάπτυξη και την επιβίωση των όγκων λόγω της αναστολής της απόπτωσης, του αυξημένου κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και την αρρυθμία της ανοσολογικής απόκρισης. Οι πρωτεΐνες STAT που εμπλέκονται περισσότερο σε καρκίνους είναι οι STAT1, STAT3 και STAT5, εκ των οποίων ο ρόλος της STAT3 έχει μελετηθεί

περισσότερο στην ανάπτυξη των όγκων. Ωστόσο, το STAT5 φαίνεται πως διαδραματίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη του όγκου σε αρκετούς καρκίνους. Θα παρουσιαστεί παρακάτω ο ρόλος του STAT5 στον καρκίνο του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα, καθώς και γονίδια στόχοι και πρωτεϊνικά συμπλέγματα του STAT5 στους προαναφερθέντες συμπαγείς καρκίνους.

I. Καρκίνος του μαστού

Το STAT5 είναι σημαντικό για την φυσιολογική ανάπτυξη του μαστικού αδένου και για την γαλουχία κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης. Η δραστηριότητα του STAT5, συγκεκριμένα, είναι κρίσιμη για τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων, την κυψελιδική διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων. Το STAT5a, κυρίως, είναι υπεύθυνο για την διαμεσολάβηση της σηματοδότησης με την προλακτίνη και απαιτείται για την ανάπτυξη και τη λειτουργία του μαστικού αδένου. Σε ποντίκια μετά τον τοκετό, η ανεπάρκεια STAT5a είχε ως αποτέλεσμα την ατελή ωρίμανση του μαστικού αδένου, η οποία συνοδεύτηκε από μειωμένο αριθμό κυψελίδων και τη μη παραγωγή γάλακτος. Οι συνέπειες της ανεπάρκειας STAT5a θα μπορούσαν εν μέρει, αλλά όχι πλήρως, να αντισταθμιστούν από τη δραστηριότητα του STAT5b.

Το STAT5 εκφράζεται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του μαστού, με μια μικρή διέγερση κατά τα τελικά στάδια της κύησης και την έναρξη της γαλουχίας. Οι PRL, GH και επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF) μπορούν να ενεργοποιήσουν το STAT5 στον μαστικό αδένου, η PRL στο επιθήλιο, ενώ οι GH και EGF κυρίως στο στρώμα. Κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης, σημειώνεται μια σημαντική επαγωγή στην φωσφορυλίωση του STAT5, η οποία κορυφώνεται στο τέλος της εγκυμοσύνης και έπειτα, μειώνεται λόγω του εκφυλισμού.

Η περίοδος της γαλουχίας του μαστικού αδένου ακολουθείται από τον εκφυλισμό. Σε αυτή την φάση παρατηρείται μεγάλη απόπτωση και κατάρρευση των κυψελιδικών δομών. Η αποφωσφορυλίωση και η απενεργοποίηση των STAT5a και STAT5b και η φωσφορυλίωση του STAT3 εμφανίζονται στο πρώτο στάδιο του εκφυλισμού, στο οποίο περιλαμβάνεται προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος χωρίς φαινοτυπικές αλλαγές, εντός αρκετών ωρών μετά την αφαίρεση του νεογνού. (Liu et al., 1996). Σε πειράματα που έγιναν σε διαγονιδιακά ποντίκια (Humphreys and Hennighausen, 1999, Iavnilovitch et al., 2002, Iavnilovitch et al., 2006), παρατηρήθηκε ότι το STAT5 λειτουργεί ως παράγοντας

επιβίωσης κατά τον εκφυλισμό προστατεύοντας τον μαστικό αδένα από αποπτωτικά σήματα.

Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί περισσότερη προσοχή στον ρόλο του STAT5 στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, καθώς οι μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε άλλα μέλη της οικογένειας STATs, στα STAT3 και STAT1. Το STAT5 έχει ανιχνευθεί σε όλους τους τύπους καρκίνου του μαστού, στους υποδοχέα οιστρογόνων (estrogen receptor, ER) – θετικό, HER2–θετικό και τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (triple–negative breast cancer, TNBC). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι το STAT5 μπορεί να δράσει τόσο ως ογκοκαταστολέας όσο και ως ογκογονίδιο στον καρκίνο του μαστού υπό διαφορετικές συνθήκες.

Ο ρόλος του STAT5 στην ογκογένεση στους μαστούς μελετήθηκε αρχικά σε διαγονιδιακά ποντίκια που εκφράζουν την πρωτεΐνη του μετασχηματισμού του αυξητικού παράγοντα άλφα (transforming growth factor alpha, TGF α) στους μαστικούς αδένες τους (Humphreys and Hennighausen, 1999) εμφανίζοντας μαστική υπερπλασία και όγκους, οι οποίοι καθυστέρησαν με την απενεργοποίηση του γονιδίου STAT5a. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης TGF α , η οποία ενισχύει την ενεργοποίηση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR), προωθεί την ανάπτυξη υπερπλασίας και όγκων περίπου ένα και ενάμιση μήνα νωρίτερα σε ποντίκια που εκφράζουν το STAT5 σε σύγκριση με τα ποντίκια στα οποία έχουν απενεργοποιηθεί το γονίδιο STAT5a (knockout).

Το STAT5 μπορεί, επίσης, να προκαλέσει την αλλαγή της δομής της χρωματίνης και την υπερέκφραση της κυκλίνης D1 (cyclin D1) με αποτέλεσμα τον σχηματισμό όγκων. Η κυκλίνη D1 εμπλέκεται στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και αποτελεί γονίδιο στόχο του STAT5. Οι όγκοι που προκύπτουν από την υπερέκφραση της κυκλίνης D1 είναι καλά διαφοροποιημένοι. Ειδικότερα, η τεκνοποίηση των διαγονιδιακών ποντικών προκαλεί μεταβολές στις θέσεις σύνδεσης του STAT5 στους υποκινητές των γονιδίων κυκλίνης D1 και Bclx. Τέλος, μεμονωμένα κύτταρα με υψηλά επίπεδα του παράγοντα STAT5, τα οποία εντοπίζονται στον πυρήνα τους, ήταν επιρρεπή στην ογκογένεση που προκαλείται από την κυκλίνη D1. (Barash, 2012).

Επιπροσθέτως, η ενεργοποίηση του STAT5a συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα E-καντερίνης (E-cadherin) και E-κατενίνης (E-catenin) στην επιφάνεια των κυττάρων T-47D, κύτταρα του καρκίνου του μαστού, *in vitro* και σε ξενομεταμοσχευμένους

(xenotransplanted) όγκους, επιβεβαιώνοντας ότι το STAT5 μπορεί να αναστείλει την μετάσταση (Sultan et al., 2015). Η E-καντερίνη είναι μια επιθηλιακή γλυκοπρωτεΐνη και η E-κατενίνη αποτελεί τον κυτταροπλασματικό διαμεσολαβητή της. Η προσκόλληση της E-καντερίνης είναι άμεσα εξαρτημένη από την ακεραιότητα των συστατικών της E-κατενίνης, τα οποία συνδέουν την πρώτη με τα νημάτια ακτίνης. Έχει αποδειχθεί ότι η E-καντερίνη είναι πρωτεΐνη ογκοκαταστολέας και η μειωμένη ρύθμιση ή λειτουργία της μπορεί να οδηγήσουν στην πρόωμη εξέλιξη μεταστάσεων των περισσότερων επιθηλιακών όγκων, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού.

Η επαγόμενη σηματοδότηση του JAK2/STAT5 μονοπατιού από την κινάση PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B) διευκολύνει την θεραπεία του TNBC, έναν ιδιαίτερα επιθετικό καρκίνο. Η PI3K/Akt δρα και ως ογκοπρωτεΐνη, η οποία συσχετίζεται με την ενζυμική δραστηριότητα. Μελέτη, η οποία παρουσιάστηκε το 2012, απέδειξε ότι η καταστολή του μονοπατιού PI3K/mTOR οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού JAK2/STAT5, ενώ η διπλή καταστολή του PI3K/mTOR πυροδοτεί την έκκριση της ιντερλευκίνης 8 (IL-8). Τέλος, η ταυτόχρονη καταστολή του μονοπατιού PI3K/mTOR και της JAK2 μείωσε σημαντικά τον αριθμό των καρκινικών κυττάρων και την ανάπτυξη των όγκων, την σπορά και την μετάσταση, ενώ προκάλεσε μια αύξηση της συνολικής επιβίωσης των ποντικών σε μελέτη επιβίωσης που πραγματοποιήθηκε (Britschgi et al., 2012).

Οι πολυμορφισμοί του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών 2 (Fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2) έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο των καρκίνων του μαστού θετικών στους υποδοχείς του οιστρογόνου και της προγεστερόνης. Ο υποδοχέας FGFR2 πυροδοτεί την ενεργοποίηση ποικίλων μονοπατιών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται το μονοπάτι JAK2/STAT5. Έχει αποδειχθεί ότι η πρωτεΐνη FGF2 ενεργοποιεί το STAT5 σε ενδοθηλιακά κύτταρα και η ίδια πρωτεΐνη μαζί με οξική μεδροξυπρογεστερόνη (medroxyprogesterone acetate, MPA) επάγουν την φωσφορυλίωση του STAT5 στα C4-H1 και T47D κύτταρα. Στις δύο κυτταρικές σειρές με FGF2 και MPA παρατηρήθηκε μια αύξηση του ολικού STAT5 και ο εντοπισμός του με PR στον πυρήνα. Με ανοσοκατακρήμνιση, επιβεβαιώθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών πρωτεϊνών (FGF2, STAT5 και PR) στον πυρήνα των κυττάρων και μετέπειτα, εντοπίστηκαν και οι τρεις σε ιστολογικά δείγματα καρκίνου του μαστού. (Cerliani et. al, 2011)

Η δραστηριότητα της πρωτεΐνης AP-1 (activating protein 1) διεγείρεται από την PRL στα καρκινικά κύτταρα. Η AP-1 ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διαδικασίες κρίσιμες για την

εξέλιξη των νεοπλασιών, μεταξύ άλλων τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την μεταφορά και την αγγειογένεση, και βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα σε πολλούς καρκίνους, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού. Οι Gutzam et al. (2007) απέδειξαν την αμοιβαία σχέση μεταξύ της PRL και των STAT5 και AP-1 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού. Ο παράγοντας STAT5 οδηγεί στην μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης AP-1 επαγόμενης από την PRL. Ωστόσο, τα δεδομένα τους υπέδειξαν ότι η PRL μπορεί να φέρει διαφορετικά αποτελέσματα στην εξέλιξη των όγκων ανάλογα με τις διαθέσιμες οδούς σηματοδότησης και στην συγκεκριμένη περίπτωση, εξαρτάται από την διαθεσιμότητα του STAT5. Τέλος, το STAT5 μπορεί να αλλάξει την δομή ή περιοχές κάλυψης των πρωτεϊνών AP-1, με άμεσο αποτέλεσμα τις τροποποιημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και επομένως, τη μειωμένη δραστηριότητα του μεταγραφικού συμπλόκου.

Η απουσία φωσφορυλίωσης της τυροσίνης του STAT5 με ταυτόχρονη παρουσία της πρωτεΐνης STAT5 συνεχούς έκφρασης σε κλινικά δείγματα του καρκίνου του μαστού υποδηλώνει ότι οι φωσφατάσες τυροσίνης αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές. Συγκεκριμένα, η αυξημένη και παρατεταμένη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του επαγόμενα με προλακτίνη STAT5 παρατηρήθηκε σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, T47D και MCF7, ως απάντηση στην μείωση της φωσφατάσης τυροσίνης PTP1B. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της PTP1B κατέστειλε την επαγόμενη από προλακτίνη φωσφορυλίωση της τυροσίνης του STAT5. Συνεπώς, μέσα από μελέτες knockdown του γονιδίου PTP1B in vitro, αποδείχθηκε ότι το PTP1B αποτελεί έναν σημαντικό αρνητικό ρυθμιστή της φωσφορυλίωσης του STAT5 σε επεμβατικούς καρκίνους του μαστού (Johnson et al., 2010).

II. Καρκίνος του ήπατος ή Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HKK)

Το ήπαρ αποτελεί ένα από τα κυριότερα όργανα αποτοξίνωσης και μεταβολισμού, το οποίο έχει την ικανότητα να ελέγχει τον μεταβολισμό των πρωτεϊνών, λιπιδίων και υδατανθράκων μέσω της απορρόφησης, μεταβολής, αποθήκευσης και απελευθέρωσης διαφόρων υποστρωμάτων και μεταβολιτών. Στο ήπαρ, η αυξητική ορμόνη, η οποία είναι μια μονόκλωνη πολυπεπτιδική αλυσίδα, αποτελεί τον κύριο υποκινητή της μεταγεννητικής ανάπτυξης του σώματος και παίζει ιδιαίτερο ρόλο στον μεταβολισμό. Δεσμεύει τον συγγενή υποδοχέα της (growth hormone receptor, GHR), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του JAK2, ο οποίος με τη σειρά του φωσφορυλιώνει το STAT5, με τελικό αποτέλεσμα την ρύθμιση των γονιδίων στόχων μέσω των μοτίβων GAS. Στο ήπαρ, η σηματοδότηση GH-STAT5 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων στόχων που σχετίζονται με διάφορες

φυσιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη του σώματος, ο κυτταρικός κύκλος, τα λιπίδια και ο μεταβολισμός φαρμάκων.

Η διακοπή της σηματοδότησης GH-STAT5 και κατ' επέκταση, η διαταραχή του οργάνου σχετίζεται με ηπατική νόσο, συμπεριλαμβανομένου του λιπώδους ήπατος, της ίνωσης και του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (ΗΚΚ), το οποίο αποτελεί την βασική αιτία θανάτου από καρκίνο και αναπτύσσεται κυρίως ως αποτέλεσμα της προχωρημένης ίνωσης του ήπατος. Σε κλινικές μελέτες των Lee et al., διαπιστώθηκε πως η ενεργοποίηση του STAT5b, κυρίως, πυροδοτεί το ΗΚΚ επιθετικού τύπου. Παρομοίως με τον καρκίνο του μαστού, το STAT5 έχει διπλό ρόλο στο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, όπου μπορεί να δράσει είτε ως ογκοκαταστολέας είτε ως ογκογονίδιο σε άλλες περιπτώσεις.

Σύμφωνα με μια μελέτη από τους Hosui et al., ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας βήτα (transforming growth factor beta, TGFβ), ο οποίος αποτελεί μια σημαντική κυτοκίνη για τις ηπατικές λειτουργίες, αλληλεπιδρά άμεσα με το STAT5 και τα αυξημένα επίπεδά του αίρουν την επαγόμενη από GH ενεργοποίηση του STAT5. Αντιθέτως, τα αυξημένα επίπεδα του TGF-β έχουν ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της GH του STAT3, όπου η συνεχής δραστηριότητα του STAT3 παρατηρείται συνήθως στο ΗΚΚ. Σε ποντίκια, στα οποία απενεργοποιήθηκε το γονίδιο του STAT5 (knockout) από τα ηπατοκύτταρα και επεξεργάστηκαν με τετραχλωράνθρακα (CCl₄), παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα του TGF-β, ενεργοποίηση του STAT3 και τέλος, η ανάπτυξη του ΗΚΚ. Αυξημένη φωσφορυλίωση του STAT5 έχει συσχετηθεί με επιθηλιακούς καρκίνους και έχει συνδεθεί με την επαγωγή των γονιδίων στόχων του STAT3.

Επιπρόσθετα, μελέτη σε διαφορετικά γονίδια στόχους αποσαφήνισε ότι το STAT5 μπορεί να δράσει ως ογκοκαταστολέας από την θετική ρύθμιση της έκφρασής τους. Ειδικότερα, αφορά την σύνδεση του STAT5 με το ένζυμο NOX4 (NADPH oxidase 4) και τις προαποπτωτικές πρωτεΐνες PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) και BIM (Bcl-2-interacting mediator of cell death). Στα ηπατοκύτταρα, η καταστολή του NOX4 οδηγεί σε μειωμένη έκφραση των PUMA και BIM. Από την άλλη, το STAT5 ελέγχει την παραγωγή των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) μέσω της ενεργοποίησης του γονιδίου NOX4 και με την σειρά του, ενεργοποιεί τα γονίδια που κωδικοποιούν τις προαποπτωτικές και ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες PUMA και BIM (Yu et al., 2012).

Η απώλεια του STAT5 από εμβρυικούς ινοβλάστες ποντικού (mouse embryonic fibroblasts, MEF) οδηγεί στον αυξημένο πολλαπλασιασμό και συνδέεται με τα μειωμένα επίπεδα των καταστολέων Cdkn2b (cyclin-dependent kinase inhibitor 2B) και Cdkn1a. Η GH, μέσω της σύνδεσης με τον υποκινητή του STAT5 στο μοτίβο GAS, αυξάνει την έκφραση των δύο προαναφερθέντων γονιδίων. Συνεπώς, οι κυτοκίνες, μέσω του STAT5, επάγουν την έκφραση των βασικών καταστολέων του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, το STAT5 ρυθμίζει τις ογκοκατασταλτικές δραστηριότητες και σε άλλα είδη κυττάρων. Στα T κύτταρα, η ογκογονική κινάση τυροσίνης NPM1-ALK επάγει την αποσιώπηση του γονιδίου STAT5a, ενώ η πρωτεΐνη STAT5a μπορεί να δράσει ως κύριος ογκοκαταστολέας αναστέλλοντας αμοιβαία την έκφραση της κινάσης NPM1-ALK.

Εντούτοις, ο παράγοντας STAT5 μπορεί να προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου και ακολούθως, την εξέλιξή του αυξάνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τον πληθυσμό των καρκινικών βλαστοκυττάρων, την χημειοανθεκτικότητα και η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετάβαση (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Σε ποντίκια L-TKO, αποδείχθηκε πως η ενεργοποίηση του στόχου της ραπαμυκίνης των θηλαστικών (mTOR-mammalian target of rapamycin) συμβάλλει στην έκφραση των γονιδίων σύνθεσης λιπιδίων, ενώ η δυσλειτουργία του γονιδίου συσχετίζεται με HKK (Li et al., 2019). Ο mTOR είναι μια κινάση, η οποία ρυθμίζει τον μεταβολισμό, και η αποκλίνουσα ενεργοποίησή του συμβαίνει στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς σε συνθήκες παχυσαρκίας. Επιπλέον, ο mTOR1 φωσφορυλιώνει το STAT5 αυξάνοντας την έκφρασή του. Συγχρόνως, σε κύτταρα HepG2, το φωσφορυλιωμένο STAT5 (p-STAT5) μπορούσε να επηρεάσει την έκφραση και να διαμορφώσει την πυρηνική κατανομή της πρωτεΐνης SREBP1 (sterol regulatory element binding protein 1). Συνεπώς, η φωσφορυλίωση του STAT5 από τον mTOR μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση της πρωτεΐνης SREBP1 και να προκαλέσει την σύνθεση των λιπιδίων στο ήπαρ με πιθανό αποτέλεσμα το ΗΗΚ (Li et al., 2019)

Σε μελέτη των Zhao et al. (2017), διαπιστώθηκε ότι ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας (insulin-like growth factor 1, IGF-1) και συγκεκριμένα, το μονοπάτι σηματοδότησής του, επάγει την μετάβαση EMT μέσω της ενεργοποίησης του STAT5 κατά την ανάπτυξη ΗΚΚ στα κύτταρα HepG2 και Hep3B. Είναι γνωστό πως η οικογένεια των αυξητικών παραγόντων IGF, καθώς και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των όγκων. Διερευνήθηκε, επίσης, η σχέση μεταξύ του υποδοχέα IGF-1R με τους βιοδείκτες της EMT. Διαπιστώθηκε από τα αποτελέσματα ότι σε

καρκινικά δείγματα, η έκφραση των N-καδερίνης, βιμετίνης, Snail1, Snail2 και Twist1 ήταν ανοδική, σε αντίθεση με την έκφραση της E-καδερίνης που ήταν καθοδική.

Τέλος, μελετήθηκε ο ρόλος μίας πρωτεΐνης, η οποία μεταφέρει χοληστερόλη, της GRAMD1A, στην εξέλιξη και στην πρόγνωση του ΗΚΚ, και η σχέση της με τον παράγοντα STAT5 (Fu et al.,2016). Αποδείχθηκε ότι η GRAMD1A ρυθμίζεται θετικά σε ΗΚΚ ιστούς και η υψηλή της έκφραση σχετίζεται σημαντικά με χαμηλή επιβίωση και συνεπώς, μπορεί να αποτελέσει προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς με ΗΚΚ. Σε κύτταρα Huh7 και HepG2, βρέθηκε ότι η GRAMD1A προκαλεί την ανάπτυξη όγκου και την αυτοανανέωση και εξάπλωση των ΗΚΚ βλαστοκυττάρων, ενώ παράλληλα, αυξάνει την αντοχή στα φάρμακα και κατ' επέκταση, στην χημειοθεραπεία μέσω της ρύθμισης του STAT5. Τέλος, τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η GRAMD1A μπορεί να ρυθμίσει το STAT5 και την μεταγραφική του δραστηριότητα προκαλώντας με την υπερέκφρασή της την έκφραση γονιδίων στόχων του STAT5, συμπεριλαμβανομένου της κυκλίνης D1, Bcl-2, c-Jun και c-Myc. Αντίθετα, η μείωση έκφρασης (knockdown) του γονιδίου GRAMD1A καταστέλλει την έκφραση των παραπάνω γονιδίων.

III. Καρκίνος του πνεύμονα

Σε αντίθεση με τους δύο προηγούμενους καρκίνους, το γονίδιο STAT5 στον καρκίνο του πνεύμονα έχει μόνο τον ρόλο του ογκογονιδίου. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος (non-small cell lung cancer, NSCLC) είναι ο πιο κοινός κακοήθεις όγκος του πνεύμονα. Σε αυτό τον υπότυπο, το μονοπάτι του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), ένα από τα κυριότερα μονοπάτια, μπορεί να προκαλέσει μέσω της σηματοδότησής του ογκογένεση αυξάνοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και χημειοαντοχή. Η υπερέκφραση του αυξητικού παράγοντα EGF έχει κρίσιμο ρόλο σε ανθρώπινα καρκινώματα. Σε μελέτες που έγιναν σε κύτταρα A549 αποδείχθηκε πως ο EGF ενεργοποιεί άμεσα την έκφραση του φωσφορυλιωμένου STAT5 (p-STAT5). Πρέπει να σημειωθεί ότι ο EGF μπορεί να επάγει την ενεργοποίηση του STAT5, αλλά δεν μπορεί να αυξήσει την έκφρασή του. Η ενεργοποίηση του STAT5 από τον EGF αυξάνει την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (cyclooxygenase-2, COX-2), της οποίας η έκφραση φαίνεται να εξαρτάται από την φωσφορυλίωση του STAT5. Υπάρχει, όμως, και ένα δεύτερο μονοπάτι, στο οποίο η έκφραση του COX-2 είναι ανεξάρτητη από τον EGF και δεν απαιτείται η φωσφορυλίωση του STAT5. Συνεπώς, η ενεργοποίηση του STAT5 μεσολαβεί της

επαγόμενης έκφρασης από EGF έκφρασης της COX-2 σε αδenoκαρκινώματα του πνεύμονα.

Σε παρόμοια μελέτη (Pastuszak–Lewandoska et al., 2017), εκτός από τον ρόλο της COX-2, εξετάστηκε και ο ρόλος των καταστολέων των STATs, SOCS και PIAS, στον καρκίνο του πνεύμονα. Ειδικότερα, οι PIAS3 και SOCS3 καταστέλλουν την δραστηριότητα του STAT5 και παρατηρείται μια αρνητική συσχέτιση των επιπέδων ανοσοέκφρασής τους. Η ανοσοέκφραση του PIAS βρέθηκε χαμηλότερη στον μη πλακώδη καρκίνο του πνεύμονα, ενώ η ανοσοέκφραση του SOCS3 σε μικρότερους όγκους.

Έχουν καταγραφεί ιντελευκίνες, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορους τύπους καρκίνων. Συγκεκριμένα, η ιντελευκίνη-7 (IL-7) μελετήθηκε για την αντικαρκινική της δραστηριότητα σε συνδυασμό με ένα φάρμακο χημειοθεραπείας, την σισπλατίνη (cisplatin), κατά του μη μικροκυτταρικού καρκίνου. Σε δύο κυτταρικές σειρές, A549 και A549/DDP, παρατηρήθηκαν τα μειωμένα επίπεδα των p-STAT και p-JAK με χορήγηση μόνο σισπλατίνης και αυξημένα επίπεδα σε συνδυασμένη χρήση IL-7 και σισπλατίνης. Το μονοπάτι JAK3/STAT5 αυξάνει την ευαισθησία της σισπλατίνης στον καρκίνο NSCLC παρουσία της IL-7 (Shi et al., 2019). Επιπρόσθετα, η ιντερλευκίνη-32γ (IL-32γ) που εκφράζεται σε CD133+ κύτταρα καταστέλλει τα επίπεδα του φωσφορυλιωμένου STAT5, του οποίου η έκφραση είναι αυξημένη στους ιστούς των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Το STAT5 μπορεί να ενεργοποιηθεί από τις ιντεγκρίνες, οι οποίες συσχετίζονται με ανάπτυξη καρκίνου, χωρίς να είναι ξεκάθαρος ο ρόλος τους. Ειδικότερα σε αυτή τη μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η υπερέκφραση της ιντεγκρίνης α V (Integrin Subunit Alpha V, ITGAV) μπορεί να ανατρέψει την επίδραση της IL-32γ στην φωσφορυλίωση του STAT5 (Sun Lee et al., 2019).

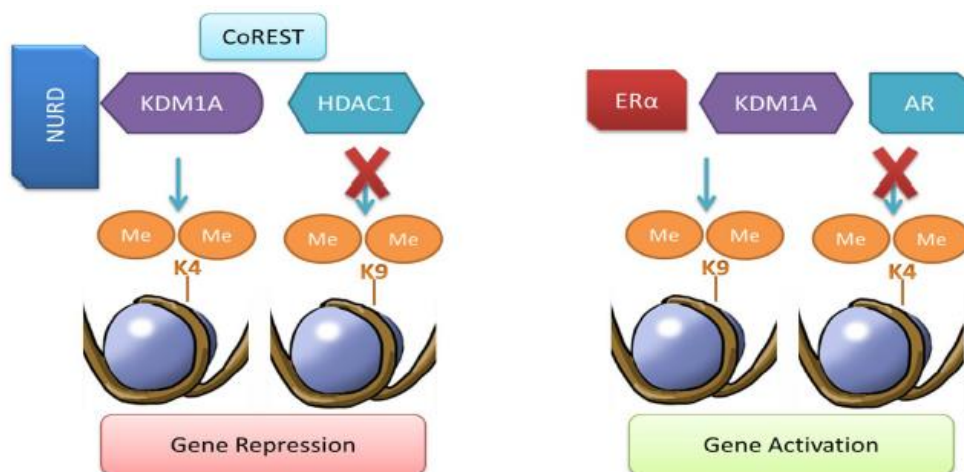
Τέλος, πρόσφατη μελέτη (Li et al., 2020) ταυτοποίησε το γονίδιο σύντηξης EML4–ALK σε ασθενείς με NSCLC χωρίς μετάλλαξη του υποδοχέα EGFR και βρήκε ότι αυτό το υβριδικό γονίδιο ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης του JAK2/STAT στα κύτταρα HEK293 και NIH3T3. Το γονίδιο σύντηξης EML4–ALK φωσφορυλιώνει το γονίδιο JAK2 και συγχρόνως, παρατηρείται η συνεχόμενη ενεργοποίηση των STAT-1, 3, 5, 6 και p-STATs με αποτέλεσμα να αυξάνεται η κυτταρική βιωσιμότητα των EML4–ALK θετικών κυττάρων. Συνεπώς, το μονοπάτι σηματοδότησης JAK/STAT μπορεί να εμπλακεί στην ογκογένεση και στην ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα μεσολαβώντας το γονίδιο EML4–ALK.

2.5 LSD1

Η πρωτεΐνη απομεθυλάσης ειδική στη λυσίνη 1 (Lysine-Specific Demethylase 1, LSD1), γνωστή και ως KDM1A, AOF2, BHC110 ή KIAA0601, ήταν η πρώτη απομεθυλάση ιστονών που βρέθηκε και ταυτοποιήθηκε αρχικά το 2004 (Shi et al., 2004). Η LSD1 διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης, της κυτταρικής διαφοροποίησης, του διαχωρισμού χρωμοσωμάτων και της εμβρυικής ανάπτυξης. Ρυθμίζει τη μεταγραφή με έναν στοχοθετημένο τρόπο και η δράση της εξαρτάται άμεσα από την αλληλεπίδρασή της με συγκεκριμένα ρυθμιστικά σύμπλοκα χρωματίνης. Συγχρόνως, μπορεί να δράσει ως ογκογονίδιο και η υπερέκφρασή της να προκαλέσει τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και τη μετάσταση.

Μέχρι στιγμής, έχουν ταυτοποιηθεί 20 ανθρώπινες απομεθυλάσες λυσίνης, οι οποίες αναγνωρίζουν το H3K4 ως υπόστρωμα και διακρίνονται σε δύο οικογένειες: ειδικές απομεθυλάσες λυσίνης (LSDs) και απομεθυλάσες Jumonji C (JMJs). Οι JMJs ανήκουν στην υπεροικογένεια των διοξυγενασών που εμπλέκονται σε αντιδράσεις αποοξυγόνωσης που εξαρτώνται από ιόντα σιδήρου και α-κετογλουταρικό οξύ, επιτρέποντας την απομεθυλίωση τριμεθυλιωμένων υπολειμμάτων λυσίνης. Αντίθετα, μέλη της οικογένειας LSD μπορούν να απομεθυλιώσουν μονομεθυλιωμένα ή διμεθυλιωμένα υπολείμματα λυσίνης.

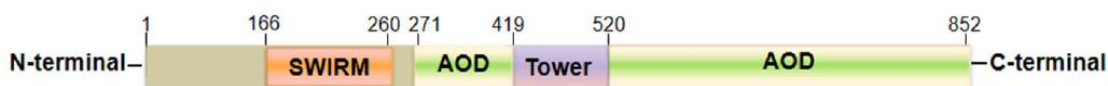
2.5.1 Δράση της LSD1



Εικόνα 3: Η διπλή δράση της LSD1 (KDM1A). (Αριστερά) Η LSD1 συνδέεται με το σύμπλοκο CoREST και NuRD προκαλώντας την απομεθυλίωση της H3K4 με αποτέλεσμα την καταστολή την γονιδιακής έκφρασης. (Δεξιά) Η αλληλεπίδραση της LSD1 με τους υποδοχείς ERα και AR επιτρέπει την μεταγραφική ενεργοποίηση προκαλώντας την απομεθυλίωση της H3K9.

Η LSD1 είναι μια φλαβινοεξαρτώμενη απομεθυλάση, η οποία ανήκει στην οικογένεια των μονοαμινοξειδάσεων, και έχει την δυνατότητα να αφαιρεί μονομεθυλάσες και διμεθυλάσες από τις λυσίνες 4 και 9 στην ιστόνη 3 (H3K4 και H3K9). Η LSD1 έχει διπλή δράση, ενεργοποίησης ή καταστολής. Συγκεκριμένα, η LSD1 επιδρά στην ιστόνη H3 ως μεταγραφικός καταστολέας μέσω της απομεθυλίωσης της λυσίνης 4 (H3K4). Η LSD1 στρατολογείται από το σύμπλοκο CoREST και NuRD προκαλώντας την καταστολή της μεταγραφής μέσω της απομεθυλίωσης της H3K4. Αντίθετα, έχει την δυνατότητα να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής μέσω της απομεθυλίωσης της λυσίνης 9 (H3K9) αλληλεπιδρώντας με τον υποδοχέα ERα και τον υποδοχέα ανδρογόνων (androgen receptor, AR) με αποτέλεσμα να ανοίγει η ετεροχρωματίνη και να είναι δυνατή η μεταγραφική δραστηριότητα.

2.5.3 Δομή της LSD1



Εικόνα 4: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της πρωτεΐνης LSD1. Η LSD1 χωρίζεται σε τρεις περιοχές: περιοχή SWIRM, περιοχή AOD και περιοχή Tower.

Η LSD1 είναι μια πρωτεΐνη 90 kDa, η οποία απαρτίζεται από τρεις κύριες περιοχές. Η περιοχή SWIRM στο αμινοτελικό άκρο, η οποία αποτελείται από τις πρωτεΐνες Swi3, Rsc8 και Moira, παίζει ιδιαίτερο ρόλο στις αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες. Η συγκεκριμένη περιοχή δεν προσδένεται με μόρια DNA και διατηρεί τη δομική ακεραιότητα των πρωτεϊνικών υποστρωμάτων. Επιπλέον, η περιοχή TOWER, η οποία έχει σχήμα σπειροειδούς έλικας, διαχωρίζει την τρίτη περιοχή AOD (amine oxidase-like) σε δύο υποτομείς. Ο πρώτος υπο-τομέας της AOD αλληλεπιδρά με την περιοχή SWIRM σχηματίζοντας μια βασική δομή, η οποία προσδένεται στο δινοκλεοτίδιο φλαβίνης – αδενίνης (Flavin Adenine Dinucleotide, FAD), ενώ ο δεύτερος υπο-τομέας προσδένεται ειδικά στο υπόστρωμα. Η περιοχή AOD είναι αναγκαία για την ρύθμιση της ενζυμικής ικανότητας και την αναγνώριση και αλληλεπίδραση με τις ιστόνες. Για τον λόγο αυτό, η LSD1 χρειάζεται τα πρώτα 20 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου, επιτρέποντας στην πρωτεΐνη να αντιλαμβάνεται τα επιγενετικά μηνύματα που είναι κωδικοποιημένα στην ουρά της ιστόνης και να ολοκληρώσει επιτυχώς την απομεθυλίωση.

Η LSD1 σχηματίζει σύμπλοκο με την μεταγραφική πρωτεΐνη συν-καταστολέα CoREST (REST corepressor) μέσω της περιοχής TOWER. Η περιοχή TOWER παρέχει μία

επιφάνεια για αλληλεπίδραση με άλλες πρωτεΐνες, η οποία είναι απαραίτητη για τις λειτουργίες του, όπως είναι η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η τροποποίηση των ιστονών. Το ετεροδιμερές LSD1/CoREST συχνά εντοπίζεται σε άλλα μεγαλύτερα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής, δρώντας ως «ικρίωμα» και συμμετέχοντας στις δραστηριότητες της αποακετυλάσης και της απομεθυλάσης σε ένα μονό σύμπλοκο. Η σχέση μεταξύ LSD1 και CoREST επιτρέπει την απομεθυλίωση του νουκλεοσώματος.

2.5.4 LSD1 στον καρκίνο

Η καταστολή του LSD1 μειώνει ή εμποδίζει την κυτταρική ανάπτυξη σε πολλούς όγκους, ενώ η υπερέκφρασή του έχει παρατηρηθεί σε ποικίλους τύπου καρκίνου, όπου συνήθως σχετίζεται με πιο επιθετικούς τύπους καρκίνου. Τα αυξημένα επίπεδα του LSD1 συσχετίζονται άμεσα με την εξέλιξη των όγκων. Θα παρουσιαστεί παρακάτω ο ρόλος του LSD1 σε τρεις συμπαγείς καρκίνους, στον καρκίνο του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα, καθώς και γονίδια στόχοι και πρωτεϊνικά συμπλέγματα του LSD1 στους συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.

I. Καρκίνος του μαστού

Η υπερέκφραση του LSD1 μπορεί να θεωρηθεί ως ένα πρώιμο χαρακτηριστικό στην καρκινογένεση του μαστού. Για να εκφραστεί το LSD1, χρειάζεται το γονίδιο του υποδοχέα ERα, το οποίο φυσιολογικά προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό στους μαστούς, ενώ παθολογικά εκφράζεται στην πλειοψηφία των όγκων του μαστού. Το LSD1 και άλλες πρωτεΐνες στρατολογούνται από τον υποδοχέα ERα, ώστε να δημιουργήσουν ένα σύμπλοκο, το οποίο προσδένεται σε υποκινητές γονιδίων εξαρτημένων από το οιστρογόνο, με συνέπεια τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ωστόσο, το CAC1 αλληλεπιδρά με το LSD1 καταστέλλοντας το και ρυθμίζοντας αρνητικά την λειτουργία του υποδοχέα ERα. Αντιθέτως, το γονίδιο ASXL2, το οποίο δημιουργεί σύμπλοκο με τα LSD1, UTX και MLL2, έχει θετική επίδραση στον υποδοχέα ERα διαμεσολαβώντας για την ενεργοποίησή του και συνεπώς, προκαλείται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων (Park et al., 2014). Το BRCA1, παρομοίως, λειτουργεί ως ογκογονίδιο και η απώλεια του αυξάνει σημαντικά τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Η μείωση της έκφρασης αυτού του ογκογονιδίου έχει ως αποτέλεσμα την υπερέκφραση του LSD1, γεγονός που παρατηρείται σε ER- καρκίνους του μαστού (Mosammaparast et al., 2013).

Η αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών USP28 και LSD1, αλλά όχι των επιπέδων του mRNA, δείχνει ότι η πρώτη πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με την δεύτερη στον τομέα AOL της LSD1 και στο άκρο N-terminal της USP28. Στην ίδια μελέτη, οι Wu et al. (2017) απέδειξαν ότι η USP28 σταθεροποιεί την LSD1 από ουμπικουϊτίνωση. Επιπρόσθετα, μη φυσιολογικές δραστηριότητες των LSDs και των HDACs συσχετίζονται με την ανώμαλη γονιδιακή έκφραση του καρκίνου του μαστού, όπως συσχετίζονται τα επίπεδα έκφρασης αυτών των γονιδίων. Η μελέτη που διεξήχθη από τους Cao et al. (2017) έδειξε πως το HDAC5 ρυθμίζει το γονίδιο LSD1 διαμέσου της ενίσχυσης της σταθερότητας της πρωτεΐνης USP28.

Το LSD1 μπορεί να δράσει και ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στην περίπτωση ενεργοποίησης του GATA3. Τα δύο γονίδια συναντώνται στα ίδια πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα, όπως με το CoREST, και ρυθμίζεται άμεσα η έκφραση του GATA3. Επίσης, οι Hu et al. (2019) έδειξαν ότι το LSD1 αναστέλλει την έκφραση ενός βασικού ογκογονιδίου, του TRIM37, εν μέρει μέσω του GATA3. Παρομοίως, η πρωτεΐνη LSD1 αλληλεπιδρά με την β-κατενίνη με σκοπό την ρύθμιση του ογκογονιδίου LEFTY1 και συγκεκριμένα, την μείωση των επιπέδων αυτού.

II. Καρκίνος του ήπατος ή Ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (HKK)

Η υπερέκφραση του γονιδίου LSD1 σχετίζεται με την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος. Οι Lei et al. (2015) παρείχαν τις πρώτες ενδείξεις για την ανάμειξη του LSD1 και της πρωτεΐνης Lgr5 στην ογκογένεση και την αυξημένη αντοχή στα φάρμακα. Η πρωτεΐνη Lgr5 έχει παρατηρηθεί ότι εμπλέκεται σε διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου και του HKK. Η Lgr5, επίσης, ενισχύει το μονοπάτι σηματοδότησης Wnt/β-κατενίνης, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την αυτοανανέωσή τους. Το LSD1 σχετίζεται άμεσα με την ογκογένεση του Lgr5, καθώς τα κύτταρα Lgr5+ εκφράζουν το LSD1 σε υψηλότερα επίπεδα, το οποίο ρυθμίζει την έκφραση του Lgr5. Επιπλέον, το LSD1 προωθεί την ενεργοποίηση της β-κατενίνης αναστέλλοντας την έκφραση των αρνητικών ρυθμιστών της οδού σηματοδότησης της β-κατενίνης σε κύτταρα Lgr5+ που οδηγεί σε παρεκκλίνουσα ενεργοποίηση της σηματοδότησης αυτής της οδού, και ρυθμίζοντας την απομεθυλίωση της H3K4 στους υποκινητές των συγκεκριμένων γονιδίων.

Την ίδια χρονιά, οι Sakamoto et al. απέδειξαν ότι το LSD1 σε συνεργασία με το GLUT1 βρίσκονται σε αυξημένα επίπεδα σε καρκινικούς ιστούς. Επίσης, έδειξαν ότι το LSD1 εμπλέκεται στον μεταβολισμό της γλυκόζης των καρκινικών κυττάρων και ότι

ρυθμίζει τα γλυκολυτικά γονίδια μέσω του μονοπατιού του HIF1α που μεσολαβεί στα καρκινικά κύτταρα του ήπατος.

Σε άλλη μελέτη, οι Khanal et al. απέδειξαν ότι η απώλεια του υποδοχέα NR2E3 προκαλεί την καταστολή του παράγοντα AHR επαναπρογραμματίζοντάς το επιγενετικά, γεγονός που μειώνει την ενεργό H3K4 επηρεάζοντας την δραστηριότητα και την κατανομή του LSD1. Ο NR2E3 είναι ένας πυρηνικός υποδοχέας και μπορεί να δράσει ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας. Ο AHR είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που μπορεί να ενεργοποιηθεί από ένα ευρύ φάσμα συνδεδετών, συμπεριλαμβανομένων και τοξικών για το περιβάλλον. Η απώλεια του AHR διευκολύνει την ογκογένεση σε ποικίλους καρκίνους, όπως και στον καρκίνο του ήπατος.

Παράλληλα, οι Liu et al. ταυτοποίησαν ότι η σηματοδότηση του Notch3 έχει σημαντικό ρόλο στην αποακετυλίωση του LSD1. Γενικά, η οδός σηματοδότησης του Notch προκαλεί την αυτοανανέωση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος, όπως και το LSD1, και στο HKK, οι υποδοχείς του Notch συνηθίζουν να υπερεκφράζονται. Φυσιολογικά, η σηματοδότηση του Notch σχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη ρυθμίζοντας την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό. Σε μελέτη, οι Liu et al. απέδειξαν ότι από τους τέσσερις υποδοχείς Notch, μόνο ο Notch3 σχετίζεται με την ρύθμιση της έκφρασης του LSD1. Η σηματοδότηση του Notch μπορεί να ρυθμίσει την ακετυλίωση του LSD1 επάγοντας την έκφραση του SIRT1, το οποίο εμπλέκεται στην αποακετυλίωση του LSD1. Οι δραστηριότητες αυτές οδηγούν στην ογκογένεση των καρκινικών κυττάρων του ήπατος και στην αυτοανανέωσή τους.

III. Καρκίνος του πνεύμονα

Η έκφραση του παράγοντα LSD1 φαίνεται να είναι υψηλότερη σε καρκινικούς ιστούς του πνεύμονα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς και το γονίδιο εντοπίζεται κυρίως στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα. Σε κλινικές μελέτες (Lv et al., 2012), παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του LSD1 σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) και αποδείχθηκε η άμεση συσχέτιση του συγκεκριμένου γονιδίου με τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα.

Σε μελέτη, οι Zhang et. al απέδειξαν ότι η έκφραση του LSD1 αυξάνεται σημαντικά στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα, στα κύτταρα του οποίου υπερεκφράζεται το

γονίδιο Sox2. Το Sox2 αποτελεί ένα ενισχυμένο ογκογονίδιο και η γονιδιακή ενίσχυσή του είναι το πιο συχνό εύρημα στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα στην περιοχή του χρωμοσώματος 3q26.33 (Bass et al., 2009 & Hussenet et al., 2010). Επιπλέον, η απενεργοποίηση του LSD1 μειώνει την έκφραση του Sox2 και επάγει γονίδια για διαφοροποίηση ρυθμίζοντας την μεθυλίωση των H3K4 και H3K9.

Αντιθέτως με προηγουμένως στον καρκίνο του ήπατος, η αναστολή του LSD1 ενεργοποιεί την οδό σηματοδότησης του Notch με αποτέλεσμα την καταστολή την ογκογένεσης στον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (Augert et al., 2019). Σε αυτή την μελέτη αποδείχθηκε ότι η αναστολή του LSD1 προκαλεί μια μείωση στον μεταγραφικό παράγοντα ASCL1 και αύξηση στην έκφραση της οικογένειας Notch. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξης του πνεύμονα η σηματοδότηση του Notch ρυθμίζει αρνητικά το γονίδιο ASCL1, ενώ η διαγραφή του γονιδίου ASCL1 καταστέλλει την ογκογένεση του μικροκυτταρικού καρκίνου, όπως και η ενεργοποίηση κυρίως του Notch1. Επομένως, η καταστολή του ASCL1 μέσω της ενεργοποίησης του Notch είναι σημαντική για την καταστολή του LSD1 και κατ' επέκταση, για την αναστολή της ογκογένεσης.

Τα τελευταία χρόνια, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs (long non-coding RNA, lncRNA) έχουν ταυτοποιηθεί σε πολλούς τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου και του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Δύο μελέτες έδειξαν ότι τα lncRNAs AGAP2-AS1 και LINC01133 σχετίζονται με την ογκογένεση και ανάπτυξη του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Το AGAP2-AS1 λειτουργεί ως ογκογόνο σε ανθρώπινα κύτταρα του μη μικροκυτταρικού καρκίνου καταστέλλοντας τα ογκοκατασταλτικά γονίδια LATS2 και KLF2 (Li et al., 2016). Παράλληλα, η έκφραση του LINC01133 είναι αυξημένη στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο καταστέλλοντας την έκφραση των KLF2, P21 και E-cadherin στα καρκινικά κύτταρα (Zang et al., 2016). Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται ότι τα lncRNAs αλληλεπιδρούν με τα LSD1 και EZH2 με την πρόσδεσή τους πάνω στα δύο γονίδια.

Παρομοίως, τα ψευδογονίδια θεωρούνταν, μέχρι πρόσφατα, γονιδιωματικοί τόποι, οι οποίοι ομοιάζουν με τα γονεϊκά γονίδια και συχνά, είναι μη λειτουργικοί, επειδή υπάρχουν μεταλλάξεις που εμποδίζουν την μεταγραφή ή την μετάφραση τους. Ωστόσο, ανακαλύφθηκε ότι τα ψευδογονίδια μπορούν να μεταγραφούν και επίσης, ότι εμπλέκονται στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων καρκίνου. Σε συγκεκριμένη έρευνα, οι Wei et al. μελέτησαν τον ρόλο του ψευδογονιδίου DUXAP10 στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και

απέδειξαν ότι ρυθμίζεται θετικά στους καρκινικούς ιστούς και τα κύτταρα. Η υπερέκφραση του DUXAP10 προκαλεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση του καρκίνου, ενώ η αποσιώπηση (knockdown) του DUXAP10 εμφανίζει ογκοκατασταλτικές ιδιότητες. Επιπλέον, απέδειξαν ότι η σύνδεση του συγκεκριμένου ψευδογονιδίου με το γονίδιο LSD1 έχει ως αποτέλεσμα την ογκογένεση. Η αλληλεπίδραση των DUXAP10 και LSD1 καταστέλλει την έκφραση των γονιδίων LATS2 και RRAD σε μεταγραφικό επίπεδο, στα οποία προσδένεται το LSD1 στην περιοχή του υποκινητή. Μελέτες έχουν δείξει πως τα LATS2 και RRAD λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά γονίδια. Συνεπώς, το ψευδογονίδιο DUXAP10 καταστέλλει την έκφραση των LATS2 και RRAD αλληλεπιδρώντας με το LSD1 και τελικά, προκαλείται η ανάπτυξη του μη μικροκυτταρικού καρκίνου.

2.6 STAT5 και LSD1

Οι STAT5a και STAT5b αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες για να ρυθμίσουν την μεταγραφή και τους μηχανισμούς ρύθμισής της. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε, οι Nanou et al. (2017) ταυτοποίησαν δύο νέους αλληλεπιδρώντες παράγοντες, τους LSD1 και HDAC3, οι οποίοι είναι επιγενετικοί τροποποιητές και σχετίζονται με την ρύθμιση της δραστηριότητας της ιστόνης, και απέδειξαν ότι το LSD1 αλληλεπιδρά με το STAT5a και έχει διπλό ρόλο. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρίμνησης χρησιμοποιώντας πυρηνικά εκχυλίσματα από διεγερμένα με IL-3 κύτταρα ποντικού προ-B Ba/F3 με βιοτινυλιωμένο STAT5a. Το LSD1 έδειξε να αλληλεπιδρά με τον τομέα πρόσδεσης στο DNA και τον τομέα SH2. Επιπλέον, η αλληλούχιση ChIP (ChIP–sequencing, ChIP–seq) έδειξε ότι τα STAT5a και LSD1 έχουν πολλές κοινές περιοχές πρόσδεσης μέσα στο γονιδίωμα. Παράλληλα, η αλληλούχιση RNA (RNA–sequencing, RNA–seq) που πραγματοποιήθηκε στα Ba/F3 κύτταρα με μείωση έκφρασης (knockdown) είτε του STAT5a είτε του LSD1 έδειξε την συν-ρύθμιση σε 3 γονίδια: IL4ra, Gfi1b και Cnr2. Βάσει των δεδομένων από τα ChIP–seq και RNA–seq, εμφανίζεται ότι η λειτουργία του LSD1 μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει την μεταγραφική δραστηριότητα του STAT5a. Ωστόσο, ο μηχανισμός λειτουργίας στην μεταγραφική δραστηριότητα του STAT5a δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πλήρως.

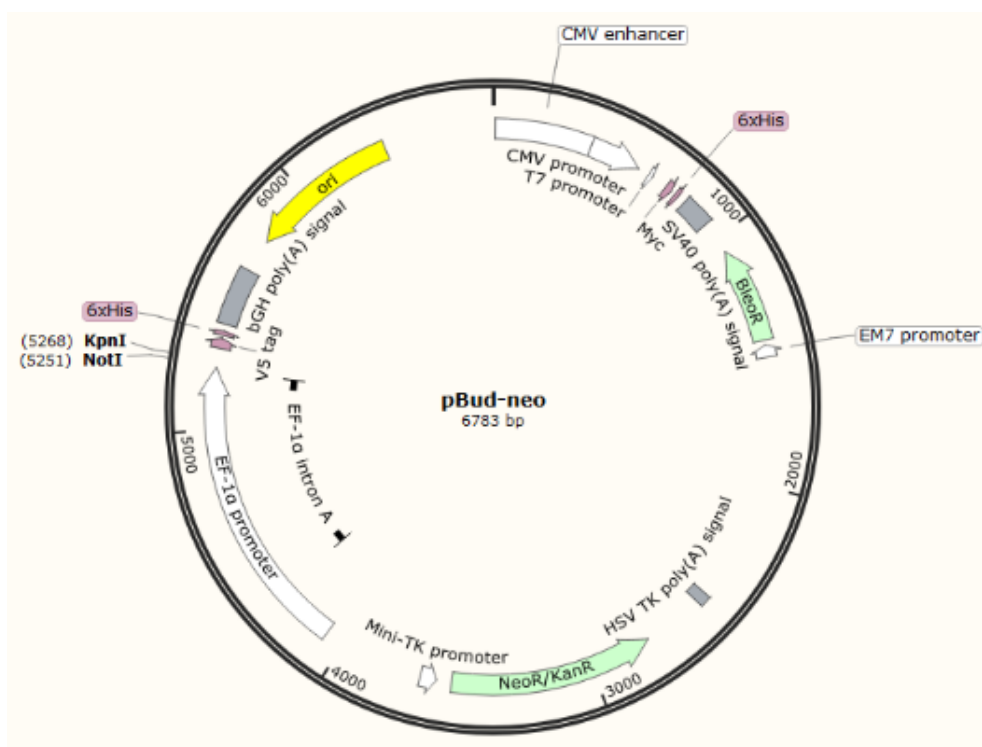
2.7 Σκοπός

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να διερευνηθεί, στο πρώτο μέρος, ο ρόλος των παραγόντων *STAT5* και *LSD1*, των οποίων η δράση ρυθμίζει τη μεταγραφή, και μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης, των γονιδίων στόχων και πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων αυτών σε τρεις συμπαγείς καρκίνους, του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα. Στο δεύτερο μέρος, κλωνοποιήθηκε εργαστηριακά το cDNA του *LSD1* στον πλασμιδιακό φορέα pBud-neo για να εκφραστεί μελλοντικά σε κύτταρα θηλαστικών.

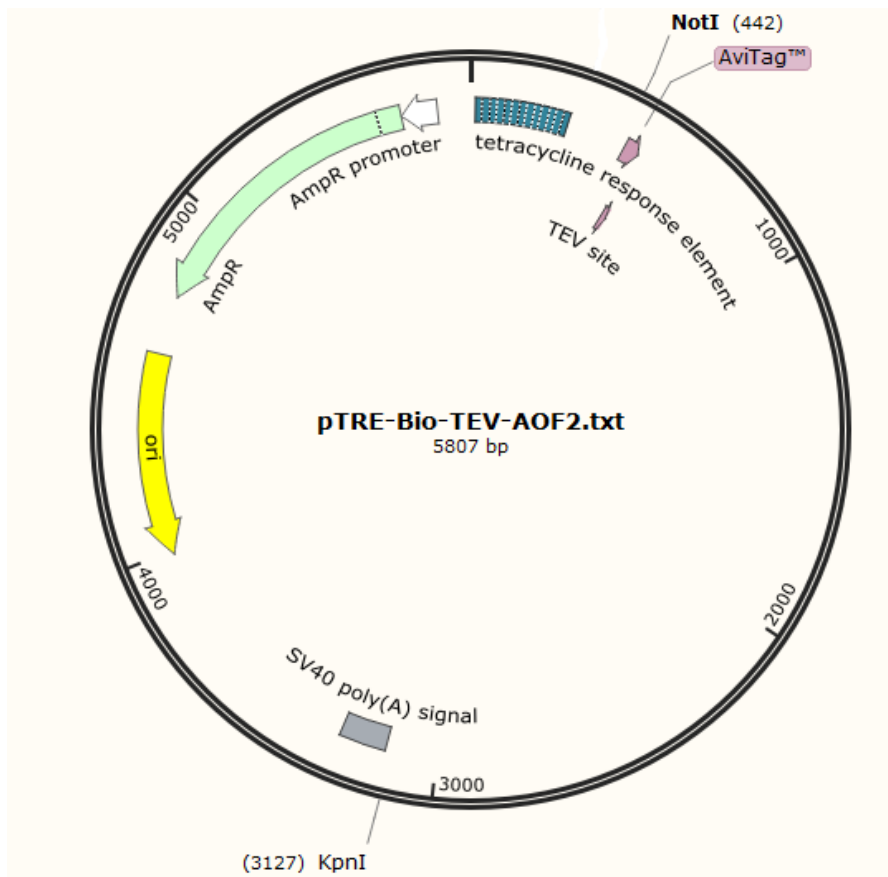
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Υλικά

Για την κλωνοποίηση του γονιδίου bio-LSD1, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια pBud-neo ως φορέας (vector) και pTRE-Bio-TEV-LSD1 ως ένθεμα (insert). Αφού ενώθηκαν με τα κατάλληλα ένζυμα, NotI και KpnI, και έγινε αποφωσφορυλίωση του φορέα, μεταφέρθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο στα βακτηριακά ηλεκτροδεκτικά κύτταρα DH5a, τα οποία προέρχονται από την *Escherichia coli* (*E. coli*) και είναι ιδανικά για κλωνοποίηση, καθώς έχουν υψηλή αποτελεσματικότητα μετασχηματισμού. Επιπλέον, επιλέχθηκαν τα βακτηριακά στελέχη DH5a, τα οποία δεν περιέχουν το γονίδιο Tn5. Το Tn5 κωδικοποιεί το γονίδιο ανθεκτικότητας στην μπλεομυκίνη προσδίδοντας ανθεκτικότητα και στην ζεοσίνη. Η επιστροφή των ανασυνδυασμένων βακτηρίων DH5a έγινε σε τρυβλία με άγαρ, στα οποία είχε προστεθεί το κατάλληλο αντιβιοτικό, η ζεοσίνη. Η ζεοσίνη επιλέχθηκε, διότι υπάρχει το γονίδιο ανθεκτικότητάς της στο πλασμίδιο pBud-neo.



Εικόνα 5: Το πλασμίδιο pBud-neo και οι θέσεις των περιοριστικών ενζύμων NotI και KpnI που χρησιμοποιήθηκαν. Η εικόνα δημιουργήθηκε στο SnapGene.



Εικόνα 6: Το πλασμίδιο pTRE-Bio-TEV-LSD1 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες (NotI – KpnI) που καθορίζουν την περιοχή του επιθυμητού γονιδίου (ένθεμα). Η εικόνα δημιουργήθηκε στο SnapGene

3.1.1 Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν

Αυτόκαυστο

Επωαστήρας με ανάδευση

Επωαστήρας χωρίς ανάδευση

Ηλεκτροδιαπερατότητα (electroporation): BTX, ECM 630

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Υδατόλουτρο

Φυγόκεντροι – Ψυχόμενη φυγόκεντρος

Φωτογράφιση ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων αгарόζης: Dolphin–Doc της Wealtec

3.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα και μάρτυρες μοριακών μεγεθών

Στις αντιδράσεις περιοριστικής ενδονουκλεάσης, χρησιμοποιήθηκαν από την εταιρία NEB (New England BioLabs) τα ρυθμιστικά διαλύματα (buffer solution):

<u>NEBuffer 1.1</u>	<u>NEBuffer 2.1</u>	<u>NEBuffer 3.1</u>	<u>CutSmart Buffer</u>
10 mM Bis-Tris-HCl	50 mM NaCl	100 mM NaCl	50 mM Potassium Acetate
10 mM MgCl ₂	10 mM Tris-HCl	50 mM Tris-HCl	20 mM Tris-acetate
100 µg/ml BSA	10 mM MgCl ₂	10 mM MgCl ₂	10 mM Magnesium Acetate
pH 7 @ 25°C	100 µg/ml BSA	100 µg/ml BSA	100 µg/ml BSA
	pH 7.9 @ 25°C	pH 7.9 @ 25°C	pH 7.9 @ 25°C

από την εταιρία Promega:

Buffer D

6 mM Tris-HCl

6 mM MgCl₂

150 mM NaCl

1 mM DTT

pH 7.9 @ 37°C

και τέλος, από την εταιρία Roche:

Buffer H

90 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

50 mM NaCl

pH 7.5 @ 37°C

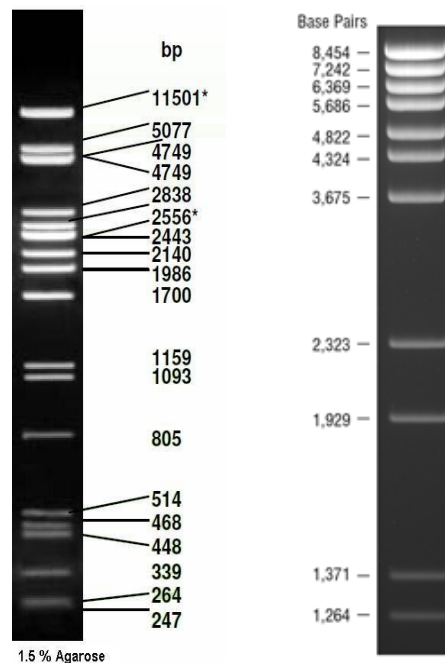
Για την διακοπή της αντίδρασης της αποφωσφορυλίωσης του φορέα, χρησιμοποιήθηκε το ρυθμιστικό διάλυμα CIAP stop buffer της εταιρίας Promega με σύσταση:

- ✓ 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- ✓ 1 mM EDTA (pH 7.5)
- ✓ 200 mM NaCl
- ✓ 0.5% SDS

Οι μάρτυρες μοριακών μεγεθών (ladders) παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο ως εξής:

- Για τον λPstI – Ready for loading (60 µl):

- 25 μ l λ PstI
- 25 μ l ddH₂O
- 10 μ l 6x DNA loading dye
- Για τον λ BstEII – Ready for loading (60 μ l):
- 25 μ l λ BstEII
- 25 μ l ddH₂O
- 10 μ l 6x DNA loading dye



Εικόνα 7: Μάρτυρες μοριακών μεγεθών. Αριστερά λ PstI και δεξιά λ BstEII

3.1.3 Πήκτωμα αγαρόζης 1.2%

Αρχικά, έγινε αραιώση του TAE Buffer 50x προς 1x προσθέτοντας 10 ml TAE buffer 50x σε 500 ml dH₂O. Έπειτα, διαλύθηκαν 1.44 gr αγαρόζης σε τελικό όγκο 120 ml TAE buffer 1x με θέρμανση. Όταν το διάλυμα ομογενοποιήθηκε και έγινε διαυγές, προστέθηκαν 3 μ l βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide, EtBr) και τοποθετήθηκε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης μέχρι να στερεοποιηθεί.

3.1.4 Τρυβλία με LB χαμηλής αλατότητας και άγαρ

- Για το LB χαμηλής αλατότητας χρησιμοποιήθηκαν:
- Τρυπτόνη 5g (10 g/L)

Εκχύλισμα ζύμης (Yeast Extract) 2.5 g (5 g/L)

NaCl 2.5g (5 g/L)

Προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 500 ml. Το pH πρέπει να είναι 7.5. Αφού διαμοιράστηκε το LB σε δύο μπουκάλια και στο ένα μπουκάλι, προστέθηκαν 3.75 g άγαρ (15 g/L) της εταιρίας Fluka, αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο. Μετά την αποστείρωση, όταν κατέβηκε η θερμοκρασία στο επιθυμητό σημείο, προστέθηκε το κατάλληλο αντιβιοτικό, 62.5 μl ζεοσίνη της Invitrogen (25 μg/ml από αρχική συγκέντρωση 100 mg/ml). Στην συνέχεια, το υγρό μοιράστηκε στα τρυβλία, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 16–18 ώρες για να πήξουν και τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό σημείο, καθώς η ζεοσίνη είναι φωτοευαίσθητη.

3.1.5 Αντιδραστήρια minipreps

- Διάλυμα επαναδιάλυσης P1

Tris 50 mM (pH 8.0)

EDTA 10 mM (pH 8.0)

RNase A 100 ug/ml

(Αποθήκευση στους 4°C)

- Διάλυμα λύσης P2

NaOH 200 mM

SDS 1% w/v

(Αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου)

- Διάλυμα εξουδετέρωσης

Οξικό κάλιο 3M (pH 5.5)

(Αποθήκευση στους 4°C)

- TE Buffer

Tris 10 mM (pH 8.0)

EDTA 1 mM

3.2 Πειραματικές μέθοδοι

3.2.1 Αντιδράσεις των πλασμιδίων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (digestions) και ηλεκτροφόρηση

Έγινε διαγνωστική αντίδραση περιοριστικών ενδονουκλεάσεων στο πλασμίδιο pTRE-Bio-TEV-LSD1 με τα ένζυμα περιορισμού: NotI (NEB), KpnI (NEB), XhoI (NEB), VspI (Promega) για να ελέγξουμε το πλασμίδιο. Σε ένα eppendorf tube 1.5 ml, προστέθηκαν 1 μl του πλασμιδίου, 1 μl KpnI, 1 μl NEBuffer 1.1 και 7 μl ddH₂O (τελικός όγκος 10 μl). Επώαστηκαν για 1 ώρα, στο υδατόλουτρο, στους 37°C. Έπειτα, προστέθηκαν 1 μl NotI και 1 μl XhoI, 2.5 μl NEBuffer 3.1 και 10,5 μl ddH₂O (τελικός όγκος 25 μl). Επαναλήφθηκε η προηγούμενη επώαση. Τέλος, προστέθηκαν 1 μl από το τελευταίο ένζυμο VspI, 1.83 μl Buffer D και 7.17 μl ddH₂O (τελικός όγκος 35 μl) και επώαστηκαν, όπως προηγουμένως. Μετά την τελική επώαση, έγινε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%. Φορτώθηκαν οι δύο ladders και το πλασμίδιο. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 100V για 30' σε TAE Buffer 1x.

Τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του φορτίου των φωσφορικών ομάδων, μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογης του μεγέθους τους. Με την προσθήκη του EtBr επιτρέπεται η εμφάνιση του DNA έπειτα από έκθεση σε λάμπα UV.

Ακολουθήθηκαν οι αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε μεγάλη κλίμακα και των δύο πλασμιδίων, pTRE-Bio-TEV-LSD1 και pBud-neo. Για το πρώτο πλασμίδιο, έγιναν τρεις διαδοχικές επώσεις για δύομισι ώρες στους 37°C, όπως προηγουμένως με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αλλά με διαφορετικές ποσότητες. Χρησιμοποιήθηκαν 35 μl DNA και 13 μl KpnI, 10 μl NEBuffer 1.1, 42 μl ddH₂O (τελικός όγκος 100 μl). Μετά την επώαση, προστέθηκαν 13 μl NotI και 13 μl XhoI, 15 μl NEBuffer 3.1 και 9 μl ddH₂O (τελικός όγκος 150 μl). Τέλος, προστέθηκαν 13 μl VspI, 10 μl Buffer D, 0.5 μl BSA και 26.6 μl ddH₂O (τελικός όγκος 200 μl).

Για το πλασμίδιο pBud-neo, χρησιμοποιήθηκαν 20 μl DNA και τα ένζυμα KpnI και NotI και πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές επώσεις διάρκειας δύομισι ωρών. Πρώτα, προστέθηκαν το DNA με 7 μl KpnI, 6 μl NEBuffer 1.1 και 27 μl ddH₂O (τελικός όγκος 60 μl) και έπειτα, 7 μl NotI, 10 μl NEBuffer και 23 μl ddH₂O (τελικός όγκος 100 μl).

Από τις παραπάνω αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες σε μεγάλη κλίμακα, λήφθηκαν 1 μl pBud-neo και 2 μl bio-LSD1 και συμπληρώθηκαν με 9 μl και 8 μl ddH₂O, αντίστοιχα, και 2 μl DNA loading dye 6x, ώστε ο τελικός όγκος και των δύο να είναι 12 μl. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε 1.2% πήκτωμα αγαρόζης στα 100V για 30' σε TAE Buffer.

3.2.2 Αποφωσφορυλίωση φορέα pBud-neo

Μετά την αντίδραση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, το γραμμικό πλασμιδιακό DNA του φορέα pBud-neo αποφωσφορυλιώθηκε με την βοήθεια του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση (calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP της Promega). Με αυτό τον τρόπο, απομακρύνεται η φωσφορική ομάδα από το 5' άκρο του πλασμιδίου με συνέπεια να καθίσταται αδύνατη η επανακυκλοποίησή του.

Από τον φορέα pBud-neo, έγινε αποφωσφορυλίωση στα 70 μl προσθέτοντας 10 μl CIAP 10x Reaction Buffer, 4 μl του ενζύμου CIAP και 14 μl ddH₂O (τελικός όγκος 98 μl). Ύστερα από επώαση για 30' στους 37°C, προστέθηκαν επιπλέον 2 μl ενζύμου CIAP (τελικός όγκος 100 μl) και ακολούθησε δεύτερη επώαση, όπως προηγουμένως. Τέλος, προστέθηκε ίση ποσότητα CIAP stop buffer (τελικός όγκος 200 μl).

3.2.3 Καθαρισμός DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για τον καθαρισμό και την απομόνωση των επιθυμητών τμημάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης, χρησιμοποιήθηκε το Gel DNA Recovery Kit της Zymoclean. Σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%, φορτώθηκαν ο αποφωσφορυλιωμένος φορέας pBud-neo (200 μl) και το ένθεμα bio-LSD1 (198 μl) και προστέθηκαν 40 μl 6x DNA loading dye και στα δύο. Χρησιμοποιήθηκαν 12 μl του ladder λBstEII. Η ηλεκτροφόρηση έγινε για 5 ώρες στα 100V σε TAE Buffer 1x. Έπειτα, με την βοήθεια λάμπας UV, από το πήκτωμα αγαρόζης αφαιρέθηκαν με νυστέρι μιας χρήσης οι ζώνες του φορέα μεγέθους 6.766 bp και του ενθέματος μεγέθους 2.685 bp και προσδιορίστηκε το βάρος τους, 1.05 g και 1.81 g αντίστοιχα.

Τα κομμάτια του πηκτώματος, τα οποία περιέχουν το επιθυμητό DNA, διαλύθηκαν προσθέτοντας την τριπλάσια ποσότητα Agarose Dissolving Buffer (ADB). Επώαστηκαν για 10' στους 50°C αναδεύοντας κάθε 2' μέχρι να διαλυθούν τελείως. Έπειτα, μεταφέρθηκε 1 ml από κάθε διάλυμα σε δύο κολόνες Zymo-Spin, οι οποίες τοποθετούνται σε eppendorf tube και φυγοκεντρήθηκαν στα 13000 rpm για 30" σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτεται η κάτω φάση και επαναλαμβάνουμε την φυγοκέντρωση μέχρι να χρησιμοποιηθεί όλη η

ποσότητα. Προστέθηκαν 200 μl DNA Wash Buffer σε κάθε κολόνα, φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 rpm για 30'' σε θερμοκρασία δωματίου και επαναλήφθηκε το βήμα της πλύσης ακόμα μία φορά. Τέλος, τοποθετήθηκαν οι δύο κολόνες Zymo-Spin σε νέα καθαρά 1.5 ml tubes, προστέθηκαν 25 μl ddH₂O και έγινε φυγοκέντρηση μέχρι εκλουθεί το DNA.

3.2.4 Αντίδραση λιγάσης (Σύνδεση διαφορετικών τμημάτων DNA, φορέα και ενθέματος)

Τόσο ο πλασμιδιακός φορέας όσο και το ένθεμα έχουν κοπεί με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα (NotI, KpnI), ώστε να δημιουργηθούν μονόκλιωνα κολλώδη άκρα που είναι συμπληρωματικά. Το επόμενο βήμα είναι ο συνδυασμός των δύο DNA με σκοπό να έρθουν σε επαφή και να συνδεθούν με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα παρουσία της T4 λιγάσης (T4 ligase της Promega) που καταλύει τον σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3' –OH ομάδας στο άκρο μίας αλυσίδας του DNA και της 5' –φωσφορικής ομάδας στο άκρο μίας άλλης. Τελικό αποτέλεσμα είναι η δημιουργία κυκλικών πλασμιδίων.

Για να αλληλεπιδράσουν ο φορέας και το ένθεμα πρέπει ο συνολικός όγκος να είναι 10 μl. Πραγματοποιήθηκαν τρεις αντιδράσεις (ligation), εκ των οποίων η μία αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα. Η σύνδεση έγινε δύο φορές με διαφορετικές ποσότητες φορέα και ενθέματος, 1 μl και 2 μl, ίδιες ποσότητες λιγάσης (1 μl) και 10x buffer (1 μl) και προστέθηκε ddH₂O μέχρι τα 10 μl. Ο αρνητικός μάρτυρας δεν περιείχε ποσότητα ενθέματος. Τα τρία tubes επώαστηκαν για 5 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στους -20°C για 16–18 ώρες.

3.2.5 Μετασχηματισμός (transformation) σε ηλεκτροδεκτικά (electrocompetent) βακτηριακά στελέχη

Ο πολλαπλασιασμός του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου που προέκυψε από την αντίδραση της λιγάσης έγινε με μετασχηματισμό ηλεκτροδεκτικών στελεχών *E.coli* DH5a. Κατά την ηλεκτροδιήθηση (electroporation), στην οποία εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα, δημιουργούνται μικροί πόροι στο κυτταρικό τοίχωμα καθιστώντας δυνατή την εισαγωγή DNA στο κύτταρο ξενιστή. Ο μετασχηματισμός έγινε με 2 μl από κάθε συνενωμένο DNA μετά από την αντίδραση λιγάσης (ligated DNA) και 50 μl από τα κύτταρα DH5a, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε αρνητικός μάρτυρας. Ως αρνητικός μάρτυρας θεωρήθηκαν τα βακτηριακά κύτταρα DH5a στα οποία δεν προστέθηκε το ligated DNA και συνεπώς, δεν λήφθηκαν αποικίες.

Τα κύτταρα DH5a από τους -80°C τοποθετήθηκαν πρώτα σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, για 5 λεπτά στον πάγο, όπως επίσης και οι ειδικές κυβέτες. Ύστερα, προστέθηκαν στις σχισμές των κυβετών τα κύτταρα DH5a και το DNA, ενώ για τον αρνητικό μάρτυρα μόνο τα DH5a. Αναδεύτηκαν και μεταφέρθηκαν στην συσκευή BTX ECM 630. Ρυθμίστηκε το μηχάνημα στα 1600V, 200Ω και 25uF. Η σταθερά χρόνου (time constant) πρέπει να είναι μεταξύ 4-4.5 msec. Κατευθείαν μετά το ηλεκτρικό σοκ, προστέθηκε 1 ml LB χωρίς αντιβιοτικό και μεταφέρθηκαν σε 1.5 ml tube, ώστε να επωαστούν στους 37°C για 1 ώρα, υπό ανάδευση.

3.2.6 Εμβολιασμός τρυβλίων και Υγρές βακτηριακές καλλιέργειες

Έπειτα από τη μία ώρα, τα μετασηματισμένα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 1 λεπτό στις 3000 rpm και απορρίφθηκαν τα 850 μl. Η υπόλοιπη ποσότητα επαναιωρήθηκε και επιστρώθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB χαμηλής αλατότητας (NaCl 5 g/L), το οποίο περιέχει ζεοσίνη (25 μg/ml). Η επιλογή του συγκεκριμένου αντιβιοτικού οφείλεται στο γονίδιο ανθεκτικότητας στην ζεοσίνη που εμπεριέχεται στον φορέα pBud-neo και δίνει την δυνατότητα να αναπτυχθούν μόνο τα μετασηματισμένα κύτταρα που έχουν προσλάβει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Η επίστρωση έγινε με αποστειρωμένο ρύγχος και σε άσηπτες συνθήκες (δίπλα σε λύχνο), κατά την οποία παραλαμβάνεται όλη η ποσότητα (150 μl) και τοποθετήθηκε στο τρυβλίο. Στην συνέχεια, τα κύτταρα «στρώθηκαν» σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου με την βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου, η οποία έχει αποστειρωθεί με αιθανόλη και περαστεί από φλόγα. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στον επωαστήρα στους 37°C χωρίς ανακίνηση για 17 ώρες περίπου.

Την επόμενη μέρα, με την βοήθεια αποστειρωμένου ρύγχους, επιλέχθηκαν τυχαία δεκαεφτά μονές αποικίες ως πιθανοί θετικοί κλώνοι για περαιτέρω έλεγχο. Το ρύγχος τοποθετήθηκε σε 2 ml θρεπτικού μέσου LB χαμηλής αλατότητας με αντιβιοτικό (ζεοσίνη 25 μg/ml). Στόχος των υγρών βακτηριακών καλλιεργειών είναι ο πολλαπλασιασμός. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37°C με ανακίνηση για 16 ώρες περίπου.

3.2.7 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής ποσότητας (Mini-preps)

- Από τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες, φυγοκεντρήθηκε 1.5ml από τέσσερις τυχαίες στις 13000 rpm για 30sec σε θερμοκρασία δωματίου.

- Απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα, ενώ τα ιζήματα επαναδιαλύθηκαν με ανάδευση σε 100 μl διαλύματος P1 και επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προστέθηκαν 200 μl διαλύματος P2 και ανακινήθηκαν κυκλικά 5-6 φορές και επωάστηκαν για 2.5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει η λύση των βακτηριακών κυττάρων. Σε αυτό το σημείο, τα διαλύματα από θολά έγιναν διαφανή.
- Προστέθηκαν 150 μl διαλύματος P3, ανακινήθηκαν 5-6 φορές κυκλικά και επωάστηκαν για 10 λεπτά στον πάγο. Κατά την προσθήκη του διαλύματος, παρατηρείται δημιουργία ιζημάτων που επιπλέουν.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 13000 rpm για 10 λεπτά και έπειτα, μεταφέρθηκαν τα υπερκείμενα σε τέσσερα νέα καθαρά eppendorf.
- Προστέθηκε ίσος όγκος (περίπου 420 μl) χλωροφόρμιο : φαινόλη 1:1 για να διαχωριστούν οι φάσεις, ανακινήθηκαν και τοποθετήθηκαν στον πάγο για 3 λεπτά.
- Φυγοκεντρήθηκαν τα δείγματα στις 13000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και διακρίθηκαν τρεις φάσεις. Σε νέα καθαρά eppendorf, μεταφέρθηκε η άνω υδατινή φάση.
- Προστέθηκε 0.7 όγκος ισοπροπανόλης (περίπου 315 μl), ώστε να κατακρημνιστεί το πλασμιδιακό DNA, και επωάστηκαν στον πάγο για 30 λεπτά.
- Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στην ψυχόμενη φυγόκεντρο (4°C) στις 13000 rpm για 15 λεπτά και απορρίφθηκαν τα υπερκείμενα.
- Προστέθηκαν 400 μl παγωμένης αιθανόλης (Ethanol, EtOH) 70%, έγινε φυγοκέντρωση στις 13000 rpm, για 5 λεπτά στους 4°C και απορρίφθηκε το υπερκείμενο υγρό με προσοχή.
- Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρωση των δειγμάτων χωρίς επιπλέον προσθήκη EtOH 70% και απορρίφθηκε η περίσσεια EtOH.
- Τα δείγματα, τα οποία περιέχουν το πλασμιδιακό DNA σε ίζημα, αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για ελάχιστα λεπτά για να στεγνώσουν.
- Τα δείγματα επαναδιαλύθηκαν με 15 μl TE buffer και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

Έπειτα από τον έλεγχο, έγιναν minipreps και στις υπόλοιπες δεκατρείς υγρές καλλιέργειες ακολουθώντας την ίδια διαδικασία. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες στο ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αρχικά, με το ένζυμο HindIII και στα 17 minipreps και τέλος, επιλέξαμε τέσσερα minipreps (5, 7, 11, 17), στα οποία πραγματοποιήθηκε η αντίδραση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες με τα

ένζυμα BamHI, PvuII, NcoI, NheI, XmaI και PstI. Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν είναι της εταιρίας NEB, εκτός της PstI που είναι της Roche.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Γονίδια στόχοι και πρωτεϊνικά συμπλέγματα των STAT5 και LSD1 σε συμπαγείς καρκίνους

Στο πρώτο μέρος της εργασίας, πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση των γονιδίων στόχων και πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων των παραγόντων STAT5 και LSD1 σε τρεις συμπαγείς καρκίνους. Επιλέχθηκαν οι καρκίνοι του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα. Στους παρακάτω δύο πίνακες, παρουσιάζονται τα γονίδια στόχοι και τα πρωτεϊνικά συμπλέγματα των δύο γονιδίων συγκεντρωτικά:

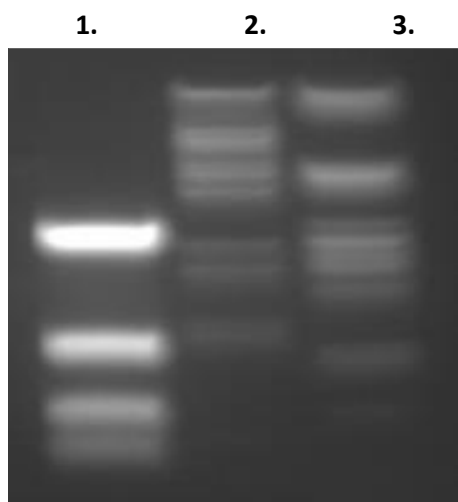
Συμπαγείς καρκίνοι	STAT5	
	Γονίδια στόχοι	Πρωτεϊνικά συμπλέγματα
Καρκίνος του μαστού	<ul style="list-style-type: none">Κυκλίνη D1 και Bclx (Barash, 2012)PTP1B επαγόμενο από PRL (Johnson et al., 2010)	<ul style="list-style-type: none">Πρωτεΐνη TGFα και υποδοχέας EGFR (Humphreys and Hennighausen, 1999)Πρωτεΐνες E-καντερίνης και E-κατενίνης (Sultan et al., 2005)Μονοπάτι σηματοδότησης PI3K/Akt/mTOR (Britschgi et al., 2012)Πρωτεΐνες FGF2 και PR (Cerliani et. al, 2011)Πρωτεΐνη AP-1 επαγόμενη από PRL (Gutzman et al., 2007)
Καρκίνος του ήπατος	<ul style="list-style-type: none">Cdkn2b, Cdkn1a (Baik et al., 2011)mTOR και SREBP1 (Li et al., 2019)IGF-1 (Zhao et al., 2017)	<ul style="list-style-type: none">Κυτοκίνη TGF-β και STAT3 (Hosui et al., 2009)NOX4 και πρωτεΐνες PUMA, BIM (Yu et al., 2012)GRAMD1A (Fu et al., 2016)
Καρκίνος του πνεύμονα	<ul style="list-style-type: none">EGF και COX-2 (Cao et al., 2011)EML4 – ALK (Li et al., 2020)	<ul style="list-style-type: none">COX-2, SOCS, PIAS3 (Pastuszak–Lewandoska et al., 2017)IL-7 (Shi et al., 2019)IL-32γ και ITGAV (Lee et al., 2019)

Συμπαγείς καρκίνοι	LSD1	
	Γονίδια στόχοι	Πρωτεϊνικά συμπλέγματα
Καρκίνος του μαστού	<ul style="list-style-type: none"> • Υποδοχέα ERα και CAC1 (Kim et al., 2012) • Υποδοχέα ERα και ASXL2, UTX, MLL2 (Park et al., 2019) • BRCA1 (Mosammaparast et al., 2013) • HDAC5 (Cao et al., 2017) • GATA3, TRIM37 (Hu et al., 2019) • LEFTY-1 και β-κατενίνη (Ismail et al., 2018) 	<ul style="list-style-type: none"> • USP28 (Wu et al., 2017)
Καρκίνος του ήπατος	<ul style="list-style-type: none"> • GLUT1 (Sakamoto et al., 2015) 	<ul style="list-style-type: none"> • Πρωτεΐνη Lgr5 (Lei et al., 2015) • Notch3 (Liu et al., 2017) • Υποδοχέας NR2E3 και AHR (Khanal et al., 2017)
Καρκίνος του πνεύμονα	<ul style="list-style-type: none"> • Sox2 (Bass et al., 2009 & Hussenet et al., 2010) 	<ul style="list-style-type: none"> • Notch, ASCL1 (Augert et al., 2019) • KLF2, P21, E-καντερίνη, EZH2 (Zang et al., 2016) • LATS2, RRAD (Wei et al., 2016) • LATS2, KLF2, EZH2 (Li et al., 2016)

4.2 Αποτελέσματα των πήκτωμάτων αγαρόζης

4.2.1 Ηλεκτροφόρηση της αντίδρασης με περιοριστικές ενδονουκλεάσες των πλασμιδίων

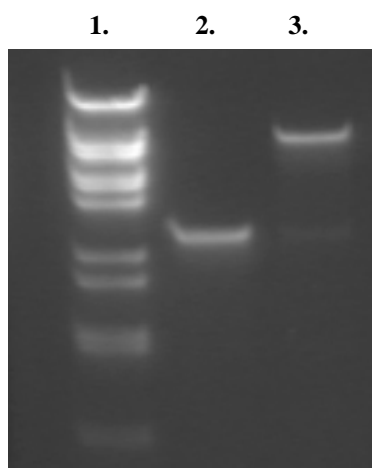
Στις διαγνωστικές αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες του πλασμιδίου pTRE-Bio-TEV-LSD1 με τα ένζυμα NotI, KpnI, XhoI και VspI, προέκυψαν 5 ζώνες, εκ των οποίων η μία δεν είναι ορατή. Οι ζώνες που εμφανίστηκαν είναι με φθίνουσα σειρά 2.685 bp, 1.234 bp, 817 bp, 631 bp και 441 bp.



Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Φορτώθηκαν δύο ladders και το πλασμίδιο ως εξής: 1) 35 μ l pTRE-TEV-Bio-LSD1 + 7 μ l DNA loading dye 6x, 2) 12 μ l λ BstEII, 3) 12 μ l λ PstI

4.2.2 DNA μετά τον έλεγχο καθαρότητας (purified DNA)

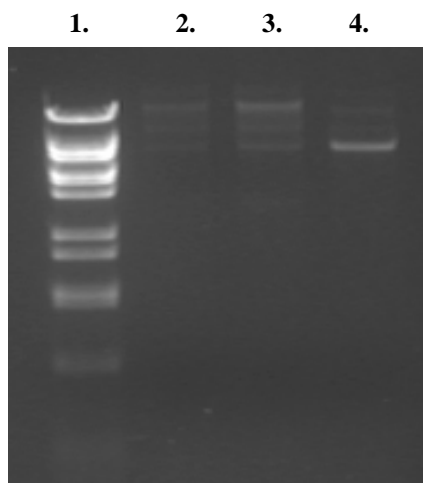
Από τα απομονωμένα DNA, χρησιμοποιήθηκε 1 μ l από το καθένα για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% για να ελεγχθούν οι συγκεντρώσεις των DNA. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 90 V για 35' σε TAE buffer 1x. Οι συγκεντρώσεις κατά προσέγγιση είναι 300 ng για το ένθεμα και 220 ng για τον φορέα, όπως φαίνεται στην εικόνα 9.



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Φορτώθηκαν ως εξής: 1) 12 μ l λ BstEII, 2) 1 μ l ένθεμα + 9 μ l ddH₂O + 2 μ l 6x DNA loading dye, 3) 1 μ l φορέας + 9 μ l ddH₂O + 2 μ l 6x DNA loading dye

4.2.3 Έλεγχος του DNA μετά την αντίδραση λιγάσης (ligated DNA)

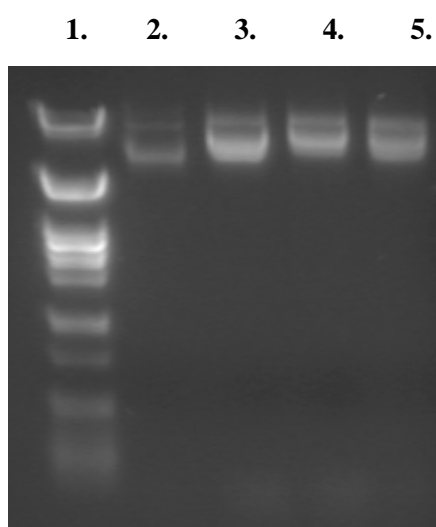
Μετά από επώαση 3 ωρών, χρησιμοποιήθηκε 1 μl για τον έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης σύνδεσης (ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%). Η ηλεκτροφόρηση έγινε για 30' στα 90V σε TAE buffer 1x. Η υπόλοιπη ποσότητα (9 μl) αποθηκεύτηκε στους -20°C.



Εικόνα 10: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης Φορτώθηκαν ως εξής: 1) 12 μl λBstEII, 2) 1 μl ligated DNA (1) + 9 μl ddH₂O + 2 μl 6x DNA loading dye, 3) 1 μl ligated DNA (2) + 9 μl ddH₂O + 2 μl 6x DNA loading dye, 4) Αρνητικός μάρτυρας

4.2.4 Έλεγχος των minipreps

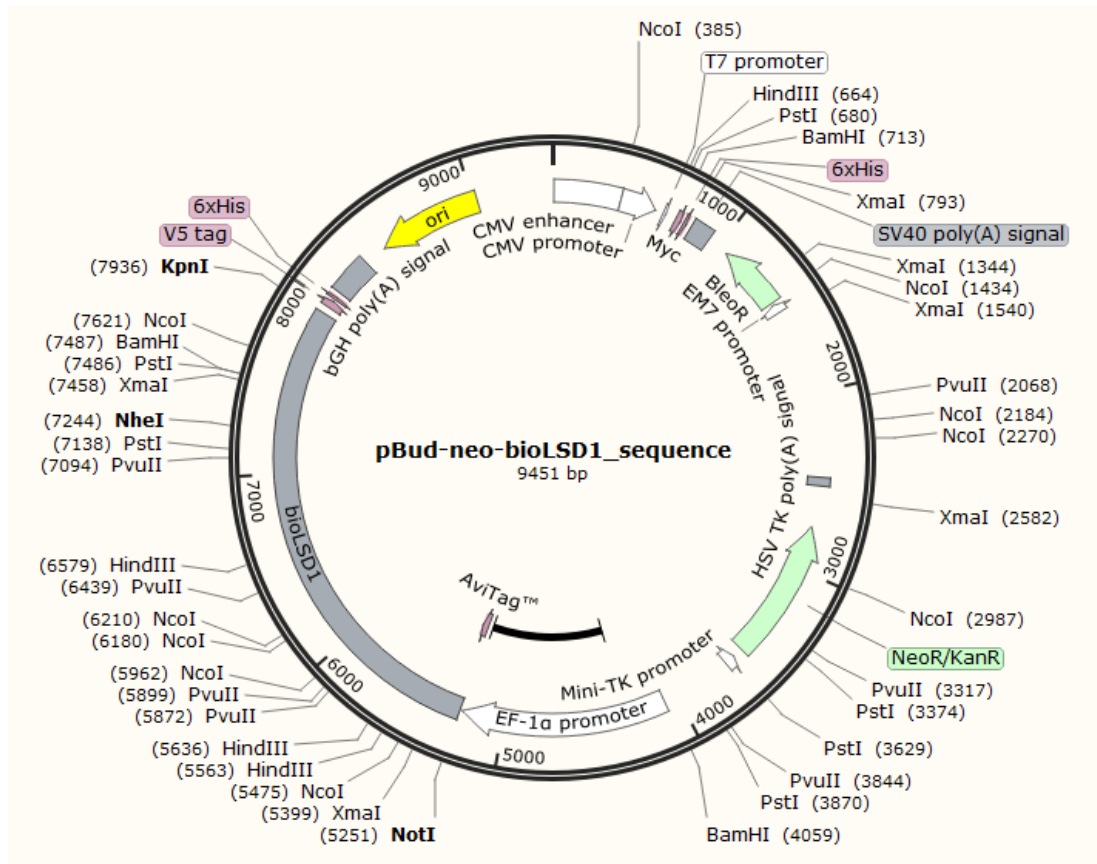
Από τα minipreps, χρησιμοποιήθηκε 1.5μl για έλεγχο της αντίδρασης με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2%. Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 90V για 30 λεπτά σε TAE buffer 1x. Οι ζώνες, οι οποίες φαίνονται στην εικόνα 11, είναι οι αναμενόμενες και αντιστοιχούν σε 9451 bp.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης των minipreps. Φορτώθηκαν ως εξής: 1) 10 μl λPstI, 2) Miniprep1 + 8.5 μl ddH₂O + 2 μl DNA loading dye 6x, 3) Miniprep3 + 8.5 μl ddH₂O + 2 μl DNA loading dye 6x, 4) Miniprep4 + 8.5 μl ddH₂O + 2 μl DNA loading dye 6x, 5) Miniprep13 + 8.5 μl ddH₂O + 2 μl DNA loading dye 6x

4.3 Ανασυνδυασμένο πλασμίδιο

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο φαίνεται στην εικόνα 12. Απεικονίζονται τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, καθώς και κάποια χαρακτηριστικά του πλασμιδίου, όπως το γονίδιο που φέρει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό νεομυκίνη για την μελλοντική διαλογή σταθερών κλώνων σε κύτταρα θηλαστικών.

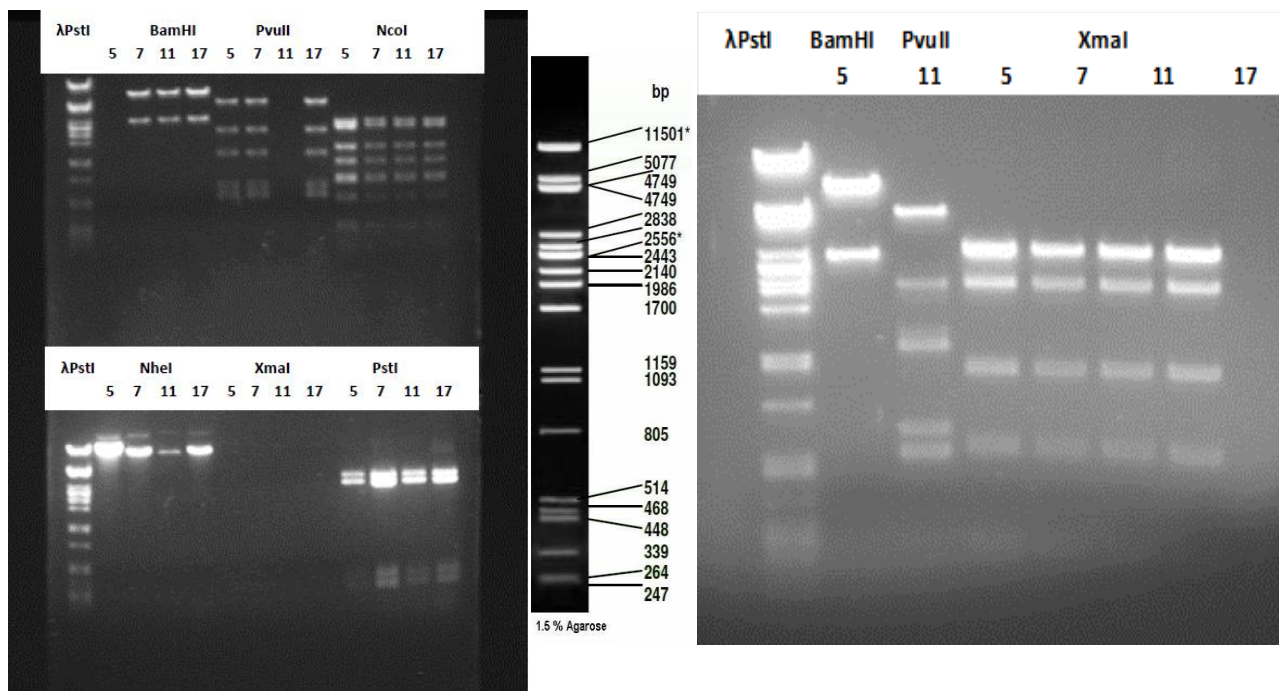


Εικόνα 12: Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBud-neo-Bio-LSD1 με τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις περιοριστικών ενδονουκλεάσεων. Η εικόνα δημιουργήθηκε μέσω του SnapGene.

Η σύνδεση μεταξύ των πλασμιδίων pBud-neo και pTRE-Bio-TEV-LSD1 συνέβη στις θέσεις KpnI και NotI. Από τις 6783 bp του πλασμιδίου pBud-neo, αφαιρέθηκαν 17 bp (6766 bp) μεταξύ των δύο ενζύμων, ενώ από το πλασμίδιο pTRE-Bio-TEV-LSD1, χρησιμοποιήθηκαν 2685 bp, τα οποία αντιστοιχούν στο γονίδιο LSD1 και την βιοτίνη (bio-tag). Εν τέλει, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο αποτελείται από 9451 bp. Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις των πλασμιδίων είναι: 3.3 ug/ul το pBud-neo και 3.642 ug/ul το pTRE-Bio-TEV-LSD1.

4.4 Αποτελέσματα των minipreps

Οι αντιδράσεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες έγιναν με τα ένζυμα περιορισμού: BamHI (NEBuffer 3.1), PvuII (NEBuffer 3.1), NcoI (NEBuffer 3.1), NheI (NEBuffer 2.1), XmaI (CutSmart Buffer), PstI (Buffer H) και HindIII (NEBuffer 2.1).



Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση αγαρόζης. Αποτελέσματα των αντιδράσεων με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Θέσεις του BamHI: 713, 4.059, 7.487

Θραύσματα: 3.428 bp, 3.346 bp, 2.677 bp

Θέσεις του PvuII: 2.068, 3.317, 3.844, 5.872, 5.899, 6.439, 7.094

Θραύσματα: 4.425 bp, 2.028 bp, 1.249 bp, 655 bp, 540 bp, 527 bp, 27 bp

Θέσεις του NcoI: 385, 1.434, 2.184, 2.270, 2.987, 5.475, 5.962, 6.180, 6.210, 7.621

Θραύσματα: 2.488 bp, 2.215 bp, 1.411 bp, 1.049 bp, 750 bp, 717 bp, 487 bp, 218 bp, 86 bp, 30 bp

Θέσεις του NheI: 7.244

Θραύσματα: 9.451 bp

Θέσεις του XmaI: 793, 1.344, 1.540, 2.582, 5.399, 7.458

Θραύσματα: 2.817 bp, 2.786 bp, 2.059 bp, 1.042 bp, 551 bp, 196 bp

Θέσεις του PstI: 680, 3.374, 3.629, 3.870, 7.138, 7.486

Θραύσματα: 3.268 bp, 2.694 bp, 2.645 bp, 348 bp, 255 bp, 241 bp

Θέσεις του HindIII: 664, 5.563, 5.636, 6.579

Θραύσματα: 4.899 bp, 3.536 bp, 943 bp, 73 bp

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα του cDNA του παράγοντα LSD1 και μέσω βακτηριακών κυττάρων (DH5a) θα βοηθήσει να εκφραστεί μελλοντικά σε κύτταρα θηλαστικών, ώστε να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Το επόμενο πειραματικό στάδιο περιλαμβάνει την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA μεσαίας ποσότητας (midipreps) επιλεγμένων κλώνων, την αντίδραση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες με διαφορετικά ένζυμα περιορισμού και ο έλεγχος της αντίδρασης θα επιβεβαιωθεί μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Στην συνέχεια, θα ελεγχθούν οι κλώνοι μέσω αλληλούχισης DNA κατά Sanger.

Μετάπειτα, το cDNA του βιοτινυλιωμένου LSD1 (bio-LSD1) θα εκφραστεί σε κύτταρα θηλαστικών και συγκεκριμένα, στην κυτταρική σειρά Ba/F3, η οποία αποτελείται από κύτταρα pro-B (pro-B cells) προερχόμενα από μύες. Η επιμόλυνση θα γίνει με ηλεκτροδιάτρηση, κατά την οποία ανοίγουν ωπές στο κύτταρο για να δεχτεί το πλασμίδιο bio-LSD1. Το πλασμίδιο, εκτός από τον επιθυμητό κλώνο, θα περιέχει την λιγάση βιοτίνης BirA. Το BirA, το οποίο προέρχεται από την *E. coli*, είναι ένα ένζυμο που έχει την ικανότητα να καταλύει την ομοιοπολική προσκόλληση της βιοτίνης στην αλυσίδα της λυσίνης σε ένα πεπτίδιο 21 αμινοξέων, το bio-tag. Η βιοτίνη είναι ένα μικρό οργανικό μόριο, το οποίο συνδέεται ομοιοπολικά με την αβιδίνη και την στρεπταβιδίνη. Η σύνδεση μεταξύ αυτών των μορίων είναι η πιο ισχυρή μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση γνωστή στην φύση ($K_d = 10^{-15}M$). Η βιοτινυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα δεν αλλάζει ούτε τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις του παράγοντα ούτε την υποπυρηνική του κατανομή. Η βιοτινυλίωση αποτελεί μια μέθοδο καθαρισμού (purification) πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι παράγοντες STAT5 και LSD1 έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση του STAT5 με την LSD1 μπορεί να ρυθμίσει την μεταγραφή, ενεργοποιώντας ή καταστέλλοντας την. Είναι αναγκαίο, λοιπόν, να ταυτοποιηθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους το STAT5 συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση και να διερευνηθούν νέοι αλληλεπιδρώντες παράγοντες ως πιθανοί συν-ρυθμιστές. Επιπλέον, η υπερέκφραση των STAT5 και LSD1 οδηγεί στην ανάπτυξη όγκων και συναντάται σε πολλούς τύπους κακοηθειών, όπως καρκίνος του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα. Το STAT5 και η LSD1 θεωρούνται αναγκαίοι στόχοι για αντικαρκινική θεραπεία και χρειάζεται, συνεπώς, να ανακαλυφθούν νέα γονίδια στόχοι και πρωτεϊνικά συμπλέγματα των STAT5 και LSD1, ώστε να οδηγηθούν σε νέες στρατηγικές αντιμετώπισης των καρκίνων.

Στην παρούσα εργασία, μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης, διερευνήθηκε ο ρόλος των παραγόντων STAT5 και LSD1 μέσω των γονιδίων στόχων και πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων τους σε τρεις συμπαγείς καρκίνους, του μαστού, του ήπατος και του πνεύμονα. Επίσης, δημιουργήθηκε εργαστηριακά μια κατασκευή με το cDNA του LSD1 με την οποία υπάρχει η δυνατότητα μελλοντικά να απομονωθούν πρωτεϊνικά συμπλέγματα του LSD1. Επιπλέον, μέσω του προσδιορισμού νέων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το LSD1, μπορούν να ανακαλυφθούν οι αναστολείς τους και να διερευνηθεί ο ρόλος αυτού του γονιδίου σε καρκινικά κύτταρα. Εν κατακλείδι, η κλωνοποίηση του *LSD1* στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pBud-neo θα είναι χρήσιμη σε μελλοντικές διεργασίες για τη διερεύνηση της δράσης του συγκεκριμένου παράγοντα σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Able AA, Burrell JA, Stephens JM. STAT5-Interacting Proteins: A Synopsis of Proteins that Regulate STAT5 Activity. *Biology (Basel)*. 2017 Mar 11;6(1):20. doi: 10.3390/biology6010020. PMID: 28287479; PMCID: PMC5372013.
2. Abraham RT. Chemokine to the rescue: interleukin-8 mediates resistance to PI3K-pathway-targeted therapy in breast cancer. *Cancer Cell*. 2012 Dec 11;22(6):703-5. doi: 10.1016/j.ccr.2012.11.012. PMID: 23238010.
3. Adamo A, Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC. LSD1 and pluripotency: a new player in the network. *Cell Cycle*. 2011 Oct 1;10(19):3215-6. doi: 10.4161/cc.10.19.17052. Epub 2011 Oct 1. PMID: 21926475.
4. Amente S, Lania L, Majello B. The histone LSD1 demethylase in stemness and cancer transcription programs. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1829(10):981-6. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.05.002. Epub 2013 May 16. PMID: 23684752.
5. Andrisani OM. Deregulation of epigenetic mechanisms by the hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis. *Viruses*. 2013 Mar 18;5(3):858-72. doi: 10.3390/v5030858. PMID: 23507839; PMCID: PMC3705300.
6. Augert A, Eastwood E, Ibrahim AH, Wu N, Grunblatt E, Basom R, Liggitt D, Eaton KD, Martins R, Poirier JT, Rudin CM, Milletti F, Cheng WY, Mack F, MacPherson D. Targeting NOTCH activation in small cell lung cancer through LSD1 inhibition. *Sci Signal*. 2019 Feb 5;12(567):eaau2922. doi: 10.1126/scisignal.aau2922. PMID: 30723171; PMCID: PMC6530478.
7. Baik M, Kim J, Piao MY, Kang HJ, Park SJ, Na SW, Ahn SH, Lee JH. Deletion of liver-specific STAT5 gene alters the expression of bile acid metabolism genes and reduces liver damage in lithogenic diet-fed mice. *J Nutr Biochem*. 2017 Jan;39:59-67. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.09.012. Epub 2016 Oct 11. PMID: 27816761.
8. Baik M, Yu JH, Hennighausen L. Growth hormone-STAT5 regulation of growth, hepatocellular carcinoma, and liver metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jul;1229:29-37. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06100.x. PMID: 21793836; PMCID: PMC3427656.
9. Barash I. Stat5 in the mammary gland: controlling normal development and cancer. *J Cell Physiol*. 2006 Nov;209(2):305-13. doi: 10.1002/jcp.20771. PMID: 16883580.
10. Barash I. Stat5 in breast cancer: potential oncogenic activity coincides with positive prognosis for the disease. *Carcinogenesis*. 2012 Dec;33(12):2320-5. doi: 10.1093/carcin/bgs362. Epub 2012 Nov 16. PMID: 23161573.

11. Basham B, Sathe M, Grein J, McClanahan T, D'Andrea A, Lees E, Rascle A. In vivo identification of novel STAT5 target genes. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jun;36(11):3802-18. doi: 10.1093/nar/gkn271. Epub 2008 May 20. PMID: 18492722; PMCID: PMC2441806.
12. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, Kim SY, Wardwell L, Tamayo P, Gat-Viks I, Ramos AH, Woo MS, Weir BA, Getz G, Beroukhir R, O'Kelly M, Dutt A, Rozenblatt-Rosen O, Dziunycz P, Komisarof J, Chirieac LR, Lafargue CJ, Scheble V, Wilbertz T, Ma C, Rao S, Nakagawa H, Stairs DB, Lin L, Giordano TJ, Wagner P, Minna JD, Gazdar AF, Zhu CQ, Brose MS, Cecconello I, Ribeiro U Jr, Marie SK, Dahl O, Shivdasani RA, Tsao MS, Rubin MA, Wong KK, Regev A, Hahn WC, Beer DG, Rustgi AK, Meyerson M. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2009 Nov;41(11):1238-42. doi: 10.1038/ng.465. Epub 2009 Oct 4. PMID: 19801978; PMCID: PMC2783775.
13. Britschgi A, Andraos R, Brinkhaus H, Klebba I, Romanet V, Müller U, Murakami M, Radimerski T, Bentires-Alj M. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell.* 2012 Dec 11;22(6):796-811. doi: 10.1016/j.ccr.2012.10.023. PMID: 23238015.
14. Buitenhuis M, Coffey PJ, Koenderman L. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5). *Int J Biochem Cell Biol.* 2004 Nov;36(11):2120-4. doi: 10.1016/j.biocel.2003.11.008. PMID: 15313458.
15. Cao C, Vasilatos SN, Bhargava R, Fine JL, Oesterreich S, Davidson NE, Huang Y. Functional interaction of histone deacetylase 5 (HDAC5) and lysine-specific demethylase 1 (LSD1) promotes breast cancer progression. *Oncogene.* 2017 Jan 5;36(1):133-145. doi: 10.1038/onc.2016.186. Epub 2016 May 23. PMID: 27212032; PMCID: PMC5121103.
16. Cao S, Yan Y, Zhang X, Zhang K, Liu C, Zhao G, Han J, Dong Q, Shen B, Wu A, Cui J. EGF stimulates cyclooxygenase-2 expression through the STAT5 signaling pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int J Oncol.* 2011 Aug;39(2):383-91. doi: 10.3892/ijo.2011.1053. Epub 2011 May 23. PMID: 21617857.
17. Cerliani JP, Guillardoy T, Giulianelli S, Vaque JP, Gutkind JS, Vanzulli SI, Martins R, Zeitlin E, Lamb CA, Lanari C. Interaction between FGFR-2, STAT5, and progesterone receptors in breast cancer. *Cancer Res.* 2011 May 15;71(10):3720-31. doi:

- 10.1158/0008-5472.CAN-10-3074. Epub 2011 Apr 4. Erratum in: *Cancer Res.* 2011 Sep 1;71(17):5941. PMID: 21464042.
18. Clancy, S. (2008) DNA transcription. *Nature Education* 1(1):41
 19. Cotarla I, Ren S, Zhang Y, Gehan E, Singh B, Furth PA. Stat5a is tyrosine phosphorylated and nuclear localized in a high proportion of human breast cancers. *Int J Cancer.* 2004 Feb 20;108(5):665-71. doi: 10.1002/ijc.11619. PMID: 14696092.
 20. Culhane JC, Cole PA. LSD1 and the chemistry of histone demethylation. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Oct;11(5):561-8. doi: 10.1016/j.cbpa.2007.07.014. Epub 2007 Sep 11. PMID: 17851108; PMCID: PMC2112775.
 21. de Boer E, Rodriguez P, Bonte E, Krijgsveld J, Katsantoni E, Heck A, Grosveld F, Strouboulis J. Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7480-5. doi: 10.1073/pnas.1332608100. Epub 2003 Jun 11. PMID: 12802011; PMCID: PMC164612.
 22. Eilon T, Barash I. Distinct gene-expression profiles characterize mammary tumors developed in transgenic mice expressing constitutively active and C-terminally truncated variants of STAT5. *BMC Genomics.* 2009 May 18;10:231. doi: 10.1186/1471-2164-10-231. PMID: 19450255; PMCID: PMC2689279.
 23. Fairhead M, Howarth M. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods Mol Biol.* 2015;1266:171-84. doi: 10.1007/978-1-4939-2272-7_12. PMID: 25560075; PMCID: PMC4304673.
 24. Fang Y, Yang C, Yu Z, Li X, Mu Q, Liao G, Yu B. Natural products as LSD1 inhibitors for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2020 Jun 20. doi: 10.1016/j.apsb.2020.06.007. Epub ahead of print. PMID: 32837872; PMCID: PMC7305746.
 25. Fang Y, Liao G, Yu B. LSD1/KDM1A inhibitors in clinical trials: advances and prospects. *J Hematol Oncol.* 2019 Dec 4;12(1):129. doi: 10.1186/s13045-019-0811-9. PMID: 31801559; PMCID: PMC6894138.
 26. Ferbeyre G, Moriggl R. The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jan;1815(1):104-14. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.10.004. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20969928.
 27. Friedbichler K, Themanns M, Mueller KM, Schleder M, Kornfeld JW, Terracciano LM, Kozlov AV, Haindl S, Kenner L, Kolbe T, Mueller M, Snibson KJ, Heim MH, Moriggl R. Growth-hormone-induced signal transducer and activator of transcription 5 signaling causes gigantism, inflammation, and premature death but protects mice from

- aggressive liver cancer. *Hepatology*. 2012 Mar;55(3):941-52. doi: 10.1002/hep.24765. Epub 2012 Jan 13. PMID: 22031092.
28. Fu B, Meng W, Zhao H, Zhang B, Tang H, Zou Y, Yao J, Li H, Zhang T. GRAM domain-containing protein 1A (GRAMD1A) promotes the expansion of hepatocellular carcinoma stem cell and hepatocellular carcinoma growth through STAT5. *Sci Rep*. 2016 Sep 2;6:31963. doi: 10.1038/srep31963. PMID: 27585821; PMCID: PMC5009375.
 29. Gan Y, Zhang Y, Buckels A, Paterson AJ, Jiang J, Clemens TL, Zhang ZY, Du K, Chang Y, Frank SJ. IGF-1R modulation of acute GH-induced STAT5 signaling: role of protein tyrosine phosphatase activity. *Mol Endocrinol*. 2013 Nov;27(11):1969-79. doi: 10.1210/me.2013-1178. Epub 2013 Sep 12. PMID: 24030252; PMCID: PMC3805849.
 30. Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J Leukoc Biol*. 2001 Sep;70(3):348-56. PMID: 11527983.
 31. Gutzman JH, Rugowski DE, Nikolai SE, Schuler LA. Stat5 activation inhibits prolactin-induced AP-1 activity: distinct prolactin-initiated signals in tumorigenesis dependent on cell context. *Oncogene*. 2007 Sep 20;26(43):6341-8. doi: 10.1038/sj.onc.1210454. Epub 2007 Apr 16. PMID: 17438530; PMCID: PMC3190200.
 32. Halim CE, Deng S, Ong MS, Yap CT. Involvement of STAT5 in Oncogenesis. *Biomedicines*. 2020 Aug 28;8(9):316. doi: 10.3390/biomedicines8090316. PMID: 32872372; PMCID: PMC7555335.
 33. Hayward D, Cole PA. LSD1 Histone Demethylase Assays and Inhibition. *Methods Enzymol*. 2016;573:261-78. doi: 10.1016/bs.mie.2016.01.020. Epub 2016 Feb 23. PMID: 27372757; PMCID: PMC5178825.
 34. Hennighausen L, Robinson GW, Wagner KU, Liu X. Developing a mammary gland is a stat affair. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1997 Oct;2(4):365-72. doi: 10.1023/a:1026347313096. PMID: 10935024.
 35. Hosui A, Kimura A, Yamaji D, Zhu BM, Na R, Hennighausen L. Loss of STAT5 causes liver fibrosis and cancer development through increased TGF- β and STAT3 activation. *J Exp Med*. 2009 Apr 13;206(4):819-31. doi: 10.1084/jem.20080003. Epub 2009 Mar 30. PMID: 19332876; PMCID: PMC2715112.
 36. Hu X, Xiang D, Xie Y, Tao L, Zhang Y, Jin Y, Pinello L, Wan Y, Yuan GC, Li Z. LSD1 suppresses invasion, migration and metastasis of luminal breast cancer cells via activation of GATA3 and repression of TRIM37 expression. *Oncogene*. 2019

- Oct;38(44):7017-7034. doi: 10.1038/s41388-019-0923-2. Epub 2019 Aug 13. PMID: 31409898; PMCID: PMC6823153.
37. Huang Y, Vasilatos SN, Boric L, Shaw PG, Davidson NE. Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Feb;131(3):777-89. doi: 10.1007/s10549-011-1480-8. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21452019; PMCID: PMC3624096.
38. Humphreys RC, Hennighausen L. Transforming growth factor alpha and mouse models of human breast cancer. *Oncogene.* 2000 Feb 21;19(8):1085-91. doi: 10.1038/sj.onc.1203278. PMID: 10713694.
39. Hussenet T, Dali S, Exinger J, Monga B, Jost B, Dembelé D, Martinet N, Thibault C, Huelsken J, Brambilla E, du Manoir S. SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One.* 2010 Jan 29;5(1):e8960. doi: 10.1371/journal.pone.0008960. PMID: 20126410; PMCID: PMC2813300.
40. Igelmann S, Neubauer HA, Ferbeyre G. STAT3 and STAT5 Activation in Solid Cancers. *Cancers (Basel).* 2019 Sep 25;11(10):1428. doi: 10.3390/cancers11101428. PMID: 31557897; PMCID: PMC6826753.
41. Ismail T, Lee HK, Kim C, Kwon T, Park TJ, Lee HS. KDM1A microenvironment, its oncogenic potential, and therapeutic significance. *Epigenetics Chromatin.* 2018 Jun 19;11(1):33. doi: 10.1186/s13072-018-0203-3. PMID: 29921310; PMCID: PMC6006565.
42. Johnson KJ, Peck AR, Liu C, Tran TH, Utama FE, Sjolund AB, Schaber JD, Witkiewicz AK, Rui H. PTP1B suppresses prolactin activation of Stat5 in breast cancer cells. *Am J Pathol.* 2010 Dec;177(6):2971-83. doi: 10.2353/ajpath.2010.090399. Epub 2010 Oct 15. PMID: 20952588; PMCID: PMC2993292.
43. Kaiser, P., Huang, L. Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol* 6, 233 (2005). <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-233>
44. Kaltenecker D, Themanns M, Mueller KM, Spirk K, Suske T, Merkel O, Kenner L, Luís A, Kozlov A, Haybaeck J, Müller M, Han X, Moriggl R. Hepatic growth hormone - JAK2 - STAT5 signalling: Metabolic function, non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma progression. *Cytokine.* 2019 Dec;124:154569. doi: 10.1016/j.cyto.2018.10.010. Epub 2018 Oct 30. PMID: 30389231.

45. Karakaidos P, Verigos J, Magklara A. LSD1/KDM1A, a Gate-Keeper of Cancer Stemness and a Promising Therapeutic Target. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 20;11(12):1821. doi: 10.3390/cancers11121821. PMID: 31756917; PMCID: PMC6966601.
46. Katsantoni E. Protein complexes and target genes identification by in vivo biotinylation: the STAT5 paradigm. *Sci Signal*. 2012 Oct 30;5(248):pt13. doi: 10.1126/scisignal.2003622. Erratum in: *Sci Signal*. 2012 Nov;5(252):er7. PMID: 23112345.
47. Kenerson HL, Yeh MM, Kazami M, Jiang X, Riehle KJ, McIntyre RL, Park JO, Kwon S, Campbell JS, Yeung RS. Akt and mTORC1 have different roles during liver tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*. 2013 May;144(5):1055-65. doi: 10.1053/j.gastro.2013.01.053. Epub 2013 Jan 30. PMID: 23376645; PMCID: PMC3633657.
48. Khanal T, Choi K, Leung YK, Wang J, Kim D, Janakiram V, Cho SG, Puga A, Ho SM, Kim K. Loss of NR2E3 represses AHR by LSD1 reprogramming, is associated with poor prognosis in liver cancer. *Sci Rep*. 2017 Sep 6;7(1):10662. doi: 10.1038/s41598-017-11106-2. PMID: 28878246; PMCID: PMC5587550.
49. Kim J, Park UH, Moon M, Um SJ, Kim EJ. Negative regulation of ER α by a novel protein CAC1 through association with histone demethylase LSD1. *FEBS Lett*. 2013 Jan 4;587(1):17-22. doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.054. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23178685.
50. Kim S, Bolatkan A, Kaneko S, Ikawa N, Asada K, Komatsu M, Hayami S, Ojima H, Abe N, Yamaue H, Hamamoto R. Dereglulation of the Histone Lysine-Specific Demethylase 1 Is Involved in Human Hepatocellular Carcinoma. *Biomolecules*. 2019 Dec 1;9(12):810. doi: 10.3390/biom9120810. PMID: 31805626; PMCID: PMC6995592.
51. Koirala S, Thomas LN, Too CK. Prolactin/Stat5 and androgen R1881 coactivate carboxypeptidase-D gene in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2014 Mar;28(3):331-43. doi: 10.1210/me.2013-1202. Epub 2014 Jan 16. PMID: 24433040; PMCID: PMC5414930.
52. Kozub MM, Carr RM, Lomberk GL, Fernandez-Zapico ME. LSD1, a double-edged sword, confers dynamic chromatin regulation but commonly promotes aberrant cell growth. *F1000Res*. 2017 Nov 16;6:2016. doi: 10.12688/f1000research.12169.1. PMID: 29225781; PMCID: PMC5691370.

53. Krebs J., Coldstein E., Kilpatrick S., Lewin' s Genes X, 10th ed., Jones and Bartlett Publishers. Sudbury 2011
54. Lan F, Nottke AC, Shi Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Jun;20(3):316-25. doi: 10.1016/j.ceb.2008.03.004. Epub 2008 Apr 25. PMID: 18440794; PMCID: PMC2674377.
55. Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Dec;29(12):1305-12. doi: 10.1016/s1357-2725(97)00085-x. PMID: 9570129.
56. LeBaron MJ, Xie J, Rui H. Evaluation of genome-wide chromatin library of Stat5 binding sites in human breast cancer. *Mol Cancer.* 2005 Feb 1;4(1):6. doi: 10.1186/1476-4598-4-6. PMID: 15686596; PMCID: PMC549029.
57. Lee TK, Man K, Poon RT, Lo CM, Yuen AP, Ng IO, Ng KT, Leonard W, Fan ST. Signal transducers and activators of transcription 5b activation enhances hepatocellular carcinoma aggressiveness through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2006 Oct 15;66(20):9948-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1092. PMID: 17047057.
58. Lee, Y.S., Kim, K.C., Mongre, R.K. et al. IL-32 γ suppresses lung cancer stem cell growth via inhibition of ITGAV-mediated STAT5 pathway. *Cell Death Dis* 10, 506 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1737-4>
59. Lei ZJ, Wang J, Xiao HL, Guo Y, Wang T, Li Q, Liu L, Luo X, Fan LL, Lin L, Mao CY, Wang SN, Wei YL, Lan CH, Jiang J, Yang XJ, Liu PD, Chen DF, Wang B. Lysine-specific demethylase 1 promotes the stemness and chemoresistance of Lgr5(+) liver cancer initiating cells by suppressing negative regulators of β -catenin signaling. *Oncogene.* 2015 Jun 11;34(24):3188-98. doi: 10.1038/onc.2015.129. Epub 2015 Apr 20. Erratum in: *Oncogene.* 2015 Jun 11;34(24):3214. PMID: 25893304.
60. Lewin B., *Genes VIII*, Pearson Prentice Hall. NJ 2004
61. Li, T., Weng, J., Zhang, Y. et al. mTOR direct crosstalk with STAT5 promotes de novo lipid synthesis and induces hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 10, 619 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1828-2>
62. Li W, Sun M, Zang C, Ma P, He J, Zhang M, Huang Z, Ding Y, Shu Y. Upregulated long non-coding RNA AGAP2-AS1 represses LATS2 and KLF2 expression through interacting with EZH2 and LSD1 in non-small-cell lung cancer cells. *Cell Death Dis.* 2016 May 19;7(5):e2225. doi: 10.1038/cddis.2016.126. PMID: 27195672; PMCID: PMC4917662.

63. Li Y, Sousa R. Expression and purification of E. coli BirA biotin ligase for in vitro biotinylation. *Protein Expr Purif.* 2012 Mar;82(1):162-7. doi: 10.1016/j.pep.2011.12.008. Epub 2012 Jan 2. PMID: 22227598; PMCID: PMC3288220.
64. Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schüle R, Buettner R, Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis.* 2010 Mar;31(3):512-20. doi: 10.1093/carcin/bgp324. Epub 2009 Dec 30. PMID: 20042638.
65. Litterst CM, Kliem S, Lodrini M, Pfitzner E. Coactivators in gene regulation by STAT5. *Vitam Horm.* 2005;70:359-86. doi: 10.1016/S0083-6729(05)70012-1. PMID: 15727811.
66. Liu Y, Lin H, Jiang L, Shang Q, Yin L, Lin JD, Wu WS, Rui L. Hepatic Slug epigenetically promotes liver lipogenesis, fatty liver disease, and type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2020 Jun 1;130(6):2992-3004. doi: 10.1172/JCI128073. PMID: 32365055; PMCID: PMC7260003.
67. Liu C, Liu L, Chen X, Cheng J, Zhang H, Zhang C, Shan J, Shen J, Qian C. LSD1 Stimulates Cancer-Associated Fibroblasts to Drive Notch3-Dependent Self-Renewal of Liver Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res.* 2018 Feb 15;78(4):938-949. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1236. Epub 2017 Dec 19. PMID: 29259010.
68. Luka Z, Pakhomova S, Loukachevitch LV, Calcutt MW, Newcomer ME, Wagner C. Crystal structure of the histone lysine specific demethylase LSD1 complexed with tetrahydrofolate. *Protein Sci.* 2014 Jul;23(7):993-8. doi: 10.1002/pro.2469. Epub 2014 Apr 18. PMID: 24715612; PMCID: PMC4088983.
69. Lv T, Yuan D, Miao X, Lv Y, Zhan P, Shen X, Song Y. Over-expression of LSD1 promotes proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *PLoS One.* 2012;7(4):e35065. doi: 10.1371/journal.pone.0035065. Epub 2012 Apr 6. PMID: 22493729; PMCID: PMC3320866.
70. Macheleidt IF, Dalvi PS, Lim SY, Meemboor S, Meder L, Käsgen O, Müller M, Kleemann K, Wang L, Nürnberg P, Rüsseler V, Schäfer SC, Mahabir E, Büttner R, Odenthal M. Preclinical studies reveal that LSD1 inhibition results in tumor growth arrest in lung adenocarcinoma independently of driver mutations. *Mol Oncol.* 2018 Nov;12(11):1965-1979. doi: 10.1002/1878-0261.12382. Epub 2018 Oct 13. PMID: 30220105; PMCID: PMC6210049.
71. Majello B, Gorini F, Saccà CD, Amente S. Expanding the Role of the Histone Lysine-Specific Demethylase LSD1 in Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Mar 7;11(3):324. doi: 10.3390/cancers11030324. PMID: 30866496; PMCID: PMC6468368.

72. Morgan A, LeGresley S, Fischer C. Remodeler Catalyzed Nucleosome Repositioning: Influence of Structure and Stability. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 23;22(1):76. doi: 10.3390/ijms22010076. PMID: 33374740; PMCID: PMC7793527.
73. Mosammaparast N, Kim H, Laurent B, Zhao Y, Lim HJ, Majid MC, Dango S, Luo Y, Hempel K, Sowa ME, Gygi SP, Steen H, Harper JW, Yankner B, Shi Y. The histone demethylase LSD1/KDM1A promotes the DNA damage response. *J Cell Biol.* 2013 Nov 11;203(3):457-70. doi: 10.1083/jcb.201302092. PMID: 24217620; PMCID: PMC3824007.
74. Nanou A, Toumpeki C, Lavigne MD, Lazou V, Demmers J, Paparountas T, Thanos D, Katsantoni E. The dual role of LSD1 and HDAC3 in STAT5-dependent transcription is determined by protein interactions, binding affinities, motifs and genomic positions. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 9;45(1):142-154. doi: 10.1093/nar/gkw832. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27651463; PMCID: PMC5224505.
75. Nevalainen MT, Xie J, Torhorst J, Bubendorf L, Haas P, Kononen J, Sauter G, Rui H. Signal transducer and activator of transcription-5 activation and breast cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2004 Jun 1;22(11):2053-60. doi: 10.1200/JCO.2004.11.046. PMID: 15169792.
76. Orlova A, Wagner C, de Araujo ED, Bajusz D, Neubauer HA, Herling M, Gunning PT, Keserű GM, Moriggl R. Direct Targeting Options for STAT3 and STAT5 in Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Dec 3;11(12):1930. doi: 10.3390/cancers11121930. PMID: 31817042; PMCID: PMC6966570.
77. Park UH, Kang MR, Kim EJ, Kwon YS, Hur W, Yoon SK, Song BJ, Park JH, Hwang JT, Jeong JC, Um SJ. ASXL2 promotes proliferation of breast cancer cells by linking ER α to histone methylation. *Oncogene.* 2016 Jul 14;35(28):3742-52. doi: 10.1038/onc.2015.443. Epub 2015 Dec 7. PMID: 26640146.
78. Pastuszek-Lewandoska D, Domańska-Senderowska D, Kordiak J, Antczak A, Czarnecka KH, Migdalska-Sęk M, Nawrot E, Kiszalkiewicz JM, Brzezińska-Lasota E. Immunoexpression analysis of selected JAK/STAT pathway molecules in patients with non- small-cell lung cancer. *Pol Arch Intern Med.* 2017 Nov 30;127(11):758-764. doi: 10.20452/pamw.4115. Epub 2017 Sep 30. PMID: 28972958.
79. Petrova YI, Schecterson L, Gumbiner BM. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell.* 2016 Nov 1;27(21):3233-3244. doi: 10.1091/mbc.E16-01-0058. Epub 2016 Aug 31. PMID: 27582386; PMCID: PMC5170857.

80. Phillips, T. & Hoopes, L.(2008) Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education* 1(1):119
81. Rani A, Murphy JJ. STAT5 in Cancer and Immunity. *J Interferon Cytokine Res.* 2016 Apr;36(4):226-37. doi: 10.1089/jir.2015.0054. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26716518.
82. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci.* 2004 Mar 15;117(Pt 8):1281-3. doi: 10.1242/jcs.00963. PMID: 15020666.
83. Robledo T, Arriaga-Pizano L, Lopez-Pérez M, Salazar EP. Type IV collagen induces STAT5 activation in MCF7 human breast cancer cells. *Matrix Biol.* 2005 Oct;24(7):469-77. doi: 10.1016/j.matbio.2005.07.004. Epub 2005 Sep 1. PMID: 16139998.
84. Sakamoto A, Hino S, Nagaoka K, Anan K, Takase R, Matsumori H, Ojima H, Kanai Y, Arita K, Nakao M. Lysine Demethylase LSD1 Coordinates Glycolytic and Mitochondrial Metabolism in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 2015 Apr 1;75(7):1445-56. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1560. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25649769.
85. Shi L, Xu Z, Yang Q, Huang Y, Gong Y, Wang F, Ke B. IL-7-Mediated IL-7R-JAK3/STAT5 signalling pathway contributes to chemotherapeutic sensitivity in non-small-cell lung cancer. *Cell Prolif.* 2019 Nov;52(6):e12699. doi: 10.1111/cpr.12699. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31599032; PMCID: PMC6869130.
86. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004 Dec 29;119(7):941-53. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.012. PMID: 15620353.
87. Si W, Zhao Y, Zhou J, Zhang Q, Zhang Y. The coordination between ZNF217 and LSD1 contributes to hepatocellular carcinoma progress and is negatively regulated by miR-101. *Exp Cell Res.* 2019 Jun 1;379(1):1-10. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.017. Epub 2019 Mar 18. PMID: 30898548.
88. Sperling S. Transcriptional regulation at a glance. *BMC Bioinformatics.* 2007 Sep 27;8 Suppl 6(Suppl 6):S2. doi: 10.1186/1471-2105-8-S6-S2. PMID: 17903283; PMCID: PMC1995546.
89. Sultan AS, Xie J, LeBaron MJ, Ealley EL, Nevalainen MT, Rui H. Stat5 promotes homotypic adhesion and inhibits invasive characteristics of human breast cancer cells. *Oncogene.* 2005 Jan 27;24(5):746-60. doi: 10.1038/sj.onc.1208203. PMID: 15592524.
90. Tweardy D, Chang JC. Stat5: from breast development to cancer prognosis, prediction, and progression. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 20;29(18):2443-4. doi: 10.1200/JCO.2010.34.2014. Epub 2011 May 16. PMID: 21576641.

91. Vasilatos SN, Katz TA, Oesterreich S, Wan Y, Davidson NE, Huang Y. Crosstalk between lysine-specific demethylase 1 (LSD1) and histone deacetylases mediates antineoplastic efficacy of HDAC inhibitors in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013 Jun;34(6):1196-207. doi: 10.1093/carcin/bgt033. Epub 2013 Jan 25. PMID: 23354309; PMCID: PMC3670252.
92. Wagner KU, Rui H. Jak2/Stat5 signaling in mammaryogenesis, breast cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008 Mar;13(1):93-103. doi: 10.1007/s10911-008-9062-z. Epub 2008 Jan 29. PMID: 18228120.
93. Walker SR, Nelson EA, Zou L, Chaudhury M, Signoretti S, Richardson A, Frank DA. Reciprocal effects of STAT5 and STAT3 in breast cancer. *Mol Cancer Res*. 2009 Jun;7(6):966-76. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0238. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19491198.
94. Walker SR, Xiang M, Frank DA. Distinct roles of STAT3 and STAT5 in the pathogenesis and targeted therapy of breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jan 25;382(1):616-621. doi: 10.1016/j.mce.2013.03.010. Epub 2013 Mar 24. PMID: 23531638; PMCID: PMC3732813.
95. Wang P, Wang Z, Liu J. Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis. *Mol Cancer*. 2020 Jan 7;19(1):5. doi: 10.1186/s12943-019-1127-7. Erratum in: *Mol Cancer*. 2020 Mar 12;19(1):55. PMID: 31910827; PMCID: PMC6945581.
96. Wang Y, Schafer CC, Hough KP, Tousif S, Duncan SR, Kearney JF, Ponnazhagan S, Hsu HC, Deshane JS. Myeloid-Derived Suppressor Cells Impair B Cell Responses in Lung Cancer through IL-7 and STAT5. *J Immunol*. 2018 Jul 1;201(1):278-295. doi: 10.4049/jimmunol.1701069. Epub 2018 May 11. PMID: 29752311; PMCID: PMC6008229.
97. Wei CC, Nie FQ, Jiang LL, Chen QN, Chen ZY, Chen X, Pan X, Liu ZL, Lu BB, Wang ZX. The pseudogene DUXAP10 promotes an aggressive phenotype through binding with LSD1 and repressing LATS2 and RRAD in non small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2017 Jan 17;8(3):5233-5246. doi: 10.18632/oncotarget.14125. PMID: 28029651; PMCID: PMC5354904.
98. Wingelhofer B, Neubauer HA, Valent P, Han X, Constantinescu SN, Gunning PT, Müller M, Moriggl R. Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer. *Leukemia*. 2018 Aug;32(8):1713-1726. doi: 10.1038/s41375-018-0117-x. Epub 2018 Mar 27. PMID: 29728695; PMCID: PMC6087715.

99. Wu Y, Wang Y, Yang XH, Kang T, Zhao Y, Wang C, Evers BM, Zhou BP. The deubiquitinase USP28 stabilizes LSD1 and confers stem-cell-like traits to breast cancer cells. *Cell Rep.* 2013 Oct 17;5(1):224-36. doi: 10.1016/j.celrep.2013.08.030. Epub 2013 Sep 26. PMID: 24075993; PMCID: PMC4004762.
100. Wu Y, Zhou BP. Epigenetic regulation of LSD1 during mammary carcinogenesis. *Mol Cell Oncol.* 2014 Dec 23;1(3):e963426. doi: 10.4161/21624011.2014.963426. PMID: 27308339; PMCID: PMC4904887.
101. Xu, L., Lin, W., Wen, L. et al. Lgr5 in cancer biology: functional identification of Lgr5 in cancer progression and potential opportunities for novel therapy. *Stem Cell Res Ther* 10, 219 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1288-8>
102. Yamashita H, Iwase H. The role of Stat5 in estrogen receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer.* 2002;9(4):312-8. doi: 10.1007/BF02967610. PMID: 12459712.
103. Yang GJ, Lei PM, Wong SY, Ma DL, Leung CH. Pharmacological Inhibition of LSD1 for Cancer Treatment. *Molecules.* 2018 Dec 4;23(12):3194. doi: 10.3390/molecules23123194. PMID: 30518104; PMCID: PMC6320820.
104. Yu JH, Zhu BM, Riedlinger G, Kang K, Hennighausen L. The liver-specific tumor suppressor STAT5 controls expression of the reactive oxygen species-generating enzyme NOX4 and the proapoptotic proteins PUMA and BIM in mice. *Hepatology.* 2012 Dec;56(6):2375-86. doi: 10.1002/hep.25900. PMID: 22711600; PMCID: PMC3505809.
105. Zang C, Nie FQ, Wang Q, Sun M, Li W, He J, Zhang M, Lu KH. Long non-coding RNA LINC01133 represses KLF2, P21 and E-cadherin transcription through binding with EZH2, LSD1 in non small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016 Mar 8;7(10):11696-707. doi: 10.18632/oncotarget.7077. PMID: 26840083; PMCID: PMC4905504.
106. Zdenko Herceg, Rabih Murr, Chapter 3 - Mechanisms of Histone Modifications, Editor(s): Trygve Tollefsbol, *Handbook of Epigenetics*, Academic Press, 2011, Pages 25-45, ISBN 9780123757098, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375709-8.00003-4>. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123757098000034>) Abstract: Publisher Summary
107. Zhang X, Lu F, Wang J, Yin F, Xu Z, Qi D, Wu X, Cao Y, Liang W, Liu Y, Sun H, Ye T, Zhang H. Pluripotent stem cell protein Sox2 confers sensitivity to LSD1 inhibition in cancer cells. *Cell Rep.* 2013 Oct 31;5(2):445-57. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.018. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24139802.
108. Zhao C, Wang Q, Wang B, Sun Q, He Z, Hong J, Kuehn F, Liu E, Zhang Z. IGF-1 induces the epithelial-mesenchymal transition via Stat5 in hepatocellular carcinoma.

Oncotarget. 2017 Dec 5;8(67):111922-111930. doi: 10.18632/oncotarget.22952. PMID: 29340101; PMCID: PMC5762369.

109. Zhao K, Li Y, Han T, Sun A, Bian W, Li M, Lin Q, Shao G. Comparison of the expression levels of lysine-specific demethylase 1 and survival outcomes between triple-negative and non-triple-negative breast cancer. *Oncol Lett.* 2021 Feb;21(2):102. doi: 10.3892/ol.2020.12363. Epub 2020 Dec 8. PMID: 33376535; PMCID: PMC7751332.
110. Zheng J, Fang F, Zeng X, Medler TR, Fiorillo AA, Clevenger CV. Negative cross talk between NFAT1 and Stat5 signaling in breast cancer. *Mol Endocrinol.* 2011 Dec;25(12):2054-64. doi: 10.1210/me.2011-1141. Epub 2011 Sep 29. PMID: 21964595; PMCID: PMC3231824.

