

ΤΜΗΜΑ  
Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



DEPARTMENT OF  
Biochemistry &  
Biotechnology  
UNIVERSITY OF THESSALY



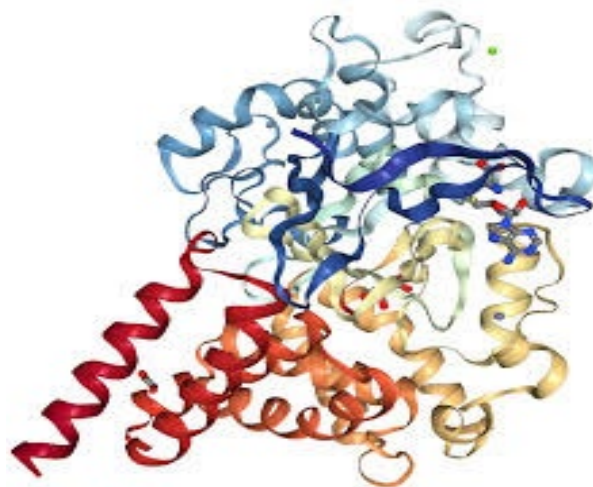
**FORTH**

INSTITUTE OF MOLECULAR BIOLOGY & BIOTECHNOLOGY

Πτυχιακή

**Μελέτη της συνεισφοράς του επιγενετικού παράγοντα  
SMYD3 στην ηπατική αναγέννηση**

**Study of the contribution of epigenetic factor SMYD3 in liver  
regeneration**



Κυδωνάκης Κωνσταντίνος

Ηράκλειο 2020-2021

## Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης

- Ιωάννης Ταλιανίδης (επιβλέπων): Διευθυντής έρευνας στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (imbv) του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) και κάτοχος της προεδρίας ΑΧΑ για την επιγενετική.
- Αντώνιος Γιακουντής (συνεπιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μπαλατσός Νικόλαος (Μέλος τριμελούς): Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

# Ευχαριστίες

Καθώς η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο επιγενετικής του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω τον Δρ. Ιωάννη Ταλιανίδη που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και μου έδωσε την ευκαιρία να αποκτήσω όλη αυτή την ανεκτίμητη εργαστηριακή εμπειρία. Εκτός αυτού, του οφείλω και ένα ευχαριστώ για την καλή διάθεση και την προθυμία να προσφέρει την βοήθειά του τόσο με γνώσεις όσο και πράξεις κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Πλην των προηγούμενων, θέλω ακόμα να τον ευχαριστήσω που μου έδωσε την ευκαιρία να γνωρίσω και να συνεργαστώ με την ομάδα του εργαστηρίου του, που με την βοήθειά τους επιτεύχθηκε η εργασία αυτή. Συγκεκριμένα θέλω να ευχαριστήσω την Μαρίνα Κουκάκη η οποία ήταν και η υπεύθυνη μου κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων και πάντα ήταν εκεί για ότι χρειαζόμουν. Την Ουρανία Γαλανπούλου, την Ευαγγελία Ταχματζίδη και την Ιωάννα Περάκη, τόσο για την καθοριστικότερη συμβολή τους στην διεκπεραίωση των πειραμάτων, όσο και την αμέριστη ηθική και ψυχολογική υποστήριξη. Τέλος δε μπορώ να μην αναφέρω τις Χαρούλα Κοντάκη και Μαρία Βασίλαρου, οι οποίες, αν και δεν είχαμε τόσο εργασιακή τριβή, ήταν πάντα εκεί να συζητήσουν και να ακούσουν τους προβληματισμούς μου καθώς και να απαντήσουν τις απορίες μου.

Όλους αυτούς τους ανθρώπους δε θα τους είχα γνωρίσει αν ο Καθηγητής μου στη Μοριακή Βιολογία και Γονιδιωματική κ. Αντώνιος Γιακουντής δε μου είχε συστήσει τον κ. Ταλιανίδη. Τον ευχαριστώ λοιπόν που αποτέλεσε την αιτία να βρεθώ ανάμεσα σε τέτοιους ανθρώπους, που δέχτηκε να είναι συνεπιβλέπων της εργασίας μου και που κάθε φορά που τον χρειάστηκα ανταποκρίθηκε με τον καλύτερο τρόπο.

Τέλος δε μπορώ να μην ευχαριστήσω και τον καθηγητή μου στη Βιοχημεία κ. Μπαλατσό Νικόλαο που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης. Ακόμα οφείλω να τον ευχαριστήσω που πάντα ήταν εκεί και ανταποκρινόταν στις απορίες και τις ανησυχίες μου.

# Περίληψη

Η ηπατική αναγέννηση είναι η γνωστότερη και καλύτερα μελετημένη διαδικασία αναγέννησης που υπάρχει στα θηλαστικά. Το ήπαρ μπορεί να αναπλάθει τον ιστό του ακόμα και σε περιπτώσεις όπου η απώλεια φτάνει τα 2/3. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν σημαντική επίδραση στη διεκπεραίωση της διαδικασίας αυτής, ωστόσο η μελέτη του ρόλου τους είναι ακόμα σε πρώιμα στάδια. Σε αυτήν τη μελέτη επιχειρήθηκε να αποσαφηνιστεί ο ρόλος της πρωτεΐνης SMYD3 σε ένα *in vivo* πειραματικό μοντέλο ηπατικής αναγέννησης. Η πρωτεΐνη SMYD3 είναι μια μεθυλοτρανσφεράση πρωτεϊνών. Παρόλο που λίγα είναι γνωστά για τον φυσιολογικό της ρόλο, η απορρύθμιση της έκφρασης της SMYD3 φαίνεται να σχετίζεται με την προαγωγή παθολογικών καταστάσεων, με πιο χαρακτηριστική την καρκινογένεση. Σε ποντίκια απώλειας λειτουργίας για το γονίδιο *smyd3* (*smyd3KO*) τα οποία είχαν υποστεί μεταχείριση με την ηπατοτοξική ουσία τετραχλωράνθρακας ( $CCl_4$ ), έγινε ιστολογικός έλεγχος για τυχόν διαφοροποιήσεις στην αναγεννητική διαδικασία. Τόσο στο μοντέλο οξείας ηπατικής βλάβης όσο και σε αυτό της χρόνιας ηπατικής βλάβης τα οποία δημιουργήθηκαν με μονή και πολλαπλή χορήγηση  $CCl_4$  αντίστοιχα, δε φάνηκε καμία αξιοσημείωτη ιστολογική διαφορά μεταξύ των ζώων *smyd3KO* σε σχέση με τα ζώα μάρτυρες. Αυτή η μελέτη αποτελεί μια πρώτη ένδειξη για την εμπλοκή της πρωτεΐνης SMYD3 στην αναγέννηση του ήπατος, ωστόσο είναι απαραίτητα και άλλα πειράματα για να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα.

# Abstract

Liver regeneration is the best-known regenerative process in mammalian species. Liver can cure and reform its tissue even if it loses 2/3 of its mass. Epigenetic modifications are involved in liver regeneration, but more studies are needed to shed light on their role in the process. In our study, we tested the role of *smyd3* gene in liver regeneration, using an experimental *in vivo* model. SMYD3 is a protein methyltransferase. Deregulation of its expression pattern is associated with many human pathological states with tumor progression being the most remarkable. *Smyd3*KO mice were treated by CCl<sub>4</sub>, a hepatotoxic agent, and tested for histological differentiations during liver regeneration. Both in acute and in chronic liver failure, that was induced by a single and multiple CCl<sub>4</sub> treatment respectively, no apparent differentiation was observed after histological examination of *smyd3*KO and control mice. This study is the first indication about the role of SMYD3 in liver regeneration, but more specific and accurate studies must be conducted in order to clarify its significance.

# Περιεχόμενα

<b>Περίληψη</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1.Εισαγωγή</b> .....	<b>8</b>
1.1Επιγενετική.....	8
1.1.1Γενικά για την επιγενετική.....	8
1.1.2Οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών SMYD .....	10
1.1.3 SMYD3.....	13
1.1.4 Επιγενετική και ηπατική αναγέννηση.....	18
1.2 Αναγέννηση.....	19
1.2.1Αναγέννηση ως βιολογικό φαινόμενο .....	19
1.2.2Ηπατική Αναγέννηση.....	20
<b>2.Σκοπός</b> .....	<b>28</b>
<b>3. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	<b>29</b>
3.1Ποντίκια και μεταχείριση.....	29
3.2 Ιστοχημεία .....	29
3.3 Απομόνωση DNA.....	30
3.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – quantitative polymerase chain reaction qPCR .....	30
<b>4. Αποτελέσματα</b> .....	<b>32</b>
4.1 Γονοτύπηση με qPCR.....	32
4.2 Μοντέλο Οξείας Βλάβης.....	32
4.3 Μοντέλο χρόνιας βλάβης .....	35
<b>5. Συζήτηση</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Βιβλιογραφικές Αναφορές</b> .....	<b>39</b>
6.1 Επιστημονικά Άρθρα .....	39
6.2 Ακαδημαϊκά συγγράμματα και βιβλία.....	45



# 1.Εισαγωγή

## 1.1Επιγενετική

### 1.1.1Γενικά για την επιγενετική

#### 1.1.1.1Ορισμός

Ο πρώτος που ανέφερε τον όρο επιγενετική ήταν ο Conrad Waddington το 1942 για να περιγράψει τον τρόπο που χρησιμοποιείται η γενετική πληροφορία κατά την αναπτυξιακή πορεία με σκοπό να δημιουργηθεί, από ένα αρχικό παντοδύναμο κύτταρο, ένας οργανισμός αποτελούμενος από ένα ετερογενές σύνολο εξειδικευμένων κυτταρικών πληθυσμών. Στην πορεία, η χρήση του όρου άλλαξε και αναφέρεται στα βιολογικά γεγονότα όπου παρατηρούνται φαινοτυπικές αλλαγές, οι οποίες όμως, δε σχετίζονται με αλλαγές στην αλληλουχία του γονιδιώματος. Αυτές οι διαφορές στο φαινότυπο οφείλονται στα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης της γενετικής πληροφορίας που εγκαθιδρύονται σε κάθε κύτταρο κατά τη διεκπεραίωση μιας κυτταρικής διεργασίας όπως η διαφοροποίηση (1). Οι μηχανισμοί που ενέχονται σε τέτοια γεγονότα και πληρούν τα παραπάνω χαρακτηριστικά ονομάζονται επιγενετικοί. Οι πιο γνωστοί και διαδεδομένοι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την ομοιοπολική τροποποίηση της χρωματίνης. Τέτοιες τροποποιήσεις γίνονται είτε απευθείας πάνω στο DNA με τη μεθυλίωση των καταλοίπων κυτοσίνης που ακολουθούνται από γουανίνη (5'-CG-3'), είτε μετα- μεταφραστικά στα αμινοξέα των ιστονών (2). Ωστόσο σημαντική είναι και η δομική δυναμική της χρωματίνης είτε σε επίπεδο τοπικό (διαφορετικά επίπεδα συμπύκνωσης της χρωματίνης) είτε σε επίπεδο διαμορφώσεων υψηλότερης τάξης (Topologically Associated Domains, TADs) (3). Επιπλέον στους επιγενετικούς μηχανισμούς συγκαταλέγονται και οι λειτουργίες των μη κωδικοποιητικών RNAs (4). Καθολικό χαρακτηριστικό όλων των επιγενετικών μηχανισμών είναι η αντιστρεψιμότητα και η κληρονομικότητα. Ωστόσο, η τελευταία έχει δεχτεί κριτική για το αν πρέπει να αποτελεί κριτήριο για να χαρακτηριστεί ένας μηχανισμός ως επιγενετικός (5).

Στα πλαίσια της Επιγενετικής, ο όρος κληρονομικότητα αφορά, πέρα από την κλασσική μεταβίβαση χαρακτηριστικών από τους γονείς στους απογόνους τους, και την αντίστοιχη μεταβίβαση από ένα κύτταρο στα θυγατρικά του. Η διαπίστωση ότι επιγενετικοί μηχανισμοί εμπλέκονται καθοριστικά στην εγκαθίδρυση και τη διατήρηση των προτύπων γονιδιακής έκφρασης, τα οποία διατηρούνται και στους απογόνους τους, τους προσδίδει αυτομάτως την ιδιότητα της κληρονομικότητας. Πράγματι, εξετάζοντας τους ορισμούς που δίνουν διάφορα μέλη της επιστημονικής κοινότητας που δραστηριοποιούνται στο χώρο όπως ο Holliday (6), ο Reinberg (2), ο Shilatifard (7), η κληρονομικότητα περιλαμβάνεται σε αυτούς και τη θεωρούν αναπόσπαστη ιδιότητα των τροποποιήσεων αυτών. Ωστόσο ο Bird θεωρεί ότι η κληρονομικότητα ως κριτήριο τελικά περιπλέκει τη διάκριση μεταξύ επιγενετικών και μη μηχανισμών καθώς υπάρχουν τροποποιήσεις στη χρωματίνη που είναι εφήμερες και δεν προλαβαίνουν να μεταβιβαστούν (5). Επιπλέον, το γεγονός ότι για κάποιες επιγενετικές τροποποιήσεις (κυρίως στις ιστόνες) δεν έχουμε καταλήξει ακόμα σε έναν ξεκάθαρο μηχανισμό με τον οποίο μεταβιβάζονται, περιπλέκει περισσότερο την κατάσταση (1). Η δυσκολία στη σύνθεση ενός ξεκάθαρου ορισμού αντανακλάται στη φράση του Bird <<Η επιγενετική είναι μια χρήσιμη λέξη εάν δε γνωρίζεις τι γίνεται. Εάν γνωρίζεις, χρησιμοποιείς κάποια άλλη>> (8).



### 1.1.1.2 Επιγενετικές τροποποιήσεις ιστονών

Πολλές είναι οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που έχουν ταυτοποιηθεί στα μόρια των ιστονών. Αυτές περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης/θρεονίνης, τη μεθυλίωση, τη βιοτινυλίωση και την ακυλίωση των καταλοίπων λυσίνης (φορμυλίωση, ακετυλίωση, προπιονυλίωση, βουτηρυλίωση, κροτονυλίωση), την υδροξυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης, την Ο- γλυκοζυλίωση, την ισομερίωση της προλίνης και την κιτρουλλινυλίωση της αργινίνης. Ακόμα στην πλευρική αλυσίδα της λυσίνης συμβαίνει και ομοιοπολική τροποποίηση με προσθήκη μικρών πεπτιδίων όπως ουβικιτινυλίωση, σουμούλιωση, νεντυλίωση **(9)**. Στα πλαίσια της εμπλοκής τους όμως στην επιγενετική, μας ενδιαφέρουν αυτές που γίνονται στα κατάλοιπα των αμινοτελικών ουρών τους και κατά βάση οι ακετυλίωσεις και οι μεθυλίωσεις **(2)**.

Η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα στις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων λυσίνης και καταλύεται από τα ένζυμα ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών (Histone Acetyltransferase ή HATs). Η τροποποίηση έχει διπλή λειτουργία. Αφενός ο σχηματισμός του αμιδικού δεσμού εξουδετερώνει το προϋπάρχον θετικό φορτίο εξασθενώντας την αλληλεπίδραση μεταξύ της ιστόνης και του DNA, αφετέρου δημιουργείται μία θέση αλληλεπίδρασης της ιστόνης με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν τις λεγόμενες επικράτειες bromo. Η μειωμένη αλληλεπίδραση ιστόνης-DNA συνεπάγεται μια λιγότερο συμπαγή διαμόρφωση της χρωματίνης που την καθιστά περισσότερο προσβάσιμη στους διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες και συμπαράγοντες **(A)**. Κατά τη μεταγραφή οι διάφοροι μεταγραφικοί παράγοντες και συνενεργοποιητές στρατολογούν τις HATs οι οποίες θα ακετυλιώσουν τις ιστόνες προωθώντας την έκφραση του γονιδίου. Από την άλλη δε λείπουν και τα ένζυμα που απομακρύνουν τις ακετυλομάδες και ονομάζονται απακετυλάσες (Histone Deacetylases ή HDACs). Αυτές λειτουργούν σαν μεταγραφικοί συγκαταστολείς αναστέλλοντας την έκφραση των γονιδίων **(B)**. Ακόμα έχουν γίνει μελέτες που δείχνουν ότι σε ενεργά γονίδια οι ιστόνες είναι σε μεγάλο βαθμό ακετυλιωμένες με πιο συνηθισμένες την ακετυλίωση της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (Histone 3 Lysine 9 acetylation ή H3K9ac), της λυσίνης 14 της ιστόνης 3 (H3K14ac) και την ακετυλίωση της λυσίνης 5 στην ιστόνη 4 (H4K5ac). Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η ακετυλίωση ιστονών οδηγεί στην εγκαθίδρυση μεταγραφικά ενεργής χρωματίνης. Ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις όπου η ακετυλίωση σχετίζεται με ανενεργή χρωματίνη όπως η ακετυλίωση της λυσίνης 14 στην ιστόνη 4 (H4K14ac) **(C)**.

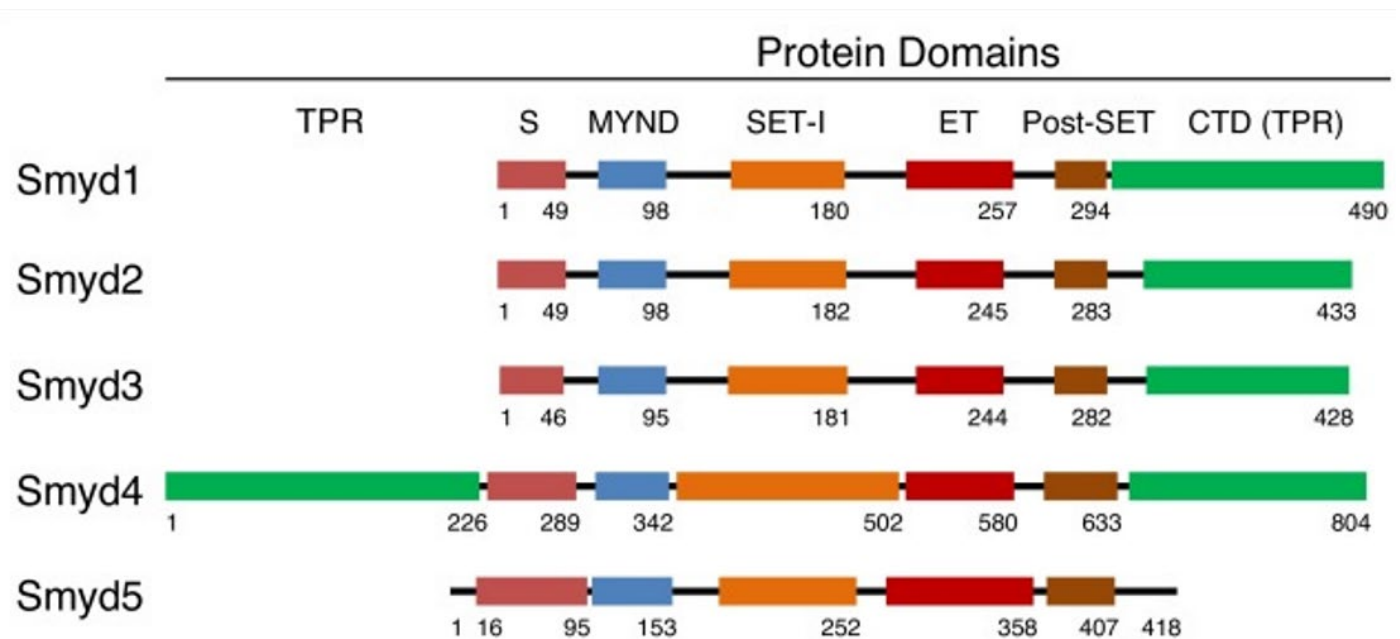
Η μεθυλίωση πραγματοποιείται στις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης και καταλύεται από τις μεθυλοτρανσφεράσες των ιστονών οι οποίες χρησιμοποιούν ως δότη μεθυλομάδας την S-αδενόσυλο-μεθειονίνη (S-Adenosylmethione ή SAM) και ταξινομούνται σε τρεις οικογένειες μεταξύ των οποίων η μια καταλύει την μεθυλίωση της αργινίνης (Arginine Methyltransferase ή RMTs) και οι άλλες δύο την μεθυλίωση της λυσίνης. Οι δύο οικογένειες μεθυλοτρανσφεράσης της λυσίνης διακρίνονται από την ύπαρξη ή όχι της επικράτειας SET (S: Su(var) 3-9, E: Enhancer of Zeste, T: Trithorax) **(10)**. Τα κατάλοιπα λυσίνης μπορούν να μονομεθυλιωθούν, να διμεθυλιωθούν και να τριμεθυλιωθούν ενώ τα κατάλοιπα αργινίνης είτε μονομεθυλιώνονται ή διμεθυλιώνονται **(A)**. Η μεθυλίωση επηρεάζει τη διαμόρφωση της χρωματίνης πολώνοντας το θετικό φορτίο της αμινομάδας αλλά και δημιουργώντας θέσεις πρόσδεσης πρωτεϊνών **(B)**. Οι πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με τις μεθυλιωμένες λυσίνες περιέχουν την χαρακτηριστική επικράτεια chromo **(A)**. Άσχετα με το βαθμό μεθυλίωσης, αυτές οι τροποποιήσεις ενέχονται στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Ωστόσο, σε αντίθεση με την ακετυλίωση, ο ρόλος της δεν είναι

ξεκάθαρος και εξαρτάται τόσο από το κατάλοιπο που τροποποιείται όσο και το βαθμό μεθυλίωσης. Για παράδειγμα η μεθυλίωση της λυσίνης 4 στην ιστόνη 3 (H3K4) σχετίζεται κατά κανόνα με διαμόρφωση ευχρωματίνης ενώ η μεθυλίωση της λυσίνης 9 στην ιστόνη 3 (H3K9) σχετίζεται με ετεροχρωματίνη. Αντίστοιχα η μονομεθυλίωση της λυσίνης 20 στην ιστόνη 4 (Histone 4 lysine 20 monomethylation ή H4K20me1) σχετίζεται με προαγωγή του κυτταρικού κύκλου, η διμεθυλίωση της λυσίνης 20 στην ιστόνη 4 (Histone 4 lysine 20 dimethylation ή H4K20me2) με επιδιόρθωση του DNA και η τριμεθυλίωση της λυσίνης 20 στην ιστόνη 4 (Histone 4 lysine 20 trimethylation ή H4K20me3) με ανενεργή χρωματίνη **(11)**. Τα κατάλοιπα αργινίνης έχουν κι αυτά συμβολή στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Να σημειωθεί ότι η διμεθυλίωση στην αργινίνη μπορεί να είναι είτε συμμετρική, δηλαδή οι μεθυλομάδες να κατανέμονται ίσα και στις 2 αμινομάδες της γουανιδινικής ομάδας του αμινοξέος, είτε ασύμμετρη όπου οι μεθυλομάδες τοποθετούνται και οι 2 σε μία αμινομάδα. Η ασύμμετρη διμεθυλίωση στην αργινίνη 2 της ιστόνης 3 (Histone 3 arginine 2 asymmetrical dimethylation ή H3R2me2a) φαίνεται να έχει ανταγωνιστική δράση απέναντι στην H3K4me3 καθώς αναστέλλει την δημιουργία της. Επιπλέον εάν βρεθούν μαζί, η H3R2me2a μπλοκάρει την ενεργοποιητική δράση της H3K4me3 εμποδίζοντας την πρόσδεση ενεργοποιητικών παραγόντων. Αντίθετη δράση φαίνεται να έχει η συμμετρική διμεθυλίωση (Histone 3 arginine 2 symmetrical dimethylation ή H3R2me2s) η οποία προωθεί την H3K4me3. **(12)**.

### 1.1.2 Οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών SMYD

#### 1.1.2.1 Δομικά χαρακτηριστικά της οικογένειας SMYD

Η οικογένεια μεθυλοτρανσφερασών SMYD αποτελείται από 5 μέλη και ανήκει στην οικογένεια που φέρουν την επικράτεια SET. Το χαρακτηριστικό αυτής της οικογένειας είναι η επιπλέον επικράτεια MYND (MY: Myeloid, N: Nervy, D: DEAF) της οποίας η αλληλουχία παρεμβάλλεται μέσα στην επικράτεια SET χωρίζοντάς τη σε 2 μέρη. Ακόμα οι πρωτεΐνες SMYD περιέχουν τις επικράτειες SET-I (SET-intermediate) και post-SET (εικόνα 1). Με εξαίρεση τη SMYD5, τα υπόλοιπα μέλη έχουν και μια καρβοξυτελική περιοχή (Carboxy terminal Domain ή CTD) **(13)**. Η τρισδιάστατη διαμόρφωση της πρωτεΐνης διακρίνεται σε 2 λοβούς όπου στον αμινοτελικό λοβό (N-λοβό) περιέχονται οι SET, MYND, SET-I και post-SET επικράτειες, ενώ στον καρβοξυτελικό περιέχεται η CTD **(14)**. Παρόλο που η έρευνα για τα μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών SMYD εντοπίζεται κυρίως στα σπονδυλωτά, αξίζει να αναφερθεί ότι μέλη αυτής της οικογένειας εντοπίζονται σε όλο το βασίλειο των ζώων, καθώς επίσης υπάρχουν και αναφορές για παρουσία και στα φυτά αλλά και στους μύκητες **(15)**.



Εικόνα 1 Η οικογένεια των πρωτεϊνών SMYD. Η επικράτεια SET είναι χωρισμένη στα δύο (S & ET) και παρεμβάλλεται από την επικράτεια MYND και την SET-I. Σημειώνεται ότι η επικράτεια CTD αποτελείται από την αλληλουχία TPR.

Η επικράτεια SET απαρτίζεται από τρεις β-πτυχωτές επιφάνειες ασύμμετρα τοποθετημένες στο κέντρο του μακρομορίου όπου εντοπίζεται και το ενεργό κέντρο του ενζύμου (14). Ο συμπαραγόντας SAM προσδέεται στην κοιλότητα πρόσδεσης που σχηματίζεται από τις επικράτειες SET, SET-I και post-SET. Από την αντίθετη πλευρά εισέρχεται το υπόστρωμα. Επειδή η πλευρική αλυσίδα της ιστονικής λυσίνης είναι πρωτονιωμένη, απαιτείται αρχικά να απομακρυνθεί το πρωτόνιο. Η αποπρωτονίωση φαίνεται να λαμβάνει χώρα από ένα διερχόμενο μόριο νερού σχηματίζοντας έτσι ένα ιόν οξωνίου ( $H_3O^+$ ). Αυτό απομακρύνεται τάχιστα από το ενεργό κέντρο μέσω ενός καναλιού που σχηματίζεται. Η αποπρωτονιωμένη αμινική ομάδα πραγματοποιεί πυρηνόφιλη προσβολή στη μεθυλομάδα του SAM αποσπώντας την. Στο τέλος της αντίδρασης έχει προκύψει μια μεθυλιωμένη λυσίνη και ένα μόριο S-αδενόσυλο-ομοκουστεΐνης (16). Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται τόσο για τη διμεθυλίωση όσο και για την τριμεθυλίωση. Ωστόσο δεν είναι όλες οι μεθυλοτρανσφεράσες σε θέση να καταλύσουν και τις 3 τάξεις μεθυλίωσης καθώς κάποιες καταλύουν μόνο τις αντιδράσεις μικρότερης τάξης, ενώ αντίθετα άλλες καταλύουν αντιδράσεις μεγαλύτερης τάξης. Βασικός περιοριστικός παράγοντας φαίνεται να είναι ο σχηματισμός του καναλιού μέσω του οποίου θα απομακρυνθεί το ιόν οξωνίου. Όσο μεγαλύτερη είναι η τάξη μεθυλίωσης του καταλοίπου που τροποποιείται τόσο πιο δύσκολο είναι να σχηματιστεί το κανάλι. Ο τρόπος που καθορίζεται αυτό το χαρακτηριστικό φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αμινοξική σύσταση του ενζύμου στη θέση πρόσδεσης της πλευρικής ομάδας της λυσίνης. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η αντικατάσταση των καταλοίπων τυροσίνης από λιγότερο ογκώδη μόρια, όπως είναι η φαινυλαλανίνη ή άλλα, να σχετίζεται με κατάλυση μεθυλίωσης υψηλότερης τάξης (17).

Η επικράτεια MYND είναι μία επικράτεια δάκτυλος ψευδαργύρου με χαρακτηριστική τοπολογία β-β-α της οποίας τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής διατάσσονται γύρω από δύο άτομα ψευδαργύρου. Ο συντονισμός των μεταλλικών στοιχείων γίνεται από 7 κυστεΐνες και μια ιστιδίνη. Αν και η επικράτεια MYND σε επίπεδο πρωτοταγούς δομής παρεμβάλλεται στην επικράτεια SET, δε φαίνεται να έχει κάποια εμπλοκή

στην κατάλυση της αντίδρασης **(18)**. Η επικράτεια MYND φαίνεται να εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση των ενζύμων με άλλους παράγοντες. Η πρωτεΐνη SMYD1 αξιοποιεί την επικράτεια MYND για να αλληλεπιδράσει με διάφορες πρωτεΐνες που ενέχονται στη γονιδιακή ρύθμιση όπως ο μεταγραφικός παράγοντας skNAC ή άλλους συγκαταστολείς όπως οι HDACs 1-3 και το ανασταλτικό σύμπλοκο SMRT **(19)**. Η SMYD2 φαίνεται να χρησιμοποιεί την επικράτεια MYND για να αναπτύσσει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης τόσο με παράγοντες ρύθμισης της μεταγραφής, όπως το ανασταλτικό σύμπλοκο SIN3A, όσο και με παράγοντες ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου όπως η p53. Οι επικράτειες MYND και των δύο αυτών ενζύμων αναπτύσσουν τις αλληλεπιδράσεις αναγνωρίζοντας ένα αμινοξικό μοτίβο πλούσιο σε προλίνες με συναινετική αλληλουχία PXLXP **(20)**. Τέλος, η SMYD4 χρησιμοποιεί την επικράτεια MYND για να αλληλοεπιδράσει με την HDAC1 **(21)** και η SMYD5 με τα ανασταλτικά σύμπλοκα NCoR και SMRT **(22)**.

Η CTD των πρωτεϊνών SMYD, αν και είναι αρκετά συντηρημένη, εμφανίζει τη μεγαλύτερη ετερογένεια. Βασικό χαρακτηριστικό της είναι η δομική ομοιότητά της με την επικράτεια TRP (tetra-tricopeptide repeats). Η CTD δημιουργεί τον C-λοβό του ενζύμου που μαζί με τον N-λοβό καθορίζουν το σημείο εισόδου του υποστρώματος. Ωστόσο, ο προσανατολισμός που υιοθετεί ο C-λοβός σε σχέση με τον N-λοβό διαφέρει. Στην πρωτεΐνη SMYD1 υιοθετείται μια πολύ ανοιχτή διάταξη λοβών η οποία οδηγεί σε ένα διευρυμένο και ευρύχωρο σημείο εισόδου. Αντίθετα στην πρωτεΐνη SMYD3 έχει δειχθεί ότι η διάταξη είναι πιο συμπαγής αποδίδοντας μια πολύ πιο στενή είσοδο. Η πρωτεΐνη SMYD2 είναι σε μια ενδιάμεση κατάσταση καθώς ο C-λοβός της παρουσιάζει ευλυγισία, η οποία υποδεικνύει μια ικανότητα προσαρμογής στα διάφορα υποστρώματα **(18)**. Ακόμα η CTD φαίνεται να εμπλέκεται και στις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Ένα καλά χαρακτηρισμένο παράδειγμα είναι αυτό της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 90 (Heat Shock Protein ή HSP90) η οποία αλληλεπιδρά με τις SMYD και ενισχύει τη δράση τους. Επιπλέον, η CTD αλληλεπιδρά με την ιστόνη 3 (H3) προάγοντας τη μεθυλίωσή της **(23)**. Η συμμετοχή της CTD στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας φανερώνεται από πειράματα τα οποία έδειξαν ότι, απουσία της, αλλάζει σε μεγάλο βαθμό η δυναμική του ενζύμου. Ωστόσο οι αλλαγές δεν οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα σε κάθε μέλος της οικογένειας. Έτσι προτάθηκε ότι η CTD ενέχεται στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας πλειοτροπικά **(18, 24)**.

#### *1.1.2.2 Οι λειτουργίες των πρωτεϊνών SMYD*

Το έργο της μεθυλίωσης που πραγματοποιούν οι πρωτεΐνες SMYD αφορά ένα σύνολο πρωτεϊνών που καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών λειτουργιών. Ο πιο γνωστός στόχος είναι οι λυσίνες των αμινοτελικών άκρων των ιστονών 3 και 4 **(18)**. Η SMYD1 ταυτοποιήθηκε ότι διμεθυλιώνει τη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 (H3K4me<sub>2</sub>), η SMYD2 την H3K4 και H3K36, ενώ η SMYD5 την H4K20me<sub>2</sub> **(20)**. Για τη SMYD4 δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα αν μεθυλιώνει κάποια ιστόνη. Πέρα όμως από τις ιστόνες έχουν χαρακτηριστεί και άλλοι παράγοντες οι οποίοι μεθυλιώνονται από τις SMYD. Η καταλυτική λειτουργία της πρωτεΐνης SMYD1 φαίνεται να περιορίζεται στη μεθυλίωση των ιστονών. Αντίθετα η SMYD2 παρουσιάζει πιο ευρύ φάσμα μεθυλίωσης σε διάφορους παράγοντες όπως την p53, την Hsp90 και MAPKAPK3 **(24)**. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η SMYD5 μπορεί πέρα από την ιστονική λειτουργία της να μεθυλιώνει και τον παράγοντα PGC1α **(25)**.

Πέρα από τη δράση τους σαν ένζυμα, οι πρωτεΐνες SMYD συμμετέχουν στις κυτταρικές λειτουργίες αναπτύσσοντας αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με διάφορους ρυθμιστικούς παράγοντες

επάγοντας πολλαπλά αποτελέσματα **(18)**. Η SMYD1 αλληλοεπιδρά με τις HDACs1-3 και τα σύμπλοκα NCoR και SMRT λειτουργώντας ανασταλτικά στην ενεργοποίηση της μεταγραφής. Επιπλέον, η πρωτεΐνη SMYD1 αλληλοεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα skNAC ο οποίος εξειδικεύεται κατά κανόνα στον σκελετικό και τον καρδιακό μυϊκό ιστό. Λαμβάνοντας υπόψιν και την διμεθυλίωση στην H3K4 φαίνεται ότι η SMYD1 μπορεί να επηρεάσει τη διαδικασία της μεταγραφής είτε ενεργοποιώντας την είτε καταστέλλοντας την. Η πιο γνωστή περίπτωση αλληλεπίδρασης της SMYD2 είναι με την Hsp90 την οποία, να μεν μεθυλιώνει αλλά και αξιοποιεί για να επάγει τη μεθυλίωση της H3K4 **(19)**. Η SMYD4 μπορεί να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου Nanog καθώς προσδένεται ειδικά στον υποκινητή του όταν η αλληλουχία του DNA του δεν είναι μεθυλιωμένη. Η SMYD5 αξιοποιεί το σύμπλοκο NCoR για να επάγει μεταγραφική καταστολή μέσω της H4K20me3 σε προφλεγμονώδη γονίδια **(26)**.

Οι βιολογικές διεργασίες που εμπλέκονται οι πρωτεΐνες SMYD αφορούν την ανάπτυξη και τη φυσιολογική λειτουργία του μυϊκού συστήματος καθώς και τη δημιουργία και την πρόοδο διαφόρων μορφών καρκίνου **(24)**. Επιπλέον, έχουν δημοσιευθεί και στοιχεία που προτείνουν την εμπλοκή των SMYD και στη ρύθμιση της φλεγμονής **(27)**. Η SMYD1 εκφράζεται κατά βάση τόσο στον καρδιακό όσο και στον σκελετικό μυϊκό ιστό. Η δράση της είναι καθοριστική κατά την ανάπτυξη στο ποντίκι καθώς η πλήρης απαλοιφή του γονιδίου αυτού οδηγεί σε θνησιμότητα από την εμβρυική ημέρα E9.5 λόγω ατελούς ωρίμανσης των μυοκυττάρων **(19)**. Πέρα όμως από την ανάπτυξη, η εν λόγω πρωτεΐνη σχετίζεται και με τη φυσιολογική λειτουργία κατά την ενήλικη φάση. Αυτό το κατέδειξαν μελέτες που εντόπισαν τη σχέση της με διάφορες καρδιακές δυσλειτουργίες όπως η μυϊκή υπερτροφία λόγω αυξημένης πίεσης. Η μειωμένη παρουσία της πρωτεΐνης στα καρδιακά μυϊκά κύτταρα φαίνεται να σχετίζεται με απορρύθμιση του μεταβολισμού και συγκεκριμένα των συστημάτων παραγωγής ενέργειας **(28)**. Σε αντίθεση με τη SMYD1, η SMYD2 φαίνεται να εμπλέκεται κυρίως σε λειτουργίες που αφορούν τον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα η SMYD2 τροποποιεί τον ογκοκατασταλτικό παράγοντα p53 αναστέλλοντας την αποπτωτική λειτουργία του. **(29)**. Επίσης παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από την τροποποίηση του παράγοντα PTEN **(30)**. Η SMYD4 εμπλέκεται κι αυτή στο πεδίο του καρκίνου του μαστού λειτουργώντας ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας προκαλώντας τη μειωμένη έκφραση του PDGFR1α **(31)**. Η πρωτεΐνη SMYD5, σε αντίθεση με όλα τα άλλα μέλη της οικογένειας, έχει χαρακτηριστεί ως ρυθμιστής της μεταγραφής γονιδίων που σχετίζονται με την επαγωγή και την πραγματοποίηση της φλεγμονής **(32)**.

### 1.1.3 SMYD3

#### 1.1.3.1 Γενικά για τη SMYD3

Η πρωτεΐνη SMYD3 αποτελείται από 428 αμινοξέα και κωδικοποιείται από το ομώνυμο γονίδιο *smyd3* το οποίο βρίσκεται στον βραχίονα q του χρωμοσώματος 1 στον άνθρωπο και στον ποντικό. Η έκφρασή της κατά τα εμβρυικά στάδια εντοπίζεται κυρίως στην καρδιά, τους όρχεις, τις ωθήκες, το έντερο και τον εγκέφαλο, ενώ στην ενήλικη φάση στην καρδιά, τις ωθήκες, τους όρχεις, τον εγκέφαλο, το νωτιαίο μυελό, τα αιμοπετάλια, τον αμφιβληστροειδή, τα CD8<sup>+</sup> T-λεμφοκύτταρα, τον προστάτη και την ουροδόχο κύστη **(33)**. Το 2004 ο Hamamoto et al. μελέτησαν την πρωτεΐνη SMYD3 και έδειξαν ότι δι- και τριμεθυλιώνει τη λυσίνη 4 της ιστόνης 3 (H3K4me2 & H3K4me3) καταδεικνύοντας τη δράση της ως πρωτεϊνική μεθυλοτρανσφεράση **(34)**.

### 1.1.3.2 Τρόποι ρύθμισης του γονιδίου *smyd3*

Η ρύθμιση του γονιδίου *smyd3* πραγματοποιείται σε επίπεδο μεταγραφικό, μέτα-μεταγραφικό καθώς και μέτα-μεταφραστικό. Στο επίπεδο της μεταγραφής, η ρύθμιση πραγματοποιείται από cis-ρυθμιστικά στοιχεία. Το πιο γνωστό αφορά ένα γενετικό πολυμορφισμό VNTR (variable number tandem repeats) για την αλληλουχία 5'-CCGCC-3' που εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου. Έχει παρατηρηθεί ότι η ομοζυγωτική παρουσία του αλληλομόρφου που φέρει την προηγούμενη αλληλουχία 3 φορές (VNTR3/3) στον υποκινητή του γονιδίου *smyd3* παρουσιάζει μεγαλύτερη έκφραση (35, 36). Η βασική αιτία για αυτή τη σχέση φαίνεται να είναι ο μεταγραφικός παράγοντας E2F-1 ο οποίος προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου *smyd3* πιο ισχυρά όταν υπάρχει το αλληλόμορφο VNTR 3/3 (35). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι η μειωμένη μεθυλίωση στον υποκινητή του γονιδίου *smyd3* σχετίζεται με αυξημένη έκφραση (37).

Η ρύθμιση του γονιδίου *smyd3* σε μέτα-μεταγραφικό επίπεδο πραγματοποιείται από ρυθμιστικά μη κωδικοποιητικά μόρια RNA. Μεταξύ αυτών εμπλέκεται και ένα sisRNA (stable intronic sequence RNA). Τα μόρια αυτά εκφράζονται από ιντρονικές περιοχές γονιδίων και συνήθως ενέχονται στη ρύθμιση των μεταγράφων του γονιδίου προέλευσης τους. Ένα τέτοιο μόριο φαίνεται να μειορρυθμίζει το γονίδιο *smyd3* προσελκύοντας το ανασταλτικό σύμπλοκο PRC2 (polycomb repressive complex 2), το οποίο με τη σειρά του θα καταλύσει την H3K9me3 αναστέλλοντας έτσι τη μεταγραφή του (38). Άλλα ρυθμιστικά μόρια είναι τα miR124 (miRNA124) και miR246. Ο ρυθμιστικός ρόλος τους φάνηκε στον ηπατοκυτταρικό (Hepatocellular Carcinoma) και τον χολαγγειακό καρκίνο, αντίστοιχα, όπου η μειορρυθμισή τους ευνοεί την υπερέκφραση του γονιδίου *smyd3* (39). Ακόμα έχει καταγραφεί ότι το lncRNA Sprightly εμπλέκεται στη μέτα-μεταγραφική ρύθμιση του *smyd3* καθώς προσδένεται σε ιντρονικές περιοχές του πρώιμου mRNA (pre-mRNA) (40).

Ένας τρίτος τρόπος ρύθμισης της πρωτεΐνης SMYD3 είναι η διαμερισματοποίηση. Η δράση της SMYD3 επεκτείνεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα. Έχει παρατηρηθεί ότι η τοποθέτησή της εξαρτάται από τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα κατά τη φάση G0/G1 η SMYD3 περιορίζεται στο κυτταρόπλασμα ενώ κατά τις φάσεις S & G2/M συσσωρεύεται στον πυρήνα (23). Ακόμα έχει καταγραφεί ότι δομικά χαρακτηριστικά του κυττάρου, όπως το σχήμα και το μέγεθος μπορούν να επηρεάσουν την κατανομή της πρωτεΐνης. Μάλιστα, επειδή τα χαρακτηριστικά αυτά εξαρτώνται και καθορίζονται από μηχανο-αισθητηριακά ερεθίσματα και σήματα, ελέγχθηκε αν αυτά επηρεάζουν την κατανομή. Σε πειράματα που διαταρασσόταν η ομαλή λειτουργία κυτταροσκελετικών στοιχείων, όπως το σύστημα ακτίνης - μυοσίνης, φάνηκε ότι το πρότυπο διαμερισματοποίησης απορρυθμίζεται (41).

### 1.1.3.3 Φυσιολογικές λειτουργίες

Η φυσιολογικές λειτουργίες της πρωτεΐνης SMYD3 είναι ανεπαρκώς αποσαφηνισμένες. Παρόλα αυτά υπάρχουν κάποιες μελέτες που δίνουν στοιχεία σχετικά για τη φυσιολογική δραστηριότητά της. Η SMYD3 έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος του ψαριού zebrafish καθώς σε πειράματα μείωσης της έκφρασης (knock down) σε έμβρυα, αυτά αναπτύσσονται με κυρτωμένο σώμα καθώς και με καρδιακές διαταραχές (13). Ωστόσο στο ποντίκι μελέτες σε μοντέλα απώλειας λειτουργίας *smyd3*KO δε διαταράσσουν την ανάπτυξη ούτε τη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι η SMYD3 ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον πολλαπλασιασμό (42). Άλλα πειράματα μείωσης της έκφρασης της SMYD3 στην κυτταρική σειρά C2C12 έδειξαν ότι η πρωτεΐνη SMYD3

προάγει τη μείωση της διαμέτρου των μυοϊνιδίων των σκελετικών μυϊκών ινών συνεισφέροντας στη συγκρότηση του θετικού παράγοντα επιμήκυνσης της μεταγραφής b (positive Transcriptional Elongation Factor b ή p-TEFb) στους υποκινητές των γονιδίων του υποδοχέα του ηπατικού αυξητικού παράγοντα (c-Met) και μυοστατίνης (myostatin). Αντίστοιχα πειράματα στην ίδια κυτταρική σειρά καταδεικνύουν τη συμμετοχή της SMYD3 στη φάση της διαφοροποίησης των μυοβλαστών σε μυϊκές ίνες. Η διαδικασία αυτή ρυθμίζεται από τη μυογενίνη (myogenin), ένα ειδικό μυϊκό μεταγραφικό παράγοντα. Η SMYD3 είναι υπεύθυνη για την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου της μυογενίνης και την έναρξη της φάσης της διαφοροποίησης των μυοβλαστών (43).

Η SMYD3 εμπλέκεται και στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης. Σε έμβρυα ποντικού έχει δειχθεί ότι αυξάνεται η έκφραση της πρωτεΐνης στο στάδιο 1-4 κύτταρα ενώ μειώνεται ελαφρώς μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης. Στην αναπτυξιακή φάση που προηγείται της εμφύτευσης (peri-implantation period) η SMYD3 ελέγχει την έκφραση πολλών γονιδίων γενεαλογίας όπως τα *Oct-4*, *Sox-2*, *Nanog*, *Eomes*, *cdx2* και *Gata-6* (44). Επίσης, έχει φανεί ότι η SMYD3 ελέγχει τη διαφοροποίηση σε μεσενδοδερμικό ιστό κατά τον σχηματισμό των εμβρυικών βλαστικών στοιβάδων αποτρέποντάς την (45). Τέλος, έχει καταγραφεί σε έμβρυα βοοειδών ότι η SMYD3 μητρικής προέλευσης από το στάδιο των ωοκυττάρων ενέχεται στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *Nanog* (46).

Επιπλέον η SMYD3 προάγει τη διαφοροποίηση των παρθένων T-λεμφοκυττάρων σε επαγόμενα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα (induced-T-regulatory leukocytes ή iTregs) κατά την απόκριση του πνεύμονα σε λοιμώξεις. Το εναρκτήριο έναυσμα γίνεται από τον παράγοντα αύξησης όγκων-β (Tumor Growth Factor-β ή TGF-β) όπου επάγει την ενεργοποίηση και την πρόσδεση της πρωτεΐνης Smad3 στον υποκινητή του γονιδίου *smyd3* το οποίο στη συνέχεια επάγει την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Foxp3 (23). Την ίδια διαδικασία με το μονοπάτι TGF-β/Smad3 πραγματοποιεί στο ίδιο πλαίσιο και η σηματοδότηση από τον προσδέτη DLL-4 (Delta-like Ligand-4) μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch (47).

#### 1.1.3.4 Μοριακή δράση της SMYD3

Η SMYD3 στον πυρήνα δρα ως μεθυλοτρανσφεράση ιστονών καταλύοντας τη δι- και τριμεθυλίωση της λυσίνης 4 στις ιστόνης 3 (H3K4), τη μονομεθυλίωση της λυσίνης 5 της ιστόνης 4 (H4K5) (48), και τη τριμεθυλίωση της λυσίνης 20 της ιστόνης 4 (49). Ένας ακόμα στόχος είναι η λυσίνη 101 της H2A.Z όταν αυτή εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου της κυκλίνης A (50). Η τριμεθυλίωση της H3K4 (H3K4me3) αποτελεί ενεργοποιητική τροποποίηση και σηματοδοτεί τη μεταγραφή ενός γονιδίου, αντίθετα με την H4K20me3 που αποτελεί ανασταλτικό δείκτη. Ωστόσο η SMYD3 ασκεί τη δράση της ως ρυθμιστής της μεταγραφής και με άλλους μηχανισμούς. Ένας από αυτούς είναι αλληλοεπίδρασή της με διάφορα στοιχεία της μεταγραφικής συσκευής όπως η πολυμεράση του RNA II (34, 42), η ελικάση του RNA HELZ (34) και τον μεταγραφικό συμπαράγοντα PC4 (51). Επιπροσθέτως, απαραίτητη για τη διεκπεραίωση των λειτουργιών της SMYD3 είναι η αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη-συνοδό HSP90 (23). Ακόμα η SMYD3 μπορεί να ενέχεται στη ρύθμιση της έκφρασης είτε αλληλοεπιδρώντας με ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο υποδοχέας οιστρογόνων (ER), είτε με άλλους παράγοντες όπως στην περίπτωση των γονιδίων *c-Met* και *myostatin* όπου συγκροτεί την πρωτεΐνη BRD4 η οποία με τη σειρά της θα συγκροτήσει τον pTEF-b παράγοντα την επιμήκυνση (52). Επιπλέον, από τις αρχικές μελέτες του Hamamoto βρέθηκε ότι η SMYD3, σε *in vitro* συνθήκες, δύναται να προσδένεται στο DNA αναγνωρίζοντας την αλληλουχία 5'-

CCTCCC-3' (34). Τη θέση αυτή ενισχύει η μελέτη των Sarris et al. σε *in vivo* σύστημα όπου προσδιόρισε διάφορες αλληλουχίες πρόσδεσης (42). Τέλος από την ίδια μελέτη προέκυψε και το ενδεχόμενο η SMYD3 να αλληλοεπιδρά με την H3K4me3 στους υποκινητές των γονιδίων.

Η δράση της SMYD3 επεκτείνεται και στο κυτταρόπλασμα καταλύοντας τη μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης μη ιστονικών πρωτεϊνών. Από τους γνωστούς στόχους της είναι η K831 του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων των αγγείων 1 (VEGFR1). Η K831 βρίσκεται στο ενεργό κέντρο της επικράτειας κινάσης της πρωτεΐνης και η μεθυλίωση της οδηγεί σε αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά την αυτοφωσφορυλίωση ενισχύοντας έτσι τη δράση της (53). Ομοίως με τον VEGFR1, η SMYD3 μεθυλιώνει τη K175 του υποδοχέα του ανθρώπινου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα 2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 ή HER2). Η μεθυλίωση αυτή προάγει τον διμερισμό του υποδοχέα προωθώντας έτσι την ενεργοποίησή του (54). Τέλος έχει καταγραφεί ότι κυτταροπλασματικός στόχος της SMYD3 αποτελεί και η κινάση AKT1. Η SMYD3 καταλύει τη μεθυλίωση της K14 της AKT1 που βρίσκεται στην επικράτεια PHD η οποία είναι υπεύθυνη για τη συγκρότηση της κινάσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η μεθυλίωση φαίνεται να ενισχύει αυτήν τη λειτουργία προάγοντας έτσι την ενεργοποίησή της (55).

#### 1.1.3.5 Εμπλοκή στη Παθογένεια

Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου *smyd3* είναι χαρακτηριστικό πολλών διαφορετικών καρκινικών τύπων. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από πάρα πολλά δεδομένα μελετών σε ένα μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών, όπου η τεχνητά επαγόμενη μείωση της έκφρασής της οδηγεί σε μειωμένη προαγωγή των σχετιζόμενων με τον καρκίνο διαδικασιών. Μια από αυτές είναι ο υπέρμετρος κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Η SMYD3 έχει εκτενή ρόλο καθώς φαίνεται να ρυθμίζει μεταξύ άλλων πολλά γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως διάφορους αναστολείς των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, γονίδια σχετιζόμενα με την απόπτωση (39) και το γονίδιο της τελομεράσης (TERT) το οποίο με τη δράση του επιμηκύνει τον χρόνο ζωής των κυττάρων (56). Στο ίδιο πλαίσιο η SMYD3 συμμετέχει στη μετάπτωση από τη μία φάση του κυτταρικού κύκλου στην άλλη, καθώς απουσία της έχει καταγραφεί η αναστολή του κυτταρικού κύκλου στη μετάπτωση G0/G1, S/G2 & G2/M (39).

Εξίσου σημαντικός είναι και ο ρόλος της πρωτεΐνης στη διαδικασία της μετάστασης. Στον καρκίνο των ωοθηκών η επαγωγή knock down στην έκφραση του γονιδίου *smyd3* οδηγεί σε μειωμένη μεταστατική ικανότητα του όγκου. Σε αυτή τη περίπτωση η δράση της SMYD3 φαίνεται να προκαλεί την αυξημένη έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν διάφορες ιντεγκρίνες (57). Ωστόσο μια ακόμα έρευνα πρότεινε τη συμμετοχή της στη μετάσταση μέσω της αλληλεπίδρασής της με την p53 όπου η σταθερότητα αυτής ελαττώνεται και οδηγείται για αποικοδόμηση (58). Μαζί με αυτά η SMYD3 ενέχεται στη μετάσταση ρυθμίζοντας την έκφραση του LOXL2 (Lysyl Oxidase like 2), ο οποίος ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια που εμπλέκονται στην απόκτηση μεταναστευτικών χαρακτηριστικών, όπως αυτό των κινασών του σαρκώματος (Sarcoma ή Src) και των κινασών των εστιακών προσφύσεων (Focal Adhesion Kinase ή FAK) στο γαστρεντερικό καρκίνο (59, 60). Για να είναι εφικτή η μετάσταση, πρέπει τα κύτταρα του πρωτογενούς όγκου να αποκτήσουν μεταναστευτικές ιδιότητες ώστε να μπορούν να μεταφερθούν σε άλλους ιστούς. Στους ιστούς που αποτελούνται από επιθηλιακού τύπου κύτταρα, όπως το ήπαρ ή ο βλεννογόμος του γαστρεντερικού σωλήνα κ.α., αυτό επιτυγχάνεται με μια διαδικασία που λέγεται επιθηλιακή/μεσεγχυματική



μετάπτωση (Epithelial-Mesenchymal Transition ή EMT). Η SMYD3 εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαδικασίας αυτής στους διάφορους καρκινικούς τύπους ρυθμίζοντας κατάλληλα την έκφραση πολλών εμπλεκόμενων γονιδίων όπως c-Met, MMP-2 & 9, VIMENTIN και πολλών άλλων (39).

Στον χημικά επαγόμενο ηπατοκυτταρικό καρκίνο η SMYD3 έχει καθοριστικό ρόλο. Σε πειράματα επαγωγής *smyd3*KO του σε ποντίκια φάνηκε ότι η απουσία της ελαττώνει σημαντικά την ανάπτυξή του. Ωστόσο η δράση της SMYD3 δεν αποτελεί τον θεμελιώδη και καθοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξη του όγκου καθώς σε ένα διαγονιδιακό μοντέλο ποντικού που υπερεκφράζεται το γονίδιο *smyd3*, δεν παρατηρείται αυξημένη εμφάνιση αυθόρμητων καρκίνων. Αυτό το δεδομένο δείχνει ότι, τουλάχιστον για τον HCC, η SMYD3 λειτουργεί ως ενισχυτής (potentiator) της διαδικασίας. Μηχανιστικά στον HCC η SMYD3 λειτουργεί ως ρυθμιστής της μεταγραφής γονιδίων που ελέγχουν την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και τον ανταποδοτικό πολλαπλασιασμό (compensatory proliferation) και όχι την απόπτωση και τη φλεγμονή (42).

Η SMYD3 εμπλέκεται ακόμα στον καρκίνο του πνεύμονα και στον αδενωματικό καρκίνο του παγκρέατος. Η πρωτεΐνη προάγει αυτούς τους καρκινικούς τύπους ενισχύοντας το μονοπάτι των κινασών RAS-RAF-MEK-ERK. Συγκεκριμένα η SMYD3 μεθυλιώνει τη K260 της επαγόμενης από μίτωση πρωτεϊνικής κινάσης 3K2 (Mitogen-activated protein KKK kinase 2 ή MAP3K2). Η μεθυλίωση αυτή αποτρέπει την πρόσδεση στη MAP3K2 της πρωτεϊνικής φωσφατάσης 2A (Protein Phosphatase 2A ή PP2A) που έχει ανασταλτική επίδραση σε αυτή. Έτσι η MAP3K2 φωσφορυλιώνει τις ERK ενισχύοντας το παραπάνω μονοπάτι των MAPKs (23).

Σε κάποιους καρκινικούς τύπους έχουν χαρακτηριστεί συγκεκριμένα μονοπάτια τα οποία στοχεύουν στην υπερέκφραση του γονιδίου *smyd3*. Μια τέτοια περίπτωση είναι στη λευχαιμία (Chronic Lymphocytic Leukemia ή CLL) όπου το σηματοδοτικό μονοπάτι IL-6/STAT3 προάγει την έκφραση του *smyd3* άμεσα καθώς ο STAT3 προσδέεται στο υποκινητή του (61). Ακόμα ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι το γονίδιο *smyd3* επάγεται στα καρκινικά βλαστοκύτταρα στον καρκίνο του στομάχου. Σε αυτήν την περίπτωση η πρωτεΐνη SMYD3 εμπλέκεται στη διατήρηση του βλαστοκυτταρικού φαινοτύπου προάγοντας την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ASCL2. Η ενεργοποίηση του *smyd3* πραγματοποιείται από το μονοπάτι Wnt3a/ β-κατενίνης (62).

Πέρα όμως από την εμπλοκή της στον καρκίνο η SMYD3 έχει ρόλο και σε άλλες καταστάσεις παθολογικές και μη. Παραπάνω αναφέρθηκε ο ρόλος στη ρύθμιση της διαμέτρου της μυϊκής ίνας. Η SMYD3 αποκρίνεται στη σηματοδότηση από τα κορτικοστεροειδή και προωθεί τη μυϊκή ατροφία μέσω των γονιδίων c-Met και Myostatin (23). Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι σχετικά πρόσφατα άρχισαν να προκύπτουν στοιχεία, τα οποία συνδέουν τη SMYD3 με τη γήρανση των αγγείων. Σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς RAEC (Rat Aorta Endothelial Cells) που είχαν υποστεί επώαση με Αγγειοτενσίνη II για την επαγωγή γήρανσης φάνηκε ότι η SMYD3 υπερεκφράζεται και προωθεί τη γήρανση μέσω της p21 (63) και του PARP16 (64). Επιπλέον όταν γινόταν knock down στη SMYD3 ελαττώνονταν και η γήρανση.

Η εκτενής εμπλοκή της πρωτεΐνης SMYD3 καθώς και η έλλειψη δυσλειτουργιών κατά την αποσιώπησή της την έχει καταστήσει έναν πολλά υποσχόμενο φαρμακευτικό στόχο για αντικαρκινικές θεραπείες. Πολλές ουσίες χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της μελέτης για να αλληλοεπιδρούν με το ένζυμο

και να παρεμποδίζουν τις λειτουργίες του ώστε να γίνει κατανοητός ο ρόλος του (π.χ το BCI121 & EPZ031686). Ταυτόχρονα αξιοποιούνται και ως μοντέλα για τη δημιουργία ουσιών ικανών να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου. Ωστόσο, όλα βρίσκονται στη φάση των προ-κλινικών δοκιμών καθώς η αποτελεσματικότητά τους σε *in vivo* συστήματα δεν έχει ακόμα φτάσει τα επιθυμητά επίπεδα (39). Η συλλογή όλο και περισσότερων δομικών δεδομένων που αφορούν την ίδια την πρωτεΐνη και τον τρόπο που αλληλοεπιδρά με το υπόστρωμα, τον συμπαράγοντα καθώς και άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη δράση της μπορεί να συνδράμουν σε αυτήν τη διαδικασία οδηγώντας σε όλο και καλύτερες υποψήφιες ουσίες (65). Κλείνοντας αξίζει να αναφερθεί μια πρόσφατη μελέτη που ανέπτυξε μια θεραπευτική προσέγγιση, η οποία χρησιμοποιεί αντί-νοηματικά ολιγονουκλεοτίδια (anti-sense oligonucleotides, ASOs) τα οποία στοχεύουν το mRNA της SMYD3 και είχαν πολύ καλά αποτελέσματα σε *in vivo* πειράματα σε ποντίκια που έπασχαν ήδη από χημικά επαγόμενο HCC (66).

#### 1.1.4 Επιγενετική και ηπατική αναγέννηση

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί συμβάλλουν στη διεκπεραίωση πολλών βιολογικών διεργασιών. Η αναγέννηση είναι μια από αυτές. Η πιο γνωστή και καλύτερα μελετημένη αναγεννητική διαδικασία στα θηλαστικά είναι η ηπατική. Η έρευνα σχετικά με τη συνεισφορά των επιγενετικών μηχανισμών στη διεξαγωγή της ηπατικής αναγέννησης βρίσκεται ακόμα σε αρχικό στάδιο. Ωστόσο υπάρχουν κάποια δεδομένα εκ των οποίων τα περισσότερα αφορούν τη μεθυλίωση του DNA (67). Κατά την ηπατική αναγέννηση φαίνεται να αλλάζει το πρότυπο μεθυλίωσης ορισμένων ρυθμιστικών στοιχείων που διέπουν την έκφραση γονιδίων τα οποία σχετίζονται με αναγέννηση. Ταυτόχρονα διαφοροποιήσεις έχουμε και στο πρότυπο έκφρασης των μεθυλοτρανσφερασών του DNA. Τόσο το πρότυπο μεθυλίωσης όσο και το πρότυπο έκφρασης των τελεστών της φαίνεται να επιστρέφουν σε αυτό που υπήρχε κατά την εμβρυική φάση της ανάπτυξης (68, 69). Όσον αφορά την ακετυλίωση, τα περισσότερα δεδομένα αφορούν τη δράση των απακετυλασών η οποία αυξάνεται αισθητά οδηγώντας στην απενεργοποίηση γονιδίων που σχετίζονται με την απόπτωση ή που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό. Ακόμα η δράση τους σχετίζεται με την προαγωγή του κυτταρικού κύκλου. Ο ρόλος της μεθυλίωσης των ιστονών είναι ελάχιστα γνωστός στα πλαίσια της ηπατικής αναγέννησης. Κάποιες μελέτες έχουν εντοπίσει τη συνεισφορά των μεθυλοτρανσφερασών EZH1 και 2 του ανασταλτικού συμπλόκου PRC2 καθώς απουσία αυτών αναστέλλεται η ηπατική αναγέννηση πιθανώς λόγω της μη αναστολής της έκφρασης γονιδίων που εκφράζουν αναστολείς του κυτταρικού κύκλου (67).

## 1.2 Αναγέννηση

### 1.2.1 Αναγέννηση ως βιολογικό φαινόμενο

Ένα από τα θέματα που έχει απασχολήσει πολύ τη βιοϊατρική έρευνα είναι το φαινόμενο της αναγέννησης. Με τον όρο αυτό αναφερόμαστε στην ικανότητα που έχουν οι διάφοροι ζωικοί οργανισμοί να αναπλάθουν τμήματα ιστού ή οργάνων είτε ακόμα και ολόκληρα τμήματα του σώματος τους τα οποία καταστράφηκαν ή απομακρύνθηκαν με τραυματισμό (70). Η ικανότητα αυτή αφενός ποικίλει σε δυναμική μεταξύ των ειδών και αφετέρου εμφανίζεται διάσπαρτα σε μερικά είδη μεταξύ των οποίων είναι η Ύδρα, οι Πλανάριοι, κάποια είδη σαλαμάνδρας (71), η *Drosophila*, ο *Xenopus*, το Zebrafish και το ποντίκι (71, 72, 73).

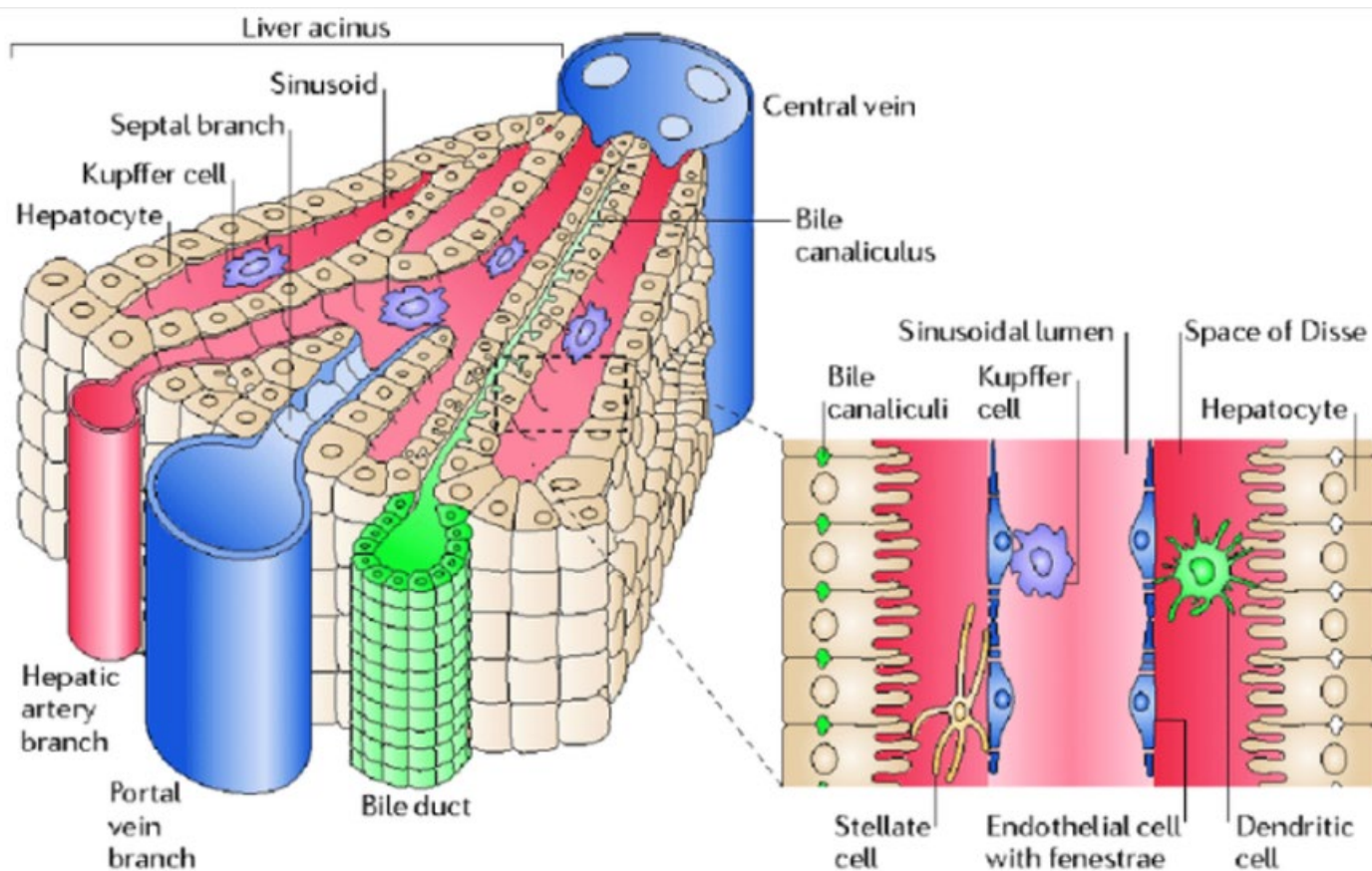
Η αναγεννητική διαδικασία που αφορά την επανασύνθεση ολόκληρων σωματικών δομών που αποτελούνται από πολλούς τύπους ιστών ονομάζεται επιμορφική (epimorphic). Η καλύτερα μελετημένη περίπτωση είναι η αναγέννηση ενός κολοβωμένου άκρου. Η διαδικασία χωρίζεται σε συγκεκριμένα στάδια. Αρχικά ο επιδερμικός ιστός καλύπτει το τραύμα. Κατόπιν εσωτερικά αυτού αναπτύσσεται, με αποδιαφοροποίηση των κυττάρων του εναπομείναντος ιστού, το βλάστημα από όπου θα προκύψει το αναγεννημένο τμήμα (71, 73). Τα αποδιαφοροποιημένα κύτταρα του βλαστήματος δύνανται είτε να πολλαπλασιαστούν και να επαναδιαφοροποιηθούν στον αρχικό τους τύπο, είτε να διαφοροποιηθούν και σε άλλους τύπους (74).

Πέρα από την επιμορφική αναγέννηση, στον ορισμό περιλαμβάνονται και οι διαδικασίες επούλωσης και ανανέωσης του ιστού. Τα θηλαστικά, αν και δε χαρακτηρίζονται γενικά από σπουδαία επιμορφική αναγεννητική ικανότητα, παρουσιάζουν αξιοσημείωτα παραδείγματα αναγέννησης σε επιμέρους ιστούς και όργανα. Το πιο γνωστό παράδειγμα είναι το ήπαρ. Ωστόσο σημαντικές είναι και οι περιπτώσεις του σκελετικού μυ, τα αιμοφόρα αγγεία, η επιδερμίδα και το επιθήλιο του γαστρεντερικού σωλήνα (71,75). Εξαιρώντας το ήπαρ, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η ανάπλαση επιτυγχάνεται με τη συμβολή βλαστοκυττάρων. Τα βλαστοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και αφότου διαφοροποιηθούν, αναπληρώνουν τον κατεστραμμένο ιστό. Η σωστή αιμάτωση είναι απαραίτητη σε αυτές τις περιπτώσεις καθώς το αίμα φέρει παράγοντες που είναι αναγκαίοι, όπως είναι οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. Επιπλέον, σημαντική είναι και η σύσταση της εξωκυτταρικής μήτρας. Το εξωκυτταρικό υλικό που υπάρχει στον υπό αναγέννηση ιστό, πέρα από ότι λειτουργεί σαν ικρίωμα πάνω στο οποίο αυτός θα «ανοικοδομηθεί», έχει και ρυθμιστικό ρόλο. Ένα αντιπροσωπευτικό παράδειγμα είναι η σύνθεση ουλώδους ιστού κατά την ανάπλαση του δέρματος η οποία δρα ανασταλτικά. Αντίστοιχο αποτέλεσμα έχει και η υπέρμετρη συσσώρευση κολλαγόνου στον σκελετικό μυϊκό ιστό. Τέλος, ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την αναγεννητική ικανότητα είναι η ηλικία. Κατά κανόνα όσο αυξάνεται η ηλικία ενός ατόμου τόσο μειώνεται και η αναγεννητική δυναμική των ιστών του (71).

## 1.2.2 Ηπατική Αναγέννηση

### 1.2.2.1 Σχετικά με το Ήπαρ

Μιλώντας κανείς για αναγέννηση αναπόφευκτα θα αναφερθεί στο ήπαρ. Αυτό το ζωτικής σημασίας όργανο, πέρα από τις διάφορες λειτουργίες του (μεταβολισμό και αποθήκευση προσλαμβανόμενων θρεπτικών καθώς και άλλων μεταβολικών αποβλήτων, αδρανοποίηση ξеноβιοτικών, σύνθεση συστατικών του αίματος και της χολής κ.α.) χαρακτηρίζεται από υπέρμετρη ικανότητα να αναπλάθει τον ιστό του σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις καταστροφής του. Το γεγονός αυτό περιλαμβάνεται στο γνωσιακό αρχείο της ανθρωπότητας από την αρχαιότητα με τη μορφή του μύθου του Προμηθέα (76). Το 1931 ο Higgin και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι τα τρωκτικά που υποβάλλονται σε χειρουργική αφαίρεση των δυο τρίτων περίπου του ήπατος μπορούν να επιβιώσουν καταφέροντας μάλιστα να αναπληρώσουν τη μάζα του οργάνου φτάνοντάς την στην αρχική του κατάσταση δίνοντας πλέον επιστημονική βάση στο περιεχόμενο του μύθου. Από τότε η παραπάνω διαδικασία, που ονομάζεται μερική ηπατεκτομή, αποτέλεσε ένα βασικό μοντέλο στην έρευνα σχετικά με την ηπατική αναγέννηση (77). Πέραν όμως της ικανότητας του να αναπλάθεται μετά από αφαίρεση κάποιου τμήματος του, το ήπαρ εμφανίζει τεράστια δυναμική επιδιόρθωσης βλαβών που δημιουργούνται από άλλους παράγοντες όπως οι ιοί της ηπατίτιδας, ξеноβιοτικά με χαρακτηριστικό παράδειγμα το αλκοόλ και από βλάβες λόγω επεισοδίων ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.

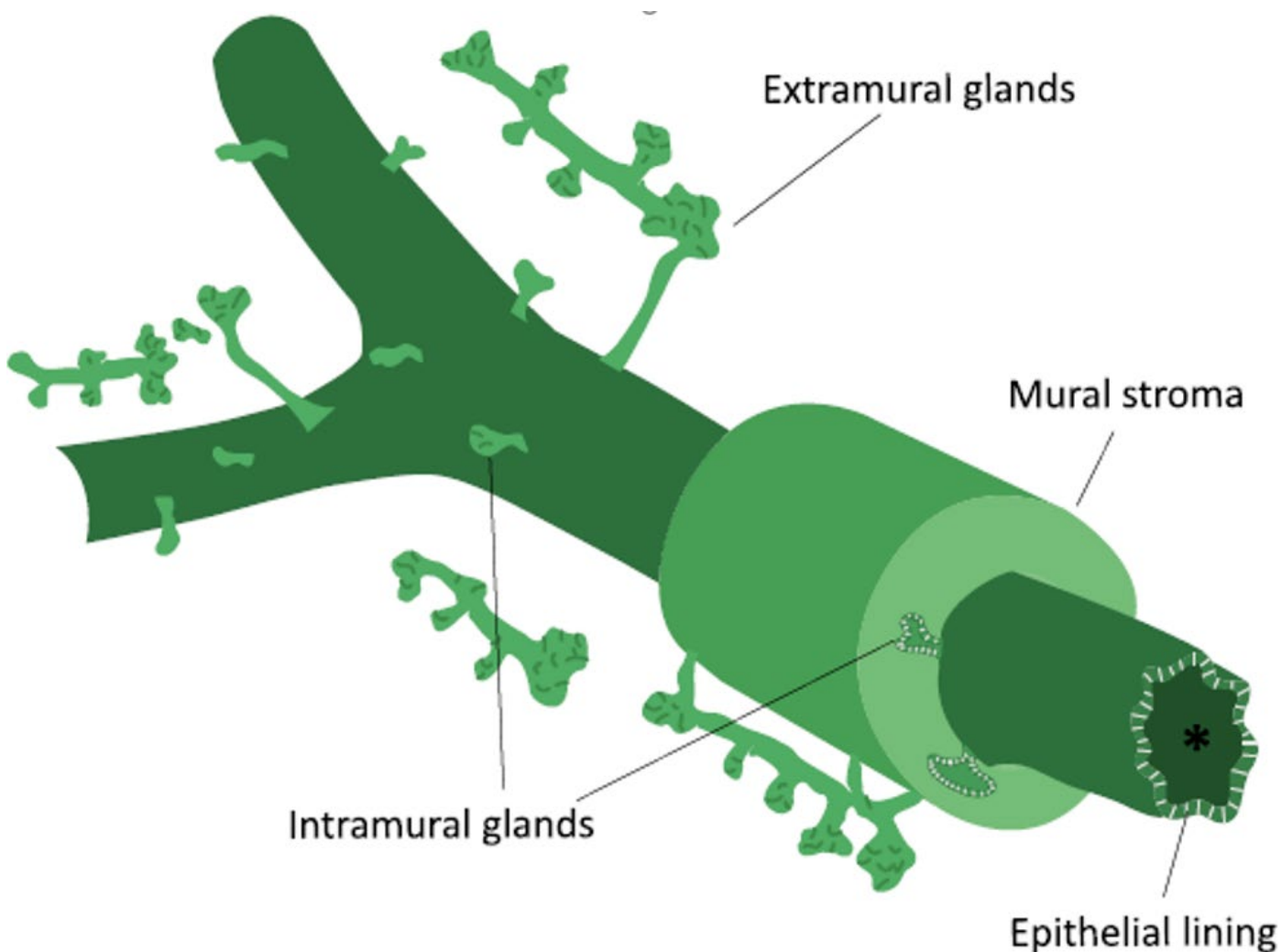


Εικόνα 2 Στην εικόνα φαίνεται η δομή ενός τυπικού ηπατικού λοβίου. Διακρίνονται τα ηπατοκύτταρα (Hepatocytes) τα οποία διατάσσονται γύρω από τον αυλό των κολποειδικών αγγείων (sinusoids) και των χολικών καναλιών (bile canaliculi). Στη μεγεθυμένη εικόνα φαίνεται το διάστημα μεταξύ της κορυφαίας πλευράς των ηπατοκυττάρων και των κολποειδικών ενδοθηλιακών κυττάρων, που ονομάζεται χώρος του Disse, στον οποίο εντοπίζονται τα αστεροειδή (stellate) κύτταρα καθώς και άλλα δένδριτικά κύτταρα. Στον αυλό των κολποειδών ενδημούν τα εξειδικευμένα ηπατικά μακροφάγα που λέγονται κύτταρα του Kupffer. Περιφερειακά του

Το ήπαρ περιέχει πολλούς κυτταρικούς τύπους και χαρακτηρίζεται από υψηλή και αυστηρή οργάνωση (εικόνα 2). Ο κυριότερος κυτταρικός τύπος είναι τα λεγόμενα παρεγχυματικά κύτταρα δηλαδή τα χολαγγειοκύτταρα και τα ηπατοκύτταρα. Τα ηπατοκύτταρα θυμίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα και διεκπεραιώνουν όλες τις γνωστές ηπατικές λειτουργίες. Άλλοι κυτταρικοί τύποι είναι τα αστεροειδή (stellate) κύτταρα, τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και μια κατηγορία ειδικών μακροφάγων που λέγονται κύτταρα του Kupffer. Όλοι αυτοί οι κυτταρικοί τύποι οργανώνονται και δημιουργούν τα ηπατικά λοβία, τη λειτουργική μονάδα του οργάνου. Κάθε ηπατικό λοβίο χαρακτηρίζεται από ένα πολυγωνικό (συνήθως εξαγωνικό) σχήμα. Στις κορυφές αυτού του σχηματισμού εντοπίζεται μια τριάδα αγγείων, ένα από την πυλαία φλέβα που μεταφέρει αίμα από το στομάχι, το έντερο και τη σπλήνα μέσα στο ήπαρ (πυλαία κυκλοφορία), ένα από την ηπατική αρτηρία που φέρει αίμα από την καρδιά και ένα χοληφόρο αγγείο που μεταφέρει τις χολικές εκκρίσεις των ηπατοκυττάρων είτε στο δωδεκαδάκτυλο για τη διεξαγωγή της πέψης είτε στη χοληδόχο κύστη για αποθήκευση και μετέπειτα χρήση της. Στο κέντρο του ηπατικού λοβίου βρίσκεται η κεντρική ηπατική φλέβα η οποία συλλέγει το αίμα που έχει εισέλθει στο ήπαρ και το επανεισάγει στη συστηματική κυκλοφορία και πίσω στην καρδιά. Οι δυο αυτές αγγειακές μοίρες επικοινωνούν μεταξύ τους με τριχοειδή αγγεία τα οποία στο ήπαρ ονομάζονται κολποειδή (sinusoids). Τα κολποειδή σχηματίζονται από τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία έχουν αναπτύξει ειδικές προσαρμογές που τα διαφοροποιούν από το συνηθισμένο πρότυπο των τριχοειδών, όπως η έλλειψη βασικής μεμβράνης και ο σχηματισμός ειδικών πόρων μεγάλων σε διάμετρο και υψηλής διευθέτησης, τις θυρίδες (fenestrae). Στον χώρο ανάμεσα στα κολποειδή (χώρος του Disse) τα ηπατοκύτταρα διατάσσονται σε στήλες που εκτείνονται από την κεντρική φλέβα ως την περιφέρεια του λοβίου. Ομοίως με τα επιθηλιακά κύτταρα, τα ηπατοκύτταρα αναπτύσσουν στενοσυνδέσμους και εμφανίζουν πολικότητα. Από τη βασοπλευρική μεριά τα ηπατοκύτταρα βλέπουν τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και στον χώρο που σχηματίζεται ανάμεσα τους βρίσκονται τα αστεροειδή κύτταρα. Οι κορυφαίες επιφάνειες των γειτονικών ηπατοκυττάρων σχηματίζουν μικρά κανάλια (bile canaliculi) στα οποία εκκρίνεται η χολή και μέσω αυτών φτάνουν στα λεγόμενα κανάλια του Hering τα οποία αποτελούν ένα ενδιάμεσο χώρο που ενώνει το πιο περιφερειακό τμήμα των χολικών αγγείων με τα ηπατοκύτταρα. Τέλος τα κύτταρα του Kupffer βρίσκονται στο εσωτερικό του αυλού των κολποειδών. (77, D).

Το σύνολο των χοληφόρων αγγείων που διατρέχουν το ήπαρ ονομάζεται χοληφόρο δέντρο. Το χοληφόρο δέντρο δομείται από τα χολαγγειοκύτταρα και μπορεί να διακριθεί με βάση τη μορφολογία του και την ακτίνα του αυλού των αγγείων σε ενδοηπατικό (IHBD) και εξωηπατικό (EHBD). Η ενδοηπατική μοίρα διακρίνεται περαιτέρω στους μικρούς και στους μεγάλους ενδοηπατικούς πόρους. Οι IHBDs συγκλίνουν και σχηματίζουν τον κοινό χοληφόρο πόρο ο οποίος εισέρχεται στο πάγκρεας, συμβάλει με τον παγκρεατικό πόρο και καταλήγει στο δωδεκαδάκτυλο. Οι μεγάλοι ενδοηπατικοί και οι εξωηπατικοί πόροι σχηματίζουν κατά μήκος του αυλού τους λεγόμενους περιχοληφόρους αδένες (peribiliary glands) οι οποίοι είναι βυθισμένοι στο τοίχωμα (εικόνα 3). Οι αδένες που βρίσκονται παραπλευρώς από τον αυλό του πόρου ονομάζονται εσωτοιχωματικοί (intramural) ενώ όσοι είναι τοποθετημένοι πιο μακριά εξωτοιχωματικοί

(extramural). Το επιθήλιο αυτών των αδένων έχει σημαντική δράση στη ρύθμιση της σύστασης των χολικών εκκρίσεων καθώς παράγει και απελευθερώνει διττανθρακικό νάτριο, ιόντα χλωρίου καθώς και νερό. Επίσης εκκρίνονται και παράγοντες που διασφαλίζουν την ακεραιότητα του χοληφόρου συστήματος από επιβλαβείς συστατικά της χολής. Τέτοιοι παράγοντες είναι διάφορες βλενώδεις γλυκοπρωτεΐνες, λιπάσες και πρωτεάσες. Οι μεγάλοι IHBDs και οι EHBDs περιβάλλονται από συνδετικό ιστό, αιμοφόρα αγγεία και καθώς οι πόροι μεγαλώνουν σε διάμετρο από λείο μυϊκό ιστό. Όλα αυτά αποτελούν το τοίχωμα του χοληφόρου πόρου (79).



Εικόνα 3 Στην εικόνα απεικονίζονται τα διάφορα διαμερίσματα που συγκροτούν το μεγάλο ενδοηπατικό και εξωηπατικό χοληφόρο σύστημα. Πάνω σε αυτό διακρίνονται οι ενδοτοιχωματικοί (Intramural) και οι εξωτοιχωματικοί (extramural) αδένες.

### 1.2.2.3 Γενικές αρχές ηπατικής αναγέννησης

Κατά την αναγέννηση όλοι οι παραπάνω κυτταρικοί τύποι συνεισφέρουν στην πραγματοποίησή της. Όταν κάποιος καταστρεπτικός παράγοντας επιδράσει στο όργανο και οδηγήσει σε βλάβη τότε έχουμε τη λεγόμενη οξεία καταστροφή ή βλάβη (acute liver failure). Αν όμως η έκθεση και η απόκριση στον παράγοντα είναι επαναλαμβανόμενη τότε σταδιακά οδηγούμαστε στη χρόνια βλάβη (chronic liver failure). Η

φλεγμονή, η ελεγχόμενη ίνωση και ο αυξημένος ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι τα βασικότερα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα κατά την αναγέννηση. Κατά κανόνα στις οξείες φλεγμονές ο ιστός αναπληρώνεται με τον πολλαπλασιασμό των παρεγχυματικών κυττάρων. Στις περιπτώσεις όμως όπου ο πολλαπλασιασμός των ηπατοκυττάρων παρακωλύεται, όπως στις σοβαρές ηπατικές ανεπάρκειες ή στις χρόνιες βλάβες, η διεκπεραίωση της αναγέννησης αναλαμβάνουν να φέρουν σε πέρας τα λεγόμενα ηπατικά προγονικά κύτταρα (80). Η κλασική βιοϊατρική έρευνα σχετικά με την αναγέννηση βασίζεται κατά κύριο λόγο σε δεδομένα που προκύπτουν από πειράματα σε τρωκτικά, αν και χρησιμοποιούνται και άλλοι οργανισμοί όπως το ψάρι ζέβρα (zebrafish). Στα τρωκτικά έχουν αναπτυχθεί πολλά πρότυπα συστήματα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη διαφορετικών περιπτώσεων ηπατικής βλάβης. Πρωταρχική θέση έχει η μερική ηπατεκτομή καθώς και μοντέλα που βασίζονται στην ηπατοτοξική δράση ουσιών όπως ο τετραχλωράνθρακας (CCl<sub>4</sub>), η ακεταμινοφαίνη (APAF) και η D-γαλακτοζαμίνη. Ακόμα έχουν αναπτυχθεί και μοντέλα που προσομοιάζουν ηπατικές ανεπάρκειες και βλάβες που οφείλονται σε μεταβολικές δυσλειτουργίες όπως το μετάλλαγμα απώλειας λειτουργίας για το ένζυμο υδρολάση του φουμαρυλοακετοξικού (Fumaryl Acetylacetate Hydrolase-deficient ή FAH-deficient) καθώς και μια ειδική δίαιτα φτωχή σε χολίνη και προσθήκη αιθιονίνης στο νερό (CDE) (81).

### 1.2.2.3 Οξεία ηπατική βλάβη και αναγέννηση

Μελετώντας το μοντέλο της ηπατεκτομής, σωρεία δεδομένων έχουν προκύψει για την αναγέννηση του ήπατος. Αν εξεταστούν συνολικά, παρατηρείται ότι η διαδικασία της αναγέννησης μπορεί να χωριστεί σε τρεις επιμέρους φάσεις: την προπαρασκευαστική, τη φάση πολλαπλασιασμού και τη φάση τερματισμού. Ένα βασικό εναρκτήριο ερέθισμα είναι το γεγονός ότι ο εναπομείναντας ιστός λαμβάνει πολύ μεγαλύτερη αιμάτωση. Αυτό μεταφράζεται και σε μεγαλύτερη έκθεση στα διάφορα συστατικά που περιέχονται στο αίμα, τα οποία προέρχονται από το πυλαίο σύστημα (θρεπτικά, μεταβολίτες, λιποσακχαρίτες προερχόμενους από την εντερική χλωρίδα καθώς και χολικά οξέα) (82). Πρώτοι αποδέκτες αυτών των αλλαγών είναι τα κύτταρα του Kupffer και τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επάγουν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτοκινών (π.χ. TNF-α, IL-6), αυξητικών παραγόντων όπως ο ηπατικός αυξητικός παράγοντας (Hepatic Growth Factor ή HGF) και διάφορους προσδέτες του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor ή EGFR) όπως ο EGF. Επιπλέον συντελείται η διαδικασία της «τριχοειδοποίησης» (Capillarization) όπου τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα χάνουν τον κολποειδικό χαρακτήρα τους και πλέον μοιάζουν με τα συνηθισμένα τριχοειδή. Οι παράγοντες αυτοί δρουν μέσω των υποδοχέων τους και των εσωτερικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος όπως ενεργοποίηση των κινασών του αμινοτελικού άκρου του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun (c-Jun N-Terminal Kinase ή JNK) και του καταρράκτη των επαγόμενων από την μίτωση πρωτεϊνικών κινασών (Mitogen-activated Protein Kinases ή MAPK). Τα μονοπάτια αυτά ελέγχουν τη δράση μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. NF-kB, STAT3) και έχουν ως αποτέλεσμα πολλές αλλαγές στην κυτταρική κατάσταση όλων των κυττάρων με χαρακτηριστικότερη τη μετάπτωση των ηπατοκυττάρων από την κατάσταση ηρεμίας (φάση G<sub>0</sub>) ξανά στη φάση G<sub>1</sub>. Να σημειωθεί ότι στην προπαρασκευαστική φάση ξεκινούν και οι διεργασίες που αφορούν την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM) (82, 83).

Η έναρξη της φάσης πολλαπλασιασμού σηματοδοτείται με την μετάπτωση των κυττάρων από τη φάση G<sub>1</sub> στη φάση S όπου γίνεται η αντιγραφή του DNA και ακολούθως ξεκινάει ο κυτταρικός

πολλαπλασιασμός. Σε αυτό το στάδιο αναπτύσσεται ένα πολυδιάστατο δίκτυο διακυτταρικής επικοινωνίας που βασίζεται επί το πλείστον σε εκκρινόμενα σηματοδοτικά μόρια. Οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι προσαρμόζουν τις λειτουργίες τους με βάση αυτή τη σηματοδότηση πετυχαίνοντας έτσι μια πολύπλοκη μεν, αλλά ακριβή δε προαγωγή της αναγέννησης. Εξέχουσα θέση σε αυτό το δίκτυο έχουν οι διάφοροι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται όπως ο HGF που εκκρίνεται από τα κολποειδικά ενδοθηλιακά και από τα αστεροειδή κύτταρα και προάγει το πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων, ο VEGF που εκκρίνεται από τα ηπατοκύτταρα και από τα κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα και συντονίζει την αγγειογένεση καθώς και μέλη της οικογένειας FGF και EGF που προάγουν τον πολλαπλασιασμό στους παραπάνω κυτταρικούς τύπους (**81, 82**).

Η τελευταία φάση λέγεται τερματισμός όπου το όργανο έχει αναπληρώσει τον ιστό και η διαδικασία της αναγέννησης τερματίζεται με την αναστολή του εκτενούς πολλαπλασιασμού. Σε αυτό το στάδιο καθορίζεται η τελική διαμόρφωση του οργάνου, όπως το μέγεθος του, καθώς το αναγεννημένο όργανο αναδιαμορφώνει την ECM. Ο πιο γνωστός παράγοντας που συμμετέχει σε αυτό το στάδιο είναι ο παράγοντας αύξησης όγκων-β (Tumor Growth Factor ή TGF-β). Ο TGF-β έχει γενικά ανασταλτική δράση στον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων. Κατά κανόνα στο ήπαρ ο TGF-β παράγεται από τα αστεροειδή κύτταρα και συμμετέχει τόσο στη ρύθμιση της παραγωγής και της διαμόρφωσης της ECM από τα ίδια κύτταρα, όσο και στην επανεγκαθίδρυση των κολποειδικών δικτύων. Ωστόσο η δράση του δεν είναι πλήρως διευκρινισμένη (**81, 82, 84**). Επιπλέον σημαντική είναι και η συμβολή του μονοπατιού Hippo, ενός καταρράκτη κινασών που η ενεργοποίηση του οδηγεί στην φωσφορύλιωση και αναστολή των μεταγραφικών συνενεργοποιητών YAP και TAZ. Οι παράγοντες YAP και TAZ προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων και ελέγχουν την έκφραση γονιδίων που καθορίζουν το σχήμα του οργάνου αλληλοεπιδρώντας με διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες (π.χ. TEAD, SMAD) (**82**). Ακόμα ένας ρυθμιστής που εμπλέκεται στη ρύθμιση του παράγοντα YAP και σχετίζεται με την ηπατική αναγέννηση είναι η α-κατενίνη. Η α-κατενίνη είναι στοιχείο του κυτταροσκελετού και συμμετέχει στον σχηματισμό συνδέσμων πρόσφυσης, μιας κατηγορίας αλληλοεπιδράσεων κυττάρου-κυττάρου. Η ακεραιότητα αυτών των δομών υποδηλώνει αντίστοιχα την ακεραιότητα του ηπατικού ιστού. Ωστόσο η α-κατενίνη φαίνεται να μπορεί να αλληλοεπιδρά άμεσα με την YAP αναστέλλοντας τη λειτουργία της (**84**).

Οι παραπάνω διαδικασίες προσδιορίστηκαν και επαληθεύτηκαν χρησιμοποιώντας κατά κανόνα το μοντέλο της μερικής ηπατεκτομής. Το μοντέλο αυτό όμως αφορά μια περίπτωση οξείας ηπατικής βλάβης όπου ο εναπομείναντας ιστός παραμένει άθικτος. Ωστόσο στις περισσότερες κλινικές περιπτώσεις που σχετίζονται με ηπατικές ανεπάρκειες η βλάβη καταλαμβάνει όλο τον ιστό. Για αυτό τον λόγο είναι απαραίτητα και τα δεδομένα που προέρχονται από άλλα μοντέλα όπως η χορήγηση CCl<sub>4</sub> και APAF. Στο μοντέλο της APAF η βλάβη προκαλείται όταν η ποσότητα που χορηγείται είναι πολύ υψηλή. Αυτό έχει ως συνέπεια την υπερσυσσώρευση ενός ενδιάμεσου μεταβολίτη, του N-acetyl-benzoquinoneimine, τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών και την ενεργοποίηση των κυττάρων Kupffer (**81**). Με αντίστοιχο τρόπο δρα και ο CCl<sub>4</sub>. Όταν εισέλθει στα ηπατοκύτταρα αποτελεί υπόστρωμα των ενζύμων της οικογένειας P450 και κυρίως του CYP2E1. Έτσι σχηματίζεται η ρίζα τριχλωρομεθυλίου (CCl<sub>3</sub>•) η οποία μπορεί να αντιδρά με τα μακρομόρια οδηγώντας σε διαβρωτικές συνέπειες όπως υπεροξειδίωση των λιπαρών οξέων και τροποποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Αυτό οδηγεί τα κύτταρα σε νέκρωση (**85**). Ωστόσο παρόλες τις



διαφορές στην αιτία πρόκλησης της βλάβης φαίνεται ότι οι γενικές αρχές και η πορεία που περιεγράφηκε για το μοντέλο της μερικής ηπατεκτομής ισχύουν σε πολύ μεγάλο βαθμό και για τα υπόλοιπα μοντέλα (81).

#### 1.2.2.4 Χρόνια ηπατική βλάβη και αναγέννηση

Τα μοντέλα οξείας ηπατικής βλάβης έδωσαν μια πολύ καλή εικόνα της αναγεννητικής πορείας. Ωστόσο αυτές αφορούν ένα μικρό ποσοστό των ηπατικών δυσλειτουργιών που συναντιούνται στην κλινική πράξη. Το μεγαλύτερο ποσοστό ηπατικών παθολογικών καταστάσεων αφορά χρόνιες ανεπάρκειες και βλάβες. Τα συχνότερα αίτια είναι η χρόνια υπερκατανάλωση αλκοόλ που οδηγεί στη λεγόμενη αλκοολική διαταραχή του ήπατος (alcoholic liver disease ή ALD) καθώς και διάφορες μεταβολικής φύσης παθήσεις (π.χ. παχυσαρκία, διαβήτης) που οδηγούν στη μη αλκοολικής αιτίας λιπιδική διαταραχή του ήπατος γνωστή και ως NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease) η οποία χαρακτηρίζεται από παθολογική υπερσυσσώρευση λιπιδίων και σε μεγάλο βαθμό στεατικού οξέος παίρνοντας έτσι την ονομασία μη αλκοολικής αιτίας στεατοηπατίτιδα (NASH) (86). Διόλου αξιοκαταφρόνητο είναι και το ποσοστό χρόνιων βλαβών που οφείλεται στους ιούς της ηπατίτιδας HBV και HCV (87). Ανεξάρτητα από τα αίτια πρόκλησης μιας χρόνιας ηπατικής βλάβης, το όργανο εμφανίζει κοινά παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά. Η συνεχής και αδιάλειπτη φλεγμονή οδηγεί στην παραγωγή και υπερσυσσώρευση εξωκυτταρικής μήτρας από τα αστεροειδή κύτταρα στον χώρο του Disse μια κατάσταση που ονομάζεται ίνωση. Για αυτή τη διαδικασία τα αστεροειδή κύτταρα διαφοροποιούνται στους λεγόμενους μυοϊνοβλάστες οι οποίοι εξειδικεύονται στη σύνθεση και έκκριση στοιχείων της ECM όπως κολλαγόνο, ελασίνη, λαμινίνη καθώς και παράγοντες (TIMPs) που αναστέλλουν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) που αποικοδομούν την ECM. Τέλος δε μπορεί να παραληφθεί και ο ρόλος των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία είτε παράγουν στοιχεία της ECM, είτε ενέχονται στην ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων αλλάζοντας τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά όπως είναι ο βαθμός σύσπασης ή αγγειακός τόνος (που αυξάνεται) και εκκρίνοντας αυξητικούς παράγοντες όπως ο TGF-β και ο PDGF (77).

Η διαδικασία της παραγωγής νέας εξωκυτταρικής μήτρας από τα αστεροειδή κύτταρα είναι ωφέλιμη και απαραίτητη για την αναγεννητική διαδικασία. Ένα από τα κυριότερα σηματοδοτικά μόρια που συμβάλλουν σε αυτήν είναι ο TGF-β, ο οποίος αρχικά παράγεται κυρίως από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού που εισέρχονται στον ιστό και ξεκινούν τη φλεγμονώδη αντίδραση (77). Η σχέση των αστεροειδών κυττάρων με το ανοσοποιητικό είναι αμφίδρομη καθώς τα ίδια τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν φαγοκυτταρική και αντιγονοπαρουσιαστική δραστηριότητα η οποία συγκροτεί περισσότερους τελεστές του ανοσοποιητικού, ενισχύοντας έτσι την ενεργοποίησή τους και προωθώντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή της ECM. Ωστόσο, η παραγωγή και η έκκριση ECM αναστέλλεται όταν πλέον αποκατασταθεί η βλάβη. Το πρόβλημα εμφανίζεται όταν, στις περιπτώσεις που η βλάβη διαρκεί για μεγάλα χρονικά διαστήματα, η παραγωγή και η εναπόθεση εξωκυτταρικής μήτρας απορρυθμίζεται και οδηγεί σε λειτουργικές βλάβες λόγω της αλλαγής της σύστασης του μικροπεριβάλλοντος (77, 80). Τέτοιες αλλαγές αφορούν την ακαμψία του ιστού (η οποία αυξάνεται) και τη διάταξη των κυττάρων του. Ακόμα, λόγω αυτών των αλλαγών, καθιστά πολύ δύσκολη την απομάκρυνση της ECM από τα αποικοδομητικά ένζυμα. Ένα τέτοιο περιβάλλον είναι αποτρεπτικό για τη σωστή διεξαγωγή της αναγεννητικής πορείας (88). Η πολυκαιρισμένη παραμονή του οργάνου σε κατάσταση ίνωσης οδηγεί εντέλει το ήπαρ σε κίρρωση, μια παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από εκτενή αντικατάσταση του παρεγχύματος από συνδετικό

(ουλώδη) ιστό. Σε αυτό το στάδιο τα κύτταρα του ιστού εντοπίζονται να σχηματίζουν χαρακτηριστικές μικρές νησίδες. Τα κύτταρα που αποτελούν αυτές τις νησίδες περιέχουν και τους κυτταρικούς πληθυσμούς που θα φέρουν την αναγεννητική ικανότητα για την επούλωση και την ανάπτυξη του ιστού. Ο ηπατικός ιστός σε κατάσταση κίρρωσης έχει πολύ υψηλές πιθανότητες να οδηγηθεί στην ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκίνου (89).

#### 1.2.2.5 Ηπατικά προγονικά κύτταρα

Η αναγεννητική ικανότητα του ήπατος επεκτείνεται και στις χρόνιες βλάβες. Αν ο επιβλαβής παράγοντας απομακρυνθεί, το ήπαρ δύναται να επαναφέρει τον ιστό στη φυσιολογική του κατάσταση. Ωστόσο, η επιτυχία της αναγεννητικής διαδικασίας εξαρτάται τόσο από την αιτία, όσο και από το στάδιο και την έκταση της βλάβης. Σε αντίθεση με τις οξείες βλάβες, οι χρόνιες βλάβες συνοδεύονται σε μεγάλο βαθμό από την ανικανότητα των παρεγχυματικών κυττάρων να αναπληρώσουν τις απώλειες. Σε αυτές τις περιπτώσεις το αναγεννητικό έργο αναλαμβάνουν τα λεγόμενα ηπατικά προγονικά κύτταρα (LPCs), τα οποία διαφοροποιούνται είτε σε ηπατοκύτταρα είτε σε χολαγγειοκύτταρα. Στα τρωκτικά ταυτίζονται με τα λεγόμενα οβάλ κύτταρα (oval cells), τα οποία πήραν το όνομά τους από το χαρακτηριστικό οβάλ σχήμα τους. Επιπλέον παρουσιάζουν υψηλή τιμή αναλογίας πυρήνα: κυτταροπλάσματος και εντοπίζονται στα κανάλια του Hering, εκεί που συνορεύουν τα ηπατοκύτταρα με τα χολαγγειοκύτταρα (77). Κατά τις χρόνιες παθήσεις στο ήπαρ παρατηρείται στις περιοχές που βρίσκονται οι τριάδες αγγείων μια μορφολογικά διακριτή αύξηση της χοληφόρου μοίρας, η οποία στη βιβλιογραφία συναντάται ως αντίδραση πόρου (ductular reaction ή DR). Συγκεκριμένα έχουμε τον έκτοπο σχηματισμό πόρων από κύτταρα που εκφράζουν χολαγγειακούς δείκτες. Επιπλέον, στον ορισμό περιλαμβάνεται και το παρακείμενο περιβάλλον το οποίο αποτελείται από κύτταρα του ανοσοποιητικού, αστεροειδή, ηπατοκύτταρα και αναδιαμορφωμένη εξωκυτταρική μήτρα. Τα θετικά σε χολαγγειακούς δείκτες κύτταρα φαίνεται να προκύπτουν από τα προγονικά κύτταρα και να διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη διεξαγωγή της ανάπτυξης καθώς από εκεί θα προκύψουν τα προερχόμενα από τα LPCs παρεγχυματικά κύτταρα (90). Αν και από την εξέταση τομών του ιστού φαίνεται αυτές οι δομές να προήλθαν από μετανάστευση των μερικώς διαφοροποιημένων προγονικών κυττάρων, φάνηκε από μελέτες τρισδιάστατης απεικόνισης ότι προκύπτουν με αναδιαμόρφωση των χοληφόρων αγγείων (91).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το κύριο έναυσμα για την ενεργοποίηση των προγονικών κυττάρων είναι η αδυναμία των παρεγχυματικών κυττάρων να πολλαπλασιαστούν για να αναπληρώσουν τις απώλειες. Ωστόσο η ενεργοποίησή τους επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από την αλληλοεπίδραση τους με τα υπόλοιπα στοιχεία του οργάνου. Σε αυτά περιλαμβάνονται στοιχεία της φλεγμονής όπως ο TNF- $\alpha$ , IL-6 και η INF- $\gamma$ , που εκκρίνονται από κύτταρα της φυσικής ανοσίας αλλά και άλλοι παράγοντες όπως οι TWEAK (TNF-related WEAK inducer of apoptosis) και FGF-7 που ενέχονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού τους. Άλλοι παράγοντες που συμβάλουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης είναι οι HGF και EGF. Ο καθορισμός της μοίρας των LPCs, δηλαδή αν θα διαφοροποιηθούν σε χολαγγειοκύτταρα ή σε ηπατοκύτταρα φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σηματοδότηση NOTCH. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα NOTCH των LPCs από την πρωτεΐνη-προσδέτη του Jagged-1 των παρακείμενων μυοϊνοβλαστών εγκαθιδρύει ένα πρότυπο γονιδιακής έκφρασης που οδηγεί στον σχηματισμό χολαγγειοκυττάρων τα οποία αναπλάθουν τις βλάβες που υπάρχουν στο ενδοηπατικό

χοληφόρο σύστημα (77). Τέλος τα LPCs επηρεάζονται και από τη σύσταση της ECM. Συγκεκριμένα φαίνεται ότι ένα εξωκυτταρικό περιβάλλον πλούσιο σε λαμινίνη προωθεί τα LPCs να παραμείνουν αδιαφοροποίητα, ενώ αντίστοιχα για φιβρονεκτίνη προωθούν τη διαφοροποίηση σε ηπατοκύτταρα (80).

## 2.Σκοπός

Από προηγούμενη μη δημοσιευμένη δουλειά του εργαστηρίου είχε φανεί ότι η SMYD3 εμπλέκεται στην ανάπτυξη του μυϊκού ιστού καθώς σε ποντίκια με έλλειψη της λειτουργίας του γονιδίου αυτού, εμφάνιζαν συσσώρευση λιπιδικών κυττάρων μέσα στον αναγεννημένο ιστό. Είναι γνωστό ότι στον σκελετικό μυϊκό ιστό, η εμφάνιση λιπώδους ιστού προέρχεται από την απορυθμισμένη διαφοροποίηση ενός ενδημικού κυτταρικού τύπου, τα λεγόμενα ινωδο-λιπιδογενετικά κύτταρα (fibro-adipogenic cells ή FAPs). Αυτά τα κύτταρα είναι μεσεγχυματικής προέλευσης και ενέχονται στην παραγωγή ECM και τη ρύθμιση της μυϊκής ανάπτυξης (92). Τα αστεροειδή κύτταρα στο ήπαρ εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά και λειτουργίες. Σκοπός αυτής της εργασίας υπήρξε:

- Να ελεγχθεί αν η απουσία της SMYD3 έχει κάποιο αντίκτυπο στην διαδικασία της ηπατικής αναγέννησης.
- Να ελεγχθεί αν αναπτύσσεται συσσώρευση λιπώδους ιστού, σε αντιστοιχία με αυτήν στο μυϊκό ιστό, ή οποιαδήποτε άλλη ιστολογική διαφοροποίηση σε μοντέλο ηπατικής αναγέννησης.

# 3. Υλικά και Μέθοδοι

## 3.1 Ποντίκια και μεταχείριση

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ποντίκια C57Bl/6J (Jackson Laboratory) αγρίου τύπου καθώς και ποντίκια τα οποία έφεραν μετάλλαξη στο γονίδιο *smyd3* που οδηγεί σε απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης SMYD3 σε όλα τα κύτταρα (*smyd3*-KO) και κατασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στη δημοσίευση του Sarris et al (42). Τα ποντίκια μεγάλωσαν σε κλουβιά ελεύθερα μικροβίων, σε χώρο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία και διάρκεια μέρας-νύχτας 12h/12h. Τόσο η τροφή τους (Altromin 1324; 19% protein, 5% fat) όσο και το νερό παρέχονταν χωρίς να υπάρχει κάποιος περιορισμός (*ad libitum*). Η ευθανασία επιτυγχάνεται με τη μέθοδο της εξάρθρωσης του αυχενικού σπονδύλου. Για επαγωγή οξείας ηπατικής φλεγμονής και καταστροφής του ηπατικού παρεγχύματος αλλά και την ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης, χρησιμοποιήθηκε τετραχλωράνθρακας (CCl<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, 289116) αραιωμένος σε καλαμποκέλαιο (corn oil) με μια αναλογία 1:5. Σε κάθε ζώο χορηγήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή ένεση (IP) όγκος διαλύματος CCl<sub>4</sub>/corn oil αντίστοιχος με το βάρος του ποντικιού (1μl CCl<sub>4</sub>/corn oil ανά γραμμάριο ποντικιού) και συγκέντρωσης 2M. Η ηλικία των ζώων ήταν δύο έως τριών μηνών. Στη περίπτωση της οξείας ηπατικής φλεγμονής έγινε χορήγηση μία φορά και τα χρονικά σημεία στα οποία θυσιάστηκαν τα ζώα για τη λήψη του ήπατος ήταν: 0h, 24h, 48h, 72h, 7 μέρες και 14 μέρες. Για την ανάπτυξη της ηπατικής ίνωσης, η χορήγηση CCl<sub>4</sub> διήρκησε 7 εβδομάδες με δύο ενέσεις ανά εβδομάδα και τα ζώα θυσιάστηκαν δύο μέρες μετά τη τελευταία ένεση.

## 3.2 Ιστοχημεία

Μετά την απομόνωση του ιστού, ένα μέρος του ιστού που απομονώθηκε καλύφθηκε με ειδικό υδατοδιαλυτό υλικό κάλυψης (optimal cutting temperature ή OCT) και μετά σε υγρό άζωτο και κατάψυξη στους -80° C. Το υπόλοιπο μονιμοποιούνταν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 4% σε PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) για 24h. Κατόπιν τα μονιμοποιημένα πλέον δείγματα οδηγήθηκαν για παραφिनοποίηση. Συγκεκριμένα η διαδικασία περιλαμβάνει το στάδιο της αφυδάτωσης που πραγματοποιήθηκε με επώαση σε διαλύματα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης για μια ώρα η κάθε επώαση. Ακολουθούν δύο επώσεις σε ξυλένιο για 45 min ανά επώαση. Ο ιστός επωάζεται μέσα σε υγρή παραφίνη για τουλάχιστον 3 ώρες. Τέλος πραγματοποιείται η σκλήνωση, δηλαδή ο εγκλεισμός του ιστού σε παραφίνη (*Paraffin Embedding Station, Leica EG 1150H*). Σε αυτό το στάδιο ο ιστός οδηγήθηκε για τομές πάχους 5μm με μικροτόμο (*Rotary Microtome, Leica RM2255*).

Η χρώση αυτών των τομών έγινε με αιματοξυλίνη/ηωσίνη (Haematoxylin και Eosin ή H&E). Αρχικά οι τομές θερμαίνονται στους 62° C για 30min και κατόπιν επωάζονται διαδοχικά σε 3 διαφορετικά δοχεία με ξυλένιο. Κατόπιν γίνεται ενυδάτωση του δείγματος με διαδοχικές εμβάπτισεις σε αιθανόλη μειούμενης περιεκτικότητας. Αφού προηγηθεί ένα ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O, ακολουθεί δεκαπεντάλεπτη επώαση σε αιματοξυλίνη (Sigma-Aldrich® Mayer's Hematoxylin solution MHS32). Της χρώσης έπεται ακόμα ένα ξέπλυμα σε ddH<sub>2</sub>O και μια εμβάπτιση 2sec σε όξινη αιθανόλη 70% περιεκτικότητας 0,185% v/v σε HCl με σκοπό να απομακρυνθεί η μη ισχυρά προσδεμένη χρωστική (διαφοροποίηση). Για να γίνει πιο έντονο το

χρώμα της αιματοξυλίνης (blueing) ακολουθεί επώαση σε Scott's buffer (20mM KHCO<sub>3</sub>, 81,3mM MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O σε 1L νερού). Οι τομές εμβαπτίζονται στην ηωσίνη (Sigma-Aldrich® Eosin Y solution alcoholic HT110132) για 2min. Με το πέρας αυτού ακολουθεί μια διαδικασία αφυδάτωσης με εμβάπτιση σε αιθανόλη αυξανόμενης συγκέντρωσης. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την ενσωμάτωση του ιστού σε ειδικό μέσο (Atom Scientific, DPX Mountant Standard Viscosity).

### 3.3 Απομόνωση DNA

Το DNA που απομονώθηκε από τα ποντίκια προήλθε από βιοψία στην ουρά τους (tailing) κατά την οποία λήφθηκε ένα κομμάτι ουράς περίπου 0,5cm όταν αυτά ήταν σε ηλικία 2-3 εβδομάδες. Ο ιστός επώαστηκε στους 55° C για 24h μέσα σε ρυθμιστικό διάλυμα TNES (50mM Tris, 400mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% SDS) και πρωτεΐνάση K (0,55mg/ml τελική συγκέντρωση). Μετά την επώαση προστέθηκε στο δείγμα κορεσμένο υδατικό διάλυμα NaCl (1,25M τελική συγκέντρωση). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (RT) για 5min στις 14000rpm. Το υπερκείμενο υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση με αιθανόλη 100%. Το συσσωματωμένο εν αιωρήσει DNA συλλέχθηκε και εν τέλει επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TE (10mM Tris, pH 8.0, 0.1mM EDTA).

### 3.4 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – quantitative polymerase chain reaction qPCR

Ο προσδιορισμός του γονοτύπου έγινε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR). Κάθε αντίδραση περιείχε γονιδιωματικό DNA (1,2ng/μl), SYBR™ Select Master Mix (Applied biosystems by life technologies) και ένα ζεύγος εκκινητών (0,225μM τελική συγκέντρωση). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε πλάκα 96 θέσεων (*MicroAmp® Fast 96-well Reaction Plate 0.1ml, Applied biosystems*). Κάθε δείγμα εξετάζεται με δύο ζεύγη εκκινητών (ένα που στοχεύει τη μετάλλαξη/ένθεση και ένα την ενδογενή αλληλουχία του γονιδίου GAPDH που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας κανονικοποίησης) σε 3 επαναλήψεις έκαστο (τεχνικές επαναλήψεις). Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Αρχικά το μηχάνημα (Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System) θερμαίνει στους 95° C για 5min για να αποδιαταχθούν τα μόρια του γονιδιωματικού DNA (genomic DNA ή gDNA). Στη συνέχεια ακολουθεί για 45 κύκλους η παρακάτω αλληλουχία θερμοκρασιών-χρόνων:

1. 95° C για 20sec
2. 58° C/56° C για 20sec
3. 72° C για 15sec

Αρχικά το προϊόν θερμαινόταν στους 95° C για αποδιάταξη. Κατόπιν η θερμοκρασία έπεφτε στους 50° C και ανέβαινε μέχρι τους 95° C λαμβάνοντας τιμές φθορισμού κάθε 0,5° C. Αφού ολοκληρωθούν οι κύκλοι, ακολουθούσε και μία ανάλυση με καμπύλη τήξης (melting curve analysis).

<b>Τύπος εκκινητή</b>	<b>Αλληλουχία εμπρόσθιου εκκινητή</b>	<b>Αλληλουχία παλίνδρομου εκκινητή</b>
<b>Ζεύγος εκκινητών ειδικό για την μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας</b>	GeoF3731: 5'-GTG CCA ATG AAT CGT CTG ACC-3'	GeoR3887: 5'-ATA CAG CGC GTC GTG ATT AGC-3'
<b>Ζεύγος εκκινητών ενδογενούς μάρτυρα</b>	664GapdhF: 5'-ACT GAG CAA GAG AGG CCC TA-3'	665GapdhR: TAT GGG GGT CTG GGA TGG AA

## 4. Αποτελέσματα

### 4.1 Γονοτύπηση με qPCR

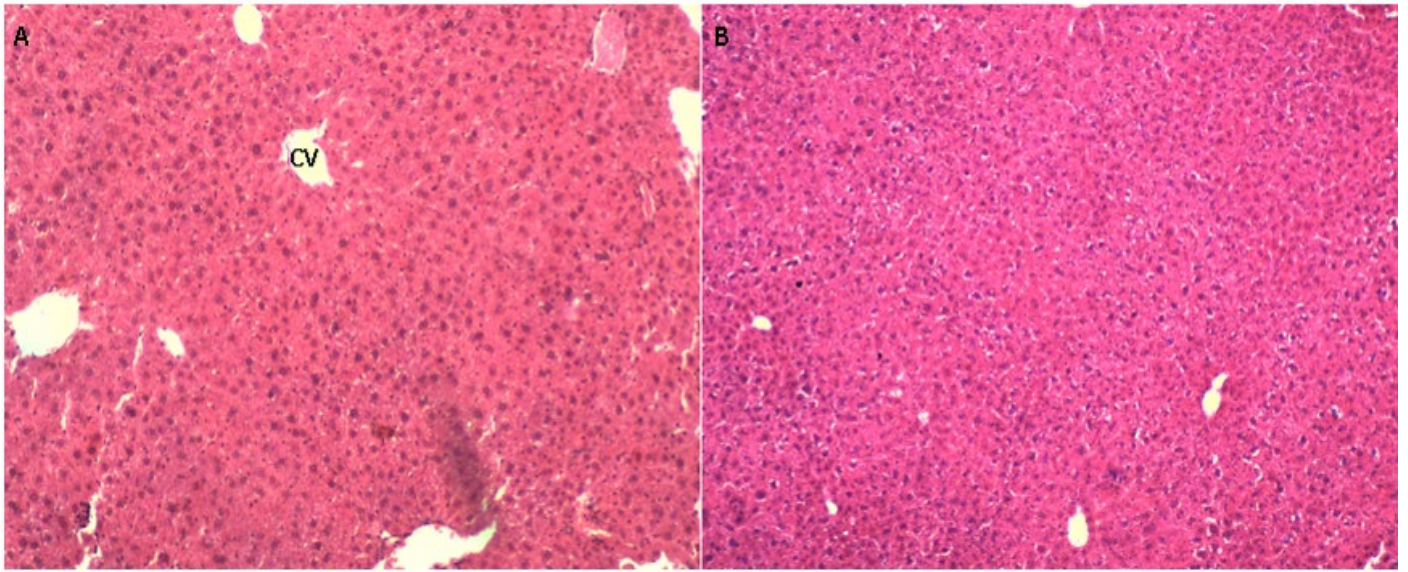
Ο προσδιορισμός του γονοτύπου πραγματοποιείται για να ελεγχθεί αν τα πειραματόζωα που θα αξιοποιηθούν είναι ομόζυγα για τη μετάλλαξη-ένθεση που οδηγεί στη δημιουργία του *smgd3KO* γονοτύπου. Για τα πειράματα ελέγχθηκαν συνολικά 18 ζώα. Ο έλεγχος γίνεται με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR) με τη μέθοδο σύγκρισης των τιμών των κύκλων κατωφλιού (Cycle threshold ή Ct) ( $\Delta\Delta Ct$ ). Σε αυτήν την προσέγγιση οι κανονικοποιημένες με τον ενδογενή μάρτυρα τιμές των προς γονοτύπηση δειγμάτων συγκρίνονται με την αντίστοιχη τιμή ενός δείγματος που προέρχεται από ετερόζυγο ζώο. Τα ομόζυγα έχουν δύο φορές την ένθεση στο γονιδίωμα ενώ τα ετερόζυγα μόνο μια. Συνεπώς για την ίδια ποσότητα DNA ένα δείγμα από ομόζυγο ζώο θα έχει διπλάσια ποσότητα της αλληλουχίας στόχου. Αυτό το γεγονός σε μια ποσοτική PCR απεικονίζεται με διαφορά μιας μονάδας στις αντίστοιχες τιμές Ct. Άρα αν το  $\Delta\Delta Ct$  ισούται με 0 το δείγμα είναι ετερόζυγο ενώ αν το  $\Delta\Delta Ct$  ισούται με -1 τότε θα είναι ομόζυγο.

### 4.2 Μοντέλο Οξείας Βλάβης

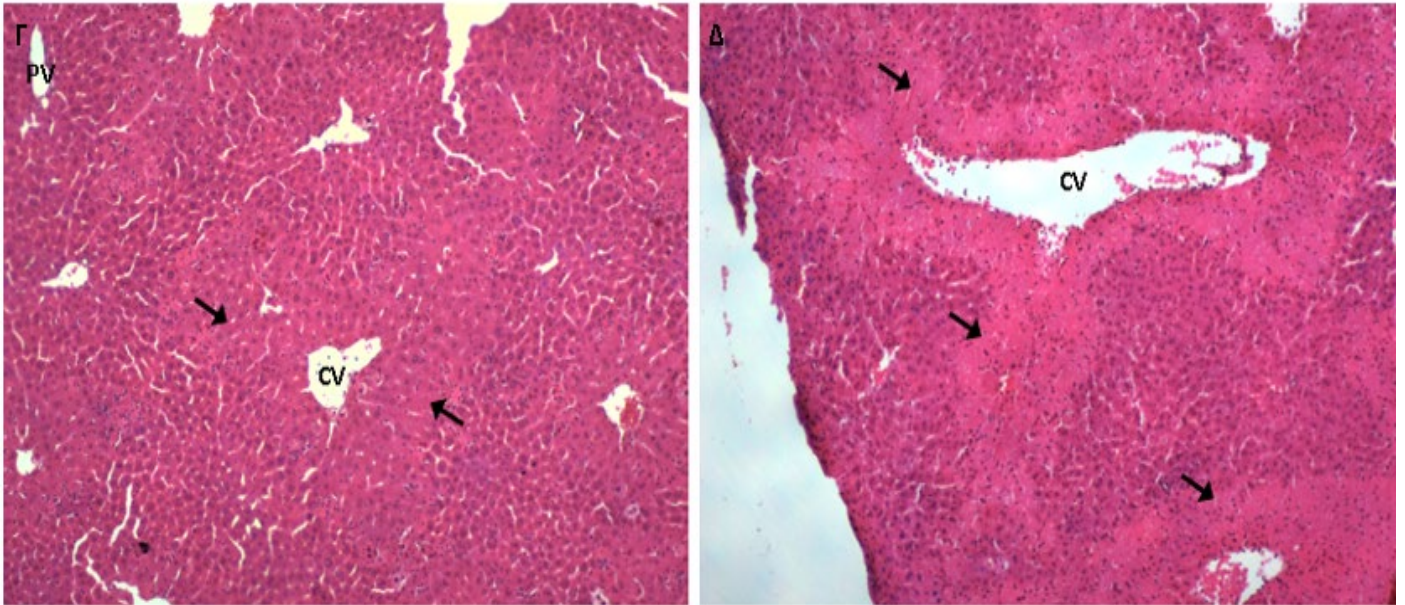
Για να ελεγχθεί η επίδραση του γονιδίου *smgd3* στη λειτουργία των αστεροειδών κυττάρων κατά την ηπατική αναγέννηση χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο επαγωγής οξείας ηπατικής βλάβης με  $CCl_4$ . Τα ζώα κατατάχθηκαν σε 2 ομάδες με βάση τον γονότυπό τους, τα αγρίου τύπου (WT) που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες και τα *smgd3KO*. Τα μέλη κάθε ομάδας υποβλήθηκαν σε μία ενδοπεριτοναϊκή ένεση διαλύματος  $CCl_4$ /καλαμποκέλαιο (1:5). Η απομόνωση του ιστού έγινε τις χρονικές στιγμές 0h, 24h, 48h και 72h. Κατόπιν μονιμοποίησης και εμβάπτισης σε παραφίνη από τον ιστό συλλέχθηκαν μικροτομές οι οποίες χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Στις 24h τα KO δείγματα έχουν αναπτύξει τη χαρακτηριστική νέκρωση στην περιοχή γύρω από τις ηπατικές φλέβες (εικόνα 4Δ). Στην αντίστοιχη χρονική στιγμή στα δείγματα WT οι νεκρωτικές περιοχές εμφανίζουν μια καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους σε σχέση με τα *smgd3KO* (εικόνα 4Γ). Στις 48h στα WT η νέκρωση φτάνει στην κορύφωσή της (εικόνα 4Ε), ενώ στα *smgd3KO* αρχίζει να ελαττώνεται (εικόνα 4ΣΤ). Στις 72h οι νεκρωτικές περιοχές είναι πολύ λιγότερες και στις 2 ομάδες δειγμάτων και ο ιστός αποκτά ξανά τη φυσιολογική του μορφή (εικόνα 4Ζ, 4Η). Ωστόσο σε καμία χρονική στιγμή δεν παρατηρείται στα δείγματα *smgd3KO* εμφάνιση λιποκυττάρων.



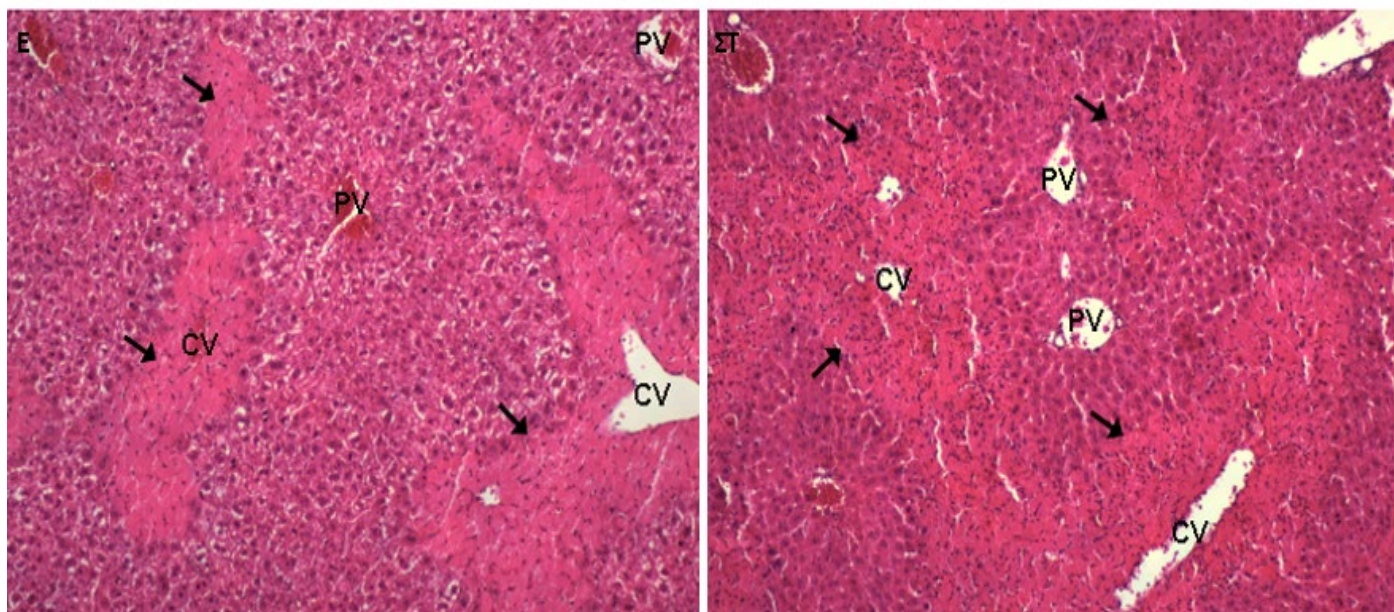
0h



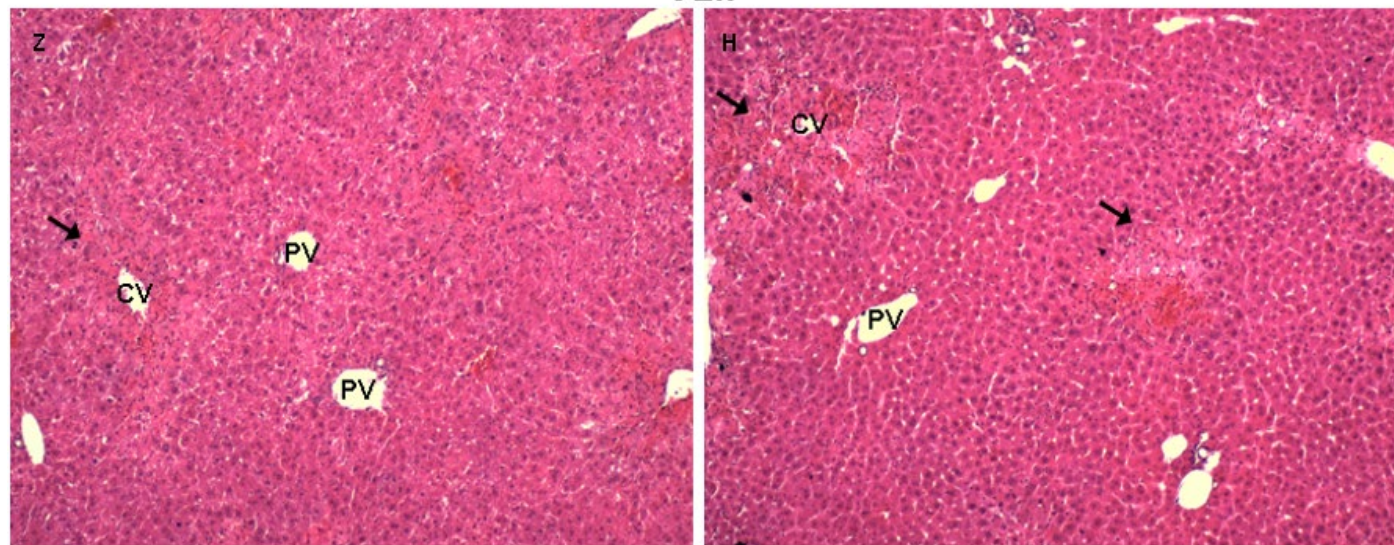
24h



48h



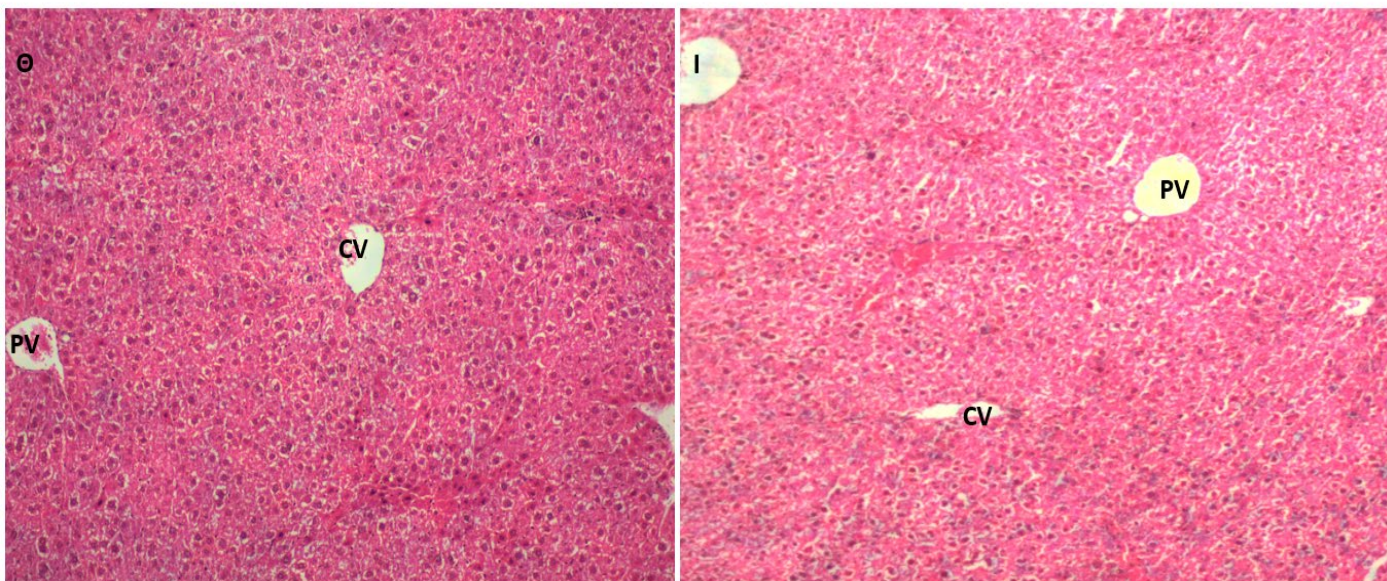
72h



Εικόνα 4 Στην εικόνα φαίνονται οι ηπατικές τομές που λήφθηκαν σε χρονικά διαστήματα 0h, 24h, 48h, 72h μετά από χορήγηση CCl<sub>4</sub> σε ζώα WT (A,Γ,E,Z) και Smyd3KO (B,Δ,ΣΤ,H). Τα βέλη απεικονίζουν τις περιοχές της νέκρωσης. CV= κεντρική ηπατική φλέβα, PV= πύλαια ηπατική φλέβα.

Για να εξεταστεί και το ενδεχόμενο η πρωτεΐνη SMYD3 να συμμετέχει στη διαδικασία επαναφοράς των ενεργοποιημένων αστεροειδών κυττάρων στην αδρανή μορφή τους, ιστός και από τις δύο ομάδες συλλέχθηκε 7 μέρες μετά τη χορήγηση μιας δόσης  $\text{CCl}_4$ . Ομοίως με τα προηγούμενα οι μικροτομές χρωματίστηκαν με H&E και εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Ούτε σε αυτή την περίπτωση υπήρξαν διαφορές στις δύο συνθήκες (εικόνα 5Θ, 5Ι).

## 7 ΜΕΡΕΣ



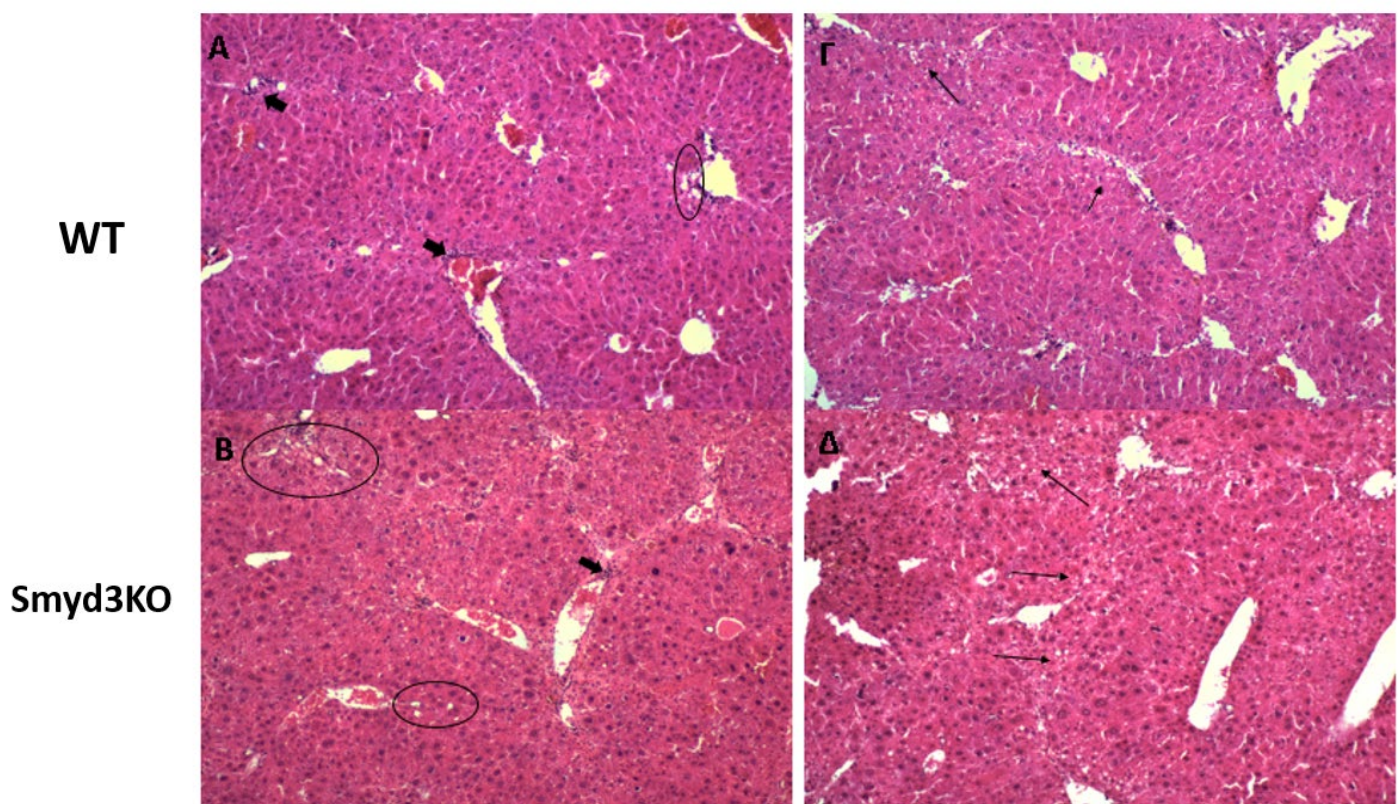
Εικόνα 5 Στην εικόνα φαίνονται οι ηπατικές τομές που λήφθηκαν σε χρονικό διάστημα 7 ημερών μετά από χορήγηση  $\text{CCl}_4$  σε ζώα WT (Θ) και *Smyd3*KO (Ι). CV= κεντρική ηπατική φλέβα, PV= πυλαία ηπατική φλέβα.

### 4.3 Μοντέλο χρόνιας βλάβης

Η ίνωση είναι ένα από τα πιο συνήθη συμπτώματα που εμφανίζονται σε όλες τις χρόνιες ηπατικές βλάβες. Η ανάπτυξη και η πρόοδος της έγκειται στην απορυθμισμένη διαδικασία παραγωγής και τροποποίησης της εξωκυτταρικής μήτρας κατά τη διαδικασία αναγέννησης (93). Τα αστεροειδή κύτταρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε αυτή την κατάσταση καθώς πραγματοποιούν αυτές τις διαδικασίες. Η επίδραση της πρωτεΐνης SMYD3 στη διεκπεραίωση των λειτουργιών των αστεροειδών κυττάρων κατά την ανάπτυξη ίνωσης ελέγχθηκε *in vivo* σε ποντίκια στα οποία έγινε πολλαπλή χορήγηση με  $\text{CCl}_4$ . Τα ζώα ήταν πάλι χωρισμένα σε 2 ομάδες, στην ομάδα μάρτυρα (WT) (n=4) και στην υπό μελέτη ομάδα (KO) (n=4). Η χορήγηση  $\text{CCl}_4$  διήρκησε για 7 εβδομάδες με δυο ενδοπεριτοναϊκές ενέσεις ανά εβδομάδα. Μετά την απομόνωση του ιστού και την κατάλληλη προετοιμασία του, οι μικροτομές χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη και ηωσίνη και εξετάστηκαν στο οπτικό μικροσκόπιο. Σε όλα τα ζώα αναπτύχθηκε ίνωση και μάλιστα παρατηρείται εκτεταμένο το γεφυρωτό πρότυπο (94) (εικόνα 6). Αυτή η κατάσταση χαρακτηρίζεται από εκτεταμένη παραγωγή ECM η οποία δημιουργεί ένα δίκτυο που γεφυρώνει τα αγγεία μεταξύ τους. Σε

κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται η αποδιοργάνωση των ηπατικών λοβίων όπου χάνεται η εξαγωνική διεύθυνση των αγγειακών τριάδων. Επιπλέον βλέπουμε την εκδήλωση της αντίδρασης πόρου (ductular reaction ή DR) όπου η χοληφόρος μοίρα επεκτείνεται και φαινομενικά σχηματίζονται πολλαπλά χοληφόρα αγγεία περιφερειακά της πυλαίας περιοχής (εικόνα 6A, 6B). Τέλος, σε αρκετές περιπτώσεις δημιουργούνται ενδοκυτταρικοί σχηματισμοί που μοιάζουν με κυστίδια, τα οποία πιθανώς να φέρουν λιπιδικό φορτίο (εικόνα 6Γ, 6Δ). Συγκρίνοντας τις δύο ομάδες, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά στο πρότυπο ή στην έκταση της ίνωσης. Παρόλα αυτά φαίνεται μια μικρή διαφορά στα μέλη της ομάδας *smyd3KO* όπου τα πιθανά ενδοκυτταρικά κυστίδια εμφανίζονται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα μέλη της ομάδας WT. Ωστόσο αυτή η παρατήρηση χρειάζεται περαιτέρω επιβεβαίωση από πιο εξειδικευμένες πειραματικές διαδικασίες.

### 7 ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ



Εικόνα 6 Στην εικόνα φαίνονται οι ηπατικές τομές που λήφθηκαν μετά από χορήγηση  $CCl_4$  σε ποντίκια WT (A,Γ) και *Smyd3KO* (B,Δ). Τα κυκλωμένα σημεία υποδεικνύουν τις περιοχές όπου παρατηρείται η DR, τα παχιά βέλη υποδεικνύουν τις περιοχές που αναπτύχθηκε η ίνωση ενώ τα λεπτά τις περιοχές που παρατηρούνται τα ενδοκυτταρικά κυστίδια.

## 5. Συζήτηση

Από προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου φάνηκε ότι η βλάβη στο μυϊκό ιστό σε ποντίκια που έχουν υποστεί γονιδιακή καταστολή του γονιδίου *smyd3* με μεταλλαξιγένεση, οδηγεί σε ατελή ανάπτυξη καθώς στον ιστό συσσωρεύονται λιπιδικά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι η λιπιδική συσσώρευση στον σκελετικό μυϊκό ιστό οφείλεται σε ένα συγκεκριμένο ενδημικό κυτταρικό τύπο, τα κύτταρα FAP, τα οποία έχουν μεσεγχυματική προέλευση, εμπλέκονται στην παραγωγή ECM καθώς και στη διεξαγωγή της ανάπτυξης του ιστού μετά από βλάβες (95). Καθώς το ήπαρ διαθέτει τα αστεροειδή κύτταρα, τα οποία έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά και αρμοδιότητες με τα FAP κύτταρα, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να ελεγχθεί αν η SMYD3 επηρεάζει τη λειτουργία των αστεροειδών κυττάρων με παρόμοιο τρόπο. Σε ποντίκια που υπέστησαν μεταχείριση με την ηπατοτοξική ουσία CCl<sub>4</sub>, για τη δημιουργία οξείας και χρόνιας ηπατικής βλάβης δεν παρουσίασαν καμία εμφανή διαφοροποίηση ως προς το πρότυπο της φλεγμονής και της ανάπτυξης. Επίσης δεν παρατηρήθηκε καμία συσσώρευση λιπιδικών κυττάρων στον αναγεννημένο ιστό σε αντιδιαστολή με τον μυϊκό. Εν κατακλείδι η SMYD3 δε φαίνεται να επηρεάζει τόσο τη φυσιολογική λειτουργία των αστεροειδών κυττάρων όσο και τη συνολική διαδικασία της ηπατικής αναγέννησης με άμεσο και καταλυτικό τρόπο.

Ανακεφαλαιώνοντας τα δεδομένα για την πρωτεΐνη SMYD3, μπορεί κανείς με ασφάλεια να συμπεράνει την άρρηκτη σχέση της πρωτεΐνης με παθολογικές καταστάσεις εκ των οποίων πρωταγωνιστικό ρόλο έχει ο καρκίνος. Σε αυτόν η SMYD3 λειτουργεί είτε αξιοποιώντας την ενζυμική της ικανότητα να καταλύει τη μεθυλίωση καταλοίπων λυσίνης διαφόρων πρωτεϊνικών τελεστών σε μια ποικιλία ρυθμιστικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος (21), είτε λειτουργώντας ως μεταγραφικός ρυθμιστής τροποποιώντας την έκφραση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στην παθογένεια όπως ογκογονίδια ή άλλα γονίδια που εμπλέκονται στην προαγωγή του πολλαπλασιασμού καθώς και της μετάστασης (39). Η συνεισφορά στη ρύθμιση επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους. Συνήθως η SMYD3 σχετίζεται με την αύξηση της H3K4me<sub>3</sub>, η οποία σηματοδοτεί τη μεταγραφικά ενεργή χρωματίνη στον υποκινητή. Ακόμα έχειδειχθεί ότι μπορεί να συνδέεται στους υποκινητές αναγνωρίζοντας συγκεκριμένα νουκλεοτιδικά μοτίβα καθώς και στην H3K4me<sub>3</sub> λειτουργώντας ως μεταγραφικός συμπαραγόντας. Σε όλα αυτά έρχεται να προστεθεί και η συνύπαρξή της με άλλους ρυθμιστικούς μεταγραφικούς παράγοντες καθώς και στοιχεία της βασικής μεταγραφικής συσκευής όπως η πολυμεράση II του RNA. Όλα αυτά υπονοούν ότι η SMYD3 αποτελεί έναν μεταγραφικό ενεργοποιητή που προάγει τη μεταγραφή τροποποιώντας τη χρωματίνη εγκαθιστώντας μια ανοιχτή διαμόρφωση. Αν και το προηγούμενο σενάριο μπορεί να ισχύει σε ορισμένες περιπτώσεις, κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η SMYD3 δε χρειάζεται την ενζυμική της δραστικότητα για να λειτουργήσει ως μεταγραφικός ρυθμιστής. Επιπλέον έχει καταγραφεί ότι η SMYD3 προσδένεται με διαφορετική συγγένεια στους υποκινητές των γονιδίων που σημαίνει ότι συνεισφέρει διαφορετικά στη ρύθμισή τους. Συγκεκριμένα στον HCC και στον CRC φαίνεται ότι τα επίπεδα συγκρότησής της στους υποκινητές είναι ανάλογα με αυτά της πολυμεράσης II του RNA υποδεικνύοντας ότι η SMYD3 συγκροτείται στην ενεργή χρωματίνη. Τέλος, μιας και η εξάλειψη του γονιδίου μετριάξει αρκετά την παθογένεια αλλά δεν την εξαφανίζει, η SMYD3 έχει χαρακτηριστεί ως ενισχυτής της και όχι ως κύριος επαγωγέας (42). Όλα αυτά μπορούν να υποστηρίξουν τον χαρακτηρισμό της SMYD3 ως συνενεργοποιητή.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αρκετά στοιχεία έχουν συσσωρευτεί σχετικά με τον τρόπο δράσης της SMYD3, όμως όλα αυτά κατά κύριο λόγο αφορούν τις λειτουργίες που επιτελεί σε περιπτώσεις καρκίνου και σε άλλες παθήσεις όπως η μυϊκή ατροφία (66). Πολύ λίγα είναι τα δεδομένα σχετικά με την εμπλοκή της σε φυσιολογικές διαδικασίες. Κάποιες από αυτές είναι η διαφοροποίηση των μυοβλαστών σε ώριμες μυϊκές ίνες (85), η εμπλοκή στα πρώιμα στάδια στην εμβρυογένεση (44, 45) καθώς και πολύ πρόσφατα προτάθηκε ότι μπορεί να συμμετέχει στην προαγωγή της γήρανσης στα αιμοφόρα αγγεία (64, 65). Η έρευνα σχετικά με την εμπλοκή των επιγενετικών φαινομένων στην ηπατική αναγέννηση βρίσκεται σε πολύ πρώιμα στάδια καθώς ελάχιστα είναι τα διαθέσιμα δεδομένα για το πώς αυτά ενέχονται στη διαδικασία (67). Τα αποτελέσματά αυτής της μελέτης μας υποδεικνύουν τη μη εμπλοκή της πρωτεΐνης στην αναγεννητική διαδικασία. Ωστόσο η μέθοδος μελέτης αποτελεί μια αδρή προσέγγιση για τον εντοπισμό πιθανού καίριου ρόλου της πρωτεΐνης σε αυτή. Δεν αποκλείεται λοιπόν η πρωτεΐνη να έχει δευτερεύοντες ή/και πιο εξειδικευμένους ρόλους που να χρειάζονται πιο στοχευμένες προσεγγίσεις για να ταυτοποιηθούν. Ακόμα υπάρχει το ενδεχόμενο η SMYD3 να εμπλέκεται ή να ρυθμίζει μονοπάτια τα οποία να χαρακτηρίζονται από πλεονασμό και να αντικαθίστανται από άλλα μονοπάτια όπως συμβαίνει συχνά στην αναγέννηση (84). Η SMYD3 φαίνεται να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό ρυθμίζοντας καθοριστικά για αυτόν γονίδια, κατόπιν μερικής ηπατεκτομής. Στον HCC, εκτός των άλλων, ελέγχει το μονοπάτι IL-6/STAT3 προωθώντας την έκφραση των Janus κινασών (JAKs) που, παρουσία της IL-6 στον υποδοχέα της, αυτές φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τον STAT3 (42). Ωστόσο αυτό το μονοπάτι είναι από τα πιο καλά χαρακτηρισμένα μονοπάτια που αποτελούν την προπαρασκευαστική φάση της ηπατικής αναγέννησης ιδιαίτερα στο μοντέλο της ηπατεκτομής (67). Ακόμα στην CLL έχει καταγραφεί ότι ο STAT3 επάγει την έκφραση του γονιδίου *smyd3* (39). Αυτά τα δεδομένα μπορούν να υπονοήσουν ένα φερόμενο μηχανισμό δράσης της SMYD3 στην ηπατική αναγέννηση όπου ο STAT3 επάγει μεταξύ άλλων την έκφραση του γονιδίου *smyd3*. Η SMYD3 με τη σειρά της ενέχεται στην ενίσχυση της σηματοδότησης του μέσω της εμπλοκής της στην έκφραση των JAKs, δημιουργώντας έτσι ένα δίκτυο θετικής ανατροφοδότησης.

# 6. Βιβλιογραφικές Αναφορές

## 6.1 Επιστημονικά Άρθρα

1. Giacomo Cavalli<sup>1</sup> & Edith Heard. (2019). *Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease*, Nature
2. Reinberg, D., & Vales, L. D. (2018). *Chromatin domains rich in inheritance*. Science, 361(6397), 33–34. doi:10.1126/science.aat7871
3. Bonev, B., & Cavalli, G. (2016). *Organization and function of the 3D genome*. Nature Reviews Genetics, 17(11)
4. Mattick, J. S., Amaral, P. P., Dinger, M. E., Mercer, T. R., & Mehler, M. F. (2009). *RNA regulation of epigenetic processes*. BioEssays, 31(1), 51–59.
5. Bird, A. (2007). *Perceptions of epigenetics*. Nature, 447(7143), 396–398
6. Holliday, R. *Epigenetics: an overview*. Dev. Genet. 15, 453–457 (1994)
7. Yu, J.-R., Lee, C.-H., Oksuz, O., Stafford, J. M., & Reinberg, D. (2019). *PRC2 is high maintenance*. Genes & Development. doi:10.1101/gad.325050.119
8. Language: *Disputed definitions*. (2008). Nature, 455(7216), 1023–1028
9. Zhao, Z., & Shilatifard, A. (2019). *Epigenetic modifications of histones in cancer*. Genome Biology, 20(1). doi:10.1186/s13059-019-1870-5
10. Feng Q, Wang H, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Struhl K, Zhang Y (June 2002). *"Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain"*. Curr. Biol. 12 (12): 1052–8.
11. Jorgensen, S.; Schotta, G.; Sorensen, C. S. (2013). *"Histone H4 Lysine 20 methylation: Key player in epigenetic regulation of genomic integrity"*. Nucleic Acids Research. 41 (5): 2797–2806
12. Fulton, M. D., Brown, T., & Zheng, Y. G. (2018). *Mechanisms and Inhibitors of Histone Arginine Methylation*. The Chemical Record. doi:10.1002/tcr.201800082
13. Tracy, C. M., Warren, J. S., Szulik, M., Wang, L., Garcia, J., Makaju, A., ... Franklin, S. (2018). *The Smyd family of methyltransferases: role in cardiac and skeletal muscle physiology and pathology*. Current Opinion in Physiology, 1, 140–152.
14. Al-Shar'i, N. A., & Alnabulsi, S. M. (2016). *Explaining the autoinhibition of the SMYD enzyme family: A theoretical study*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 68, 147–157.
15. Zhao, X., Li, Y., Duan, L., Chen, X., Mao, F., Juma, M., ... Gao, S. (2020). *Functional analysis of the methyltransferase SMYD in the single-cell model organism Tetrahymena thermophila*. Marine Life Science & Technology
16. Zhang, X., & Bruice, T. C. (2008). *Enzymatic mechanism and product specificity of SET-domain protein lysine methyltransferases*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(15), 5728–5732
17. Le, D. D., & Fujimori, D. G. (2012). *Protein and nucleic acid methylating enzymes: mechanisms and regulation*. Current Opinion in Chemical Biology, 16(5-6), 507–515.

18. Spellmon, N., Holcomb, J., Trescott, L., Sirinupong, N., & Yang, Z. (2015). *Structure and Function of SET and MYND Domain-Containing Proteins*. International Journal of Molecular Sciences, 16(1), 1406–1428
19. Rasmussen, T. L., Ma, Y., Park, C. Y., Harriss, J., Pierce, S. A., Dekker, J. D., ... Tucker, H. O. (2015). *Smyd1 Facilitates Heart Development by Antagonizing Oxidative and ER Stress Responses*. PLOS ONE, 10(3), e0121765
20. Zhao, X., Li, Y., Duan, L., Chen, X., Mao, F., Juma, M., ... Gao, S. (2020). *Functional analysis of the methyltransferase SMYD in the single-cell model organism Tetrahymena thermophila*. Marine Life Science & Technology
21. Xiao, D., Wang, H., Hao, L., Guo, X., Ma, X., Qian, Y., ... Ma, D. (2018). *The roles of SMYD4 in epigenetic regulation of cardiac development in zebrafish*. PLOS Genetics, 14(8), e1007578. doi:10.1371/journal.pgen.1007578
22. Stender, J.D., et al., *Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20*. Mol Cell, 2012. 48(1): p. 28-38.
23. Giakountis A, Moulos P, Sarris ME, Hatzis P, Talianidis I (2017) *Smyd3-associated regulatory pathways in cancer*. Semin Cancer Biol 27:70–80
24. Deepika Jaiswal,<sup>a</sup> Rashi Turniansky,<sup>a</sup> James J. Moresco,<sup>b</sup> Sabeen Ikram,<sup>a</sup> Ganesh Ramaprasad,<sup>a</sup> Assefa Akinwale,<sup>a</sup> Julie Wolf,<sup>a</sup> John R. Yates III,<sup>b</sup> Erin M. Greena (2020) *Function of the MYND Domain and C-Terminal Region in Regulating the Subcellular Localization and Catalytic Activity of the SMYD Family Lysine Methyltransferase Set5*. American Society for Microbiology Vol 40 (2), e00341-19
25. Yuning Hou, Xiaonan Sun, Pooneh Tavakoley Gheinani, Xiaoqing Guan, Shaligram Sharma, Yu Zhou, Chengliu Jin, Zhe Yang, Aparavanda P. Naren, Jun Yin, Timothy L. Denning, Andrew T. Gewirtz, Zhonglin Xie, (2020). *Methyltransferase SMYD5 Exaggerates IBD by Downregulating Mitochondrial Functions via Post-translational Control of PGC-1 $\alpha$  Stability*. BioRxiv
26. Liu, S., Cheng, K., Zhang, H., Kong, R., Wang, S., Mao, C., & Liu, S. (2020). *Methylation Status of the Nanog Promoter Determines the Switch between Cancer Cells and Cancer Stem Cells*. Advanced Science, 1903035.
27. Samuel Becker; Gustav Steinemann; Weronika Karle; Kerrin Roos; Celine Huajia Liem; Shalini Muralikumar; Andrea Volkamer; Barbara Munz; Andreas Zakrzewicz; Janine Berkholz, (2020). *Stability of Smyd1 in endothelial cells is controlled by PML-dependent SUMOylation upon cytokine stimulation*. Biochemical Journal
28. Junco S. Warrena,<sup>b,1</sup> Christopher M. Tracya , Mickey R. Millera , Aman Makajua , Marta W. Szulika , Shin-ichi Okac , Tatiana N. Yuzyukd,<sup>e</sup> James E. Cox<sup>f,g</sup>, Anil Kumarh , Bucky K. Loziere , Li Wanga , June García Llanaa , Amira D. Sabrya , Keiko M. Cawleya , Dane W. Bartonb , Yong Hwan Han , Sihem Boudinaj , Oliver Fiehnk,<sup>l</sup> Haley O. Tuckerm,<sup>n</sup> Alexey V. Zaitseva,<sup>o</sup> and Sarah Franklin, (2018). *Histone methyltransferase Smyd1 regulates mitochondrial energetics in the heart*. PNAS vol. 115, no. 33, E7871–E7880



29. Huang J, Perez-Burgos L, Placek BJ, Sengupta R, Richter M, Dorsey JA, Kubicek S, Opravil S, Jenuwein T, Berger SL (2006). *Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation*. *Nature* 444(7119):629- 32.
30. Nakakido M, Deng Z, Suzuki T, Dohmae N, Nakamura Y, Hamamoto R (2015) *Dysregulation of AKT Pathway by SMYD2-Mediated Lysine Methylation on PTEN*. *Neoplasia* 17(4):367-73.
31. Hu, L., Zhu, Y. T., Qi, C., & Zhu, Y.-J. (2009). *Identification of Smyd4 as a Potential Tumor Suppressor Gene Involved in Breast Cancer Development*. *Cancer Research*, 69(9), 4067–4072
32. Stender, J. D., Pascual, G., Liu, W., Kaikkonen, M. U., Do, K., Spann, N. J., ... Glass, C. K. (2012). *Control of Proinflammatory Gene Programs by Regulated Trimethylation and Demethylation of Histone H4K20*. *Molecular Cell*, 48(1), 28–38.
33. Kim, M.-S., Pinto, S. M., Getnet, D., Nirujogi, R. S., Manda, S. S., Chaerkady, R., ... Jain, S. (2014). *A draft map of the human proteome*. *Nature*, 509(7502), 575–581. doi:10.1038/nature13302
34. Hamamoto, R., Furukawa, Y., Morita, M. et al. *SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells*. *Nat Cell Biol* 6, 731–740 (2004). <https://doi.org/10.1038/ncb1151>
35. Binh, M.T., Hoan, N.X., Giang, D.P. et al. *Upregulation of SMYD3 and SMYD3 VNTR 3/3 polymorphism increase the risk of hepatocellular carcinoma*. *Sci Rep* 10, 2797 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59667-z>
36. AL-Eitan, L. N., & Rababa'h, D. M. (2019). *Correlation between a variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism in SMYD3 gene and breast cancer: a genotype-phenotype study*. *Gene*, 144281. doi:10.1016/j.gene.2019.144281
37. Li, B.; Pan, R.; Zhou, C.; Dai, J.; Mao, Y.; Chen, M.; Huang, T.; Ying, X.; Hu, H.; Zhao, J.; et al. *SMYD3 promoter hypomethylation is associated with the risk of colorectal cancer*. *Future Oncol*. 2018, 14, 1825–1834
38. Guil, S., Soler, M., Portela, A., Carrère, J., Fonalleras, E., Gómez, A., ... Esteller, M. (2012). *Intronic RNAs mediate EZH2 regulation of epigenetic targets*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(7), 664–670. doi:10.1038/nsmb.2315
39. Cinzia Bottino, Alessia Peserico, Cristiano Simone, and Giuseppina Caretti (2020). *SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways Cancers*, 12(1), 142
40. Lee, B.; Sahoo, A.; Marchica, J.; Holzhauser, E.; Chen, X.; Li, J.L.; Seki, T.; Govindarajan, S.S.; Markey, F.B.; Batish, M.; et al. *The long noncoding RNA SPRIGHTLY acts as an intranuclear organizing hub for pre-mRNA molecules*. *Sci. Adv.* 2017, 3, e1602505.
41. Pereira, D., Richert, A., Medjkane, S., Hénon, S., & Weitzman, J. B. (2020). *Cell geometry and the cytoskeleton impact the nucleo-cytoplasmic localisation of the SMYD3 methyltransferase*. *Scientific Reports*, 10(1).
42. Sarris, M. E., Moulos, P., Haroniti, A., Giakountis, A., & Talianidis, I. (2016). *Smyd3 Is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development*. *Cancer Cell*, 29(3), 354–366

43. Codato, R., Perichon, M., Divol, A., Fung, E., Sotiropoulos, A., Bigot, A., ... Medjkane, S. (2019). *The SMYD3 methyltransferase promotes myogenesis by activating the myogenin regulatory network*. Scientific Reports, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-53577-5
44. Suzuki, S., Nozawa, Y., Tsukamoto, S., Kaneko, T., Imai, H., & Minami, N. (2015). *Histone methyltransferase Smyd3 regulates early embryonic lineage commitment in mice*. REPRODUCTION, 150(1), 21–30. doi:10.1530/rep-15-0019
45. Raffaella Fittipaldi, Pamela Floris, Valentina Proserpio, Franco Cotelli, Monica Beltrame and Giuseppina Caretti (2021). *The Lysine Methylase SMYD3 Modulates Mesendodermal Commitment during Development*. Cells 10(5) <https://doi.org/10.3390/cells10051233>
46. Bai, H., Li, Y., Gao, H., Dong, Y., Han, P., & Yu, H. (2015). *Histone methyltransferase SMYD3 regulates the expression of transcriptional factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development*. Cytotechnology, 68(4), 849–859. doi:10.1007/s10616-014-9838-5
47. Ting, H.-A., de Almeida Nagata, D., Rasky, A. J., Malinczak, C.-A., Maillard, I. P., Schaller, M. A., & Lukacs, N. W. (2018). *Notch ligand Delta-like 4 induces epigenetic regulation of Treg cell differentiation and function in viral infection*. Mucosal Immunology
48. Van Aller, G.S., Reynoird, N., Barbash, O., Huddleston, M., Liu, S., Zmoos, A.F., McDevitt, P., Sinnamon, R., Le, B., Mas, G., et al. (2012). *Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation*. Epigenetics 7, 340–343.
49. Foreman, K.W., Brown, M., Park, F., Emtage, S., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Crew, A., Arnold, L., Shaaban, S., and Tucker, P. (2011). *Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3*. PLoS One 6, e22290.
50. Tsai, C.H.; Chen, Y.J.; Yu, C.J.; Tzeng, S.R.; Wu, I.C.; Kuo, W.H.; Lin, M.C.; Chan, N.L.; Wu, K.J.; Teng, S.C. *SMYD3-Mediated H2A.Z.1 Methylation Promotes Cell Cycle and Cancer Proliferation*. Cancer Res. 2016, 76, 6043–6053.
51. Kim, J.-M., Kim, K., Schmidt, T., Punj, V., Tucker, H., Rice, J. C., ... An, W. (2015). *Cooperation between SMYD3 and PC4 drives a distinct transcriptional program in cancer cells*. Nucleic Acids Research, 43(18), 8868–8883. doi:10.1093/nar/gkv874
52. Proserpio, V., Fittipaldi, R., Ryall, J. G., Sartorelli, V., & Caretti, G. (2013). *The methyltransferase SMYD3 mediates the recruitment of transcriptional cofactors at the myostatin and c-Met genes and regulates skeletal muscle atrophy*. Genes & Development, 27(11), 1299–1312.
53. Kunizaki, M., Hamamoto, R., Silva, F. P., Yamaguchi, K., Nagayasu, T., Shibuya, M., ... Furukawa, Y. (2007). *The Lysine 831 of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 Is a Novel Target of Methylation by SMYD3*. Cancer Research, 67(22), 10759–10765. doi:10.1158/0008-5472.can-07-1132
54. Yoshioka, Y., Suzuki, T., Matsuo, Y., Tsurita, G., Watanabe, T., Dohmae, N., ... Hamamoto, R. (2017). *Protein lysine methyltransferase SMYD3 is involved in tumorigenesis through regulation of HER2 homodimerization*. Cancer Medicine, 6(7), 1665–1672. doi:10.1002/cam4.1099
55. Yuichiro Yoshioka, Takehiro Suzuki, Yo Matsuo, Makoto Nakakido, Giichiro Tsurita, Cristiano Simone, Toshiaki Watanabe, Naoshi Dohmae, Yusuke Nakamura, Ryuji Hamamoto (2016).

*SMYD3-mediated lysine methylation in the PH domain is critical for activation of AKT1.* *Oncotarget* 4 (46), 75023-75037.

56. Yuan, X., Dai, M., & Xu, D. (2020). *TELOMERE- RELATED MARKERS FOR CANCER.* *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 20.
57. Lyu, T., Jiang, Y., Jia, N., Che, X., Li, Q., Yu, Y., ... Feng, W. (2019). *SMYD3 promotes implant metastasis of ovarian cancer via H3K4 trimethylation of integrin promoters.* *International Journal of Cancer*
58. Zhang, Liwei; Jin, Yue; Yang, Hao; Li, Yu; Wang, Chao; Shi, Yongheng; Wang, Yu (2019). *SMYD3 promotes epithelial ovarian cancer metastasis by downregulating p53 protein stability and promoting p53 ubiquitination.* *Carcinogenesis*, bgz078
59. Zhu, Y.; Zhu, M.X.; Zhang, X.D.; Xu, X.E.; Wu, Z.Y.; Liao, L.D.; Li, L.Y.; Xie, Y.M.; Wu, J.Y.; Zou, H.Y.; et al. *SMYD3 stimulates EZR and LOXL2 transcription to enhance proliferation, migration, and invasion in esophageal squamous cell carcinoma.* *Hum. Pathol.* 2016, 52, 153–163.
60. Peng, L.; Ran, Y.L.; Hu, H.; Yu, L.; Liu, Q.; Zhou, Z.; Sun, Y.M.; Sun, L.C.; Pan, J.; Sun, L.X.; et al. *Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway.* *Carcinogenesis* 2009, 30, 1660–1669.
61. Lin, F.;Wu, D.; Fang, D.; Chen, Y.; Zhou, H.; Ou, C. *STAT3-induced SMYD3 transcription enhances chronic lymphocytic leukemia cell growth in vitro and in vivo.* *Inflamm. Res.* 2019, 68, 739–749.
62. Wang, T.; Wu, H.; Liu, S.; Lei, Z.; Qin, Z.; Wen, L.; Liu, K.; Wang, X.; Guo, Y.; Liu, Q.; et al. *SMYD3 controls a Wnt-responsive epigenetic switch for ASCL2 activation and cancer stem cell maintenance.* *Cancer Lett.* 2018, 430, 11–24.
63. Yang, D., Wei, G., Long, F., Nie, H., Tian, X., Qu, L., ... Zhu, Y. Z. (2020). *Histone methyltransferase Smyd3 is a new regulator for vascular senescence.* *Aging Cell.*
64. Di Yang , Qing Wang, Gang Wei, Jiaxue Wu, Yi Chun Zhu, Qing Zhu, Ting Ni, Xinhua Liu, Yi Zhun Zhu (2020) . *Smyd3-PARP16 axis accelerates unfolded protein response and vascular aging.* *AGING*, Vol. 12, No. 21
65. Fabini, E., Talibov, V. O., Mihalic, F., Naldi, M., Bartolini, M., Bertucci, C., ... Danielson, U. H. (2019). *Unveiling the biochemistry of the epigenetic regulator SMYD3.* *Biochemistry.*
66. Haroula Kontaki Marina Koukaki Maria Vasilarou Antonis Giakountis Elena Deligianni Xiaolin Luo Youngsoo Kim Iannis Talianidis (2021), *Targeting Smyd3 by next-generation antisense oligonucleotides suppresses liver tumor growth*, *iScience*, 4 (5)
67. Arechederra, M., Berasain, C., Avila, M. A., & Fernández-Barrena, M. G. (2019). *Chromatin dynamics during liver regeneration.* *Seminars in Cell & Developmental Biology.* doi:10.1016/j.semcd.2019.03.004
68. B. Górnikiewicz, A. Ronowicz, J. Podolak, P. Madanecki, A. Stanisławska- Sachadyn, P. Sachadyn, *Epigenetic basis of regeneration: analysis of genomic DNA methylation profiles in the MRL/MpJ mouse,* *DNA Res.* 20 (2013) 605–621.
69. H. Lu, J. Cui, S. Gunewardena, B. Yoo, X. Zhong, C. Klaassen, *Hepatic ontogeny and tissue distribution of mRNAs of epigenetic modifiers in mice using RNA-sequencing.* *Epigenetics* 7 (2012) 914–929.

70. Bergmann, A., & Steller, H. (2010). *Apoptosis, Stem Cells, and Tissue Regeneration*. *Science Signaling*, 3(145),
71. Carlson, B. M. (2005). *Some principles of regeneration in mammalian systems*. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*, 287B(1), 4–13
72. Ghosh, S. (2016). *Human regeneration: An achievable goal or a dream?* *Journal of Biosciences*, 41(1), 157–165. doi:10.1007/s12038-016-9589-x
73. Simon, A., & Tanaka, E. M. (2012). *Limb regeneration*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 2(2)
74. Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2018). *Regeneration: sooner rather than later*. *The International Journal of Developmental Biology*, 62(6-7-8), 363
75. Mokalled, M. H., & Poss, K. D. (2018). *A Regeneration Toolkit*. *Developmental Cell*, 47(3), 267–280
76. Lopez, M. J., & Jarazo, J. (2014). *State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine*. *Equine Veterinary Journal*
77. Tanaka, M., & Miyajima, A. (2016). *Liver regeneration and fibrosis after inflammation*. *Inflammation and Regeneration*, 36(1). doi:10.1186/s41232-016-0025-2
78. Sue Anne Chew, Stefania Moscato, Sachin George, Bahareh Azimi, and Serena Danti (2019) *Liver Cancer: Current and Future Trends Using Biomaterials*. *Cancers*, 11, (12) 2026 <https://doi.org/10.3390/cancers11122026>
79. De Jong, I. E. M., van Leeuwen, O. B., Lisman, T., Gouw, A. S. H., & Porte, R. J. (2018). *Repopulating the biliary tree from the peribiliary glands*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1864(4), 1524–1531. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.07.037
80. Shang, H., Wang, Z., & Song, Y. (2016). *Liver progenitor cells-mediated liver regeneration in liver cirrhosis*. *Hepatology International*, 10(3), 440–447.
81. Mao, S. A., Glorioso, J. M., & Nyberg, S. L. (2014). *Liver regeneration*. *Translational Research*, 163(4), 352–362
82. Arechederra, M., Berasain, C., Avila, M. A., & Fernández-Barrena, M. G. (2019). *Chromatin dynamics during liver regeneration*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. doi: 10.1016/j.semcdb.2019.03.004
83. Marrone, G., Shah, V. H., & Gracia-Sancho, J. (2016). *Sinusoidal communication in liver fibrosis and regeneration*. *Journal of Hepatology*, 65(3), 608–617. doi:10.1016/j.jhep.2016.04.018
84. Valizadeh, A., Majidinia, M., Samadi-Kafil, H., Yousefi, M., & Yousefi, B. (2019). *The roles of signaling pathways in liver repair and regeneration*. *Journal of Cellular Physiology*. doi:10.1002/jcp.28336
85. Knockaert, L., Berson, A., Ribault, C., Prost, P.-E., Fautrel, A., Pajaud, J., ... Robin, M.-A. (2011). *Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver*. *Laboratory Investigation*, 92(3), 396–410.
86. Wang, H., Mehal, W., Nagy, L.E. et al. *Immunological mechanisms and therapeutic targets of fatty liver diseases*. *Cell Mol Immunol* 18, 73–91 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00579-3>

87. Van Haele, M., Snoeck, J., & Roskams, T. (2019). *Human Liver Regeneration: An Etiology Dependent Process*. International Journal of Molecular Sciences, 20(9), 2332. doi:10.3390/ijms20092332
88. Lafoz, E., Ruart, M., Anton, A., Oncins, A., & Hernández-Gea, V. (2020). *The Endothelium as a Driver of Liver Fibrosis and Regeneration*. Cells, 9(4), 929. doi:10.3390/cells9040929
89. Lucía Cordero-Espinoza and Meritxell Huch. (2018). *The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis*. The Journal of Clinical Investigation.;128(1):85–96.
90. Diletta Overi 1, Guido Carpino 2, \*, Vincenzo Cardinale 3, Antonio Franchitto 1, Samira Safarikia 4, Paolo Onori 1, Domenico Alvaro 4 and Eugenio Gaudio. (2018). *Contribution of Resident Stem Cells to Liver and Biliary Tree Regeneration in Human Diseases*. International Journal of Molecular Sciences 19, 2917
91. Atsunori Tsuchiya, Wei-Yu Lu. (2019). *Liver stem cells: Plasticity of the liver epithelium*. World Journal of Gastroenterology 25(9): 1037-1049
92. Biferali B, Proietti D, Mozzetta C and Madaro L (2019). *Fibro–Adipogenic Progenitors Cross - Talk in Skeletal Muscle: The Social Network*. Front. Physiol. 10:1074. doi: 10.3389/fphys.2019.01074
93. Zannis Almpanis, Maria Demonakou, and Dina Tiniakos (2016). *Evaluation of liver fibrosis: “Something old, something new...”*. Annals of Gastroenterology. 29(4): 445–453 doi: 10.20524/aog.2016.0046
94. Axley P, Mudumbi S, Sarker S, Kuo Y-F, Singal A (2018). *Patients with stage 3 compared to stage 4 liver fibrosis have lower frequency of and longer time to liver disease complications*. PLoS ONE 13(5): e0197117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197117>
95. Biferali B, Proietti D, Mozzetta C and Madaro L (2019) *Fibro–Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network*. Front. Physiol. 10:1074. doi: 10.3389/fphys.2019.01074

## 6.2 Ακαδημαϊκά συγγράμματα και βιβλία

- A. Burton, E. T. (2012) *Βασικές αρχές μοριακής βιολογίας*. 1<sup>η</sup> έκδ. Jones & Barlett Learning
- B. Cooper, G. Hausmann, R. (2009) *Το κύτταρο – Μια μοριακή προσέγγιση*. 5<sup>η</sup> έκδ. Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press
- C. Caudy, A. Myers, R. Watson, J. Witkowski, J. (2007) *Ανασυνδυσασμένο DNA – Από τα γονίδια στα γονιδιώματα*. 3<sup>η</sup> εκδ. Cold Spring Laboratory Press
- D. Sherwood, L. (2012) *Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου – Από το κύτταρο στα συστήματα*. 4<sup>η</sup> εκδ. BROOKS/COLE Cengage Learning