

AND O'CONNOR

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



025000200213





1381

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ  
ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΦΩΤΣΗΣ

**ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΚΟΗΘΗΣ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ:  
ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΚΤΙΒΙΝΗΣ Α**

**ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΥ  
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2004**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Νόμος 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2).



**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΑΙΤΗΣΗΣ: 12-01-1998**

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: 353<sup>α</sup>/16-06-1998**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:**

**Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων  
ΜΕΛΗ:**

**Ορέστης Τσόλας, Ομότιμος Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΘΕΜΑΤΟΣ: 09-11-1998**

**ΚΑΤΑΘΕΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ: 08-01-2004**

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**Επαμεινώντας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας**

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Ορέστης Τσόλας, Ομότιμος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης**

**Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων**

**Δημήτρης Καρδάσης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης**

**Παναγιώτης Κούκλης, Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Σάββας Χριστοφορίδης, Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Η διατριβή έγινε ομόφωνα αποδεκτή με βαθμό: «ΑΡΙΣΤΑ»**

**Η Γραμματέας της Ιατρικής Σχολής**

**ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ**



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση, τον οποίο ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου παρείχε καθώς και για τις πολύτιμες ιδέες και συμβουλές του κατά την εκπόνηση και την συγγραφή της εργασίας αυτής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να εκφράσω στην κ. Carol Murphy για την πολύτιμη παρουσία της στο εργαστήριο και το αμείωτο ενδιαφέρον της καθώς και για την σημαντική μετάδοση γνώσεων που μου πρόσφερε με μεγάλη υπομονή καθ' όλη την διάρκεια αυτής της εργασίας.

Τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Ορέστη Τσόλα και την Επίκουρη Καθηγήτρια κ. Θωμαΐδα Παπαμαρκάκη, ευχαριστώ θερμά για την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και για τις χρήσιμες παρατηρήσεις και υποδείξεις τους. Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που στην κρίση τους υποβάλλεται αυτή η διατριβή ευχαριστώ θερμά για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για το ευχάριστο περιβάλλον και την συμπαράστασή τους για την ολοκλήρωση της προσπάθειας αυτής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Ελισάβετ Χατζή που στο ξεκίνημα του διδακτορικού, όχι μόνο με βοήθησε να προσαρμοστώ στην άγνωστη για μένα τότε πόλη των Ιωαννίνων, αλλά με στήριξε στα πρώτα βήματά μου στο εργαστήριο ενώ η συνεχή της συμπαράσταση υπήρξε πολύτιμη. Ευχαριστώ επίσης θερμά την Ελένη Μπαγκλή για την άψογη συνεργασία, και την κατανόηση που έδειξε στις δύσκολες στιγμές όλα αυτά τα χρόνια καθώς και την Σοφία Μπέλλου που ως πιο καινούριο μέλος του εργαστηρίου έδωσε μια ευχάριστη νότα και μου συμπαραστάθηκε στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής. Φυσικά δεν θα μπορούσα να ξεχάσω την Λαμπρινή Κύρκου και την Φανή Ταχμάζογλου που μου συμπαραστάθηκαν και με βοήθησαν με κάθε δυνατό τρόπο και που πάνω από όλα είναι αγαπημένες φίλες.

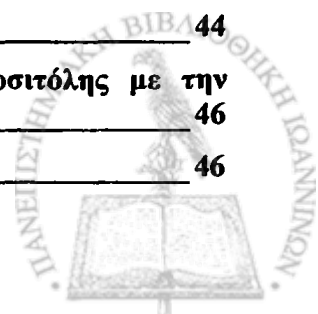


*Ευχαριστώ τους αγαπημένους μου γονείς που με στήριξαν με την αγάπη και την φροντίδα τους και τα αδέρφια μου Παναγιώτη και Ελένη που στάθηκαν δίπλα μου και με βοήθησαν να ολοκληρώσω το στόχο μου.*



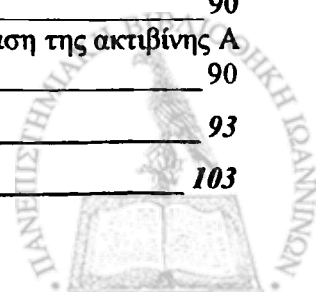
# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Η γένεση και ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου</b>	<b>1</b>
1.1.1 Γενικά-ορισμοί	1
1.1.2 Αγγειακή διαφοροποίηση	2
1.1.2.1 Διαφοροποίηση αρχέγονων κυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα	2
1.1.2.2 Διαφοροποίηση αρτηριών και φλεβών	4
1.1.3 Αγγειακή μυογένεση: ωρίμανση του αγγειακού τοιχώματος	5
1.1.3.1 Προσέλκυση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων	6
1.1.3.2 Διαφοροποίηση σε περικύτταρα/λεία μυϊκά κύτταρα	7
1.1.4 Αγγειογένεση	8
1.1.4.1 Διεγέρτες και αναστολείς της αγγειογένεσης	9
1.1.4.2. Στάδια της αγγειογενετικής εκβλάστησης	12
1.1.4.3. Μορφοποίηση, οργάνωση και σταθεροποίηση των αγγείων	13
<b>1.2 Αγγειογένεση και καρκίνος</b>	<b>16</b>
1.2.1 Γενικά	16
1.2.2 Υποξία και νεοπλασματική αγγειογένεση	17
1.2.3 Γενετικές αλλαγές του καρκίνου και αγγειογένεση	18
1.2.4 Ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων και της αγγειοδιαφοροποιητικής απομίμησης	19
1.2.5 Διαγνωστική και προγνωστική αξία της αγγειογένεσης	20
1.2.6 Θεραπευτική αξία της αγγειογένεσης	21
<b>1.3 Ακτιβίνη A</b>	<b>22</b>
1.3.1 Η υπεροικογένεια του TGF-β	22
1.3.2 Δομικά χαρακτηριστικά της ακτιβίνης	23
1.3.3 Βιολογικές δράσεις της Ακτιβίνης A	23
1.3.4 Μεταγωγή σήματος	25
1.3.4.1 Βασικός μηχανισμός	25
1.3.4.2 Υποδοχείς	25
1.3.4.3 Διαμεσολαβητές	26
1.3.4.4 Είσοδος και έξοδος από τον πυρήνα	28
1.3.4.5 Τερματισμός σηματοδότησης-ανάδραση	30
1.3.5 Γονιδιακή ρύθμιση	31
1.3.5.1 Γενικά	31
1.3.5.2 Συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες	32
1.3.5.3 Συνενεργοποιητές και αποσιωπητές	34
1.3.6 TGF-β/ακτιβίνη και καρκίνος	35
1.3.6.1 Ρύθμιση πολλαπλασιασμού	35
1.3.6.2 Απόπτωση	38
1.3.6.3 Επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση (EMT)	39
1.3.6.4 Αγγειογένεση	40
<b>2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>43</b>
2.1 Κυτταροκαλλιέργειες	43
2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών	44
2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western	44
2.4 Ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης της 3-φωσφατιδυλικής ινοσιτόλης με την περιοχή FYVE με την μέθοδο SPR (Surface Plasmon Resonance)	46
2.5 Ενδοκυτταρική εντόπιση της SARA με συνεστιακή μικροσκοπία	46





2.6 Έκφραση ακτιβίνης A σε κύτταρα WAC2 με σταθερή διαμόλυνση	47
2.7 Κατασκευές	48
2.7.1 Κατασκευές ανασυνδυασμένου DNA	48
2.7.2 Κατασκευή και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών	51
2.8 Δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς	53
2.9 Δοκιμασίες πολλαπλασιασμού	54
2.9.1 με μέτρηση αριθμού κυττάρων	54
2.9.2 με ενσωμάτωση [ <sup>3</sup> H] μεθυλοθυμιδίνης	55
2.9.3 με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης	55
2.10 Δοκιμασία μετακίνησης ενδοθηλιακών κυττάρων	56
2.11 Δοκιμασία ζυμογραφικής ανάλυσης	57
2.12 Δοκιμασία ανάπτυξης ξενομοσχευματικών όγκων σε ποντίκια	58
2.13 Στατιστική ανάλυση	58
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
3.1 Η ακτιβίνη A παίζει σημαντικό ρόλο στον κακοήγη μετασχηματισμό του νευροβλαστώματος	59
3.1.1 Η ακτιβίνη A αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων νευροβλαστώματος	59
3.1.2 Η ακτιβίνη A αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων νευροβλαστώματος σε δοκιμασίες ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια: οι ξενομοσχευματικοί όγκοι έχουν μειωμένη αγγείωση	61
3.2 Η ακτιβίνη A ρυθμίζει σημαντικές ανταποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων	61
3.2.1 Η ακτιβίνη A αναστέλλει την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων στα ενδοθηλιακά κύτταρα	63
3.2.2 Η ακτιβίνη A αναστέλλει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων	63
3.2.3 Η ακτιβίνη A αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων	65
3.2.3.1. Η ακτιβίνη A επάγει αναστολές του κυτταρικού κύκλου	68
3.2.3.2 Η ακτιβίνη A αναστέλλει μιτογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια	70
3.3 Η ακριβής θέση των Smad πρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της ακτιβίνης A	73
3.3.1 Η SARA εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα	74
3.3.2 Η περιοχή FYVE της SARA συνδέεται με το μεμβρανικό λιπίδιο PI(3)P και είναι επαρκής για την στόχευση της SARA στο πρώιμο ενδόσωμα	74
3.3.3 Η SARA συμμετέχει στην μεταγωγή σήματος από ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα	78
3.3.4 Η ενδοκυττάρωση και η σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων επηρεάζουν την μεταγραφική ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών	79
3.3.5 Η Rab5S34N αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κερατινοκυττάρων	83
3.4 Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A δεν εξαρτάται μόνο από την ενεργοποίηση του μονοπατιού Smad αλλά και από μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών.	85
3.4.1 Αμφότερες οι Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες μετάγουν αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα	85
3.4.2 Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την ενεργοποίηση των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών	90
3.4.3 Η αναστολή της p70 <sup>S6K</sup> συμμετέχει στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A	90
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	103





## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

**Ad (Adenovirus):** αδενοϊός.

**ALK (Activin-like kinase):** κινάση παρόμοια με αυτή της ακτιβίνης.

**Ang (Angiopoietins):** αγγειοποιητίνες.

**ARE (Activin Response Element):** στοιχείο ανταπόκρισης της ακτιβίνης

**BBCE (Bovine Brain Capillary Endothelial cells):** ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου βοός.

**BMP (Bone Morphogenetic Proteins):** μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών

**Cdk (Cyclin dependent kinase):** κυκλινοεξαρτώμενη κινάση

**EMT (Epithelial-mesenchymal transition):** επιθηλιακή-μεσεγχυματική διαφοροποίηση.

**EPCs (Endothelial Progenitor Cells):** πρόγονα ενδοθηλιακά κύτταρα.

**FBS (Fetal Bovine Serum):** ορός εμβρύου βοός.

**FGF (Fibroblast Growth Factor):** ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας

**FITC (Fluorescein Isothiocyanate):** ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη.

**FLAG:** οκταπεπτίδιο που αποτελείται από τα αμινοξέα N-Asp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C.

**FSH (Follicle-stimulating Hormone):** θυλακιοτρόπος ορμόνη.

**FYVE (Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1):** αρχικά των τεσσάρων πρωτεϊνών Fab1p, YOTB, Vac1p, EEA1 που περιέχουν περιοχή ψευδαργύρου.

**GFP (Green Fluorescent Protein):** πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.

**GS region (Glycine Serine region):** περιοχή πλούσια σε σερίνες και γλυκίνες.

**GST (Glutathione-S-Transferase):** τρανσφεράση της γλουταθειόνης.

**HIF (Hypoxia Inducible Factor):** επαγόμενος παράγοντας υποξίας.

**HRE (Hypoxia Response Element):** στοιχείο ανταπόκρισης σε υποξία.

**HRP (Horse Raddish Peroxidase):** ραφανδική υπεροξειδάση.

**HSCs (Haematopoietic Stem Cells):** αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.

**MH (Mad Homology):** ομολογία των mad.

**MMPs (Matrix Mettaloproteinases):** μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας.

**MOI (Multiplicity Of Infection):** πολλαπλότητα μόλυνσης.

**Mowiol:** πολυβινυλική αλκοόλη.

**MVD (Microvascular density):** βαθμός πυκνότητας των αγγείων.

**NCS (Newborn Calf Serum):** ορός νεογέννητου μοσχαριού.



**NLS (Nuclear Localisation Signal):** σήμα πυρηνικού εντοπισμού.

**NO (Nitric Oxide):** μονοξείδιο του αζώτου.

**PA (Plasminogen Activator):** ενεργοποιητής του πλασμινογόνου.

**PAI (Plasminogen Activator Inhibitor):** αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.

**PBS (Phosphate Buffer Saline):** ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών.

**PDGF (Platelet-Derived Growth Factor):** αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων

**PI(3)P (Phosphatidyl Inositol 3-Phosphate):** 3-φωσφορική φωσφατίδυλο-ινοσιτόλη.

**SARA (Smad Anchor for Receptor Activation):** πρωτεΐνη αγκυροβόλησης των Smad στη μεμβράνη για ενεργοποίηση από τους υποδοχείς.

**SBD (Smad Binding Domain):** περιοχή σύνδεσης των Smad πρωτεϊνών.

**SBE (Smad Binding Element):** στοιχείο ανταπόκρισης στις πρωτεΐνες Smad.

**Smad:** πρόκειται για σύμπτυξη των φράσεων **Mad (Mothers against decapentaplegic)** και ***C.elegans Sma* (Derynck et al., 1996)**.

**SMCs (Smooth Muscle Cells):** λεία μυϊκά κύτταρα.

**TGF-β (Transforming Growth Factor-β):** αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β.

**TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases):** αναστολείς μεταλλοπρωτεασών ιστικού τύπου.

**TRITC (Tetramethylrhodamine Isothiocyanate):** ισοθειοκυανική τετραμεθυλοροδαμίνη

**TSP (thrombospondin):** θρομβοσποντίνη.

**VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor):** ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας.



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η γένεση και ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου

### 1.1.1 Γενικά-ορισμοί

Τα αγγεία του σώματος στον αυλό τους καλύπτονται σε όλο το μήκος τους από ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρτιότητα και την σωστή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν βασικό συστατικό του αγγειακού τοιχώματος και ο ρόλος τους είναι απαραίτητος για διαδικασίες όπως η μεταφορά αίματος, οξυγόνου και θρεπτικών υλικών στους διάφορους ιστούς. Επειδή τα αγγεία του σώματος είναι επιρρεπή σε διαρροές και αποφράξεις, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν υποστεί έντονη εξελικτική πίεση με αποτέλεσμα την ανάπτυξη πολύπλοκων μηχανισμών για την ρύθμιση της περατικότητας του αίματος εξασφαλίζοντας την αιμόσταση και την διαπερατότητα των αγγείων. Παράλληλα, όντας η διαχωριστική γραμμή μεταξύ ιστών και έμμορφων αμυντικών κυττάρων του αίματος, τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν αναπτύξει συστήματα μεταφοράς των αμυντικών κυττάρων του οργανισμού από το αίμα στους ιστούς σε περιπτώσεις μόλυνσης από μικροοργανισμούς, συμμετέχοντας στην τοπική άμυνα και τη δημιουργία φλεγμονώδους αντίδρασης. Επιπλέον, το αγγειακό δίκτυο δείχνει αξιοσημείωτη πλαστικότητα για να ανταποκρίνεται στην δημιουργία νέων αγγείων όταν αυτό είναι απαραίτητο, όπως για παράδειγμα μετά από καταστροφή ιστών.

Οι λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων ρυθμίζονται από πληθώρα κυτταροκινών και αυξητικών παραγόντων. Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από τους παράγοντες αυτούς καθώς και τα γονίδια τα οποία ρυθμίζουν, συνιστούν ένα πολύπλοκο σύστημα το οποίο απαιτεί εξαιρετικό συντονισμό και πολλούς μηχανισμούς ρύθμισης. Ένα τέτοιο πολύπλοκο σύστημα είναι επιρρεπές σε απορύθμιση και αποτελεί την πηγή πολλών ασθενειών για τον άνθρωπο. Θρομβώσεις, αθηρομάτωση, υπέρταση, αιμορραγίες, αγγειογένεση των όγκων και άλλες αγγειακές ασθένειες προκαλούν πάνω από το 50% των θανάτων στις προηγμένες κοινωνίες.

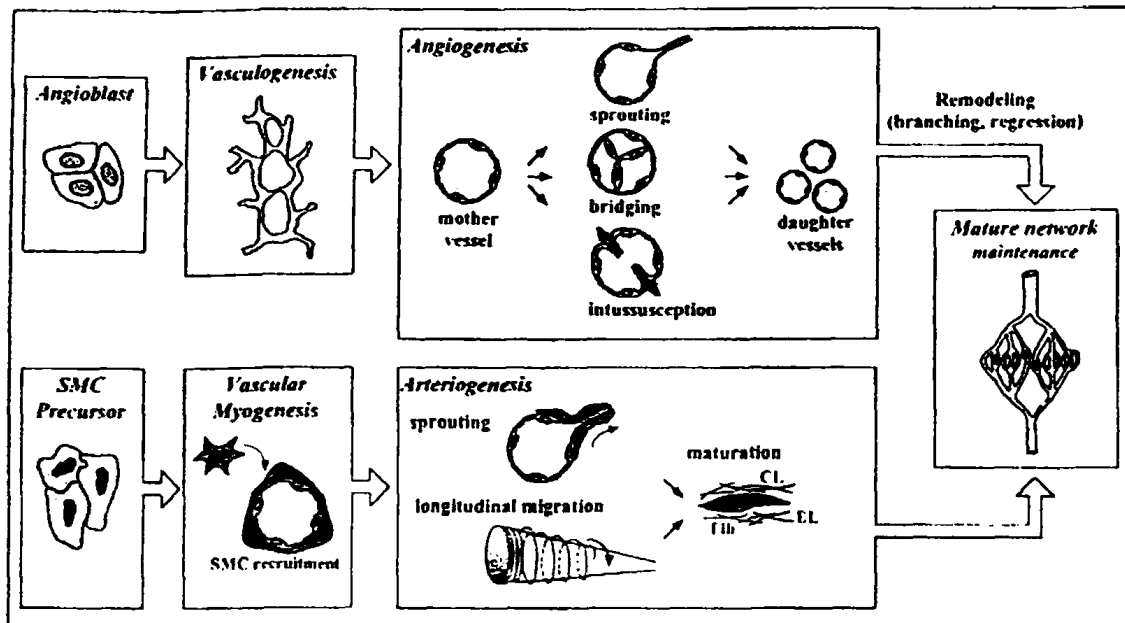
Κατά την διάρκειά της εμβρυογένεσης τα αγγεία αναπτύσσονται μέσω δύο διαδικασιών της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis) και της αγγειογένεσης. Η αγγειακή διαφοροποίηση περιλαμβάνει την *de novo* διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από αρχέγονα κύτταρα του μεσοδέρματος. Κατά την αγγειακή διαφοροποίηση

σχηματίζεται ένα πρώιμο αγγειακό δίκτυο το οποίο περιλαμβάνει κάποια από τα βασικότερα αγγεία του εμβρύου όπως είναι η αορτή, άλλες μεγάλες φλέβες και αρτηρίες καθώς και ένα μικρό δίκτυο αγγείων που βοηθάει στην σύνδεση των μεγαλύτερων αγγείων. Η μετέπειτα αύξηση, επέκταση και αγγειακή αναδιαμόρφωση του αρχικού δικτύου γίνεται με την διαδικασία της αγγειογένεσης. Ανάλογα με τον τύπο του αγγείου (αρτηρία, φλέβα, τριχοειδές) τα τοιχώματα των αγγείων ωριμάζουν, καθώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσελκύουν και συνδέονται στενά με λεία μυϊκά κύτταρα ή περικύτταρα μια διαδικασία που αποκαλείται αγγειακή μυογένεση (vascular myogenesis). Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας παράγεται εξωκυττάρια ουσία από τα κύτταρα των τοιχωμάτων (mural cells) για την σταθεροποίηση του δικτύου. Οι διαδικασίες αυτές απεικονίζονται στην Εικόνα 1.

## 1.1.2 Αγγειακή διαφοροποίηση

### 1.1.2.1 Διαφοροποίηση αρχέγονων κυττάρων σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Ο σχηματισμός νέων αγγείων στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εντοπίζεται στο λεκιθικό ασκό ως εστιακές συναθροίσεις μεσεγχυματικών κυττάρων, οι οποίες είναι γνωστές ως αιματικές νησίδες (blood islands). Πολλές μελέτες διαφοροποίησης *in vitro* έχουν δείξει ότι τα αρχέγονα κύτταρα των ενδοθηλιακών και αιματοποιητικών κυττάρων έχουν κοινή προέλευση τους αιμαγγειοβλάστες. Τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των αιμαγγειοβλαστών γίνονται μέσα στις αιματικές νησίδες και τα κύτταρα που βρίσκονται στην περίμετρο αυτών δημιουργούν τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλάστες), ενώ αυτά που βρίσκονται στο κέντρο αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα των αιμοποιητικών κυττάρων. Οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν την τύχη των αιμαγγειοβλαστών δεν είναι πλήρως κατανοητοί, αλλά πολλοί παράγοντες έχουν βρεθεί που επηρεάζουν τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης (Carmeliet, 1999b). Ανάμεσα σε αυτούς, είναι πρωτεΐνες μέλη της οικογένειας GATA, βασικοί παράγοντες έλικας-θηλειάς-έλικας (basic helix-loop-helix, bHLH) και οι πρωτεΐνες Id (inhibitors of differentiation) (Carmeliet, 2000; Dyer et al., 2001). Αυξητικοί παράγοντες, όπως ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας-2 (fibroblast growth factor-2, FGF-2) επάγουν την δημιουργία αγγειοβλαστών από το μεσόδερμα (Poole et al., 2001). Επιπλέον, οι αγγειοβλάστες εκφράζουν τον υποδοχέα 2 του ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) και πολλαπλασιάζονται σε ανταπόκριση του αυξητικού αγγειακού παράγοντα VEGF.



Εικόνα 1. Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (αγγειοβλάστες) οργανώνονται σε ένα αρχικό δίκτυο (αγγειακή διαφοροποίηση) που στην συνέχεια επεκτείνεται και αναδιαμορφώνεται (αγγειογένεση). Λεία μυϊκά κύτταρα σταθεροποιούν τα νέα αγγεία για την δημιουργία του ώριμου αγγειακού δικτύου (Carmeliet, 2000).

Απενεργοποίηση του γονιδίου VEGFR-2 σε ποντίκια έχει σαν αποτέλεσμα την θνησιμότητα των εμβρύων, τα οποία δεν αναπτύσσουν αγγειακό δίκτυο και ο αριθμός των αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων που παρατηρείται είναι ελάχιστος (Shalaby et al., 1995). Σε αντίθεση με τον υποδοχέα VEGFR-2, μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τον υποδοχέα VEGFR-1 δείχνουν διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά η ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος παρουσιάζεται αποδιοργανωμένη λόγω του μεγάλου αριθμού αιμαγγειοβλαστών (Fong et al., 1995; Fong et al., 1999). Οι γενετικές αυτές μελέτες υποδηλώνουν ότι και οι δύο υποδοχείς είναι απαραίτητοι για την σωστή δημιουργία του αγγειακού συστήματος στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Ο υποδοχέας VEGFR-2 είναι απαραίτητος για την διαφοροποίηση των αιμαγγειοβλαστών σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ ο VEGFR-1 φαίνεται να αναστέλλει την αυξημένη ανάπτυξη των αιμαγγειοβλαστών (Πίνακας 1) Ο υποδοχέας VEGFR-3 μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος στο έμβryo, αλλά ο κυριότερος ρόλος του είναι στην ανάπτυξη του λεμφικού συστήματος όπου υπερέκφραση του υποδοχέα οδηγεί σε υπερπλασία (Olofsson et al., 1999; Taipale et al., 1999).

Πίνακας 1: Γονιδιακές απαλείψεις και οι επιπτώσεις τους

Γονιδιακή απάλειψη	Στάδιο αγγειακής ανάπτυξης	Αιτία θνησιμότητας	Αναφορά
VEGFR-1	αγγειακή διαφοροποίηση	Μεγάλος αριθμός ενδοθηλιακών κυττάρων και αποδιοργανωμένο αγγειακό δίκτυο	(Fong et al., 1995)
VEGFR-2	αγγειακή διαφοροποίηση	Απουσία αγγειακού δικτύου, και ενδοθηλιακών κυττάρων	(Shalaby et al., 1995)
VEGFR-3	αγγειακή διαφοροποίηση	Ανωμαλίες στην αγγειακή αναδιαμόρφωση και οργάνωση	(Dumont et al., 1998)
Ang1	αγγειακή ωρίμανση	Ανωμαλίες στην ακεραιότητα των αγγείων, οίδημα και αιμορραγία	(Suri et al., 1996)
Ang2	αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην αγγειακή οργάνωση, αναδιαμόρφωση και εκβλάστηση.	(Gale et al., 2002; Maisonnier et al., 1997)
Tie1	αγγειακή ωρίμανση	Ανωμαλίες στην ακεραιότητα των αγγείων, οίδημα και αιμορραγία	(Sato et al., 1995)
Tie2	αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην αγγειακή οργάνωση, αναδιαμόρφωση και εκβλάστηση.	(Sato et al., 1995)
ΕφρίνηB2/EphB4	αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση	Ανωμαλίες στο δίκτυο αρτηριών και φλεβών και την μυοκαρδιακή διαμερισματοποίηση (myocardial trabeculation)	(Gerety et al., 1999; Wang et al., 1998)
TGF-β1	αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην διαφοροποίηση του μεσοδέρματος και της αιματοποίησης	(Dickson et al., 1995)
TβRII	αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην αγγειακή διαφοροποίηση και αιματοποίηση του λεκιθικού ασκού και παραμόρφωση αγγείων	(Oshima et al., 1996)
ALK1	αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην διαφοροποίηση και την προσέγκυση λείων μυϊκών κυττάρων.	(Oh et al., 2000)
ALK5	αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην μετακίνηση και τον πολλαπλασιασμό των ΕΚ και στην παραγωγή ιώδους	(Larsson et al., 2001)
Ενδογλίνη	αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση	Ανωμαλίες στην ανάπτυξη λείων μυϊκών κυττάρων και κακομορφίες της καρδιάς	(Arthur et al., 2000; Bourdeau et al., 1999; Li et al., 1999)

### 1.1.2.2 Διαφοροποίηση αρτηριών και φλεβών

Η διάκριση μεταξύ αρτηριών και φλεβών γίνεται πολύ νωρίς κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Οι αγγειοβλάστες διαφοροποιούνται σε προαρτηριακούς ή σε προφλεβικούς αγγειοβλάστες για την δημιουργία του αρχικού αγγειακού πλέγματος που στην συνέχεια θα βελτιωθεί σε ένα πιο λειτουργικό δίκτυο. Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται σε αυτήν την διαδικασία είναι ελάχιστα γνωστοί. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι μέλη της οικογένειας των εφρινών (eprins) παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαφοροποίηση μεταξύ φλεβών και αρτηριών (Roman and Weinstein, 2000; Wilkinson, 2000). Οι εφρίνες προσδένονται στους αντίστοιχους υποδοχείς που αποτελούν μια μεγάλη



οικογένεια από 14 υποδοχείς με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης (Gale and Yancopoulos, 1999b). Σε αντίθεση με άλλους παράγοντες, οι εφρίνες θα πρέπει να είναι προσκολλημένες στην κυτταρική μεμβράνη για να ενεργοποιήσουν τους υποδοχείς (Davis et al., 1994). Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, η έκφραση της εφρίνης B2 περιορίζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης και στην συνέχεια η έκφραση αυτή επεκτείνεται και στα αρτηριακά λεία μυϊκά κύτταρα (Gale et al., 2001; Helbling et al., 2000). Σε αντίθεση, ο υποδοχέας B4 της εφρίνης B2 βρίσκεται κυρίως στις φλέβες (Helbling et al., 2000). Απενεργοποίηση των γονιδίων είτε της εφρίνης B2 είτε του υποδοχέα B4 δεν επηρεάζει την αγγειακή διαφοροποίηση αλλά δημιουργεί ανωμαλίες στην λειτουργία της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα την μη σωστή διαμόρφωση και ωρίμανση αρτηριών και φλεβών (Gerety et al., 1999; Wang et al., 1998). Τα χαρακτηριστικά έκφρασης της εφρίνης B2 συνεχίζονται και στα μετέπειτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης αλλά και στον ενήλικα οργανισμό, παρ' όλο που η έκφραση επεκτείνεται σταδιακά από το αρτηριακό ενδοθήλιο στα περιβάλλοντα αρτηριακά λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα (Gale et al., 2001; Shin et al., 2001). Φαίνεται, πως οι εφρίνες παίζουν σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην διαφοροποίηση μεταξύ φλεβών και αρτηριών στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αλλά μπορεί να συνεχίζουν την δράση τους κατά την διάρκεια ανάπτυξης και ωρίμανσης των αρτηριών (Shin et al., 2001). Είναι γεγονός ότι, οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν ποια ενδοθηλιακά κύτταρα ανήκουν σε αρτηρία ποια σε φλέβα ή ποια σε αγγείο δεν είναι πλήρως γνωστοί αν και πρόσφατα διάφοροι παράγοντες, όπως μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας έλικας-θηλειάς-έλικας (bHLH), έχουν χαρακτηριστεί που εμπλέκονται σε αυτή την διαδικασία (Wilkinson, 2000; Zhong et al., 2000).

### 1.1.3 Αγγειακή μυογένεση: ωρίμανση του αγγειακού τοιχώματος

Το άωρο αγγειακό πλέγμα, το οποίο προέρχεται από την αγγειακή διαφοροποίηση, προκειμένου να ανταποκριθεί στις ανάγκες των αναπτυσσόμενων ιστών του εμβρύου, υφίσταται συνεχή αγγειογενετική αναδιαμόρφωση. Κατ' αυτή δημιουργούνται καινούργια αγγεία με διαδικασίες όπως η εκβλάστηση, η γεφυροποίηση και ο εγκολεασμός, αλλά επίσης και υποστροφή εκεί όπου τα αγγεία υπερεπαρκούν ή δεν χρειάζονται πλέον. Η εκβλάστηση είναι η περισσότερο γνωστή διαδικασία και οι μοριακοί μηχανισμοί της περισσότερο κατανοητοί (βλέπε κεφάλαιο 1.1.4.2). Παράλληλα με την αγγειογενετική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος, τα αγγεία πρέπει να γίνουν λειτουργικά και το τοίχωμά τους να ωριμάσει με την προσέλκυση μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία θα

διαφοροποιηθούν σε περιενδοθηλιακά κύτταρα (περικύτταρα στο επίπεδο των τριχοειδών και λεία μυϊκά κύτταρα στο επίπεδο των αρτηριδίων και αρτηριών). Η διαδικασία αυτή καλείται αγγειακή μυογένεση και είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την λειτουργικότητα του αγγειακού συστήματος.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων σταθεροποιούν τα νέα αγγεία και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Underwood et al., 1998), ενώ η απογύμνωση της αορτής από ενδοθηλιακά κύτταρα προκαλεί στένωση της λόγω πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων (Orlandi et al., 1994). Επίσης, τα αγγεία υποστρέφονται πιο εύκολα όταν δεν καλύπτονται από λεία μυϊκά κύτταρα και το αγγειογενετικό ερέθισμα είναι περιορισμένο (Benjamin et al., 1999; Lindahl et al., 1999). Όμοια, τα περικύτταρα έχουν πολλές δράσεις που περιλαμβάνουν ρύθμιση της αιματικής ροής και της αγγειακής διαπερατότητας μέσω μεταγωγής σημάτων στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την εξωκυττάρια ουσία (Rucker et al., 2000). Συνολικά λοιπόν, τα περιενδοθηλιακά κύτταρα με μια ποικιλία αγγειοδραστικών πεπτιδίων, και κυτταροκινών που εκκρίνουν, αλλά και με την αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εξασφαλίζουν σταθεροποίηση, στεγανοποίηση και ρύθμιση του τόνου των αγγείων.

Η προέλευση των κυττάρων αυτών είναι πολύπλοκη και εξαρτάται από την θέση τους μέσα στο έμβρυο (Gittenberger-de Groot et al., 1999). Τα SMCs μπορούν να διαφοροποιηθούν από ενδοθηλιακά κύτταρα όπως γίνεται στα πρώτα νεοσχηματιζόμενα αγγεία του εμβρύου (Gittenberger-de Groot et al., 1999), από μεσεγχυματικά κύτταρα, από πρόγονα κύτταρα του μυελού του οστού ή από μακροφάγα. Τα SMCs στην στεφανιαία φλέβα προέρχονται από το μυοκάρδιο, ενώ αυτά της στεφανιαίας αρτηρίας από το επικάρδιο (Dettman et al., 1998). Πρόσφατα, χαρακτηρίστηκε ένας κοινός πρόγονος κυττάρων που διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε ανταπόκριση στον αυξητικό παράγοντα VEGF ή σε SMCs σε ανταπόκριση στον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων B (Platelet-derived growth factor B, PDGF-B) (Yamashita et al., 2000).

### 1.1.3.1 Προσέλκυση αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων

Η προσέλκυση των περιενδοθηλιακών κυττάρων στα τοιχώματα των αγγείων γίνεται από διάφορους παράγοντες. Ο παράγοντας PDGF-B έχει δείξει ότι παίζει ρόλο χημειοτακτικό (chemoattractant) για τα κύτταρα που απαρτίζουν τα τοιχώματα των αγγείων, ενώ ο παράγοντας VEGF μέσω της σύνδεσής του με τους VEGF υποδοχείς επίσης συνεισφέρει σε αυτή την διαδικασία (Lindahl et al., 1998). Η απουσία είτε του

παράγοντα PDGF-B είτε του υποδοχέα οδηγεί στην αιμορραγία των αγγείων, αποτέλεσμα της μειωμένης κάλυψης με περικύτταρα (Leveen et al., 1994; Lindahl et al., 1997).

Επίσης, οι αγγειοποιητίνες (angiopoietins, Ang) καθώς και οι υποδοχείς Tie έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ωρίμανση των αγγείων. Οι αγγειοποιητίνες (Ang1 και Ang2) που προσδένονται στους υποδοχείς Tie με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης, εκφράζονται στο αγγειακό ενδοθήλιο όπως και οι υποδοχείς του VEGF (Maisonpierre et al., 1993; Sato et al., 1993). Η σύνδεση της Ang1 με τον υποδοχέα της Tie2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί στην παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων, όπως ο PDGF-B, οι οποίοι προσελκύουν μεσεγχυματικά κύτταρα. Μελέτες σε έμβρυα ποντικού έχουν δείξει ότι κατά την απουσία έκφρασης της Ang1 το αγγειακό σύστημα παρουσιάζει ανωμαλίες στην ακεραιότητα των αγγείων, οίδημα και αιμορραγία (Sato et al., 1995; Suri et al., 1996). Επιπλέον, υπερέκφραση της Ang1 καθιστά τα αγγεία ανθεκτικά στις ρωγμές (Thurston et al., 2000). Επίσης, οι παραπάνω μελέτες έχουν δείξει ότι η Ang1 σταθεροποιεί τα αγγεία επηρεάζοντας μόρια σύνδεσης και προάγοντας την αλληλεπίδραση μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και των κυττάρων που υποστηρίζουν το αγγείο. Η Ang2 φαίνεται να έχει αντίθετη δράση από αυτή της Ang1. Υπερέκφραση της Ang2 στο ενδοθήλιο του εμβρύου οδηγεί στην θνησιμότητα του εμβρύου και οι ανωμαλίες που παρουσιάζονται είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται κατά τη απουσία έκφρασης της Ang1 ή του υποδοχέα Tie2 (Maisonpierre et al., 1997). Στον ενήλικα οργανισμό η Ang2 επάγεται στο ενδοθήλιο των αγγείων που βρίσκονται υπό ενεργή διαμόρφωση όπως στην εκβλάστηση ή την αποστροφή των αγγείων στις ωοθήκες (Goede et al., 1998; Maisonpierre et al., 1997). Ο ρόλος λοιπόν της Ang2 είναι η αποσταθεροποίηση των αγγείων επιτρέποντας είτε την υποστροφή των αγγείων (regression) στις περιπτώσεις απουσίας αυξητικού παράγοντα είτε τις αγγειογενετικές αλλαγές που επάγονται από αγγειογενετικούς παράγοντες όπως ο VEGF. Κατά την διάρκεια της ενήλικης ζωής η σύνδεση της Ang1 με τον υποδοχέα Tie2 είναι απαραίτητη για την διατήρηση του εφesusχάζοντος αγγειακού συστήματος, υποδεικνύοντας ότι η ισορροπία μεταξύ Ang1 και Ang2 σημάτων πρέπει να είναι ακριβής για την σωστή λειτουργία του αγγειακού συστήματος.

### 1.1.3.2 Διαφοροποίηση σε περικύτταρα/λεία μυϊκά κύτταρα

Μέλη της οικογένειας TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), περιλαμβανομένου του TGF- $\beta$ 1, παίζουν επίσης ρόλο στην ωρίμανση των αγγείων με το να ενεργοποιούν τη διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων προς λεία μυϊκά κύτταρα ή περικύτταρα και την εναπόθεση εξωκυττάριας ουσίας, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλουν τον

πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο παράγοντας TGF-β μεταδίδει σήματα μέσω του υποδοχέα τύπου II (TGF-βR II) που φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα τύπου I (TGF-βR I) που με την σειρά του ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες Smad όπως αναφέρεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο 1.3. Γενετικές μελέτες σε ποντίκια έχουν δείξει ότι η απενεργοποίηση των γονιδίων του TGF-β και σημαντικών για την μεταγωγή του σήματός του παραγόντων οδηγεί στην θνησιμότητα των εμβρύων σαν αποτέλεσμα πολλαπλών ανωμαλιών που παρατηρούνται στην διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών και αιματοποιητικών κυττάρων, αλλά και την ανεπαρκή προσέλκυση και διαφοροποίηση μεσεγχυματικών κυττάρων (Πίνακας 1). Πολλοί από τους φαινότυπους αυτούς είναι παρόμοιοι με τις αγγειακές αλλοιώσεις που παρατηρούνται σε ασθενείς που πάσχουν από την κληρονομική αιμορραγική τηλεαγγειεκτασία (hereditary haemorrhagic telangiectasia, HHT), όπου λόγω της ανωριμότητας των αγγείων, αυτά αιμορραγούν. Τα γονίδια των οποίων η απενεργοποίηση είναι υπεύθυνη για την HHT έχουν χαρακτηριστεί και ανήκουν στην οικογένεια TGF-β. Για την τύπου 2 HHT (HHT2) είναι ο υποδοχέας τύπου I του παράγοντα TGF-β (ALK-1) που εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, ενώ μεταλλάξεις στην ενδογλίνη (endoglin), υποδοχέας τύπου III που διευκολύνει την σύνδεση του παράγοντα TGF-β με τον υποδοχέα τύπου II, είναι υπεύθυνες για την τύπου 1 HHT (HHT1) (van den Driesche et al., 2003).

#### 1.1.4 Αγγειογένεση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αγγειογένεση καλείται η δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα (κεφάλαιο 1.1.1). Έτσι, νέα αγγεία μπορούν να προκύψουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη από το άωρο αγγειακό πλέγμα της αγγειακής διαφοροποίησης (κεφάλαιο 1.1.2). Στην περίπτωση αυτή η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι στενά συνδεδεμένη με την διαδικασία της αγγειακής μυογένεσης (κεφάλαιο 1.1.3). Στους ενήλικες οργανισμούς όμως, η αγγειογένεση λαμβάνει χώρα από ήδη ώριμα αγγεία, είτε αυτή είναι φυσιολογική (επανόρθωση ιστών, αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας), είτε παθολογική (αγγειογενετικές νόσοι περιλαμβανομένων και αυτών του οφθαλμού). Η αγγειογένεση από ώριμα αγγεία συνήθως συμβαίνει με την διαδικασία της εκβλάστησης, της οποίας οι μοριακοί μηχανισμοί είναι περισσότερο μελετημένοι και σε αυτούς βασικά αναφέρεται το κεφάλαιο αυτό.

#### 1.1.4.1 Διεγέρτες και αναστολείς της αγγειογένεσης

Η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και βρίσκεται υπό συνεχή αναστολή στον ενήλικα οργανισμό με εξαίρεση τις καταστάσεις επανόρθωσης τραυμάτων και τις κυκλικές αλλαγές του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Στις καταστάσεις αυτές, η αγγειογένεση υπόκειται σε αυστηρούς μηχανισμούς ρύθμισης και συντονισμού ώστε η παραγωγή νέων τριχοειδών αγγείων να σταματήσει όταν εκπληρωθεί ο σκοπός για τον οποίο προκλήθηκε. Η απώλεια μηχανισμών ρύθμισης της αγγειογένεσης έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή του ελέγχου και του συντονισμού της παραγωγής διεγερτών και αναστολέων της αγγειογένεσης. Επομένως, η ακριβής ισορροπία μεταξύ των διεγερτών και των αναστολέων της αγγειογένεσης είναι απαραίτητη για την διατήρηση του εφesuχάζοντος αγγειακού δικτύου και την φυσιολογική λειτουργία των ιστών.

Πολλοί παράγοντες έχουν χαρακτηριστεί οι οποίοι είτε αναστέλλουν είτε επάγουν την αγγειογένεση (Πίνακας 2). Ο ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας-2 (Fibroblast Growth Factor-2, FGF-2) είναι από τους πρώτους διεγέρτες της αγγειογένεσης που ανακαλύφθηκε (Shing et al., 1984). Σήμερα τουλάχιστον 20 παράγοντες που ανήκουν στην οικογένεια FGF έχουν χαρακτηριστεί. Από αυτούς, η βασική και η όξινη (basic και acidic FGF, FGF-2 και FGF-1) μορφή είναι τα σημαντικά μέλη της οικογένειας αυτής. Οι FGFs συνδέονται με μεγάλη συγγένεια σε πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης (HSPGs) που βρίσκονται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων αλλά και στην εξωκυττάρια ουσία (Vlodavsky et al., 1991). Η συγκέντρωση αυτή των FGFs αποτελεί ένα απόθεμα αυξητικών παραγόντων που μπορεί να ελευθερωθεί υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Οι HSPGs μπορούν να λειτουργήσουν και σαν συνεργαζόμενοι υποδοχείς ρυθμίζοντας την δράση του FGF *in vivo* και *in vitro* (Ornitz, 2000). Οι βιολογικές δράσεις του FGF επιτυγχάνονται μέσω των υποδοχέων FGFR1-4 με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης. Διατάραξη των γονιδίων που κωδικοποιούν τους υποδοχείς FGFR-1 και FGFR-2 οδηγεί στον εμβρυϊκό θάνατο πριν την γαστριδίωση (gastrulation) (Deng et al., 1994; Xu et al., 1998). Πιο πρόσφατες αναφορές δείχνουν ότι ο υποδοχέας FGFR-1 είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη και την διατήρηση του αγγειακού συστήματος στο έμβρυο (Lee et al., 2000) ενώ διαταραχές στο γονίδιο του υποδοχέα FGFR-3 οδηγούσε ανωμαλίες του σκελετού (Colvin et al., 1996).

Ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) ανακαλύφθηκε για την ικανότητά του να αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα (Senger et al., 1983) ενώ αργότερα χαρακτηρίστηκε ως από τους πιο

ισχυρούς επαγωγείς της αγγειογένεσης. Η οικογένεια VEGF αποτελείται από έξι μέλη: VEGF-A (ο αρχικός παράγοντας που χαρακτηρίστηκε), ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (placenta growth factor, PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και VEGF-E. Επιπλέον, εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου που κωδικοποιεί το γονίδιο VEGF-A έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή και άλλων ισομορφών που διαφέρουν στον τελικό αριθμό αμινοξέων. Η σημασία του VEGF-A στην αγγειακή ανάπτυξη φαίνεται από το γεγονός ότι απαλοιφή ενός αλληλίου του VEGF-A έχει σαν αποτέλεσμα την ανώμαλη ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος και τον εμβρυϊκό θάνατο (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Οι βιολογικές δράσεις των VEGFs πραγματοποιούνται μέσω ειδικών κυτταρικών υποδοχέων VEGFR1-3. Οι VEGFR-1 και VEGFR-2 εκφράζονται κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Shibuya et al., 1999). Η έλλειψη του υποδοχέα VEGFR-2 έχει σαν αποτέλεσμα την μη διαφοροποίηση των αιμαγγειοβλαστών σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Shalaby et al., 1995) ενώ οι ανωμαλίες στο αγγειακό σύστημα απουσία του VEGFR-1 είναι αποτέλεσμα της αύξησης του αριθμού των αιμαγγειοβλαστών (Fong et al., 1999). Ο υποδοχέας VEGFR-2 έχει βρεθεί σε σύμπλοκο με την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$  η οποία εκφράζεται στο αγγειακό ενδοθήλιο και η ενεργοποίησή της αυξάνει την ενεργότητα της κινάσης του VEGFR-2 με αποτέλεσμα την αύξηση του πολλαπλασιασμού από τον VEGF (Soldi et al., 1999). Ο παράγοντας FGF αλλά και ο VEGF ενεργοποιούν μονοπάτια επιβίωσης, πολλαπλασιασμού, μετακίνησης και διαφοροποίησης αρχέγονων και ενδοθηλιακών κυττάρων, παρ' όλο που η αποτελεσματικότητα αυτών των ανταποκρίσεων εξαρτάται από τον τύπο της ενδοθηλιακής κυτταρικής σειράς.

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη αναστολέων της αγγειογένεσης έγιναν από παρατηρήσεις που έδειξαν ότι η ιντερφερόνη- $\alpha$  και ο παράγοντας αιμοπεταλίων-4 μπορούν να αναστείλουν τον χημειοτακτισμό και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων αντίστοιχα. Από τους πιο σημαντικούς όμως αναστολείς της αγγειογένεσης θεωρείται η εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη θρομβοσποντίνη-1 (thrombospondin-1, TSP-1) (Good et al., 1990). Τα επίπεδα έκφρασης της TSP-1 είναι υψηλά σε φυσιολογικά κύτταρα, ενώ έχει δειχτεί ότι η TSP-1 ρυθμίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 (Dameron et al., 1994). Επιπλέον, υπάρχουν και άλλοι αναστολείς της αγγειογένεσης που είναι "κρυφά" μέρη μεγαλύτερων μορίων που δεν έχουν αντιαγγειογενετική δράση. Ένας ισχυρός αναστολέας της αγγειογένεσης, η αγγειοστατίνη, έχει χαρακτηριστεί ως τμήμα του πλασμινογόνου και αναστέλλει την μετανάστευση και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων (Holmgren et al., 1995; O'Reilly et al., 1996; O'Reilly et al., 1994). Η ενδοστατίνη επίσης σημαντικός αναστολέας της αγγειογένεσης έχει παρόμοια

δράση με αυτή της αγγειοστατίνης, είναι τμήμα του κολλαγόνου XVIII (O'Reilly et al., 1997).

Έτσι, στο φυσιολογικά εφesuχαζόμενο αγγειακό δίκτυο μπορεί να ενεργοποιηθεί η αγγειογένεση μέσω της αλλαγής της ισορροπίας μεταξύ αναστολέων και διεγερτών. Σε πολλούς ιστούς η απουσία διεγερτών κρατάει των αγγειογενετικό “διακόπτη” κλειστό, ενώ σε άλλους οι υπάρχοντες διεγέρτες αναστέλλονται από τα υψηλά επίπεδα των αναστολέων. Η μείωση των επιπέδων έκφρασης των αναστολέων ή η αύξηση των διεγερτών έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της ισορροπίας και την ενεργοποίηση του αγγειογενετικού διακόπτη.

**Πίνακας 2: Διεγέρτες και αναστολείς της αγγειογένεσης**

Διεγέρτες	Λειτουργία	Αναστολείς	Λειτουργία
VEGFs	Επάγουν την αγγειογένεση, την αγγειακή διαφοροποίηση, διαπερατότητα και λεμφαγένεση	Ang2	Ανταγωνιστής της Ang1
FGFs	Επάγουν την αγγειογένεση και αρτηριογένεση	TSP-1	Αναστολή της μετακίνησης ανάπτυξης, σύνδεσης και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων
Ang1	Σταθεροποίηση αγγείων	Αγγειοστατίνη	Αναστολή της μετακίνησης και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων
PDGF-B και υποδοχείς	Στρατολόγηση λείων μυϊκών κυττάρων	Ενδοστατίνη	Αναστολή της μετακίνησης και επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων
TGF-β και υποδοχείς	Σταθεροποίηση αγγείων και παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας	Παράγοντας αιμοπεταλίων 4	Αναστολή της σύνδεσης του bFGF και VEGF
Εφρίνες	Διάκριση αρτηριών και φλεβών	TIMPs	Αναστολή παθολογικής αγγειογένεσης
Ιντεγκρίνες	Υποδοχείς για μόρια της εξωκυττάριας ουσίας	Ιντερφερόνες α,β,γ	Αναστολή της μετακίνησης των ενδοθηλιακών κυττάρων
PA και MMPs	Μετακίνηση κυττάρων και διαμόρφωση εξωκυττάριας ουσίας και απελευθέρωση FGF-2 και VEGF	Προλακτίνη (M <sub>r</sub> 16K)	Αναστολή των bFGF/VEGF
PAI-1	Σταθεροποίηση γειτονικών αγγείων	Οστεοποντίνη	Εμπλοκή στην μεταγωγή σήματος από τις ιντεγκρίνες
Συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS)	Επαγωγή της αγγειογένεσης και της αγγειοδιαστολής		
VE-κατχερίνη και PECAM	Μόρια σύνδεσης των ενδοθηλιακών κυττάρων		

### 1.1.4.2. Στάδια της αγγειογενετικής εκβλάστησης

Η διαδικασία της νεοαγγείωσης αρχίζει με αγγειοδιαστολή που οφείλεται κυρίως στο μονοξείδιο του αζώτου (NO). Ο VEGF, ο οποίος επάγεται μεταγραφικά από το NO (Kimura et al., 2000), αλλά και από άλλα αγγειογενετικά ερεθίσματα όπως η υποξία, αυξάνει τη διαπερατότητα των αγγείων προκαλώντας αφενός μεν σχηματισμό ανοιγμάτων και κυστικών κενотоπιών στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αφ' ετέρου ανακατάταξη των κυτταρικών μορίων συγκόλλησης όπως το PECAM-1 και η αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη (VE-cadherin), μέσω ενεργοποίησης μια σειράς κινασών (Eliceiri et al., 1999; Gale and Yancopoulos, 1999a).

Στη συνέχεια ακολουθεί εξαγγείωση πρωτεϊνών του πλάσματος, οι οποίες παρέχουν μια προσωρινή οδό για τα προς μετανάστευση κύτταρα. Αν όμως αυτή η διαρροή είναι εκτεταμένη, μπορεί να έχει δραματικά αποτελέσματα όπως ενδοκρανιακή υπέρταση, μετάσταση, κυκλοφορική ανεπάρκεια ή τύφλωση. Γι' αυτό το λόγο η αγγειακή διαπερατότητα πρέπει να είναι αυστηρά ελεγχόμενη. Η αγγειοποιητίνη 1 (Ang1), το πρόσδεμα για τον ενδοθηλιακό υποδοχέα Tie2, είναι ένας ένδογενής παράγοντας που αναστέλλει την διαπερατότητα των αγγείων και έτσι παρέχει προστασία από μια εκτεταμένη εξαγγείωση του πλάσματος (Thurston et al., 2000). Όταν η Ang1 χορηγείται σε ώριμα αγγεία τα προστατεύει από την εξαγγείωση του πλάσματος, χωρίς να επηρεάζει τη μορφολογία τους.

Προκειμένου τα ενδοθηλιακά κύτταρα να ενεργοποιηθούν από τους αγγειογενετικούς παράγοντες και να μεταναστεύσουν, χρειάζεται να χαλαρώσουν οι κύτταρο-κυτταρικές συνδέσεις και να μειωθεί η περιαγγειακή υποστήριξη, δηλαδή το ώριμο αγγείο να αποσταθεροποιηθεί. Η Ang-2 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία όπως έχει αναφερθεί παραπάνω.

Η διάσπαση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυττάριας ουσίας γίνεται με μια σειρά πρωτεασών και όχι μόνο παρέχει χώρο στα ενδοθηλιακά κύτταρα για να μεταναστεύσουν, αλλά και ελευθερώνει αυξητικούς παράγοντες όπως ο FGF-2, ο VEGF, ο IGF-1, οι οποίοι φυσιολογικά βρίσκονται απομονωμένοι και ανενεργοί μέσα στην εξωκυττάρια ουσία. Επιπλέον, μπορούν να εκτεθούν κρυφές θέσεις συγκόλλησης για τα προς μετανάστευση κύτταρα που πριν καλυπτόταν από μη διασπασμένα συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας. Πάνω από 20 μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) έχουν περιγραφεί, οι οποίες παίζουν κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση (Nelson et al., 2000), ενώ φυσικοί αναστολείς τους περιλαμβάνουν τους ιστικά εντοπιζόμενους αναστολείς των



μεταλλοπρωτεΐναισών (TIMPs) (Brew et al., 2000). Μια λεπτή ισορροπία ανάμεσα στις μεταλλοπρωτεΐνάσες και τους αναστολείς τους είναι σημαντική. Έτσι, εκτεταμένη πρωτεόλυση της πλασμίνης μπορεί να αναστείλει την καρκινική και φλεγμονώδη αγγειογένεση (Bajou et al., 1998).

Καθώς οι φυσικοί φραγμοί μειώνονται, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν στον εξωκυττάριο χώρο, όπου αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Σε αυτό το στάδιο η συνδυαστική δράση παραγόντων όπως ο VEGF, ο FGF-2, οι αγγειοποιητίνες και οι υποδοχείς τους είναι καθοριστική, παρ' όλο που και άλλα μόρια μπορεί να ενέχονται σε αυτή τη διαδικασία (βλέπε κεφάλαιο 1.1.4.1).

Ο VEGF-A, ο PlGF, ο VEGF-B, ο VEGF-C, ο VEGF-D και οι υποδοχείς τους έχουν ειδικές δράσεις που περιλαμβάνουν επαγωγή του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της διάσπασης της εξωκυττάριας ουσίας.

#### 1.1.4.3. Μορφοποίηση, οργάνωση και σταθεροποίηση των αγγείων

Προκειμένου να μορφοποιηθεί η αγγειακή εκβλάστηση σε αγγείο θα πρέπει να αυλοποιηθεί και στη συνέχεια να σταθεροποιηθεί, να οργανωθεί και να ωριμάσει, ώστε να ανταποκριθεί στις τοπικές ανάγκες.

Το ανώριμο αγγείο έχει αρχικά τη μορφή συμπαγών κορμών που ακολούθως αυλοποιούνται. Όταν αυτή η διαδικασία δεν πραγματοποιείται σωστά, τα αγγεία είναι δομικά και λειτουργικά ανώμαλα. Έτσι τα αγγεία των όγκων είναι ανώμαλα διασταλμένα, και έχουν πολλές διακλαδώσεις και βραχυκυκλώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια ανισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF και μορίων όπως οι αγγειοποιητίνες. Ως αποτέλεσμα η αιματική κυκλοφορία σε αυτά τα αγγεία είναι χαοτική (Baish and Jain, 2000).

Η διάμετρος του αυλού ρυθμίζεται αυστηρά από διάφορους παράγοντες. Ενώ λοιπόν ο VEGF121, ο VEGF165 και οι υποδοχείς τους αυξάνουν το σχηματισμό αυλού, ο VEGF189 μειώνει τη διάμετρο του. Η Ang1 σε συνδυασμό με το VEGF αυξάνει τη διάμετρο του αυλού (Suri et al., 1998), ενώ στο σχηματισμό του ενέχονται και διάφορες ιντεγκρίνες ( $\alpha_5\beta_1$  και  $\alpha_v\beta_3$ ) (Bayless et al., 2000). Η εκτεταμένη επίσης πρωτεόλυση μπορεί να δημιουργήσει αγγειακές κύστες και να εμποδίσει τη δημιουργία αυλού. Τέλος, υπάρχουν και αρκετοί αναστολείς σχηματισμού του όπως η θρομβοσποντίνη και ένα πρόσφατα αναγνωρισμένο γονίδιο tubedown (tbdn-1), το οποίο έχει ομολογία με τις ακετυλοτρανσφεράσες (Gendron et al., 2000).

Ουσιαστικό ρόλο προκειμένου να πραγματοποιηθεί η λειτουργική ωρίμανση του αγγείου διαδραματίζει η προσέλκυση και διαφοροποίηση των περιενδοθηλιακών κυττάρων στο τοίχωμα του (η οποία πραγματοποιείται με μηχανισμούς ανάλογους με συτούς που αναφέρονται στο κεφάλαιο 1.1.3).

Με το σχηματισμό των νέων αγγείων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα γίνονται αξιοσημείωτα ανθεκτικά σε εξωγενείς παράγοντες με επιβίωση που αντιστοιχεί σε χρόνια. Μειωμένη επιβίωση του ενδοθηλίου ή απόπτωση του προκαλεί υποστροφή των αγγείων στο έμβρυο (Carmeliet, 1999a), η οποία είναι φυσιολογική στον αμφιβληστροειδή μετά τη γέννηση και στην ωσθήκη κατά το γενετήσιο κύκλο. Ο αριθμός των παραγόντων που αναγνωρίστηκαν ότι ρυθμίζουν την ενδοθηλιακή απόπτωση είναι εκτενής και ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης, τη θέση, τη λειτουργία, τον τύπο του αγγείου καθώς και τα γύρω φυσιολογικά ή παθολογικά ερεθίσματα (Kockx and Knaapen, 2000; Stefanec, 2000).

Η οργάνωση του αγγειακού δικτύου σε τρεις διαστάσεις έχει απασχολήσει τους επιστήμονες από πολύ παλιά. Αρκετοί αγγειογενετικοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί ότι επηρεάζουν τη διαδικασία της διακλάδωσης, αλλά οι γνώσεις σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους πραγματοποιείται, είναι ελλιπείς (Carmeliet, 2000).

Ο VEGF φαίνεται να συμμετέχει στην πολυπλοκότητα του αγγειακού δικτύου με το να ενεργοποιεί τη δημιουργία αγγειακών εκβλαστήσεων (Pettersson et al., 2000). Έμβρυα που είναι ετερόζυγα στο VEGF έχουν λιγότερες εκβλαστήσεις (Carmeliet, 2000; Ferrara et al., 1996). Επιπλέον, ποντίκια, τα οποία εκφράζουν μόνο το VEGF120, έχουν ελαττωμένη διακλάδωση των μυοκαρδιακών αγγείων (Carmeliet et al., 1999). Η έκφραση του PDGF-BB, ο οποίος είναι γνωστό ότι επηρεάζει τη διακλάδωση των αεραγωγών, είναι μειωμένος σε αυτά τα ζώα. Είναι όμως πιθανό ο VEGF να λειτουργεί ο ίδιος ως παράγοντας διακλάδωσης με το να επιδρά απευθείας στα ενδοθηλιακά ή και στα λεία μυϊκά κύτταρα.

Η Ang1 και ο υποδοχέας Tie2 επάγει τη δημιουργία αγγειογενετικών εκβλαστήσεων (Gale and Yancopoulos, 1999b). Απενεργοποίηση του γονιδίου της Ang1 και του Tie2 είχε ως αποτέλεσμα διασταλμένα αγγεία τριχοειδικής μορφής με ομοιόμορφο μέγεθος, τα οποία αποτυγχάνουν να οργανώσουν ώριμο και πολύπλοκο δίκτυο από μεγάλα αγγεία που διακλαδίζονται σε μικρότερους κλάδους.

Η ρενίνη είναι ένας παράγοντας διακλάδωσης για τις νεφρικές αρτηρίες (Gomez and Palazzo, 1998), ενώ ο FGF-1 είναι ένας παράγοντας διακλάδωσης για τις μυοκαρδιακές αρτηρίες (Fernandez et al., 2000), γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με το ρόλο των FGF-σχετιζόμενων σημάτων στη διακλάδωση των αεραγωγών. Επίσης, η μεταγωγή του

σήματος από μόρια όπως τα *Notch*, *Delta* και *Jagged*, τα οποία φαίνεται να συμμετέχουν στη διακλάδωση των αεραγωγών, τώρα αρχίζουν να σχετίζονται με την αγγειογένεση (Krebs et al., 2000; Xue et al., 1999).

Αρκετοί άλλοι παράγοντες φαίνεται επίσης να ενέχονται με διαφορετικούς ρόλους στη διαμόρφωση των αγγείων και περιλαμβάνουν τους VEGFR3, Tie1, tal-1, Ets family, GTP-binding factors, VCAM-1, α<sub>4</sub> ιντεγκρίνη και φμπρονεκτίνη (Carmeliet and Collen, 2000).

Η ικανοποίηση τέλος των τοπικών φυσιολογικών αναγκών είναι ουσιαστική παράμετρος στην ανάπτυξη των νέων αγγείων. Γι αυτό το λόγο τα ενδοθηλιακά κύτταρα πρέπει να έχουν ειδικά χαρακτηριστικά, ώστε να ανταποκρίνονται στις εκάστοτε απαιτήσεις. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού απαιτεί συνδέσεις μεταξύ αστρογλιακών κυττάρων τα οποία εκφράζουν gFAP, περικυττάρων και επαρκή επίπεδα αγγειοτενσινογόνου (Lindahl et al., 1998).

Οι σφικτές συνδέσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνουν αρκετές μεμβρανικές και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες από τις οικογένειες των καντχερινών, οκλουντίνων (occludins), κλαουντίνων (claudins) (Rubin and Staddon, 1999; Tsukita and Furuse, 1999). Η κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων με το που έρχονται σε επαφή μεταξύ τους, υφίσταται δομικές και λειτουργικές τροποποιήσεις, οι οποίες είναι κρίσιμες για τη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας. Άλλες πρωτεΐνες όπως οι 7H6, cingulin και jam παίζουν ρόλο στη διαμετανάστευση (transmigration) των μονοκυττάρων και τη ρύθμιση της διαπερατότητας (Tsukita and Furuse, 1999).

Σε αντίθεση τα ενδοθηλιακά κύτταρα των ενδοκρινών αδένων δεν έχουν σφικτές συνδέσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις το ενδοθήλιο είναι ως επί το πλείστον ασυνεχές επιτρέποντας τη μεταφορά μεγάλων όγκων μορίων και ιόντων. Συνολικά, οι παράγοντες που καθορίζουν τις ιδιότητες του ενδοθηλίου είναι άγνωστοι. Τα τελευταία χρόνια όμως έχει δοθεί έμφαση στην παρακρινική σχέση μεταξύ των κυττάρων του αγγείων και των ειδικών για κάθε ιστό κυττάρων στην ανάπτυξη των ιδιοτήτων που πρέπει να διαθέτει το αγγείο προκειμένου να ανταποκριθεί στις τοπικές ανάγκες (Risau, 1997; Risau and Flamme, 1995). Επίσης ο VEGF φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο.

## 1.2 Αγγειογένεση και καρκίνος

### 1.2.1 Γενικά

Η αγγειογένεση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία. Έτσι στον ενήλικα οργανισμό βρίσκεται υπό συνεχή αναστολή, με εξαίρεση τις καταστάσεις επανόρθωσης τραυμάτων και τις κυκλικές αλλαγές του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος. Η απώλεια μηχανισμών ρύθμισης της αγγειογένεσης προκαλεί την δημιουργία παθολογικών καταστάσεων, όπου η ανεξέλεγκτη παραγωγή νέων τριχοειδών οδηγεί στην καταστροφή της αρχιτεκτονικής και της λειτουργίας των φυσιολογικών ιστών. Είναι γνωστό εδώ και πολλά χρόνια ότι η ανάπτυξη των όγκων εξαρτάται από την δημιουργία νέων τριχοειδών. Οι περισσότεροι όγκοι προέρχονται από μικρές μη αγγειωμένες μάζες που στην συνέχεια επάγουν την ανάπτυξη και τον σχηματισμό νέων αγγείων όταν η διάμετρος του όγκου ξεπεράσει το μέγεθος των  $2 \text{ mm}^3$ . Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι όγκοι δεν προέρχονται μόνο από μη αγγειωμένες μάζες. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται την ύπαρξη ήδη προϋπαρχόντων αγγείων (co-option) για να ξεκινήσουν την δημιουργία ενός καλά αγγειωμένου όγκου (Holash et al., 1999b). Η αμυντική ανταπόκριση των αρχικών αγγείων σε αυτή την διαδικασία είναι η υποστροφή (regression) των αγγείων με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός μη αγγειωμένου όγκου. Οι όγκοι που θα καταφέρουν να αναπτυχθούν είναι αυτοί που θα έχουν ξεπεράσει την διαδικασία υποστροφής των αγγείων επάγοντας εκ νέου την αγγειογένεση. Η επαγωγή της Ang2 και του παράγοντα VEGF συνδέεται άμεσα με αυτές τις διαδικασίες (Holash et al., 1999a). Έτσι, αμέσως μετά την αγγείωση του όγκου με συγχρησιμοποιούμενα αγγεία (co-opted), τα αγγεία αυτά αρχίζουν να εκφράζουν υψηλά επίπεδα Ang2 (Holash et al., 1999b; Zagzag et al., 1999). Επειδή η Ang2 αποσταθεροποιεί τα αγγεία (βλέπε παραπάνω), τα συγχρησιμοποιούμενα αυτά αγγεία γίνονται αποπτωτικά αμέσως μετά την έκφραση της Ang2. Η υποχώρηση αυτή των αγγείων έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη υποξίας στον όγκο, γεγονός το οποίο επάγει τον VEGF. Ο VEGF επάγει την αγγειογένεση από αγγεία της περιφέρειας του όγκου επιτρέποντας την επιβίωση και περαιτέρω ανάπτυξή του, ενώ το κέντρο του όγκου παραμένει χωρίς αγγεία και μπορεί να νεκρωθεί.

Είναι κοινά αποδεκτό σήμερα ότι η ασυντόνιστη αγγειογένεση είναι αποτέλεσμα της διαταραχής της ρύθμισης του συντονισμού της παραγωγής διεγερτών και αναστολέων της αγγειογένεσης. Έτσι, ο “αγγειογενετικός διακόπτης” είναι “κλειστός” όταν τα προαγγειογενετικά μόρια είναι σε ισορροπία με τα αντιαγγειογενετικά, και είναι “ανοικτός” όταν η ισορροπία ευνοεί την αγγειογένεση. Πολλά είναι τα σήματα τα οποία

μπορούν να ανατρέψουν αυτήν την ισορροπία όπως το μεταβολικό στρες, η έλλειψη οξυγόνου και οι γενετικές αλλαγές. Ο τρόπος με τον οποίο η αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών και γενετικών μηχανισμών επηρεάζει την αγγειογένεση και την ανάπτυξη των όγκων είναι εξαιρετικά πολύπλοκος και η διερεύνησή του αποτελεί μια μεγάλη πρόκληση για την ανάπτυξη αποτελεσματικών θεραπειών.

### 1.2.2 Υποξία και νεοπλασματική αγγειογένεση

Όταν η κυτταρική μάζα αυξάνει είτε από υπερπλασία είτε από υπερτροφία, το τοπικό μικροπεριβάλλον αλλάζει με ποικίλους τρόπους. Ένας από αυτούς είναι η αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου. Η μεταφορά του οξυγόνου μειώνεται σαν αποτέλεσμα της αύξησης των αποστάσεων διάχυσης μεταξύ των τριχοειδών και του κέντρου απ' όπου αυξάνεται η κυτταρική μάζα. Το φαινόμενο αυτό της έλλειψης οξυγόνου ονομάζεται υποξία και όταν γίνεται αντιληπτό από τα κύτταρα ενεργοποιούνται διάφοροι μοριακοί μηχανισμοί για την καταπολέμηση του προβλήματος. Ο πρώτος συνδετικός κρίκος μεταξύ επιπέδων οξυγόνου και αγγειογένεσης αποδείχτηκε με την ανακάλυψη ότι η έκφραση του αγγειογενετικού παράγοντα VEGF αυξάνεται από την υποξία (Shweiki et al., 1992). Ο κυριότερος μεσολαβητής για την επαγωγή μεταγωγής σήματος από την υποξία είναι ο επαγόμενος παράγοντας υποξίας HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor) (Semenza, 1998). Ο HIF-1 συνδέεται σε συγκεκριμένες περιοχές ανταπόκρισης, HRE (Hypoxia Response Element) στους υποκινητές ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων που ανταποκρίνονται στην υποξία αυξάνοντας την έκφρασή τους. Εκτός από την παρουσία της περιοχής HRE στον υποκινητή του γονιδίου του VEGF, οι περιοχές HREs έχουν βρεθεί και στους υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων VEGFR-1 και Tie-2 (Levy et al., 1995; Liu et al., 1995). Ο ρόλος του HIF-1 στην αγγειογένεση, αν και δεν είναι πλήρως κατανοητός, φαίνεται να είναι αρκετά σημαντικός αφού μη λειτουργικές μεταλλάξεις στην υπομονάδα α του HIF-1 έχουν σαν αποτέλεσμα την θνησιμότητα των εμβρύων (Iyer et al., 1998; Ryan et al., 1998). Παρ' όλο τον σχηματισμό μεγάλων αγγείων, υπήρξαν πολλές ανωμαλίες στον σχηματισμό τριχοειδών ενώ η αγγείωση στο κεφάλι ήταν σχεδόν ολοκληρωτικά απύσα.

Επίσης και άλλα μονοπάτια μεταγωγής σήματος εμπλέκονται στις ανταποκρίσεις των κυττάρων στο φαινόμενο της υποξίας, τα οποία συμβάλλουν στη ρύθμιση της αγγειογένεσης ανάλογα με τα επίπεδα οξυγόνου στο γύρω περιβάλλον. Η υποξία έχει συνδεθεί με την συσσώρευση των πρωτο-ογκογονιδίων fos και jun στον πυρήνα. Οι επαγόμενες από το στρες κινάσες SAPK και JNK ενεργοποιούν την έκφραση του γονιδίου c-jun, ενώ οι ίδιες επάγονται από την υποξία.

### 1.2.3 Γενετικές αλλαγές του καρκίνου και αγγειογένεση

Είναι γνωστό ότι η ογκογένεση είναι μια διαδικασία με πολλά στάδια στην οποία συσσωρεύονται πολλές γενετικές αλλαγές. Σχεδόν όλοι οι τύποι όγκων παρουσιάζουν μια πολυπλοκότητα και μια πληθώρα αλλαγών στην δράση γονιδίων. Έτσι, η ενεργοποίηση ογκογονιδίων ή η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανεξέλεχτη αύξηση των όγκων. Μεταλλάξεις σε ογκογονίδια καθιστούν δυνατή την επαγωγή διεγερτών της αγγειογένεσης ή την αναστολή αντιαγγειογενετικών πρωτεϊνών από τα καρκινικά κύτταρα (Rak et al., 2000) (Πίνακας 3). Ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *ras* (*Kras* και *Hras*) για παράδειγμα, έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα VEGF και αναστολή της έκφρασης του αναστολέα της αγγειογένεσης θρομβοσποντίνης (TSP1) (Udagawa et al., 2002). Παρόμοια, μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επάγουν την αγγειογένεση. Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 αναστέλλει την αγγειογένεση στους όγκους αφού επάγει τον αναστολέα της αγγειογένεσης TSP1 και την αποικοδόμηση του επαγόμενου παράγοντα της υποξίας HIF, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει την μεταγραφή του παράγοντα VEGF και της πρωτεΐνης που συνδέεται με τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Έτσι, η απουσία ή μετάλλαξη του γονιδίου του p53 διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ αναστολέων και διεγερτών της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα την αυξημένη αγγείωση των όγκων.

Πίνακας 3: Ογκογονίδια που επηρεάζουν την αγγειογένεση

Ογκογονίδιο	Προ-αγγειογενετική δράση	Αναφορά
Kras, Hras	Επαγωγή VEGF, αναστολή TSP-1	(Rak et al., 1995a; Rak et al., 1995b)
SRC	Επαγωγή VEGF, αναστολή TSP-1	(Mukhopadhyay et al., 1995a; Mukhopadhyay et al., 1995b; Slack and Bornstein, 1994)
c-MYB	Αναστολή TSP-2	(Bein et al., 1998)
n-MYC	Αγγειογενετικές ιδιότητες στο νευροβλάστωμα	(Fotsis et al., 1999; Meitar et al., 1996)
c-MYC	Αγγειογενετικές ιδιότητες στην επιδερμίδα	(Pelengaris et al., 1999)
ERBB2	Επαγωγή VEGF	(Rak et al., 1995a; Vilorio-Petit et al., 2001)
EGFR	Επαγωγή VEGF, FGF-2 και IL-8	(Perrotte et al., 1999)
FOS	Έκφραση VEGF	(Saez et al., 1995)
trkB	Αναστολή VEGF	(McGregor et al., 1999)
HPV-16	Έκκριση VEGF και IFN- $\alpha$	(Le Buanec et al., 1999; Lopez-Ocejo et al., 2000)
BCL2	Επαγωγή VEGF	(Fernandez et al., 2001)

#### 1.2.4 Ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων και της αγγειοδιαφοροποιητικής απομίμησης

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι κυκλοφορούντα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Endothelial Progenitor Cells, EPCs) προσελκύονται και ενσωματώνονται σε σημεία όπου διαδραματίζεται ενεργή νεοαγγείωση, όπως για παράδειγμα στις ισχαιμίες του μυοκαρδίου (Asahara et al., 1999), αλλά και στον καρκίνο (Rafii et al., 2002). Επιπρόσθετα, τα EPCs έχειδειχτεί ότι εμπλέκονται στην διατήρηση της αγγειογένεσης αντικαθιστώντας ένα ποσοστό ενδοθηλιακών κυττάρων που έχει χαθεί (Peichev et al., 2000). Τα EPCs αρχικά χαρακτηρίστηκαν και απομονώθηκαν με βάση την έκφραση των αντιγόνων VEGFR-2 και CD34 που είναι και κλασικοί δείκτες των αγγειοβλαστών (Asahara et al., 1997). Ο υψηλός ρυθμός πολλαπλασιασμού που διακρίνει τα EPC είναι ένα από τα πιο έντονα χαρακτηριστικά διαχωρισμού μεταξύ των EPC και των ενδοθηλιακών κυττάρων που βρίσκονται στα αγγεία (Lin et al., 2000). Η πλειοψηφία των EPC βρίσκεται στον μυελό των οστών σε στενή σύνδεση με τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (haematopoietic stem cells, HSCs) και το στρώμα του μυελού των οστών. Πολλές πρόσφατες παρατηρήσεις δείχνουν ότι τα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα αλλά και τα κύτταρα του στρώματος μπορεί να συμβάλλουν στον πολλαπλασιασμό και στην μετακίνηση των EPC μέσα από το φράγμα μυελού των οστών και αίματος. Σημαντικό ρόλο στην κινητοποίηση των EPC (τα οποία εκφράζουν το VEGFR-2) και των HSC (τα οποία εκφράζουν το VEGFR-1) παίζει η παραγωγή VEGF από τα κύτταρα των όγκων. Έτσι, αμφότερα προσελκύονται στους όγκους όπου αλληλοϋποστηρίζονται αναφορικά με τη διαφοροποίησή τους σε ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα/μονοκύτταρα, αντίστοιχα (Rafii et al., 2002). Έτσι, ουσιαστικά τα νέα αγγεία των όγκων προέρχονται είτε από προϋπάρχοντα αγγεία διαμέσου αγγειογένεση είτε από προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα με τη διαδικασία της αγγειακής διαφοροποίησης.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα νέα αγγεία των όγκων μπορούν να δημιουργηθούν από τα ίδια τα καρκινικά κύτταρα με τη διαδικασία της αγγειοδιαφοροποιητικής απομίμησης (vasculogenic mimicry) (Maniatis et al., 1999). Με τον όρο αυτό περιγράφηκε αρχικά η ικανότητα των επιθετικών κυττάρων μελανώματος να σχηματίζουν δίκτυα σεξωκυττάρια ουσία σε 3D καλλιέργειες. Τα δίκτυα αυτά είναι παρόμοια με τα αγγειακά δίκτυα κατά την διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, και παρατηρούνται σε επιθετικούς όγκους ασθενών με καρκίνο (Makitie et al., 1999; Maniatis et al., 1999; Seflor et al., 2002). Πολλά από τα γονίδια, των οποίων η έκφραση αυξάνεται

από επιθετικά καρκινικά κύτταρα, είναι τα ίδια με αυτά που εμπλέκονται στην διαδικασία της αγγειογένεσης και της αγγειακής διαφοροποίησης. Κάποια από αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν την Ε-καντχερίνη, την ΕΡΗΑ2 (erythropoietin-producing hepatocellular carcinoma A2) και την  $\gamma_2$ -αλυσίδα της λαμίνης 5 (LAMC2). Τα μόρια αυτά μαζί με τις πρωτεΐνες με τις οποίες συνδέονται είναι μερικοί από τους παράγοντες που χρειάζονται για τη διατήρηση των αγγείων αλλά και για την αγγειοδιαφοροποιητική απομίμηση στα μελανώματα. Η Ε-καντχερίνη είναι μόριο προσκόλλησης και προάγει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, ενώ η ΕΡΗΑ2 είναι ένας υποδοχέας με ενεργότητα τυροσινικής κινάσης που έχει συνδεθεί με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Οι λαμίνες είναι σημαντικές πρωτεΐνες της βασικής μεμβράνης και εμπλέκονται στην ρύθμιση της κυτταρικής προσκόλλησης, της μετανάστευσης και της αγγειογένεσης. Έτσι μόρια, που εμπλέκονται στην φυσιολογική ανάπτυξη, επάγονται και κατά την διαδικασία της αγγειοδιαφοροποιητικής απομίμησης, μια διαδικασία που φαίνεται να μιμείται το πρόγραμμα της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

#### 1.2.5 Διαγνωστική και προγνωστική αξία της αγγειογένεσης

Η νεοαγγείωση ενός όγκου είναι απόλυτα απαραίτητη διαδικασία για την πρόοδο ενός νεοπλάσματος από έναν μικρό και εντοπισμένο όγκο σε έναν μεγαλύτερο με την ικανότητα μετάστασης. Έτσι, η ποσοτικοποίηση της αγγείωσης των όγκων έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να είναι ισχυρός δείκτης πρόγνωσης. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ του βαθμού πυκνότητας των αγγείων (microvascular density, MVD) σε έναν αρχικό όγκο και της πρόγνωσης του όγκου αυτού. Έτσι, όσο μεγαλύτερη είναι η αγγείωση σε έναν όγκο τόσο χειρότερη είναι η πρόγνωση (Weidner et al., 1991). Επιπλέον, η διαπίστωση αυτή συσχετίζει άμεσα την αγγειογένεση με την διαδικασία της μετάστασης των όγκων. Ο συσχετισμός αυτός δείχθηκε αρχικά για τον καρκίνο του μαστού αλλά και αργότερα και για πολλούς διαφορετικούς όγκους όπως του πνεύμονα του προστάτη και άλλους. Ο βαθμός αγγείωσης των όγκων υπολογίζεται με χρώση (staining) των τομών με ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν αντιγόνα που εκφράζονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα όπως είναι ο παράγοντας VIII (von Willibrand factor), CD-31 και CD-34 και στην συνέχεια μετρώντας τα αγγεία σε συγκεκριμένες περιοχές όπου παρατηρείται αυξημένη αγγείωση (vascular 'hotspots') (Weidner et al., 1991). Παρ'όλη την προγνωστική αξία της MVD, υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι η MVD δεν σχετίζεται πάντα με τον κίνδυνο μετάστασης (Hlatky et al., 2002). Μεθοδολογίες που εξετάζουν την έκφραση ή την συγκέντρωση συγκεκριμένων αγγειογενετικών παραγόντων



ανεπιθύμητες ανοσολογικές αντιδράσεις των ασθενών σε κλινικό επίπεδο (Holash et al., 2002).

Άλλες στρατηγικές που έχουν σαν στόχο την αύξηση αναστολέων, όπως είναι η TSP1, έχουν δείξει ελπιδοφόρες σε πολλά μοντέλα ζώων και κλινικές προσπάθειες είναι ήδη στο ξεκίνημά τους (Streit et al., 1999). Δύο άλλοι σημαντικοί αναστολείς της αγγειογένεσης η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη βρίσκονται ήδη στις πρώτες φάσεις κλινικών δοκιμασιών (O'Reilly et al., 1997; O'Reilly et al., 1994).

Ο τρόπος χορήγησης των αγγειογενετικών παραγόντων μπορεί να είναι ο συμβατικός, αλλά επίσης στρατηγικές γονιδιακής θεραπείας έχουν ήδη αρχίσει να χρησιμοποιούνται σε πολλά μοντέλα *in vivo*. Η χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν τις περιοχές πρόσδεσης των υποδοχέων του παράγοντα VEGF, έχουν δείξει ενθαρυντικά αποτελέσματα σε μοντέλα όγκων *in vivo*, με αναστολή της ανάπτυξης ήδη προϋπάρχοντων όγκων μέχρι και 80% (Kuo et al., 2001). Αντίθετα, ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν τους αναστολείς αγγειοστατίνη και ενδοστατίνη δεν ήταν το ίδιο αποτελεσματικοί στις ίδιες μελέτες (Kuo et al., 2001). Συμπερασματικά, αν και η ύπαρξη πολλών θεραπευτικών προσεγγίσεων που στοχεύουν την αναστολή της αγγειογένεσης στους όγκους είναι ελπιδοφόρες, εντατικές κλινικές δοκιμασίες (clinical trials) είναι απαραίτητες για την αναγνώριση συγκεκριμένων στρατηγικών με υψηλή αποτελεσματικότητα.

### 1.3 Ακτιβίνη Α

#### 1.3.1 Η υπεροικογένεια του TGF-β

Ο παράγοντας TGF-β αποτελεί το πρότυπο ανάμεσα σε τουλάχιστον σαράντα μέλη της υπεροικογένειας TGF-β που μοιράζονται πολλές ομοιότητες στην δομή και την δράση τους. Τα μέλη της υπεροικογένειας TGF-β έχουν κυρίαρχο ρόλο σχεδόν σε όλες τις σημαντικές κυτταρικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένων της εμβρυϊκής ανάπτυξης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της μετακίνησης των κυττάρων και της απόπτωσης. Δύο υποοικογένειες έχουν οριστεί ανάλογα με τις ομοιότητες αλληλουχίας και των μηνυματοφόρων μονοπατιών που μπορεί να ενεργοποιούν η υποοικογένεια TGF-β/Ακτιβίνη/Nodal και η υποοικογένεια BMP (Bone Morphogenetic Protein)/GDF (Growth and Differentiation Factor)/MIS (Mullerian Inhibiting Substance). Τα μέλη της τελευταίας είναι γνωστά για τον σημαντικό ρόλο των καθοδηγητικών σημάτων κατά την διάρκεια της

στους όγκους έχουν επίσης αναπτυχθεί. Ανάμεσα σε αυτούς, ο παράγοντας VEGF είναι αυτός που έχει μελετηθεί εκτενώς αφού είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες διαφοροποίησης και ανάπτυξης του αγγειακού συστήματος. Σε πολλές πειραματικές δοκιμασίες, σε διάφορα καρκινώματα, η έκφραση του VEGF είναι αυξημένη (O'Brien and Harris, 1995), ενώ στον καρκίνου του μαστού θεωρείται ως καλός ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης (Folkman, 1995; Toi et al., 1994). Επίσης, οι όγκοι ασθενών με υψηλά επίπεδα VEGF είναι συνήθως εξαιρετικά επιθετικοί (Toi et al., 1994). Αυξημένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα του VEGF, VEGFR-2, έχουν επίσης συσχετιστεί με προχωρημένα στάδια του καρκίνου του εντέρου (Takahashi et al., 1995). Τα μέχρι σήμερα δεδομένα δείχνουν ότι ο παράγοντας VEGF είναι από τους πιο ιδανικούς προγνωστικούς δείκτες που μπορεί να αξιοποιηθεί και για την βιολογική δράση αντιαγγειογενετικών ουσιών σε προκλινικές μελέτες.

### 1.2.6 Θεραπευτική αξία της αγγειογένεσης

Η διαπίστωση ότι στοχεύοντας και αναστέλλοντας την διαδικασία της αγγειογένεσης μπορεί να αναχαιτιστεί η αύξηση και μετάσταση του όγκου οδήγησε σε πολλές προσπάθειες ανάπτυξης αναστολέων της αγγειογένεσης για θεραπευτική χρήση. Πολλές από αυτές στοχεύουν την αναστολή του VEGF λόγω της σημαντικότητας του τελευταίου στη νεοπλασματική αγγειογένεση. Έτσι, στρατηγικές που χρησιμοποιούν αντινοσηματικά ολιγοκουκλεοτίδια (antisense oligonucleotides) ειδικά για τον VEGF ή ριβοζύμα (ribozymes) για την στόχευση του mRNA του υποδοχέα VEGFR-1 έχουν αναπτυχθεί και έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε πολλά *in vivo* μοντέλα (Belletti et al., 1999; Parry et al., 1999; Shih and Claffey, 1999). Επιπλέον, μονοκλωνικά αντισώματα ενάντια στον VEGF αλλά και στον υποδοχέα VEGFR-1 έχουν αναπτυχθεί και έχουν δείξει αποτελεσματικά σε πολλούς ανθρώπινους όγκους αλλά και σε μοντέλα ξеноμοσχευμάτων (Kim et al., 1993; Prewett et al., 1999). Εναλλακτικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν ανασυνδυασμένο διαλυτό υποδοχέα VEGFR-1 για την δέσμευση του παράγοντα VEGF έχουν επίσης δοκιμαστεί. Διαλυτές μορφές του υποδοχέα VEGFR-1, που θεωρείται ο πιο ικανός δεσμευτής του παράγοντα VEGF, υστερούν σε επίπεδο φαρμακοκινητικής και φαίνεται να αλληλεπιδρούν μη ειδικά με την εξωκυττάρια ουσία (Gerber et al., 1999; Kuo et al., 2001). Η πρόσφατη κατασκευή του δεσμευτή VEGF-TrpR1R2 έχει ικανοποιητικό προφίλ φαρμακοκινητικής και ελάχιστες αλληλεπιδράσεις με την εξωκυττάρια ουσία, ενώ αποτελείται εξ ολοκλήρου από ανθρώπινες αλληλουχίες ελαττώνοντας στο ελάχιστο τις

εμβρυογένεσης αλλά και για την διατήρηση και επιδιόρθωση των οστών και άλλων ιστών στον ενήλικα. Τα μέλη της οικογένειας TGF-β/Ακτιβίνη/Nodal έχουν συμπληρωματική δράση σε αυτή των BMP/GDF/MIS. Οι διάφορες μορφές των TGF-β και ακτιβίνης είναι δομικά διαφορετικές από τις BMPs, και είναι γνωστές για τον σημαντικό ρόλο που παίζουν στα προχωρημένα στάδια της εμβρυογένεσης και στον ενήλικα οργανισμό.

### 1.3.2 Δομικά χαρακτηριστικά της ακτιβίνης

Η ακτιβίνη είναι ένα διμερές πολυπεπτίδιο που σταθεροποιείται από έναν δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στο ογδοηκοστό κατάλοιπο της ώριμης μορφής του. Η ακτιβίνη Α ανήκει στην οικογένεια των ινχιμπινών/ακτιβινών, τα μέλη της οποίας προέρχονται από το διμερισμό δύο ανόμοιων υπομονάδων: της υπομονάδας α και της υπομονάδας β (Ling et al., 1986). Η υπομονάδα β έχει πολλές ισομορφές -β<sub>A</sub>, β<sub>B</sub>, β<sub>C</sub>, β<sub>D</sub> και β<sub>E</sub>- όπου η καθεμία εντοπίζεται σε διαφορετικό χρωμόσωμα με αποτέλεσμα η σύνθεση τους να είναι ανεξάρτητη (Ying, 1988). Οι ακτιβίνες Α, Β, ΑΒ είναι ομοδιμερή (β<sub>A</sub>-β<sub>A</sub>, β<sub>B</sub>-β<sub>B</sub>, και β<sub>A</sub>-β<sub>B</sub>) των πολυπεπτιδικών αλυσίδων β<sub>A</sub> και β<sub>B</sub>. Παράλληλα, οι αλυσίδες β<sub>A</sub> και β<sub>B</sub> μπορούν να ετεροδιμεριστούν με την αλυσίδα α δίνοντας έτσι την ινχιμπίνη Α (α-β<sub>A</sub>) και ινχιμπίνη Β (α-β<sub>B</sub>). Για τις τρεις νέες β υπομονάδες που έχουν αναφερθεί πρόσφατα, β<sub>C</sub>, β<sub>D</sub> και β<sub>E</sub>, δεν υπάρχουν αρκετές πληροφορίες για τις διμερείς πρωτεΐνες που σχηματίζουν. Οι ισομορφές β<sub>D</sub> και β<sub>E</sub> απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκες του βατράχου και ποντικού αντίστοιχα (Fang et al., 1997), ενώ η ισομορφή β<sub>C</sub> χαρακτηρίστηκε στο συκώτι (G et al., 1995). Όπως και πολλοί άλλοι παράγοντες ανάπτυξης και διαφοροποίησης η βιολογικά ενεργή ακτιβίνη είναι προϊόν μιας ανενεργής πρόδρομης μορφής της πρωτεΐνης. Η πρόδρομη μορφή της ακτιβίνης είναι ένα διμερές των 110 kDa, που περιέχει ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, μια γλυκοσυλιωμένη περιοχή και την ώριμη ενεργή περιοχή στο καρβοξυτελικό άκρο (Ying, 1988). Η ώριμη μορφή της ακτιβίνης δεν είναι γλυκοσυλιωμένη και ενδοκυτταρικές επεξεργασίες είναι απαραίτητες για την πλήρη βιολογική δράση της.

### 1.3.3 Βιολογικές δράσεις της Ακτιβίνης Α

Η ακτιβίνη απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1986 από ωθηλακικό υγρό με βάση την ικανότητά της να επάγει την απελευθέρωση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone, FSH) από κύτταρα υπόφυσης (Ling et al., 1986; Vale et al., 1986). Από τότε μέχρι σήμερα, έχει διαπιστωθεί από πολλές επιστημονικές μελέτες ότι οι ακτιβίνες δεν παράγονται μόνο στις γονάδες, αλλά και σε άλλους ιστούς, όπου μπορούν να

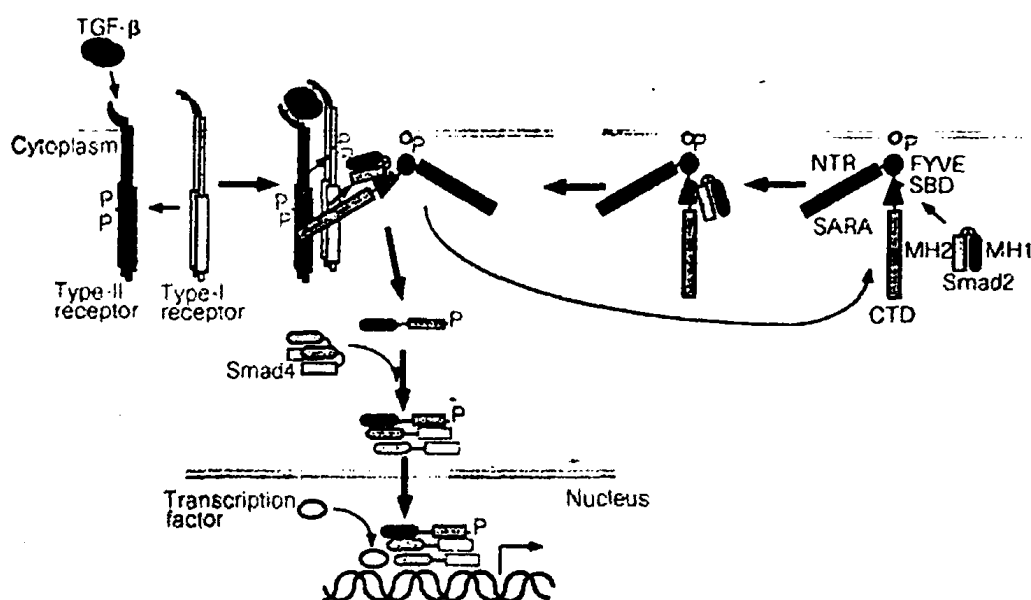
δρουν ως παρακρινείς και αυτοκρινείς παράγοντες για την ρύθμιση πολλών διαδικασιών. Η έκφραση του mRNA της ακτιβίνης σε ιστούς, όπως ο πλακούντας, η σπλήνα, η υπόφυση, ο μυελός των οστών και συγκεκριμένες περιοχές του εγκεφάλου, καθώς και οι ποικίλες βιολογικές δράσεις σε αυτούς τους ιστούς, υποδεικνύουν ότι η ακτιβίνη δρα ως αυξητικός παράγοντας και ως κυτταροκίνη (Kingsley, 1994). Η υπόφυση είναι από τα πιο γνωστά σημεία δράσης της ακτιβίνης A όπου επάγει την έκκριση της ορμόνης FSH (Miyake et al., 1993). Πράγματι, σε πρωτογενή κύτταρα υπόφυσης από επίμυες, η επεξεργασία με ακτιβίνη A αυξάνει τον αριθμό των κυττάρων που εκκρίνουν FSH, ενώ τα επίπεδα της ωχρινοποιητικής ορμόνης (luteinising hormone, LH) δεν επηρεάζονται (Katayama et al., 1990). Μια άλλη σημαντική δράση της ακτιβίνης είναι ότι παίζει τον ρόλο παράγοντα επιβίωσης στους νευρώνες (Schubert et al., 1990). Φαίνεται ότι η ακτιβίνη A ρυθμίζει την επιβίωση συγκεκριμένου πληθυσμού “τραυματισμένων” νευρικών κυττάρων (Wu et al., 1999), και η επαγωγή με ακτιβίνη A είναι απαραίτητη για την προστασία των νευρικών κυττάρων κατά εγκεφαλικών τραυματισμών (Tretter et al., 2000). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι επεξεργασία με ακτιβίνη A μπορεί να βοηθήσει στον εκφυλισμό των νευρώνων στην ασθένεια Huntington's (Hughes et al., 1999). Τέλος, εκτός από την ενδοκρινή της δράση στη υπόφυση, η ακτιβίνη ρυθμίζει και την δράση του υποθάλαμου και των ωοθηκών υποδεικνύοντας ότι η ακτιβίνη παίζει σημαντικό ρόλο στο αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας.

Από τις πιο σημαντικές λειτουργίες της ακτιβίνης κατά την διάρκεια της ανάπτυξης είναι η επαγωγή μεσοδέρματος σε έμβρυα *Xenopus laevis* (Thomsen et al., 1990). Έμβρυα ποντικών με γονιδιακή απάλειψη στο γονίδιο βA ή βB αναπτύσσονται κανονικά μέχρι την γέννηση τους (Matzuk et al., 1995a; Matzuk et al., 1995b; Vassalli et al., 1994). Ποντίκια που δεν εκφράζουν ακτιβίνη A παρουσιάζουν ανωμαλίες στα μουστάκια, στους κοπτήρες και στους ουρανίσκους και πεθαίνουν 24 ώρες μετά την γέννηση τους (Matzuk et al., 1995a; Matzuk et al., 1995b). Αντίθετα, ποντίκια στα οποία απουσιάζει η ακτιβίνη B επιβιώνουν κανονικά με κάποιες ανωμαλίες στην ανάπτυξη των βλεφαρίδων και καθυστερημένη τεκνοποιία (Vassalli et al., 1994). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει ότι, η ακτιβίνη A είναι απαραίτητη για την σωστή ανάπτυξη των ωοθηκών και των όρχεων.

### 1.3.4 Μεταγωγή σήματος

#### 1.3.4.1 Βασικός μηχανισμός

Λαμβάνοντας υπόψη την πληθώρα φυσιολογικών ανταποκρίσεων των μελών της υπερικογένειας του TGF- $\beta$  το βασικό σύστημα μεταγωγής σήματος αλλά και η ρύθμιση αυτού είναι σχετικά πολύπλοκη. Η βασική μηχανή του σηματοδοτικού μονοπατιού αποτελείται από δύο τύπους υποδοχέων, I και II, με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης και μια οικογένεια διαμεσολαβητών, Smad πρωτεΐνες, που μπορούν να μετακινηθούν στον πυρήνα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Γενική απεικόνιση της μεταγωγής σήματος από την οικογένεια TGF- $\beta$ /ακτιβίνη.

#### 1.3.4.2 Υποδοχείς

Οι υποδοχείς της ακτιβίνης είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου I και II με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης, οι οποίες ακολουθούν το πρότυπο της TGF- $\beta$  οικογένειας (Mathews and Vale, 1991). Υπάρχουν δύο επιμέρους υποδοχείς του τύπου II για την ακτιβίνη, ο ActRII και ο ActRIIB (Attisano et al., 1992; Mathews et al., 1992). Το εξωκυττάριο τμήμα των υποδοχέων τύπου II είναι πλούσιο σε κυστεΐνες, ενώ το ενδοκυττάριο τμήμα περιέχει την περιοχή με την δραστηριότητα κινάσης χαρακτηριστική των σερινών/θρεονινών κινασών. Σε αναλογία με τους τύπου II υποδοχείς, δύο μορφές τύπου I υποδοχέων έχουν αναφερθεί για την ακτιβίνη, οι οποίοι είναι γνωστοί ως ActRIIB

ή ALK-4 και ως ActRI ή ALK-2 (Attisano et al., 1992; Mathews et al., 1992; Tsuchida et al., 1993). Ο επικρατέστερος τύπου I υποδοχέας για την ακτιβίνη θεωρείται ο ALK-4. Ο ALK-2 αν και χαρακτηρίστηκε αρχικά ως τύπου I υποδοχέας της ακτιβίνης, μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι λειτουργεί ως υποδοχέας των πρωτεϊνών BMPs (Chen et al., 2000; Macias-Silva et al., 1998). Οι τύπου I υποδοχείς όπως και οι τύπου II έχουν ένα εξωκυττάριο τμήμα πλούσιο σε κυστεΐνες, ενώ σε αντίθεση με τους τύπου II, έχουν μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες (GS region) ανάμεσα στην διαμεμβρανική περιοχή και την περιοχή της κινάσης (Attisano et al., 1996). Η ακτιβίνη προσδέεται στους υποδοχείς τύπου II, οι οποίοι δεν μπορούν όμως να μεταγουν σήματα από αυτήν χωρίς την συνεργασία των τύπου I υποδοχέων (Laiho et al., 1991; Wrana et al., 1992). Έτσι, οι ακτιβίνες μεταδίδουν σήματα μέσω ετεροδιμερών συμπλόκων των υποδοχέων κινάσης τύπου II και τύπου I. Η πρόσδεση ακτιβίνης στον υποδοχέα τύπου II επάγει την φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα στην περιοχή GS από τον υποδοχέα τύπου II. Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας I στη συνέχεια μπορεί να φωσφορυλιώσει και ενεργοποιήσει άλλα μόρια που εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος από την ακτιβίνη.

#### 1.3.4.3 Διαμεσολαβητές

Τα γεγονότα που ακολουθούν την ενεργοποίηση του υποδοχέα τύπου I ήρθαν στο φως με την ανακάλυψη των Smad πρωτεϊνών ως μεσολαβητές σήματος της οικογένειας TGFβ (Raferty et al., 1995). Η ανακάλυψη της οικογένειας Smad στα σπονδυλωτά βασίστηκε στο ήδη αναγνωρισμένο γονίδιο της Δροσόφιλας Mad (*Mothers against decapentaplegic*) που χαρακτηρίστηκε ως απαραίτητο για την μεταγωγή του σήματος από την πρωτεΐνη Dpp (Decapentaplegic protein) (Sekelsky et al., 1995). Με βάση τη δομή και τη λειτουργία τους, οι Smad πρωτεΐνες διακρίνονται σε τρεις ομάδες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν εκείνες οι Smad που είναι άμεσα υποστρώματα για τους υποδοχείς της οικογένειας TGFβ (R-Smad). Η δεύτερη υποομάδα αποτελείται από πρωτεΐνες Smad που συνεργάζονται με τις ενεργοποιημένες από τους υποδοχείς Smad (Co-Smad), ενώ στην τρίτη κατηγορία ανήκουν οι Smad που αναστέλλουν την δράση των Smad και αναφέρονται ως αντί-Smads (I-Smad). Ανάμεσα στις Smad που ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς, οι Smad1, 5 και 8 είναι υπεύθυνες για την μετάδοση σημάτων που προέρχονται από τις BMP πρωτεΐνες (Bone Morphogenic Proteins) (Hoodless et al., 1996; Kretschmar et al., 1997), ενώ οι Smad2 και 3 μεταγουν σήματα προερχόμενα από την ακτιβίνη και τον παράγοντα TGF-β (Baker and Harland, 1996; Macias-Silva et al., 1996). Δομικά και λειτουργικά, οι Smad πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις διακριτές περιοχές: το

αμινοτελικό (MH1) και καρβοξυτελικό άκρο (MH2), τα οποία είναι καλά συντηρημένα, καθώς και μία ενδιάμεση περιοχή (Linker region), η οποία μπορεί να είναι ποικίλου μεγέθους και αλληλουχίας. Η μεταγωγή του σήματος από τις Smad πρωτεΐνες, οι οποίες ενεργοποιούνται από τους υποδοχείς, εξαρτάται από την συνεργασία της Smad4, το μοναδικό μέλος της δεύτερης κατηγορίας. Σχηματικά, η ροή πληροφορίας από την μεμβράνη ως τον πυρήνα έχει ως εξής: η σύνδεση συνδέτη-υποδοχέα τύπου II ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I, ο οποίος με τη σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί το C-τελικό άκρο των Smad πρωτεϊνών. Ακολουθεί αποσύνδεση των ενεργοποιημένων Smad από τον υποδοχέα που εν συνεχεία σχηματίζουν ενδοκυττάρια σύμπλοκα με την Smad4 (π.χ. Smad2/4, Smad3/4) και μετατοπίζονται στον πυρήνα, όπου και ασκούν τον μεταγραφικό τους ρόλο.

Δομική ανάλυση των R-Smad έδειξε ότι η θηλειά 3 (L3) και η α έλικα 1 (H1) στην περιοχή MH2 παίζουν καθοριστικό ρόλο στην σύνδεση των R-Smad με τους υποδοχείς τύπου I (Chen and Massague, 1999; Lo et al., 1998). Κρυσταλλική ανάλυση για την περιοχή MH2 της Smad2 έδειξε ότι υπάρχει μια θετικά φορτισμένη περιοχή που βρίσκεται δίπλα στην L3, η οποία παρατηρείται σε όλες τις R-Smad και στην Smad4 (Wu et al., 2000). Σε παρόμοιες μελέτες, η θηλειά 45 (L45) στην περιοχή κινάσης των υποδοχέων τύπου I προσδιορίζει την ειδικότητα σύνδεσης με τις R-Smads (Chen et al., 1998; Feng and Derynck, 1997). Έτσι, η σύνδεση υποδοχέα-Smad γίνεται μεταξύ της θηλειάς L3 στην Smad και της L45 στον υποδοχέα, ενώ η βασική περιοχή κοντά στην θηλειά L3 προάγει την σύνδεση με την πρόσδεσή της στην φωσφορυλιωμένη περιοχή GS του υποδοχέα (Wu et al., 2000).

Η σύνδεση μεταξύ υποδοχέων και R-Smad πρωτεϊνών είναι καθοριστικό βήμα για την έναρξη του ενδοκυττάριου σηματοδοτικού μονοπατιού. Για τον λόγο αυτό η αναγνώριση των R-Smad από τους υποδοχείς διευκολύνεται από την παρουσία άλλων βοηθητικών πρωτεϊνών. Η ανακάλυψη της πρωτεΐνης SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) δείχνει την πολυπλοκότητα της μεταγωγής του σήματος από την υπεροικογένεια TGFβ. Η SARA ανακαλύφθηκε για την ικανότητά της να συνδέεται με τις μη φωσφορυλιωμένες μορφές των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών (Tsukazaki et al., 1998) και περιέχει μία περιοχή από οκτώ συντηρημένες κυστεΐνες οι οποίες περιβάλλουν δύο ιόντα ψευδαργύρου (Stenmark et al., 1996). Η περιοχή αυτή ονομάζεται περιοχή δακτύλου FYVE (FYVE finger domain) και βρέθηκε ότι δένεται ειδικά σε PI(3)P (Gaullier et al., 1998). Η SARA εκτός από την περιοχή FYVE περιέχει και μια ειδική περιοχή SBD (Smad Binding Domain), η οποία συνδέεται με τις μη φωσφορυλιωμένες Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες και

όχι με άλλα μέλη της οικογενείας των Smad (Tsukazaki et al., 1998). Η περιοχή SBD βρίσκεται καθοδικά της περιοχής FYVE και προς το καρβοξυτελικό άκρο της SARA και συνδέεται με το καρβοξυτελικό άκρο (MH2 domain) των πρωτεϊνών Smad2 ή Smad3. Η σύνδεση αυτή οφείλεται σε ένα μοτίβο πλούσιο σε προλίνες στην περιοχή SBD, το οποίο συνδέεται με την περιοχή MH2 των Smad μέσω της αντίστοιχης πλούσιας σε προλίνες περιοχής (Wu et al., 2000). Επιπλέον, το κατάλοιπο ασπαραγίνης (N381) στην Smad2 (συντηρημένο και στην Smad3) παίζει καθοριστικό ρόλο στην σύνδεση με την SARA (Wu et al., 2000). Το σύμπλοκο SARA-Smad στην συνέχεια συνδέεται με τον υποδοχέα τύπου I μέσω του αμινοτελικού άκρου της SARA (Tsukazaki et al., 1998). Ο ρόλος λοιπόν της SARA είναι να προσελκύσει τις Smad πρωτεΐνες και να τις φέρει σε επαφή με τον υποδοχέα, ώστε να φωσφορυλιωθούν και να δημιουργήσουν σύμπλοκα με την κοινή Smad4 για την επιτυχή μεταγωγή του σήματος. Δεν είναι παράξενο λοιπόν ότι η φωσφορυλίωση των Smad2 ή Smad3 επάγει την αποσύνδεσή τους από την SARA και ότι τα σύμπλοκα Smad2/Smad3-Smad4 με τα σύμπλοκα Smad2/Smad3-SARA δεν σχηματίζονται ποτέ ταυτόχρονα. Η SARA επομένως είναι απαραίτητος μεσολαβητής για την μεταγωγή του σήματος από τον παράγοντα TGF-β γιατί προσελκύει τις Smad πρωτεΐνες στις μεμβράνες που περιέχουν τον υποδοχέα.

#### 1.3.4.4 Είσοδος και έξοδος από τον πυρήνα

Απουσία προσδέματος, οι R-Smad βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ενώ η Smad4 κατανέμεται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα. Μετά την ενεργοποίηση των υποδοχέων, οι φωσφορυλιωμένες R-Smad μετατοπίζονται στον πυρήνα. Η περιοχή MH1 των R-Smad περιέχει μια περιοχή πλούσια σε λυσίνες στην έλικα 2 (H2), η οποία βρίσκεται δίπλα στην περιοχή πρόσδεσης των R-Smad με το DNA (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998). Η αλληλουχία αυτή (Lys-Lys-Leu-Lys-Lys) καλά συντηρημένη ανάμεσα στις R-Smad θεωρείται ότι δρα ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localisation Signal-like, NLS-like) (Xiao et al., 2000a; Xiao et al., 2001). Η περιοχή NLS-like, έχει αναφερθεί ότι είναι απαραίτητη για την μετακίνηση της Smad3 στον πυρήνα μετά από επαγωγή από τον παράγοντα TGF-β και ότι η μετακίνηση αυτή εξαρτάται από την φωσφορυλίωση της Smad (Kurisaki et al., 2001; Xiao et al., 2000a). Η διαδικασία της εισαγωγής των R-Smad στον πυρήνα φαίνεται να είναι διαφορετική από το κλασικό μονοπάτι της ινπορτίνης. Σε αυτό το μονοπάτι, η ινπορτίνη β συνδέεται με την ινπορτίνη α, η οποία αναγνωρίζει σαν NLS την πλούσια σε λυσίνες αλληλουχία στην πρωτεΐνη που πρόκειται να μεταφερθεί (Gorlich and Kutay, 1999). Στις μελέτες που έχουν γίνει όμως για την μεταφορά της MH1



περιοχής των R-Smad, η αλληλουχία NLS-like που είναι μέρος της α-έλικας (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998) συνδέεται με την ινπορτίνη β, αλλά όχι με την ινπορτίνη α (Kurisaki et al., 2001; Xiao et al., 2000b).

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός για την είσοδο και την έξοδο των R-Smad από τον πυρήνα βασίζεται σε παρατηρήσεις ότι η περιοχή MH2 συνδέεται άμεσα με συστατικά συμπλόκου στον πυρηνικό πόρο, τις νουκλεοπορίνες CAN/Nup214 και Nup153 (Xu et al., 2003; Xu et al., 2002). Για την σύνδεση ευθύνεται η επανάληψη της περιοχής FG (Phe-Gly) των νουκλεοπορινών, η οποία επιτρέπει την είσοδο των R-Smad στον πυρήνα απουσία των ινπορτινών και την έξοδο τους από αυτόν ανεξάρτητα από τον παράγοντα εξόδου Crm-1 (Xu et al., 2002). Η απευθείας σύνδεση με το σύμπλοκο του πυρηνικού πόρου οδηγεί τις R-Smad σε μια συνεχή παλινδρόμηση, δημιουργώντας ένα δυναμικό ενεργής μεταφοράς ανάμεσα στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η περιοχή σύνδεσης των R-Smad με την νουκλεοπορίνη συμπίπτει με την περιοχή σύνδεσης με την SARA (Wu et al., 2000). Η υδρόφοβη αυτή περιοχή είναι κοινή περιοχή σύνδεσης για την SARA, αλλά και για πυρηνικούς μεταγραφικούς παράγοντες, αφού οι πρωτεΐνες αυτές μοιράζονται το καλά συντηρημένο μοτίβο σύνδεσης με τις R-Smad (Smad Interacting motif, SIM) (Randall et al., 2002). Έτσι, η SARA στο κυτταρόπλασμα και οι μεταγραφικοί παράγοντες στον πυρήνα συναγωνίζονται με τις νουκλεοπορίνες CAN/Nup214 και Nup153 για την σύνδεσή τους στην υδρόφοβη περιοχή των R-Smad (Xu et al., 2002). Η φωσφορυλίωση των R-Smad από των υποδοχέα τύπου I μειώνει την συγγένεια σύνδεσης της SARA, αλλά όχι των CAN/Nup214 και Nup153 στην περιοχή SIM (Tsukazaki et al., 1998; Xu et al., 2000; Xu et al., 2002). Η μεταφορά των R-Smad μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα φαίνεται να είναι καθοριστικό στάδιο για την μεταγωγή του σήματος από τους TGF-β/ακτιβίνη (Inman et al., 2002) (Xu et al., 2002). Η συνεχής παλινδρόμηση των R-Smad επιτρέπει την συνεχή ανίχνευση της ενεργοποιημένης ή μη κατάστασης του υποδοχέα εξασφαλίζοντας έτσι την αποτελεσματική λήξη της μεταγωγής του σήματος (Inman et al., 2002).

Η Smad4 συσσωρεύεται στον πυρήνα εφόσον δημιουργήσει σύμπλοκο με τις R-Smad (Hoodless et al., 1999; Liu et al., 1997). Παρ' όλα αυτά η Smad4 υφίσταται και αυτή μεταφορά μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα ανεξάρτητα από την μεταγωγή σήματος από τους TGF-β/ακτιβίνη (Pierreux et al., 2000; Watanabe et al., 2000). Η Smad4 εκτός από την περιοχή NLS-like στην έλικα H2 στο αμινοτελικό της άκρο, έχει και ένα κατάλοιπο Arg81 στην περιοχή αναδίπλωσης β (Xiao et al., 2003). Το σήμα εξόδου της Smad4 από τον πυρήνα βρίσκεται στην ενδιάμεση περιοχή (linker) και αποκρύπτεται με

την δημιουργία ετερομερούς συμπλόκου με τις R-Smad (Inman et al., 2002; Watanabe et al., 2000; Xiao et al., 2001).

#### 1.3.4.5 Τερματισμός σηματοδότησης-ανάδραση

Ως μεσολαβητής πολλών σημαντικών λειτουργιών, η μετάδοση σήματος από τους TGF-β/ακτιβίνη υποβάλλεται σε αυστηρά ελεγχόμενη ρύθμιση. Η ρύθμιση αυτή μπορεί να είναι εξωκυττάρια ή ενδοκυττάρια. Η ακτιβίνη σπάνια κυκλοφορεί ελεύθερα στο αίμα. Έτσι έξω από το κύτταρο η ακτιβίνη είναι συνδεδεμένη με προσδένουσες πρωτεΐνες όπως η φολλιστατίνη. Η φολλιστατίνη είναι μια εκκρινόμενη γλυκοπρωτεΐνη, η οποία όταν προσδεθεί με την ακτιβίνη την καθιστά σε μεγάλο βαθμό ανενεργή (Hashimoto et al., 1997).

Μέσα στο κύτταρο εκτός από τις R-Smads και Co-Smad, που μεταγουν σήματα από τους υποδοχείς στον πυρήνα, η τρίτη κατηγορία των I-Smads (Inhibitory-Smads) δρα ανταγωνιστικά για την κατάργηση των σημάτων από την οικογένεια TGF-β. Δύο ανασταλτικές Smad πρωτεΐνες, η Smad6 και η Smad7, έχουν βρεθεί ως σήμερα στα σπονδυλωτά (Hata et al., 1998; Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997). Η Smad7 δρα ως γενικός αναστολέας της οικογένειας TGF-β, ενώ η Smad6 αναστέλλει επιλεκτικά την μεταγωγή του σήματος από τους παράγοντες BMPs (Ishisaki et al., 1999; Itoh et al., 1998) και ανταγωνίζεται με τις ενεργοποιημένες R-Smad (Smad1) για σύνδεση με την Smad4 (Hata et al., 1998). Η ανασταλτική δράση της Smad7 γίνεται μέσω του ανταγωνισμού της με τις R-Smads για την σύνδεση με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I. (Hayashi et al., 1997; Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997; Souchelnytskyi et al., 1998). Πιο πρόσφατα, ένας άλλος μηχανισμός έχει αναφερθεί για τη δράση της Smad7 στην αναστολή σήματος από το μονοπάτι TGF-β/Smad. Η Smad7 φαίνεται να βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα απουσία διεγέρτη και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα μετά από επαγωγή με TGF-β (Itoh et al., 1998). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Smad7 μέσω της περιοχής PY (PY motif) συνδέεται με τις λιγάσες της ουβικιτίνης της Smurf1 και Smurf2 (Ebisawa et al., 2001; Kavsak et al., 2000). Το σύμπλοκο Smad7/Smurf προσελκύεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα τύπου I και αναστέλλει την φωσφορυλίωση των R-Smads (Kavsak et al., 2000; Suzuki et al., 2002). Στο μεμβρανικό αυτό σύμπλοκο, η Smurf1 επάγει την άμεση αποικοδόμηση των υποδοχέων μέσω του πρωτεοσωμικού και λυσοσωμικού μονοπατιού (Ebisawa et al., 2001; Tajima et al., 2003). Η ίδια η Smad7 υπόκειται σε ουβικουιτινίωση και αποικοδόμηση κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας. Ο κύκλος αυτός ανάδρασης της Smad7 διαιωνίζεται, αφού ο παράγοντας

TGF-β (και οι BMPs) μπορούν να ενεργοποιούν την Smad7 σε μεταγραφικό επίπεδο (Ishisaki et al., 1998; Nakao et al., 1997) εξασφαλίζοντας έτσι την συνεχή παραγωγή της πρωτεΐνης καθώς αυτή αποικοδομείται. Στον πυρήνα η Smad7 συνδέεται με την ακέτυλο-τρανσφεράση p300 η οποία ακετυλιώνει τα κατάλοιπα λυσίνης 64 και 70 στην Smad7 προστατεύοντάς την από την Smurf-επαγόμενη ουβικιτινίωση στα ίδια κατάλοιπα (Gronroos et al., 2002). Η ακετυλίωση της Smad7 χάνεται καθώς η πρωτεΐνη μεταφέρεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, ύστερα από επαγωγή με TGF-β, οπότε και αποσυνδέεται από την p300.

Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις τονίζουν την σημασία ύπαρξης μοριακών μηχανισμών για την ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από την οικογένεια TGF-β και δεν αποκλείεται να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που να ρυθμίζουν την σταθερότητα των Smad πρωτεϊνών και στο βασικό αλλά και στο ενεργοποιημένο στάδιο. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η Smad7 δεν δρα μόνο ως μόριο αρνητικής ανάδρασης για την μεταγωγή σήματος από τον TGF-β αλλά μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι αυτό μέσω άλλων ανταγωνιστικών σημάτων. Έτσι, κυτοκίνες όπως η ιντερφερόνη-γ και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων α (TNF-α) που μεταδίδουν σήματα μέσω των Stat1 και NF-κB αντίστοιχα, ενεργοποιούν την έκφραση της Smad7 αναστέλλοντας έτσι την σηματοδότηση από τον TGF-β (Bitzer et al., 2000; Ulloa et al., 1999).

Εκτός από τις I-Smad, οι πρωτεΐνες Smurf συνδέονται και με τις R-Smads (Zhang et al., 2001; Zhu et al., 1999), τις οποίες οδηγούν σε ουβικουτινίωση και αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Η Smurf1 συνδέεται επιλεκτικά με τις R-Smad της οικογένειας BMP, ενώ η Smurf2 συσχετίζεται και με τις R-Smads της οικογένειας TGF-β/ακτιβίνης, αλλά και με τις BMP R-Smads (Zhang et al., 2001; Zhu et al., 1999). Συγκεκριμένα μοτίβα στις πρωτεΐνες Smurf (WW μοτίβα) αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές στην ενδιάμεση περιοχή (linker region) των R-Smad πλούσιες σε προλίνες (PY μοτίβα) (Ebisawa et al., 2001; Zhu et al., 1999). Η αποικοδόμηση των R-Smad από τις Smurf ελαττώνει την ικανότητα της υπεροικογένειας TGF να μετάγει συγκεκριμένες κυτταρικές ανταποκρίσεις (Zhang et al., 2001; Zhu et al., 1999).

### 1.3.5 Γονιδιακή ρύθμιση

#### 1.3.5.1 Γενικά

Αρχικές μελέτες για την δράση των Smad ως ρυθμιστές της μεταγραφής αποκάλυψαν ότι οι Smad μπορούν να συνδέονται απευθείας στο DNA. Παρ' όλα αυτά με την

ανακάλυψη ότι οι Smads συνδέονται με διάφορες πρωτεΐνες με ικανότητα σύνδεσης στο DNA μπορεί να θεωρηθεί ότι ο κυρίαρχος ρόλος των Smad δεν είναι η στόχευση συγκεκριμένων γονιδίων μέσω της σύνδεσης τους στο DNA αλλά ότι μάλλον δρουν ως ρυθμιστές της μεταγραφικής ενεργότητας σε συνεργασία με άλλους παράγοντες.

### 1.3.5.2 Συνεργασία με μεταγραφικούς παράγοντες

Η Smad4 και όλες οι R-Smads, εκτός από την Smad2, έχουν την ικανότητα της άμεσης πρόσδεσης σε συγκεκριμένες αλληλουχίες στο DNA. Η ελάχιστη ακολουθία πρόσδεσης (SBE, Smad Binding Element), που αρχικά χαρακτηρίστηκε ως η ιδανική ακολουθία για την πρόσδεση της Smad4 και Smad3 στο DNA περιέχει μόνο τέσσερα ζεύγη βάσεων 5'-AGAC-3' (Dennler et al., 1998; Yingling et al., 1997; Zawel et al., 1998), αν και οι περισσότερες φυσιολογικές ακολουθίες DNA που υπάρχουν περιέχουν μία επιπλέον βάση C στο άκρο 5'. Η κρυσταλλική δομή της Smad3 συνδεδεμένης με την ακολουθία SBE έδειξε ότι η υψηλά διατηρημένη β-καμπί (β-hairpin) συνδέεται ειδικά με τρεις βάσεις της ακολουθίας SBE (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998). Η υψηλά συντηρημένη β-καμπί υποδεικνύει ότι όλες οι R-Smad μπορούν να συνδέονται ειδικά στην ακολουθία SBE (Shi et al., 1998). Συγκρινόμενη με τις άλλες R-Smad, η Smad2 περιέχει ένα μοναδικό πρόθεμα 30 καταλοίπων μεταξύ της β-καμπής και της έλικας H2 που δεν επιτρέπει την άμεση πρόσδεση της στο DNA, πιθανότατα λόγω της διατάραξης της διαμόρφωσης της β-καμπής (Shi et al., 1998). Η πρόσδεση των Smad στο DNA είναι σημαντική για την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων αν και η πρόσδεση αυτή είναι χαμηλής ειδικότητας και συγγένειας. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι Smad θα πρέπει να συνεργάζονται και με άλλους παράγοντες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA για να προκαλέσουν συγκεκριμένες μεταγραφικές ανταποκρίσεις.

Από τους πρώτους και πιο καλά χαρακτηρισμένους παράγοντες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA είναι η οικογένεια FAST (Chen et al., 1996; Liu et al., 1999). Στον *Xenopus*, ο παράγοντας FAST (FAST-1) έχει μορφή winged-helix/forkhead, και προσδέεται στο στοιχείο ανταπόκρισης στην ακτιβίνη (ARE, Activin Responsive Element) στην θέση του υποκινητή του γονιδίου *Mix.2* (Chen et al., 1996; Chen et al., 1997). Ομόλογα του παράγοντα FAST (FAST-1 και FAST-2) έχουν βρεθεί στον άνθρωπο και στον ποντικό (Labbe et al., 1998; Liu et al., 1999). Εκτός από το να ρυθμίζει το γονίδιο *Mix.2*, ο FAST έχει δειχθεί ότι προσδέεται στην περιοχή ανταπόκρισης του TGF-β/ακτιβίνης στον υποκινητή *gooseoid* (Labbe et al., 1998). Απουσία σήματος, ο παράγοντας FAST είναι συνεχώς προσδεμένος στις περιοχές ανταπόκρισης, αλλά δεν έχει

την ικανότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής. Η παρουσία όμως ακτιβίνης ή TGF- $\beta$  οδηγεί στην δημιουργία ενός πιο πολύπλοκου συμπλόκου που διαμορφώνεται στο DNA που περιλαμβάνει τον παράγοντα FAST, την Smad2 και Smad4 και έχει την δυνατότητα ενεργοποίησης της μεταγραφής (Chen et al., 1997; Labbe et al., 1998; Liu et al., 1997; Zhou et al., 1998).

Είναι αξιοσημείωτο ότι οι Smad μπορούν να συνεργάζονται και με πρωτεΐνες με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA, οι οποίες όμως εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος άλλων μονοπατιών. Πολλά στοιχεία ανταπόκρισης για τον TGF- $\beta$  έχουν βρεθεί να περιέχουν σημεία πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα AP1 που ενεργοποιούνται από τον ετεροδιμερισμό των c-Jun και c-Fos. Υπερέκφραση της Smad3 ενεργοποιεί ισχυρά πολλούς υποκινητές που περιέχουν σημεία AP1. Η Smad3 μπορεί να συνδέεται άμεσα με την c-Jun μέσω της περιοχής MH1 και της ενδιάμεσης περιοχής (linker domain), ενώ συνδέεται έμμεσα με την c-Fos μέσω της c-Jun (Zhang et al., 1998). Απουσία σύνδεσης των c-Jun και c-Fos, ο παράγοντας TGF- $\beta$  και η Smad3 επάγουν ελάχιστα την μεταγραφή από υποκινητές που περιέχουν σημεία AP1 υποδεικνύοντας έτσι ότι οι Smads χρειάζονται ενεργά διμερή c-Jun/c-Fos σαν συνεργάτες για την επαγωγή της μεταγραφής (Liberati et al., 1999; Zhang et al., 1998). Έτσι βρέθηκε ότι οι Smads συνδέονται επιλεκτικά με την φωσφορυλιωμένη-ενεργή μορφή της c-Jun (Liberati et al., 1999), η οποία παράγεται από την κινάση Jun. Αναστολή της κινάσης Jun αναστέλλει και την TGF- $\beta$  εξαρτώμενη ενεργοποίηση από τις περιοχές AP1 (Hocavar et al., 1999). Η σύνδεση των Smad με τις ενεργές c-Jun και c-Fos σηματοδότησε για πρώτη φορά την συνεργασία του Smad μονοπατιού με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Επιπλέον, έχειδειχτεί ότι οι Smad3 και Smad4 συνδέονται με τον μεταγραφικό παράγοντα ATF2, μια βασική πρωτεΐνη έλικας-θηλειάς-έλικας με φερμουάρ λευκίνης (bHLH-Zip), η οποία προσδένεται σε περιοχές ανταπόκρισης του cAMP, μέσω της περιοχής MH1 και είναι στόχος της κινάσης p38 (Hocavar et al., 1999; Sano et al., 1999). Ένα άλλο μέλος της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων bHLH-Zip, ο TFE3, συνδέεται στο DNA μέσω του στοιχείου E (E-box element). Η Smad3 και ο παράγοντας TFE3 συνεργάζονται για την ενεργοποίηση της από τον TGF- $\beta$  επαγόμενης μεταγραφής με το να συνδέονται σε διπλανάς θέσεις στον υποκινητή PAI-1 (Hua et al., 1999).

Σύνδεση των Smad πρωτεϊνών έχει αναφερθεί και για την πρωτεΐνη του ιού πολυώματος PEBP2/CBF (Polyomavirus Enhancer Binding Protein 2/Core Binding Factor) (Hanai et al., 1999). Επιπρόσθετα, οι Smads εμπλέκονται στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος από την βιταμίνη D (Yanagisawa et al., 1999). Έχει δειχτεί ότι το στοιχείο

ανταπόκρισης της βιταμίνης D (VDRE, Vitamin D Responsive Element) ανταποκρίνεται στο παράγοντα TGF- $\beta$  παρουσία της βιταμίνης D (Yanagi et al., 1999; Yanagisawa et al., 1999).

### 1.3.5.3 Συνενεργοποιητές και αποσιωποητές

Η περιοχή MH2 των Smad πρωτεϊνών επιδεικνύει μεταγραφική ενεργότητα σαν συντηγμένη πρωτεΐνη με την περιοχή σύνδεσης DNA της GAL4 υποδεικνύοντας ότι οι Smad μπορούν να συνδέονται άμεσα με την βασική μεταγραφική μηχανή. Πράγματι η περιοχή MH2 των R-Smad αλλά και της Smad4 συνδέονται με τους μεταγραφικούς συνενεργοποιητές p300 και CBP (CREB Binding Protein). Οι p300/CBP γεφυρώνουν τους μεταγραφικούς παράγοντες με την βασική μεταγραφική μηχανή μέσω της ενδογενούς ενεργότητας ακετυλοτρανσφεράσης (HAT, Histone acetyltransferase) που διευκολύνει την μεταγραφή μειώνοντας την συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων μέσω της ακετυλίωσης των ιστονών. Οι p300/CBP που βρίσκονται σε μικρά ποσά μέσα στο κύτταρο δρουν ως συνενεργοποιητές για πολλούς μεταγραφικούς παράγοντες ενσωματώνοντας έτσι πολλαπλά σήματα. Η σύνδεση των R-Smad με την p300/CBP μπορεί να αυξήσει την μεταγραφική ικανότητα προσελκύοντας άλλους συνενεργοποιητές όπως είναι ο MSG1 που συνδέεται στην περιοχή MH2 της Smad4 (Shioda et al., 1998). Φαίνεται ότι η σύνδεση των Smad με την p300/CBP και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να είναι σημαντική για την συνεργία μεταξύ διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Εναλλακτικά, η σύνδεση των Smad και άλλων μεταγραφικών παραγόντων στην CBP/p300 μπορεί να είναι αμοιβαία αποκλειστική οδηγώντας στην μείωση της Smad-εξαρτώμενης μεταγραφής.

Έκτος από το να επάγουν την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων στόχων οι Smads μπορούν να δράσουν και ως αποσιωποητές της μεταγραφής. Έτσι για παράδειγμα στον υποκινητή *gooseoid*, η Smad2 ενεργοποιεί την μεταγραφή του γονιδίου σε συνεργασία με τον παράγοντα FAST2, ενώ η Smad3 δεν έχει την ίδια δράση και φαίνεται να αναστέλλει την Smad2-εξαρτώμενη ενεργοποίηση (Labbe et al., 1998). Η διαφορά αυτή οφείλεται στην περιοχή MH1 της Smad3 που συνδέεται στο DNA και συναγωνίζεται με την Smad4 για την περιοχή Smad που βρίσκεται δίπλα στην περιοχή FAST. Σε αντίθεση με τον υποκινητή *gooseoid*, η περιοχή ARE στο γονίδιο *Mix.2* στον *Xenopus* ενεργοποιείται από την Smad2 και Smad3 (Yagi et al., 1999). Έτσι η Smad3 μπορεί να δρα ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή αποσιωποητής ανάλογα με τον υποκινητή. Η ικανότητα των R-Smads να συνδέονται στο DNA μπορεί να καθορίζει την αρνητική ή

θετική δράση τους στην μεταγραφή αν και ο μηχανισμός για αυτή την διαφορετική δράση δεν είναι ακόμα γνωστός.

Η ανακάλυψη πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τις Smad οδήγησε στον χαρακτηρισμό αποσιωπητών, όπως ο TGIF (TGF- $\beta$  induced factor) και ο Ski/SnoN, οι οποίοι φαίνεται να υποκινούν την ικανότητα των Smad να ρυθμίζουν αρνητικά την μεταγραφή (Akiyoshi et al., 1999; Luo et al., 1999; Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999a; Sun et al., 1999b; Wotton et al., 1999). Ο παράγοντας TGIF, μια πρωτεΐνη χωρίς προηγούμενη γνωστή λειτουργία, όταν υπερεκφράζεται αναστέλλει την ενεργοποίηση γονιδίων στόχων του παράγοντα TGF- $\beta$  (Wotton et al., 1999). Η πρωτεΐνη TGIF αλληλεπιδρά με την Smad2 και φαίνεται να καταστέλλει την έκφραση γονιδίων στόχων με το να προσελκύει τις απακετυλάσες των ιστονών στους υποκινητές στόχους του παράγοντα TGF- $\beta$ . Οι ογκοπρωτεΐνες Ski και SnoN μπορούν επίσης να συνδέονται με τις Smad2 και Smad3 (Akiyoshi et al., 1999; Luo et al., 1999; Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999a; Sun et al., 1999b). Η σύνδεση της Ski ή της SnoN με την Smad2 ή την Smad3 καταστέλλει την μεταγραφή γονιδίων στόχων των Smad πρωτεϊνών και κατά συνέπεια ανατρέπει την αρνητική δράση του παράγοντα TGF- $\beta$  στον πολλαπλασιασμό. Είναι σημαντικό ότι ο παράγοντας TGF- $\beta$  δρα αναδραστικά ελαττώνοντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα της SnoN τερματίζοντας έτσι την ανασταλτική της δράση (Luo et al., 1999; Stroschein et al., 1999; Sun et al., 1999a; Sun et al., 1999b). Από την στιγμή που οι πρωτεΐνες αποσιωπητές στρατολογούνται στα γονίδια που ενεργοποιούνται από τον TGF- $\beta$ , είναι πιθανόν η επαγωγή των TGF- $\beta$  γονιδίων στόχων να εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των ενεργοποιητών CBP/p300 και των αποσιωπητών TGIF, Ski και SnoN και τα αντίστοιχα ένζυμα ακετυλίωσης και αποακετυλίωσης.

### 1.3.6 TGF- $\beta$ /ακτιβίνη και καρκίνος

#### 1.3.6.1 Ρύθμιση πολλαπλασιασμού

Παρ' όλο που ο παράγοντας TGF- $\beta$  και η ακτιβίνη παίζουν διαφορετικό ρόλο στην ανάπτυξη των ιστών και στο αναπαραγωγικό σύστημα, έχουν πολλές ομοιότητες στην μεταγωγή σήματος. Για παράδειγμα οι υποδοχείς τύπου I του TGF- $\beta$  και της ακτιβίνης φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες. Αφού λοιπόν χρησιμοποιούν τις ίδιες Smad πρωτεΐνες για την δράση είναι φυσικό να μοιράζονται και κάποιους μηχανισμούς ρύθμισης.



Ο παράγοντας TGF- $\beta$  και η ακτιβίνη αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό πολλών διαφορετικών κυτταρικών τύπων σταματώντας τα κύτταρα στην φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (Massague et al., 2000). Η ανασταλτική αυτή δράση γίνεται μέσω πολλαπλών μηχανισμών και εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Η αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την οικογένεια TGF- $\beta$ /ακτιβίνης έχει συνδεθεί με την ρύθμιση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών (CKIs, Cyclin-dependent Kinase Inhibitors) p15<sup>Ink4B</sup>, p21<sup>Cip1</sup> και p27<sup>Kip1</sup>. Σε κερατινοκύτταρα, αλλά και σε επιθηλιακά κύτταρα, η παρουσία του TGF- $\beta$  οδηγεί στην επαγωγή του p15<sup>Ink4B</sup> και στην αύξηση σύνδεσης του p15<sup>Ink4B</sup> με το σύμπλοκο κυκλοεξαρτώμενων κινασών (Cdks, Cyclin Dependent Kinases) Cdk4/6 και κατά συνέπεια αναστολή της δράσης τους (Reynisdottir et al., 1995). Η επαγωγή του p15<sup>Ink4B</sup> από τον TGF- $\beta$ /ακτιβίνη οδηγεί επίσης και στην απελευθέρωση του p27<sup>Kip1</sup> από το σύμπλοκο Cdk4-κυκλίνης D με αποτέλεσμα την αύξηση του p27<sup>Kip1</sup> στο σύμπλοκο Cdk2-κυκλίνης E που ενεργοποιείται στο τέλος της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου. Η διαφορετική ενδοκυτταρική εντόπιση των p15<sup>Ink4B</sup> (κυτταρόπλασμα) και p27<sup>Kip1</sup> (πυρήνας) φαίνεται να διευκολύνει την συντονισμένη αναστολή των κινασών Cdk2 και Cdk4/6 (Reynisdottir and Massague, 1997). Η δράση του TGF- $\beta$ /ακτιβίνης στους αναστολείς p21<sup>Cip1</sup> και p27<sup>Kip1</sup> αλλά και της φωσφατάσης Cdc25A, φαίνεται να παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της ενεργότητας των κινασών Cdks. Έχει δείχτει ότι ο TGF- $\beta$ /ακτιβίνη επάγει τα γονίδια των αναστολέων p15<sup>Ink4B</sup> και p21<sup>Cip1</sup> μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Sp1, ο οποίος συνδέεται σε συγκεκριμένες Sp1 περιοχές στο DNA (Datto et al., 1995; Li et al., 1995). Οι Smad μπορούν να συνδέονται φυσικά και ενεργά με την Sp1 (Feng et al., 2000; Pardali et al., 2000), ενώ η ενεργοποίηση άλλων μονοπατιών όπως είναι το μονοπάτι Ras/MAPK θεωρείται απαραίτητο για την επαγωγή του p21<sup>Cip1</sup> (Hu et al., 1999; Kardassis et al., 1999). Εκτός από την επαγωγή των παραπάνω αναστολέων, έχει δείχτει ότι η δράση του TGF- $\beta$  αλλά και της ακτιβίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό οφείλεται και στην αναστολή της έκφρασης της Cdk τυροσινικής φωσφατάσης Cdc25A (Iavarone and Massague, 1997). Η αναστολή της Cdc25A γίνεται μέσω του συμπλόκου E2F-p130, το οποίο προσελκύει τις απακετυλάσες των ιστονών στον υποκινητή (Iavarone and Massague, 1999), αλλά δεν είναι γνωστό εάν οι Smad πρωτεΐνες εμπλέκονται άμεσα στην αποσιώπηση του γονιδίου Cdc25A.

Ο παράγοντας c-Myc ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων βασικής έλικας-θηλειάς-έλικας με περιοχή φερμουάρ λευκίνης (bHLH-LZ) και η δράση του είναι ευρέως διαδεδομένη στην κυτταρική ανάπτυξη και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Σε αντίθεση με την δράση του TGF- $\beta$  στις διάφορες Cdk, η οποία



εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο, η μεταγραφική αναστολή του c-Myc παρατηρείται στα περισσότερα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού. Ο c-Myc έχει μικρό όριο ημιζωής και γι' αυτό το αποτέλεσμα της αναστολής οδηγεί στην γρήγορη εξαφάνιση της πρωτεΐνης. Η αναστολή του c-Myc από τον TGF-β είναι απαραίτητο γεγονός για την από τον TGF-β επαγόμενη αδρανοποίηση της φάσης G1 από τις Cdk (Warner et al., 1999). Πώς μπορεί όμως ο παράγοντας c-Myc να εμποδίζει την επαγωγή των αναστολέων των Cdk από τον TGF-β; Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι παράγοντες c-Myc και Miz-1 εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του υποκινητή του  $p15^{Ink4B}$  από τον TGF-β (Seoane et al., 2001). Ο Miz-1 μπορεί να ενεργοποιήσει το γονίδιο του  $p15^{Ink4B}$  με το να προσδέεται σε μια περιοχή εκκίνησης της μεταγραφής (Inr, transcription initiator element) του γονιδίου. Απουσία του παράγοντα TGF-β, η πρωτεΐνη c-Myc σε συνεργασία με μια άλλη πρωτεΐνη τύπου bHLH-LZ, συνδέεται με τον παράγοντα Miz-1 στην περιοχή Inr. Η σύνδεση του c-Myc με την Miz-1 παρεμβαίνει στην προσέλευση των μεταγραφικών ενεργοποιητών p300/CBP. Με την παρουσία του TGF-β που οδηγεί στην μείωση των επιπέδων της c-Myc, η Miz-1 μέσω των περιοχών ψευδαργύρου συνδέεται με την περιοχή MH1 των Smad3 και Smad4 που αναγνωρίζουν την περιοχή SBE στον υποκινητή του  $p15^{Ink4B}$ . Επιπλέον, η Miz-1 έχει την ικανότητα να συνδέεται με τον παράγοντα Sp1, μια σύνδεση η οποία εξαρτάται από τον TGF-β και την παρουσία της Smad4. Έτσι στο από τον TGF-β επαγόμενο σύμπλοκο, το οποίο περιέχει τις Smad, Sp1 και Miz-1, ο κάθε παράγοντας συνδέεται σε συγκεκριμένη περιοχή στον υποκινητή για την ενεργοποίηση του  $p15^{Ink4B}$  γονιδίου (Seoane et al., 2001). Οι περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα έχουν δείξει ότι οι Smad πρωτεΐνες μετακινούνται στον πυρήνα όπου και προσελκύουν διάφορους μεταγραφικούς ενεργοποιητές και συνδέονται με μεταγραφικούς παράγοντες που έχουν μεγάλη συγγένεια για κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο ή ομάδα γονιδίων. Πρόσφατες αναφορές όμως δείχνουν ότι ήδη προϋπάρχοντα σύμπλοκα των Smad πρωτεϊνών με άλλους παράγοντες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αναστολή ή την ενεργοποίηση γονιδίων. Σε κύτταρα στα οποία ο παράγοντας TGF-β επάγει την αναστολή της έκφρασης του c-Myc, η Smad3 αναστέλλει την μεταγραφή του c-Myc σε συνεργασία με τους παράγοντες E2F4 και E2F5, και με τον αποσιωποποιητή p107 (Chen et al., 2002). Το σύμπλοκο αυτό προϋπάρχει στο κυτταρόπλασμα και σε ανταπόκριση στον παράγοντα TGF-β μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρά με την Smad4 και συνδέεται σε συγκεκριμένες Smad-E2F θέσεις στον υποκινητή του c-Myc αναστέλλοντας την μεταγραφή του (Chen et al., 2002).

Η αναστολή του πολλαπλασιασμού από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGF-β δεν εξαρτάται σε όλες τις περιπτώσεις από την ενεργοποίηση των Smad. Πράγματι, η υπομονάδα Βα της φωσφατάσης 2 Α (PP2A) συνδέεται με τον TGF-β υποδοχέα τύπου I (Griswold-Prenner et al., 1998) και με την κινάση με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης p70<sup>S6k</sup> (Petritsch et al., 2000). Παρουσία TGF-β, η PP2A αποφωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί την κινάση p70<sup>S6k</sup> που είναι απαραίτητη για την πρόοδο της G1/S φάσης. Έτσι, η απενεργοποίηση της p70<sup>S6k</sup> και η ενεργοποίηση του Smad μονοπατιού μπορεί να συνεργάζονται για την διακοπή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στην G1 φάση.

Επειδή ο TGF-β μεταφέρει ανασταλτικά του πολλαπλασιασμού σήματα και θεωρείται σαν το πρότυπο ανασταλτικό πολυπεπτίδιο, μεταλλάξεις αρκετών από τα συστατικά της μεταγωγής του σήματος του TGF-β, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων και των Smad πρωτεϊνών, συμμετέχουν στη δημιουργία καρκίνων καθιστώντας τα κύτταρα μη ανταποκρίσιμα στον TGF-β (Massague et al., 2000; Ten Dijke et al., 2002). Μεταξύ των βασικών συστατικών της μηχανής σήματος, οι τύπου II υποδοχείς για τον TGF-β και η Co-Smad, Smad4, απενεργοποιούνται συχνότερα στους επιθηλιακούς ανθρωπίνους καρκίνους κυρίως στο έντερο και στο πάγκρεας (Ten Dijke et al., 2002). Πράγματι, η Smad4 αρχικά είχε χαρακτηριστεί ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο σε καρκίνους του παγκρέατος, αφού το γονίδιο Smad4 στο χρωμόσωμα 18q21 είχε χαθεί στο 50% αυτών των όγκων (Hahn et al., 1996). Μεταλλάξεις στην Smad2 που βρίσκεται στο ίδιο χρωμόσωμα 18q21, έχουν επίσης βρεθεί σε κάποιους καρκίνους του εντέρου. Οι μεταλλάξεις στην Smad4 και στην Smad2 στους καρκίνους προκαλούνται είτε από πλήρη διαγραφή του χρωμοσωμικού locus, μικρές διαγραφές, μεταλλάξεις μετατόπισης, παρανοηματικές μεταλλάξεις ή μη νοηματικές μεταλλάξεις (Massague, 1998).

### 1.3.6.2 Απόπτωση

Μέλη της οικογένειας του παράγοντα TGF-β επάγουν το προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο σε πολλά είδη κυττάρων και πολύ συχνά το φαινόμενο αυτό συνοδεύεται και από αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι γεγονός, ότι η απόπτωση που προκαλείται από μέλη της οικογένειας TGF-β αποτελεί σημαντική διαδικασία για την φυσιολογική ανάπτυξη πολλών ιστών και οργάνων. Οι μοριακοί μηχανισμοί που ενεργοποιούνται από τον παράγοντα TGF-β και είναι υπεύθυνοι για την διαδικασία της απόπτωσης δεν είναι πλήρων ξεκάθαροι. Η έκτοπη έκφραση των Smad πρωτεϊνών αυξάνει την από τον TGF-β επαγόμενη απόπτωση σε κάποιους κυτταρικούς τύπους, υποδεικνύοντας έτσι ότι οι Smad πρωτεΐνες εμπλέκονται στην διαδικασία αυτή. Η

ενεργοποίηση και η αναστολή της έκφρασης των προ- και αντι-αποπτωτικών μελών της οικογένειας Bcl, αντίστοιχα, που οδηγούν στην ενεργοποίηση των κασπασών έχουν επίσης εμπλακεί στην TGF- $\beta$  επαγόμενη απόπτωση. Πιο πρόσφατα η κινάση DAP (death associating protein) που επάγει την απόπτωση σε κάποιους κυτταρικούς τύπους βρέθηκε ότι επάγεται από το μονοπάτι TGF- $\beta$ /Smad. Αναστολή της ενεργότητας της κινάσης DAP προστατεύει τα κύτταρα από την TGF- $\beta$  επαγόμενη απόπτωση (Jang et al., 2002).

Η από τον TGF- $\beta$  επαγόμενη ενεργοποίηση της κινάσης TAK-1 (TGF- $\beta$ -activated kinase-1), μια πρωτεΐνη η οποία είναι μέλος της οικογένειας των MAP κινασών και η οποία είναι ικανή να ενεργοποιήσει τα μονοπάτια της κινάσης p38 και των JNK, έχει δειχτεί ότι εμπλέκεται στην διαδικασία της απόπτωσης από την οικογένεια TGF- $\beta$  (Yamaguchi et al., 1995). Η πρωτεΐνη που ενεργοποιεί την TAK-1, η TAB1 (TAK-1 binding protein), συνδέεται με τον ενεργοποιημένο υποδοχέα μέσω της πρωτεΐνης HPK1. Πιο πρόσφατα πρωτεΐνες όπως η ARTS (apoptosis-related protein), έχουν εμπλακεί στην απόπτωση από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του παράγοντα TGF- $\beta$ . Η ARTS που έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον κυτταρικό θάνατο από τον TGF- $\beta$ , εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και μετατοπίζεται στον πυρήνα όταν υπάρχει απόπτωση. Επιπλέον, η πρωτεΐνη Daxx (Fas-receptor-associated protein), δρα ως μεσολαβητής της TGF- $\beta$  επαγόμενης απόπτωσης μέσω της σύνδεσής της με τον υποδοχέα τύπου II του TGF- $\beta$ . Η Daxx ενεργεί καθοδικά του υποδοχέα τύπου I και ενεργοποιεί το μονοπάτι των JNK και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο από τον υποδοχέα Fas. Ο ρόλος των Smad στην απόπτωση ο οποίος προκαλείται από τον TGF- $\beta$  μέσω των HPK1, ARTS, ή Daxx δεν είναι ξεκάθαρος. Παρ' όλα αυτά η πρωτεΐνη Smad7 που δρα καθοδικά στο μονοπάτι του TGF- $\beta$ , μπορεί να επάγει απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα (Landstrom et al., 2000; Mazars et al., 2001; Schiffer et al., 2001), ανεξάρτητα από την ανταγωνιστική δράση που έχει στο μονοπάτι TGF- $\beta$ /Smad (Mazars et al., 2001). Η Smad7 μπορεί να επάγει την απόπτωση αναστέλλοντας σήματα επιβίωσης από τον παράγοντα NF $\kappa$ B ή ενεργοποιώντας το μονοπάτι JNK (Mazars et al., 2001).

### 1.3.6.3 Επιθηλιακή-μεσεγχοματική μεταδιαφοροποίηση (EMT)

Στα τελευταία στάδια της ογκογένεσης, ο TGF- $\beta$  μπορεί να προάγει τον κακοήθη φαινότυπο δρώντας άμεσα πάνω στα καρκινικά κύτταρα (Oft et al., 1998; Yin et al., 1999). Πράγματι, ο TGF $\beta$  μπορεί να επάγει την μεταδιαφοροποίηση επιθηλιακών κυττάρων του μαστού και του δέρματος προς επιθηλιακού τύπου κύτταρα με ισχυρά διεισδυτικό και μεταστατικό φαινότυπο (Piek et al., 1999). Η διαδικασία EMT είναι πολύπλοκη και

περιλαμβάνει την διατάραξη της πολωμένης μορφολογίας των επιθηλιακών κυττάρων σε κύτταρα με ατρακτοειδή μορφολογία. Τα χαρακτηριστικά των τελευταίων είναι η δημιουργία ινιδίων ακτίνης του στρες, η ελάττωση των κυτταρικών συνδέσμων (μέσω εκτόπισης και αναστολής της E-κατχερίνης), και η αυξημένη κυτταρική κινητικότητα. Η επαγωγή της διαδικασίας της EMT από τον παράγοντα TGF-β έχει δειχτεί σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές (Piek et al., 1999; Zavadil et al., 2001), και προάγεται από την ενεργοποίηση της Ras, ή την ενεργοποίηση της Raf (Lehmann et al., 2000) ή ακόμα και με την επεξεργασία ορού (Piek et al., 1999). Ο TGF-β μπορεί να επάγει την γρήγορη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RhoA που ρυθμίζει τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και τους συνδέσμους προσκόλλησης των επιθηλιακών κυττάρων (Bhowmick et al., 2001). Αναστολείς των Rho κινασών ανατρέπουν την από τον TGF-β επαγόμενη δημιουργία ινιδίων του στρες και επαναφέρουν την E-κατχερίνη στην σωστή της θέση. Το γεγονός ότι η διαδικασία EMT απαιτεί καινούρια πρωτεϊνική σύνθεση (Bhowmick et al., 2001), υποδεικνύει ότι η μεταγωγή σήματος από τις Smad πρωτεΐνες μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία αυτή. Πράγματι πολλές μελέτες εμπλέκουν τις Smad στην διαδικασία EMT. Η πρωτεΐνη Net1, η οποία είναι ειδικός παράγοντας ανταλλαγής γουανίνης για την RhoA, επάγεται γρήγορα από τον TGF-β με τρόπο εξαρτώμενο από τις Smad πρωτεΐνες σε πολλές διαφορετικές κυτταρικές σειρές (Shen et al., 2001; Zavadil et al., 2001). Έχει δειχτεί ότι η Net1 παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ινιδίων του στρες από τον παράγοντα TGF-β (Shen et al., 2001). Επίσης, ο TGFβ ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση της E-κατχερίνης διαμέσου του μονοπατιού των Smad. Πράγματι, ο TGFβ επάγει την έκφραση των αποσιωπητών της μεταγραφής της κατχερίνης SIP1 και Slug (comijin 2001, Zavadil 2001). Πειράματα με μικροσυστοιχίες DNA έδειξαν ότι η έκφραση περίπου 4000 γονιδίων αλλάζει κατά την από τον TGFβ επαγόμενη EMT. Τουλάχιστον 80 από αυτά ρυθμίζονται από το μονοπάτι των ERK (Zavadil et al., 2001). Φαίνεται λοιπόν, πως η από τον TGF-β επαγόμενη EMT συμβαίνει μέσω Smad εξαρτημένων αλλά και Smad ανεξάρτητων μονοπατιών. Το γεγονός πάντως ότι ο παράγοντας TGF-β μπορεί να επάγει την διαδικασία EMT έχει εξαιρετικό ενδιαφέρον αφού συναντάται πολύ συχνά στα τελευταία στάδια του καρκίνου και πολύ συχνά συνδέεται με την ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να κάνουν μετάσταση.

#### 1.3.6.4 Αγγειογένεση

Πρόσφατες, αλλά και παλαιότερες, μελέτες έδειξαν ότι η μεταγωγή του σήματος από τον TGF-β είναι σημαντική για τη ρύθμιση της αγγειακής διαφοροποίησης και της

αγγειογένεσης. Ο TGF- $\beta$  αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες, ενώ διεγείρει την νεοαγγείωση στον κερατοειδή των κουνελιών και την χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη της όρνιθας (Roberts and Sporn, 1989; Yang and Moses, 1990). Πράγματι, στοχευόμενη απενεργοποίηση των γονιδίων του TGF- $\beta$ 1 (Dickson et al., 1995) ή του T $\beta$ RII (Oshima et al., 1996) οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα λόγω ελαττωματικής αγγειακής διαφοροποίησης και αγγειογένεση. Φαινότυποι με ελαττωματική αγγειογένεση παρατηρήθηκαν επίσης σε ποντίκια με απενεργοποίηση των γονιδίων του T $\beta$ RI (ALK-5) (Larsson et al., 2001), του ALK-1 (Oh et al., 2000), της Smad5 (Chang et al., 2000; Yang et al., 1999), και της ενδογλίνης (Arthur et al., 2000; Li et al., 1999), ενός ειδικού ενδοθηλιακού υποδοχέα του TGF- $\beta$  τύπου III (χαμηλής συγγένειας). Επιπλέον, αρκετά μοντέλα υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο για τον από τους όγκους εκκρινόμενο TGF- $\beta$ 1 στην αγγειογένεση των όγκων. Υπερέκφραση του TGF- $\beta$ 1 σε διαμολυσμένα κύτταρα προστατικού καρκινώματος ή ωοθηκών Κινέζικου χοιριδίου προκάλεσε σημαντική αύξηση της αγγειογένεσης των όγκων σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). Τοπική χορήγηση εξουδετερωτικών αντισωμάτων του TGF- $\beta$ 1 ελάττωσε σημαντικά την αγγειογένεση των όγκων (Ueki et al., 1992). Τα δεδομένα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο TGF $\beta$  έχει αγγειογενετικό ρόλο *in vivo* και διαμέσου της ενεργοποίησης της αγγειογένεσης σε διάφορους καρκίνους μπορεί να προωθήσει τον κακοήγη φαινότυπο των καρκίνων αυτών (Wakefield and Roberts, 2002).

Σε αντίθεση με τον TGF $\beta$ , η ακτιβίνη A φαίνεται να έχει αντιαγγειογενετική δράση *in vivo*. Πράγματι, η ακτιβίνη A όχι μόνο έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, αλλά αναστέλλει επίσης την δημιουργία αγγείων στην δοκιμασία αγγειογένεσης στην χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσού όρνιθας *in vivo* (Breit et al., 2000). Αυτό την διαφοροποιεί από τον TGF- $\beta$  και αποτελεί σημαντικό σημείο μελέτης. Πράγματι, δεν υπάρχουν αλλά δεδομένα στη βιβλιογραφία αναφορικά με τη δράση της ακτιβίνης A στην αγγειογένεση και το σημείο αυτό αποτελεί και ένα από τους βασικούς σκοπούς της παρούσας διατριβής (βλέπε σχετικό κεφάλαιο).

## 2. ΥΛΙΚΑ και ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Κυτταροκαλλιέργειες

Ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου βοός (*Bovine Brain Capillary Endothelial, BBCE*) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L και 10% ορό νεογέννητου βοός (Newborn Calf Serum, NCS). Προσθήκη του ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα FGF-2 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) σε συγκέντρωση 2,5 ng/ml γίνονταν κάθε δεύτερη ημέρα έως ότου τα κύτταρα καλύψουν όλη την επιφάνεια των τρυβλίων. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 8-12.

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC*) καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τα οποία είχαν πριν υποστεί επεξεργασία με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I για 30 λεπτά στους 37 °C και εκπλυθεί με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS). Η ανάπτυξη των HUVEC έγινε σε θρεπτικό υλικό M199 με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L, εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (Fetal Bovine Serum, FBS) θερμικά απενεργοποιημένο, 0,05 mg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) και 0,05/ml IU ηπαρίνης. Για τις ανάγκες των πειραμάτων της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 4-10.

Εμβρυονικά κύτταρα από νεφρό ανθρώπου 293 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS θερμικά απενεργοποιημένο. Ανθρώπινα κερατινοκύτταρα (*Human Keratinocytes, HaCaT*) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 4,5 g/L και 10% FBS θερμικά απενεργοποιημένο. Νεφρικά κύτταρα αφρικανικού πράσινου πιθήκου (*African Green Monkey Kidney, COS-1*) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα D-γλυκόζης 1 g/L και 10% FBS θερμικά απενεργοποιημένο.

Οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές νευροβλαστώματος, WAC2 και SH-EP007 έχουν προηγουμένως περιγραφεί (Schweigerer et al., 1990). Η καλλιέργειά τους έγινε σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% NCS, 50 μg/ml μυκητοκτόνο, 2 mM γλουταμίνη και 0,2 mg/ml γενετισίνης (G418). Οι WAC2 κυτταρικές σειρές που εκφράζουν ακτιβίνη A (Wact1, Wact2 και Wact5) και οι αντίστοιχοι κλώνοι μάρτυρες (Wvect2 και Wvect3) καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό υλικό με την κυτταρική σειρά WAC2 με επιπλέον προσθήκη πουρομυκίνης 0,75 μg/ml.

Όλα τα θρεπτικά υλικά ήταν εμπλουτισμένα με 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM γλουταμίνη (4 mM για τα κύτταρα COS-1).

Όλα τα κύτταρα συντηρήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο των 37°C και 5% CO<sub>2</sub> εκτός των ενδοθηλιακών κυττάρων BBCE που διατηρήθηκαν σε 10% CO<sub>2</sub>. Όλα τα θρεπτικά μέσα και υλικά προήλθαν από την εταιρεία Invitrogen (Invitrogen, GmbH., Karlsruhe, Germany). Το εκχύλισμα ECGS, η ηπαρίνη και το αντιβιοτικό G418 προήλθαν από την εταιρία Sigma (Sigma, St. Louis, MO) ενώ όλα τα υλικά ήταν ελεύθερα ενδοτοξινών.

## 2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών

Στις περιπτώσεις όπου τα κυτταρικά εκχυλίσματα περιείχαν SDS, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (bikinchromic acid, βικινχρωμικό οξύ) σύμφωνα με το αντιδραστήριο εμπορίου BCA Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce (GmbH., Bonn, Germany). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin), 2 µg/ml, ενώ προστέθηκε ποσότητα διαλύματος λύσης με SDS ίση με την ποσότητα των δειγμάτων προς μέτρηση. Τα δείγματα επώαστηκαν στους 37 °C για 30 λεπτά ενώ η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562 nm.

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford (Biorad GmbH., München, Germany) που βασίζεται στην παρατήρηση ότι κατά την σύνδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στις πρωτεΐνες σε όξινο pH, το διάλυμά της παρουσιάζει μετατόπιση του μεγίστου της απορρόφησης του από τα 465 nm στα 595 nm. Η πρότυπη καμπύλη έγινε όπως αναφέρεται πιο πάνω, ενώ τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά πριν την μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm.

## 2.3 Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Κυτταρικά εκχυλίσματα ελήφθησαν με διάλυμα φωσφορικών pH 7,0 (PBS) που περιείχε 0,1 % SDS, 100 µM PMSF, 1 µM leupeptin, 1µM pepstatin και 0,3 µM aprotinin. Εν συνεχεία, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπέρηχους (Branson Digital Sonifier) τρεις φορές από 10 δευτερόλεπτα και βράστηκαν για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.200g για 20 λεπτά απ' όπου συλλέχτηκε το υπερκείμενο.

Κυτταρικά εκχυλίσματα ή πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Schleicher and Schuell, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory

Manual (Maniatis *et.al.*, 1989). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ronceau S (0,1% σε οξικό οξύ 1%) για 1 λεπτό και ξεβάφτηκαν με νερό. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western (1 M Tris pH 7,2, 0,1% Tween 20, και 150 mM NaCl) είτε σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα είτε στους 4 °C ολονυχτίως υπό ανατάραξη για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα αρχικά αντισώματα για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο σύντομες πλύσεις σε διάλυμα Western, μια πλύση για 7 λεπτά και τέλος δύο πλύσεις των 5 λεπτών στο ίδιο διάλυμα. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα συζευγμένα με την ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις όπως αναφέρεται παραπάνω. Η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την δοκιμασία ήταν το μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού *Flag-M2* που προήλθε από την εταιρία Sigma, ενώ το πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου *φώσφο-Smad2* ήταν προσφορά του κ. Αριστείδη Μουστάκα (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden). Τα πολυκλωνικά αντισώματα κόνικλου *φωσφο-p44/p42* (αντι-p-ERK) και *p44/42* (αντι-ERK) προήλθαν όλα από την εταιρία Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA). Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι στην ακτιβίνη A (*αντι-actA*) προήλθε από την εταιρία Serotec (Oxford, UK), ενώ πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου για τον υποδοχέα VEGFR-2, *αντι-VEGFR-2*, και την ακτίνη (*αντι-ακτίνη*) από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού *9E10* (*αντι-Myc*) και *12Ca5* (*αντι-HA*) παρασκευάστηκαν από κύτταρα υβριδιώματος 9E10 και 12Ca5 αντίστοιχα. Εν συντομία, για την ανάπτυξη των κυττάρων υβριδιώματος χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 εμπλουτισμένο με 10% FBS θερμικά ανενεργό, και επιπλέον 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM γλουταμίνη. Για την παραγωγή αντισωμάτων, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε δύο φιάλες καλλιέργειας επιφάνειας 225 cm<sup>2</sup> σε πληρότητα 50%, και αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640 απουσία ορού, εμπλουτισμένο με 100 U/ml πενικιλίνη, 100 µg/ml στρεπτομυκίνη, 2 mM γλουταμίνη και υλικό Nutridoma 10 ml/L (Invitrogen). Η συλλογή του υπερκειμένου έγινε όταν το μεγαλύτερο ποσοστό



των κυττάρων είχε νεκρωθεί. Η καθίζηση των αντισωμάτων έγινε με θειϊκό αμμώνιο (35 g/100 ml) και προσαρμογή του pH σε 7,0. Η διαπίδυση έγινε ενάντια σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,0 και η συγκέντρωση υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford όπως αναφέρεται στην υποενότητα 2.2.

Όλα τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με την ραφανιδική υπεροξειδάση προήλθαν από την εταιρία Dianova (Dianova, GmbH., Hambourg, Germany).

#### 2.4 Ποσοτικοποίηση της αλληλεπίδρασης της 3-φωσφατιδυλικής ινοσιτόλης με την περιοχή FYVE με την μέθοδο SPR (Surface Plasmon Resonance)

Τα πειράματα του επιφανειακού συντονισμού πλάσμονιου πραγματοποιήθηκαν στην Νορβηγία από τον Dr. Harald Stenmark (The Norwegian Radium Hospital, Montebello, Oslo, Norway). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στους 25 °C σε όργανο BiaCore X (BiaCore, Sweden) όπως περιγράφεται στην αναφορά (Gaulhier et al., 2000). Τα λιποσώματα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 63% φωσφατιδυλο-χολίνη, 20% φωσφατιδυλο-σερίνη, 15% φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη και 2% PI(3)P. Τα λιποσώματα (0,35 mg/ml) τοποθετήθηκαν πάνω σε τσιπ της Biacore L1 με τρεις συνεχόμενες ενέσεις λιποσωμάτων των 80 μl και με ρυθμό ροής 5 μl ανά λεπτό. Για τον μάρτυρα χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια λιποσώματα απουσία όμως PI(3)P. Τα διαγράμματα συντονισμού καταγράφηκαν με την ένεση 0,1-2 μg πρωτεΐνης με ρυθμό ροής 20 μl ανά λεπτό. Η επιφάνεια των λιπιδίων αναγεννήθηκε με 10 mM καυστικό νάτριο (NaOH).

#### 2.5 Ενδοκυτταρική εντόπιση της SARA με συνεστιακή μικροσκοπία

Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν 24 ώρες πριν την διαδικασία διαμόλυνσης, σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm και σε συγκέντρωση 100.000 κύτταρα/φρεάτιο. Τα κύτταρα μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους ιούς δαμαλίτιδας (vaccinia) της RNA πολυμεράσης T7 (Bucci et al., 1992; Sutter et al., 1995). Η μόλυνση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες απουσίας ορού σε θρεπτικό υλικό OptiMEM (Invitrogen). Έπειτα από 30 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου το διάλυμα μόλυνσης απομακρύνθηκε και τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές pGEM-T7-FLAG-SARA και τον T7-υποδοχέα της τρανσφερίνης (T7-human-transferrin-receptor, T7-hTR) ή με τις κατασκευές pGEM-T7-FLAG-SARA και pGEM-T7-GFP-Rab5Q79L. Για την διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο LipofectAMINE Plus (Life

Technologies GmbH., Karlsruhe, Germany), ενώ τα κύτταρα επώαστηκαν μετά την διαμόλυνση σε υλικό OptiMEM για 4 ώρες στους 37 °C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Τρανσφερίνη 50 µg/ml (Alexa transferrin) από την εταιρία Molecular Probes (Eugene, OR) προστέθηκε για 20 λεπτά στα κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με pGEM-T7-FLAG-SARA και T7-hTR. Ο δείκτης Lycotracker (Molecular Probes) προστέθηκε σε συγκέντρωση 50 nM και για 30 λεπτά σε κύτταρα που εκφράζουν μόνο pGEM-T7-FLAG-SARA. Υδροξουρία σε συγκέντρωση 10 mM προστέθηκε σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις για την αποφυγή της έκφρασης των όψιμων ιϊκών γονιδίων.

Υστερα από την 4ωρη επώαση, ακολούθησε μονιμοποίηση των κυττάρων σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3% και εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεύδης με 50 mM χλωριούχο αμμώνιο (NH<sub>4</sub>Cl). Στην συνέχεια τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0,1% για 4 λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Η δέσμευση των μη ειδικών σημείων έγινε με ορό 10% (10% FCS) και για 30 λεπτά. Η SARA ανιχνεύτηκε με αντίσωμα αντι-Flag, η Rab5Q79L μέσω της έκφρασης της GFP και η ενδογενής EEA1 με πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-EEA1 (Mu et al., 1995). Τα δευτερογενή αντισώματα κονίκλου ή ποντικού συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRICH) προήλθαν από την εταιρία Dianova και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 5% (5% FCS). Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS.

## 2.6 Έκφραση ακτιβίνης A σε κύτταρα WAC2 με σταθερή διαμόλυνση

Η κατασκευή που φέρει την β<sub>A</sub> υπομονάδα της ανθρώπινης ινχιμπίνης (CMV-ινχιμπίνη-β<sub>A</sub>) χρησιμοποιήθηκε για την σταθερή διαμόλυνση κυττάρων WAC2 σε τρυβλία των 100 mm κύτταρα και σε πληρότητα 70%. Ποσότητα 10 µg από την κατασκευή CMV-ινχιμπίνη β<sub>A</sub> και 1µg από την κατασκευή που φέρει το γονίδιο για ανθεκτικότητα στην πουρομυκίνη (pRSV-puromycin), διαλύθηκαν σε διάλυμα DOTAP που περιείχε 1 M HEPES pH 7,2 και 5 M NaCl σε τελικό όγκο 250 µl. Λιπίδιο DOTAP 100 µl (Roche Diagnostics GmbH., Mannheim, Germany) διαλυμένο σε 250 µl διαλύματος DOTAP προστέθηκαν στο διάλυμα DNA και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια, το μίγμα προστέθηκε στα WAC2 κύτταρα σε θρεπτικό υλικό

RPMI που δεν περιείχε ορό και σε τελικό όγκο 3,5 ml. Μετά από 5 ώρες επώαση στους 37 °C και σε 5% CO<sub>2</sub> το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με 10 ml πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI. Ο φορέας CMV χωρίς το γονίδιο της ακτιβίνης A και η κατασκευή pRSV-πυρομυκίνη χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες της διαμόλυνσης. Τα κύτταρα υποκαλλιεργήθηκαν σε υλικό που περιείχε 0,75μg/ml πυρομυκίνη 24 ώρες μετά την διαμόλυνση για την επιλογή σταθερών κλώνων. Συνολικά συλλέχθηκαν 10 κλώνοι (Wact1-10) για την ακτιβίνη A και 5 (Wvect1-5) από την διαμόλυνση μάρτυρα. Τα υπερκείμενα των κλώνων ελέγχθηκαν για την έκφραση ακτιβίνης A με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τρεις κλώνοι (Wact1, Wact2 και Wact5) με υψηλά επίπεδα έκφρασης ακτιβίνης A επιλέχθηκαν και υπέστησαν επιπλέον υποκλωνοποίηση, ώστε να επιτευχθεί ομογενής έκφραση της ακτιβίνης A.

## 2.7 Κατασκευές

### 2.7.1 Κατασκευές ανασυνδυασμένου DNA

Η κατασκευή CMV-ινχιμπίνη-β<sub>A</sub> έγινε μετά από περιορισμό της κατασκευής pBKS-Ινχιμπίνη-β<sub>A</sub> με τα ένζυμα NotI-XhoI και υποκλωνοποίηση στις αντίστοιχες θέσεις στον φορέα CMV-p163/7 (Woodrooffe et al., 1992). Όσον αφορά τις κατασκευές των ενεργοποιημένων Smad (Smad2 activated, Smad2ca και Smad3 activated, Smad3ca) τα τέσσερα τελευταία αμινοξέα, SSMS, στο καρβόξυ-τελικό άκρο των Smad2 και Smad3 αντικαταστάθηκαν με τα αμινοξέα EDME. Στην αντίδραση PCR χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο το γονίδιο της Smad2 από την κατασκευή FLAG-Smad2 χρησιμοποιήθηκε πολυμεράση υψηλής πιστότητας (High Fidelity), ρυθμιστικό διάλυμα MgCl<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 2,5 mM, 0,1 mM dNTPs και 100 pmol πρόσθιου και ανάστροφου εκκινητή. Η αλληλουχία των εκκινητών είχε ως εξής: 5'- TGA AGA TCT TCA ACA ACC -3' και 5'-GGC GTC GAC TTC CAT GTC TTC GCA ACG CAC TGA AGG -3'. Παρόμοια, σε αντίδραση PCR με εκμαγείο το γονίδιο της Smad3 από την κατασκευή FLAG-Smad3 χρησιμοποιήθηκαν οι αλληλουχίες εκκινητών: 5'- TGA AGA TCT TCA ACA ACC -3' και 5'- GGC GTC GAC TTC CAC GTC TTC ACA GCG GAT GCT TGG -3'. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε 30 κύκλους ως εξής: 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 42°C για 30 δευτερόλεπτα και 68°C για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος πραγματοποιήθηκε προέκταση 10 λεπτών στους 68°C. Τα τμήματα που προέκυψαν για τις Smad2 και Smad3 υποκλωνοποιήθηκαν στο φορέα PCR 2.1 (Invitrogen, The Original TA Cloning kit). Οι

κατασκευές που προέκυψαν στάλθηκαν για αλληλούχηση (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Γερμανία) και στη συνέχεια τα τμήματα απομονώθηκαν με τα περιοριστικά ένζυμα BglII και SalI και κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pRK5 στις αντίστοιχες θέσεις.

Όλες οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και η φωσφατάση Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) προήλθαν από την εταιρία Fermentas (Fermentas GmbH, st.Leon-Rot, Germany). Η υψηλής πιστότητας Taq πολυμεράση προήλθε από την εταιρία Roche.

Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει όλες τις κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία αυτή και προήλθαν από διάφορους συνεργάτες.

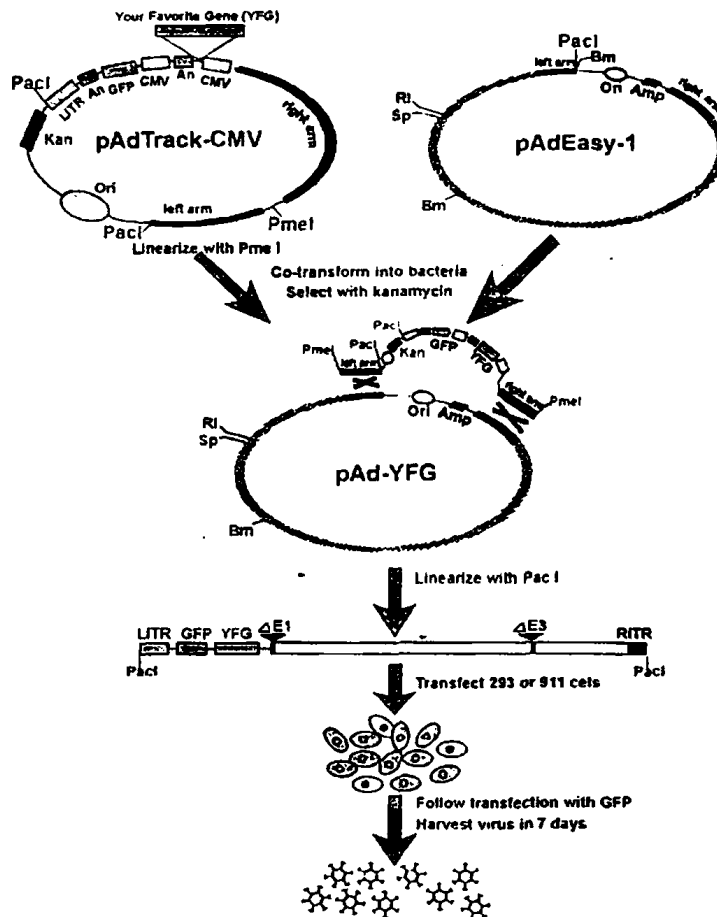
**Πίνακας : Κατάσταση κατασκευών**

Όνομασία	Πηγή	Αναφορά
ActRIIB	Dr. Peter ten Dijke, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam	(Goumans et al., 2002; Piek et al., 1999)
ALK4T206D	Dr. Jeffrey L. Wrana, Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canada	(Attisano et al., 1996)
ARE	Dr. Jeffrey L. Wrana, Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canada	(Macias-Silva et al., 1998)
CD39-GFP	Dr. Σαββας Χριστοφορίδης, Lab. Biological Chemistry, Medical School, Ioannina, Greece	-
Dynammin K44A	Dr. Sandra Schmid, Dept.of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA	(Damke et al., 1994; van der Blik et al., 1993)
E-selectin-luc	Dr. Shosaku Namuri, Department of Preventive Medicine, University of Tokyo, Japan	(Tamaru and Narumi, 1999)
FAST2	Dr. Eseng Lai, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York	(Liu et al., 1999)
FLAG-SARA	Dr. Jeffrey L. Wrana, Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canada	(Tsukazaki et al., 1998)
FLAG-SARAΔ1-664	Dr. Jeffrey L. Wrana, Samuel Lunenfeld Research Institute, Toronto, Canada	(Tsukazaki et al., 1998)
FLAG-Smad2	Dr. Rik Derynck, University of California, San Francisco, CA	(Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997)
FLAG-Smad3	Dr. Rik Derynck, University of California, San Francisco, CA	(Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997)

FLAG-Smad4	Dr. Rik Derynck, University of California, San Francisco, CA	(Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997)
HA-ALK2KR	Dr. Peter ten Dijke, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam	(Goumans et al., 2002; Piek et al., 1999)
HA-ALK4	Dr. Peter ten Dijke, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam	(Goumans et al., 2002; Piek et al., 1999)
HA-ALK4KR	Dr. Peter ten Dijke, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam	(Goumans et al., 2002; Piek et al., 1999)
HA-ALK5KR	Dr. Peter ten Dijke, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam	(Goumans et al., 2002; Piek et al., 1999)
Myc-Rab5Q79L	Dr. Carol Murphy, Biomedical Research Institute, Ioannina, Greece	(Murphy et al., 1996)
Myc-Rab5S34N	Dr. Carol Murphy, Biomedical Research Institute, Ioannina, Greece	-
Myc-Smad2Δc	Dr. Rik Derynck, University of California, San Francisco, CA	(Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997)
Myc-Smad3Δc	Dr. Rik Derynck, University of California, San Francisco, CA	(Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997)
Myc-Smad4Δc	Dr. Rik Derynck, University of California, San Francisco, CA	(Zhang et al., 1996; Zhang et al., 1997)
NF-κB-luc	Dr. Christoph Esslinger, Ludwig Institute for Cancer Research, University of Lausanne, Switzerland	(Esslinger et al., 1998)
p15-luc	Dr. Αριστέιδης Μουστάκας, Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden	(Moustakas and Kardassis, 1998)
p21-luc	Dr. Δημήτρης Καρδάσης, Institute of Molecular Biology, Heraklion, Crete, Hellas	(Kardassis et al., 1999)
p27-luc	Dr. A. Moro, Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia, Havana, Cuba	(Moro et al., 2000)
pBKS-Iνχμπίνη-β <sub>A</sub>	Bender	(Murata et al., 1988)
RN-tre	Dr. Pier Paolo Di Fiore, European Institute of Oncology, Milan, Italy	(Lanzetti et al., 2000)
SBE-luc	Dr. Peter ten Dijke, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam	(Dennler et al., 1998)
SV40-luc	Promega	-

### 2.7.2 Κατασκευή και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την αναφορά (He et al., 1998) και η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην ιστοσελίδα ([www.coloncancer.org/adeasy.htm](http://www.coloncancer.org/adeasy.htm)) (Εικόνα 3). Όλοι οι φορείς και τα στελέχη βακτηρίων για την δημιουργία των αδενοϊών ήταν ευγενική προσφορά του Bert Vogelstein (The John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD).



Εικόνα 3. Σχηματική περιγραφή του συστήματος AdEasy. Το γονίδιο προς μελέτη πρώτα κλωνοποιείται στον κατάλληλο παλινδρομικό φορέα (π.χ. pAdTrack-CMV). Το πλασμίδιο που δημιουργείται ευθυγραμμίζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI, και χρησιμοποιείται για τον μετασχηματισμό κυττάρων E.coli BJ5183 μαζί με πλασμίδιο που φέρει το γονιδίωμα του αδενοϊού (π.χ. pAdEasy-1) χωρίς τα γονίδια αναδιπλασιασμού E1 και E3. Η επιλογή αποικιών με ανασυνδυασμένα πλασμίδια έγινε ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και ο ανασυνδυασμός ελέγχθηκε με περιοριστική ανάλυση με ενδονουκλεάσες. Τελικά το ευθυγραμμισμένο με PacI ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για την διαμόλυνση κυτταρικής σειράς πακεταρίσματος π.χ. 911 ή 293. Τα σημεία "left arm" και "right arm" αντιπροσωπεύουν τις περιοχές όπου γίνεται ο ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του παλινδρομικού φορέα και του φορέα του αδενοϊού.

Η ινχιμπίνη-β<sub>A</sub> απομονώθηκε από την κατασκευή pBKS-Ινχιμπίνη-β<sub>A</sub> με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI/XhoI και κλωνοποιήθηκε στον φορέα pGEM (pGEM-

ινχιμπίνη-β<sub>A</sub>) Το θραύσμα NotI από την κατασκευή pGEM-ινχιμπίνη-β<sub>A</sub> υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pADTrack-CMV στην θέση NotI του πολυσυνδέτη έπειτα από αποφωσφορυλίωση με την φωσφατάση Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) από την εταιρία Fermentas. Ο συνεχώς ενεργός υποδοχέας της ακτιβίνης A, ALK4T206D, κλωνοποιήθηκε ως KpnI-XbaI θραύσμα στις αντίστοιχες θέσεις του πολυσυνδέτη στον φορέα έκφρασης pADTrack-CMV. Τμήμα SnaBI-SmaI της FLAG-SARAΔ1-664 κλωνοποιήθηκε στην θέση EcoRV του φορέα pADTrack-CMV. Στις περιπτώσεις των Rab πρωτεϊνών η Myc-Rab5S34N και η Myc-Rab5Q79L κλωνοποιήθηκαν στην θέση BglIII του πολυσυνδέτη στον φορέα pADTrack-CMV. Η συνεχώς ενεργή μορφή της Smad3 κλωνοποιήθηκε ως τμήμα BamHI/HindIII στις θέσεις BglIII/HindIII του φορέα pADTrack-CMV. Ανασυνδυασμένος αδενοϊός που εκφράζει την μη ενεργή μορφή της πρωτεΐνης Smad4 ήταν προσφορά του κ. Αριστεΐδη Μουστάκα (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden).

Για την δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια BJ5183 επιδεκτικά για ηλεκτροδιάτρηση (He et al., 1998). Έτσι, καθένα από τα παραπάνω πλασμίδια υποβλήθηκε σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI και αναμειχθηκε με τον σκελετό-φορέα pAdEasy1 που περιέχει όλο το γονιδίωμα του αδενοϊού εκτός από τις περιοχές των πρώιμων γονιδίων E1 και E3. Η επιλογή των αποικιών έγινε με την χρήση 50 μg/ml αντιβιοτικού καναμυκίνη (Sigma). Οι αποικίες αναλύθηκαν αρχικά σε πήγμα αγαρόζης ανάλογα με το υπερελικωμένο μέγεθος του DNA τους αλλά και με ενδεικτικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PacI και BamHI.

Για την παραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά πακεταρίσματος 293 (packaging line) η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των παραγόμενων αδενοϊών προμηθεύοντας τους με τα προϊόντα των γονιδίων που τους λείπουν E1 και E3. Έτσι τα παραπάνω ανασυνδυασμένα πλασμίδια μετά από πέψη με την ενδονουκλεάση PacI, χρησιμοποιούνται για την διαμόλυνση κυττάρων 293 με την χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου LipofectAMINE Plus (Life Technologies) σε υλικό OptiMEM (Invitrogen). Οι αδενοϊοί που παράχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή μεγάλης κλίμακας αδενοϊών μετά από διαδοχικές ενισχύσεις.

Η τιτλοποίηση των αδενοϊών έγινε με την διαδικασία δημιουργίας πλακών. Κύτταρα 293 καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο των 6 φρεατίων σε συγκέντρωση 500.000 κύτταρα/φρεάτιο μέχρι το 80%-90% της πληρότητάς τους. Την επόμενη ημέρα μολύνθηκαν με διάφορες αραιώσεις αδενοϊού ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  κ.λ.π.). Μετά από 4 ώρες

μόλυνσης τα κύτταρα επικαλύφθηκαν με μείγμα επικάλυψης που περιείχε 20 mM HEPES, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% αγαρόζη σε θρεπτικό υλικό RPMI. Η εμφάνιση των πλακών έγινε μετά από 7-10 ημέρες ενώ έγιναν συνεχείς μετρήσεις μέχρι την πλήρη εμφάνιση των πλακών.

## 2.8 Δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς

Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 6 φρεατίων σε συγκέντρωση 5x10<sup>5</sup> κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με την χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου LipofectAMINE ή LipofectAMINE Plus (Life Technologies) σε υλικό OptiMEM (Invitrogen). Περιληπτικά, χρησιμοποιήθηκε 1 μg συνολικής ποσότητας DNA ανά φρεάτιο, διαλυμένο σε 100 μl OptiMEM. Στην συνέχεια, προστέθηκε αντιδραστήριο LipofectAMINE Plus 6 μl και ακολούθησε επώαση 15 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Λιπίδιο LipofectAMINE Plus 4 μl διαλυμένο σε 0,8 ml OptiMEM προστέθηκε στο διάλυμα με το DNA και ακολούθησε μια επιπλέον επώαση 15 λεπτών πριν το μίγμα προστεθεί στα κύτταρα. Στις περιπτώσεις όπου έγινε χρήση ανασυνδυασμένων αδενοϊών, τα κύτταρα πρώτα μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς για 2 ώρες και μετά έγινε διαμόλυνση των κυττάρων με τα παραπάνω αντιδραστήρια. Το υλικό OptiMEM αντικαταστάθηκε και στις δύο περιπτώσεις με πλήρες θρεπτικό υλικό μετά από 4 ώρες διαμόλυνσης. Στην συνέχεια, χορηγήθηκε στα κύτταρα ακτιβίνη A 50 ng/ml (προσφορά του Dr. Y. Eto Central Research Laboratories, Kawasaki, Japan, (Eto et al., 1987)) παρουσία ή απουσία (0,2% NCS) ορού ανάλογα με τις συνθήκες των πειραματικών διαδικασιών και ανάλογα με το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιείται ανά περίπτωση όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Ύστερα από συνολική επώαση 16 ωρών το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και συλλέχθηκαν τα κυτταρικά εκχυλίσματα.

Η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης έγινε με το εμπορικό προϊόν της Promega Luciferase Assay System (Promega Biosciences Inc., Mannheim, Germany) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Περιληπτικά, εκχυλίσματα κυττάρων συλλέχθηκαν μετά την διαδικασία διαμόλυνσης σε διάλυμα λύσης (160 μl/φρεάτιο). Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν απευθείας σε υγρό άζωτο, αφέθηκαν να ξεπαγώσουν και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415D) σε θερμοκρασία δωματίου για 30 δευτερόλεπτα. Όγκος 20 μl από κάθε υπερκείμενο αναλύθηκε ως προς την ενεργότητα λουσιφεράσης σε λουμινόμετρο Berthold (junior EG



G, Berthold). Μέρος των κυτταρικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Εκχυλίσματα των διαμολυσμένων κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση της ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης για τον προσδιορισμό του επιπέδου διαμόλυνσης των κυττάρων BBCE. Η δοκιμασία μέτρησης ενεργότητας της β-γαλακτοσιδάσης έχει προηγουμένα περιγραφεί (Hall et al., 1983). Μικρό μέρος κυτταρικού εκχυλίσματος αναμίχθηκε με διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0,1 M pH 7,5, διάλυμα μαγνησίου (0,1 M  $MgCl_2$ , 4,5 M β-μερκαπτοαιθανόλη) και ONPG (o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) σε τελική συγκέντρωση 1 mg/ml. Τα δείγματα επώαστηκαν μέχρι την εμφάνιση αχνού κίτρινου χρώματος στους 37 °C. Η απορρόφηση κάθε δείγματος μετρήθηκε στα 420nm ενώ κατώτερο και ανώτερο όριο γραμμικότητας θεωρούνται οι τιμές απορρόφησης 0,2 και 0,8 αντίστοιχα.

## 2.9 Δοκιμασίες πολλαπλασιασμού

### 2.9.1 με μέτρηση αριθμού κυττάρων

Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE μολύνθηκαν με τους ανάλογους αδenoϊούς όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων και το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε μετά από 2 ώρες μόλυνσης. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα διασπάρθηκαν σε τρυβλία των 12 φρεατίων σε συγκέντρωση 5.000 κύτταρα/φρεάτιο και 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα σε φρεάτια μάρτυρες μετρήθηκαν για να επιβεβαιωθεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων για κάθε περίπτωση μόλυνσης. Στα πειραματικά φρεάτια χορηγήθηκε παράγοντας FGF-2 (2,5 ng/ml) και δύο ημέρες αργότερα κύτταρα από τριάδες φρεατίων για κάθε περίπτωση μετρήθηκαν.

Κύτταρα νευροβλαστώματος WAC2 ή κερατινοκύτταρα HaCaT διασπάρθηκαν πρώτα σε τρυβλία των 12 φρεατίων σε συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/φρεάτιο και στη συνέχεια μολύνθηκαν με τους ανάλογους αδenoϊούς. Μετρήσεις κυττάρων από τριάδες φρεατίων έγιναν ανά 24 ώρες ξεκινώντας μία μέρα μετά την μόλυνση.

Για τις καμπύλες ανάπτυξης κυττάρων νευροβλαστώματος, SH-EP007, WAC2 και WAC2 κυττάρων που εκφράζουν ακτιβίνη A (Wact1, Wact2 και Wact5) τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 12 φρεατίων σε συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/φρεάτιο. Μετρήσεις κυττάρων από τριάδες φρεατίων έγιναν για έξι συνεχόμενες ημέρες ενώ το θρεπτικό υλικό ανανεώνονταν κάθε δεύτερη μέρα.

Όλες οι κυτταρικές μετρήσεις έγιναν με τον μετρητή σωματιδίων Coulter particle Counter .(Beckman Coulter Inc.)

### 2.9.2 με ενσωμάτωση [<sup>3</sup>H] μεθυλοθυμιδίνης

Κύτταρα BBCE διασπάρθηκαν σε τρυβλία των 24 φρεατίων σε συγκέντρωση 80.000 κύτταρα/φρεάτιο και 24 ώρες αργότερα χορηγήθηκε FGF-2 (2,5 ng/ml) παρουσία ή απουσία ακτιβίνης A (50 ng/ml) για 24 ώρες. Εναλλακτικά, τα κύτταρα μολύνθηκαν με τους ανάλογους αδενοϊούς και το θρεπτικό υλικό ανανεώθηκε μετά από 2 ώρες ενώ την επόμενη ημέρα χορηγήθηκε FGF-2 (2,5 ng/ml) για 24 ώρες. Κύτταρα μολυσμένα σε φρεάτια μάρτυρες μετρήθηκαν μετά την επώαση με τον FGF-2 για να επιβεβαιωθεί ο ίδιος αριθμός κυττάρων. Και στις δύο περιπτώσεις μολυσμένων ή μη μολυσμένων κυττάρων, 1 μCi/ml [<sup>3</sup>H] μεθυλοθυμιδίνης (ICN Biomedical Inc., Costa Mesa, CA) προστέθηκε σε κάθε φρεάτιο για τις 4 τελευταίες ώρες της επώασης με τους αντίστοιχους παράγοντες. Στην συνέχεια το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 0,5 ml κρύο τριχλωροξικό οξύ 10% για 20 λεπτά στους 4°C και μετά από τρεις πλύσεις με νερό, διαλυτοποιήθηκαν σε 0,5 ml 0,1 M NaOH για 16 ώρες στους 4 °C. Η ραδιενεργή θυμιδίνη που ενσωματώθηκε στο DNA αντιπροσωπεύει τα κύτταρα που πολλαπλασιάζονται και μετρήθηκε σε μετρητή β-σπινθηρισμού μετά την προσθήκη 2 ml υγρού βήτα σπινθηρισμού.

Στις πειραματικές δοκιμασίες ενσωμάτωσης [<sup>3</sup>H] μεθυλοθυμιδίνης όπου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HUVE, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 24 φρεατίων σε συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/φρεάτιο και μολύνθηκαν με ανσυνδυασμένους αδενοϊούς για συνολικά 30 ώρες ενώ μετά τις 2 πρώτες ώρες της μόλυνσης το θρεπτικό υλικό ανανεώθηκε. Τα κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού (5 % FBS) για 12 ώρες και στην συνέχεια χορηγήθηκαν 50 ng/ml VEGF (R&D Systems, Inc.) για επιπλέον 24 ώρες. Τις τελευταίες 6 ώρες της επώασης προστέθηκε 1 μCi/ml [<sup>3</sup>H] μεθυλοθυμιδίνης σε κάθε φρεάτιο. Με το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και η ραδιενεργή ενσωματωμένη θυμιδίνη μετρήθηκε όπως ακριβώς αναφέρεται στην περίπτωση των κυττάρων BBCE.

### 2.9.3 με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης

Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm και σε συγκέντρωση 60.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα υπέστησαν μικροενέσεις είτε με 100 ng DNA της συνεχώς ενεργής Smad2 είτε με

100 ng DNA της κατασκευής CD39-GFP. Η τελευταία χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, και περιέχει την διαμεμβρανική περιοχή της πρωτεΐνης CD39 συζευγμένη με την πρωτεΐνη GFP και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Τα κύτταρα, 24 ώρες αργότερα, επεξεργάστηκαν με 100  $\mu$ M βρωμοδεόξυ ουριδίνη (BrdU) από την εταιρία Sigma, για επιπλέον 3 ώρες. Στο τέλος της 3ωρης επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3% και εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεύδης με 50 mM χλωριούχο αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Στην συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0,1% για 4 λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Η δέσμευση των μη ειδικών σημείων έγινε με ορό 10% (10% FCS) και για 30 λεπτά και ακολούθησε μια ώρα επώαση με τα αντισώματα αντι-Myc και αντι-GFP (κ. Σάββα Χριστοφορίδη) σε αραιώση 1:3000 και 1:500 αντίστοιχα. Έπειτα από πλύση με PBS έγινε επώαση με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθιοκυανική ροδαμίνη (TRICH) σε αραιώση 1:200 και για μια ώρα. Ακολούθησε μονιμοποίηση των αντισωμάτων με διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3% και επεξεργασία με 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Στην συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με 1,5 M υδροχλωρικό οξύ (HCl) με σκοπό την αποδιάταξη του DNA, ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με PBS και κάλυψη των μη ειδικών θέσεων για 30 λεπτά με 10% FCS. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν επώσεις πρώτα με αντίσωμα έναντι στην BrdU (αντι-BrdU, Sigma) σε αραιώση 1:100 και έπειτα με αντίσωμα συζευγμένο με ισοθιοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε 5% FCS. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθιοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRICH) προήλθαν από την εταιρία Dianova. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS.

## 2.10 Δοκιμασία μετακίνησης ενδοθηλιακών κυττάρων

Κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 24 φρεατίων έτσι ώστε να καλύπτουν όλη την επιφάνεια του ταπητίου. Έπειτα από 24 ώρες, η μονοστιβάδα των κυττάρων τραυματίστηκε με την χρήση ενός πλαστικού ξύστη και εικόνες της τραυματισμένης περιοχής ελήφθησαν κάτω από μικροσκόπιο. Οι τραυματισμένες καλλιέργειες εκτέθηκαν σε θρεπτικό υλικό μόνο ή μόνο σε FGF-2 (2,5 ng/ml) ή μόνο σε ακτιβίνη A (60 ng/ml) ή

σε FGF-2 και ακτιβίνη A για την ενεργοποίηση της μετακίνησης προς την τραυματισμένη περιοχή, και φωτογραφήθηκαν 8 ώρες μετά την προσθήκη των παραγόντων. Τα κύτταρα που μετακινήθηκαν προς την τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά mm<sup>2</sup> τραυματισμένης περιοχής. Συνολικά τέσσερα πεδία αναλύθηκαν σε κάθε πειραματική διαδικασία (περίπου 300 κύτταρα μετρήθηκαν σε κάθε πείραμα), ενώ η όλη πειραματική δοκιμασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

## 2.11 Δοκιμασία ζυμογραφικής ανάλυσης

Κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 6 φρεατίων σε συγκέντρωση  $5 \times 10^5$  κύτταρα/φρεάτιο. Το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με φρέσκο 24 ώρες πριν την προσθήκη των παραγόντων προς ανάλυση. Οι καλλιέργειες εκτέθηκαν μόνο σε θρεπτικό υλικό ή μόνο σε FGF-2 (2,5 ng/ml) ή μόνο σε ακτιβίνη A (60 ng/ml) ή σε FGF-2 και ακτιβίνη A και επώαστηκαν για 15 ώρες στους 37°C. Στις καλλιέργειες, αφού εκπλύθηκαν δύο φορές με φωσφορικό φυσιολογικό διάλυμα (PBS), προστέθηκαν σε 2ml θρεπτικού υλικού χωρίς ορό, το οποίο περιείχε 200 KIU/ml τραζυλόλης (trasylol), και τους παράγοντες προς ανάλυση. Κυτταρικά εκχυλίσματα και υπερκείμενα των καλλιεργειών συλλέχθηκαν ύστερα από 3 ώρες επώαση. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν σε 0,3 ml διαλύματος 0,1 M TRIS-HCl που περιείχε 0,2% Triton X-100 και 200 KIU/ml τραζυλόλης. Στις περιπτώσεις μόλυνσης με αδενοϊούς, πλήρεις καλλιέργειες κυττάρων BBCE μολύνθηκαν και το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε ύστερα από 2ωρη επώαση. Ύστερα από 24 ώρες οι μολυσμένες καλλιέργειες εκτέθηκαν είτε μόνο σε θρεπτικό υλικό είτε σε FGF-2 (2,5 ng/ml) και επώαστηκαν για επιπλέον 15 ώρες στους 37°C. Στην συνέχεια, οι καλλιέργειες εκπλύθηκαν όπως προαναφέρθηκε και επώαστηκαν σε θρεπτικό υλικό χωρίς ορό που περιείχε τραζυλόλη (200 KIU/ml) παρουσία ή απουσία FGF-2. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν όπως αναφέρεται παραπάνω. Η ζυμογραφική ανάλυση εκτελέστηκε ακριβώς όπως αναφέρεται στις βιβλιογραφικές αναφορές (Pepper et al., 1990; Vassalli et al., 1984). Πιο συγκεκριμένα τα δείγματα χωρίς να υποστούν βράσιμο, υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου 12% και σε χαμηλή ισχύ ρεύματος (30 mA). Στην συνέχεια το πήγμα ακρυλαμιδίου εκπλύθηκε δύο φορές με 2,5% Triton X-100 και δύο φορές με PBS (20 λεπτά η κάθε πλύση) και τοποθετήθηκε πάνω σε πήγμα υποστρώματος που περιείχε 0,8% αγαρόζη, 1,5% ξηρό άπαχο γάλα (Carnation instant non-fat dry milk) και 80 μg/ml πλασμινογόνο σε PBS. Το μείγμα ετοιμάστηκε στους 45°C και τοποθετήθηκε προς πήξη

εντός γυάλινων πλακών σε θερμοκρασία δωματίου. Τα ζυμογραφήματα φωτογραφήθηκαν σε σκοτεινό υπόβαθρο ύστερα από 15-24 ώρες επώαση στους 37°C και σε ελαφρά υγρές συνθήκες.

## 2.12 Δοκιμασία ανάπτυξης ξενομοσχευματικών όγκων σε ποντίκια

Τα *in vivo* πειράματα ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια πραγματοποιήθηκαν στην Νορβηγία από τον Dr. Einar Rofstad (Department of Biophysics, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway). Επιγραμματικά, ποντίκια BALB/c *nu/nu* 8-10 εβδομάδων χρησιμοποιήθηκαν ως ζώα ξενιστές. Για την εκτίμηση του ρυθμού αύξησης των όγκων,  $1 \times 10^6$  διαμολυσμένα κύτταρα WAC2 σε 10 μl ισορροπιστικό διάλυμα αλάτων Hank's ( $\text{Ca}^{2+}$ - and  $\text{Mg}^{2+}$ -free Hank's balanced salt solution, HBSS) εμβολιάστηκαν ενδοδερμικά στα πλευρά των ποντικίων. Το μέγεθος των όγκων (V) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση  $V = (\pi/6)ab^2$ , όπου a είναι η μεγαλύτερη και όπου b η μικρότερη από τις δυο κάθετες διαμέτρους που μετρήθηκαν με Calipers. Ο όγκος τέσσερις εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως παράμετρος για τον ρυθμό αύξησης των όγκων. Η αγγειογένεση των όγκων προσδιορίστηκε με την δοκιμασία ενδοδερμικής αγγειογένεσης (Rofstad and Halsor, 2000). Ο εμβολιασμός των WAC2 διαμολυνσμένων κυττάρων πραγματοποιήθηκε όπως για τον ρυθμό αύξησης των όγκων και τα ποντίκια θυσιάστηκαν την έβδομη ημέρα μετά τον εμβολιασμό.

## 2.13 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων όσον αφορά τις δοκιμασίες ανάπτυξης ξενομοσχευματικών όγκων σε ποντίκια έγινε με το τεστ Mann-Whitney μη-παραμετρικά και έπειτα από την δοκιμασία *t*-τέστ, χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό SPSS 10.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Τα κριτήρια σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκαν είναι της τάξεως  $P < 0,05$ .

Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, τρεις ή περισσότερες ομάδες συγκρίθηκαν με το τεστ Anova, ανάλυση post hoc (post hoc analysis) και ομαλοποίηση LSD (LSD correction) χρησιμοποιώντας το στατιστικό λογισμικό SPSS 10.0. Τα κριτήρια σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκαν είναι της τάξεως  $P < 0,05$ .

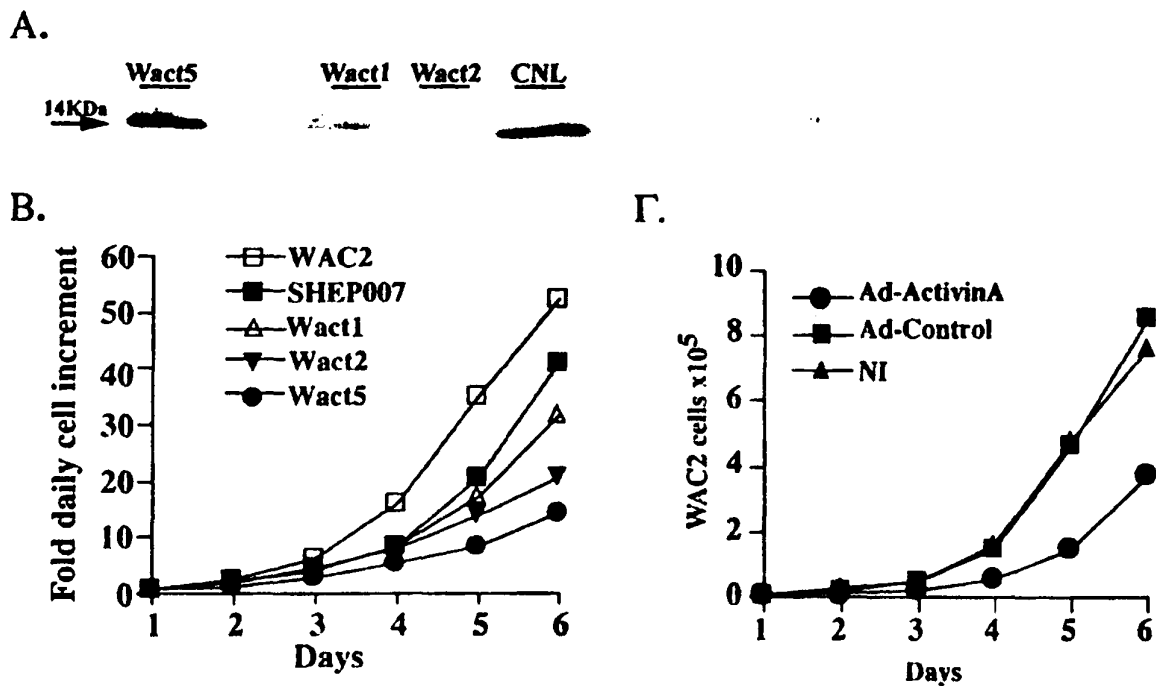
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Η ακτιβίνη A παίζει σημαντικό ρόλο στον κακοήγη μετασχηματισμό του νευροβλαστώματος

Προηγούμενα πειράματα μας έχουν δείξει ότι η ακτιβίνη A i) ρυθμίζεται αρνητικά από το ογκογονίδιο *N-Myc* σε κύτταρα νευροβλαστώματος, και ii) είναι αναστολέας της αγγειογένεσης στην δοκιμασία χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης σε όρνιθα (Breit et al., 2000). Ως μέλος της οικογένειας των παραγόντων TGF-β/ακτιβίνης, οι οποίοι είναι γνωστοί αναστολείς του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είναι εύλογο να σκεφτεί κανείς ότι η ακτιβίνη A μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στον κακοήγη μετασχηματισμό του νευροβλαστώματος αναστέλλοντας άμεσα τον πολλαπλασιασμό των νευροβλαστωμάτων. Επίσης, σαν αναστολέας της αγγειογένεσης, θα ήταν δυνατό να επηρεάζει έμμεσα τον κακοήγη φαινότυπο των νευροβλαστωμάτων.

##### 3.1.1 Η ακτιβίνη A αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων νευροβλαστώματος

Για να εξετάσουμε την σημασία της ακτιβίνης A στον κακοήγη μετασχηματισμό, αναζητήσαμε πρωταρχικές ενδείξεις για τον ρόλο της ακτιβίνης A στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό κυττάρων νευροβλαστώματος. Για τον σκοπό αυτό, εισάγαμε εκ νέου το γονίδιο της ακτιβίνης A στα κύτταρα νευροβλαστώματος WAC2 με σταθερή διαμόλυνση κατασκευής που περιέχει ολόκληρη την κωδικεύουσα περιοχή της β<sub>A</sub>-υπομονάδας της ανθρώπινης ινχιμπίνης, η οποία βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του υποκινητή του κυτομεγαλοϊού (CMV). Αφού ο υποκινητής CMV δεν επηρεάζεται αρνητικά από την υπερέκφραση του ογκογονιδίου *N-Myc* στην κυτταρική σειρά WAC2, μπορέσαμε να απομονώσουμε τρεις κλώνους που εκφράζουν την ακτιβίνη A σε υψηλά επίπεδα. Για λόγους συντομίας οι κλώνοι αυτοί αναφέρονται ως Wact1, Wact2, και Wact5. Από αυτούς ο κλώνος Wact5 παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση ακτιβίνης A (Εικόνα 4, A). Για να διερευνήσουμε την επίδραση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό κυττάρων νευροβλαστώματος, μετρήσαμε τον αριθμό κυττάρων από τις διαφορετικές κυτταρικές σειρές για έξι συνεχόμενες ημέρες. Έτσι, και οι τρεις κλώνοι που εκφράζουν ακτιβίνη A παρουσίασαν σημαντική μείωση στον ρυθμό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με την μητρική κυτταρική σειρά WAC2 (Εικόνα 4, B). Επιπλέον, η κυτταρική σειρά SH-EP007



**Εικόνα 4.** Η ακτιβίνη Α αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων νευροβλαστώματος. Α, Το γονίδιο της ακτιβίνης Α εισήχθη στα κύτταρα νευροβλαστώματος WAC2 με σταθερή διαμόλυνση. Κυτταρικά εκχυλίσματα των κλώνων που επιλέχθηκαν αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Β, Κύτταρα WAC2, SHEP007 και WAC2 κλώνοι που προήλθαν από την διαμόλυνση με ακτιβίνη Α, τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 12 φρεατίων και σε συγκέντρωση 10.000 κυττάρων ανά φρεάτιο. Κύτταρα από τριάδες φρεατίων μετρήθηκαν για 6 συνεχόμενες ημέρες. Γ, Κύτταρα WAC2 τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 12 φρεατίων σε συγκέντρωση 10.000 κυττάρων ανά φρεάτιο και μολύνθηκαν για δύο ώρες με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και ακτιβίνη Α (Ad-ActivinA). Τριάδες φρεατίων μετρήθηκαν για 6 συνεχόμενες ημέρες ξεκινώντας μία μέρα μετά την μόλυνση, ενώ το θρεπτικό υλικό ανανεώθηκε τις ημέρες 3 και 5. NI (Non Infected): κύτταρα WAC2 που δεν έχουν μολυνθεί.

με την χαμηλή έκφραση του N-myc ογκογονιδίου, παρουσίασε μειωμένο ρυθμό πολλαπλασιασμού συγκρινόμενη με την σειρά WAC2, αλλά σαφέστατα υψηλότερο σε σύγκριση με τους κλώνους που υπερεκφράζουν ακτιβίνη Α. Η μείωση αυτή του ρυθμού ανάπτυξης συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης της ακτιβίνης Α στην κάθε κυτταρική σειρά. Έτσι, ισχυρή έκφραση της ακτιβίνης Α στα κύτταρα WAC2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό τους.

Η έντονη αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού από την ακτιβίνη Α στα WAC2 κύτταρα επιβεβαιώθηκε και με την χρήση ανασυνδυασμένου αδενοϊού που εκφράζει ακτιβίνη Α. Έτσι, κύτταρα WAC2 που μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει ακτιβίνη Α (Ad-Activin A) παρουσίασαν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με κύτταρα WAC2 που μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει μόνο GFP (Ad-Control) ή με κύτταρα WAC2 που δεν έχουν μολυνθεί με αδενοϊό (NI) (Εικόνα 4, Γ).

Η φανερή δράση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων νευροβλαστώματος αναδεικνύει την μεγάλη σημασία που μπορεί να έχει ο παράγοντας αυτός στην διαδικασία του κακοήθου μετασχηματισμού.

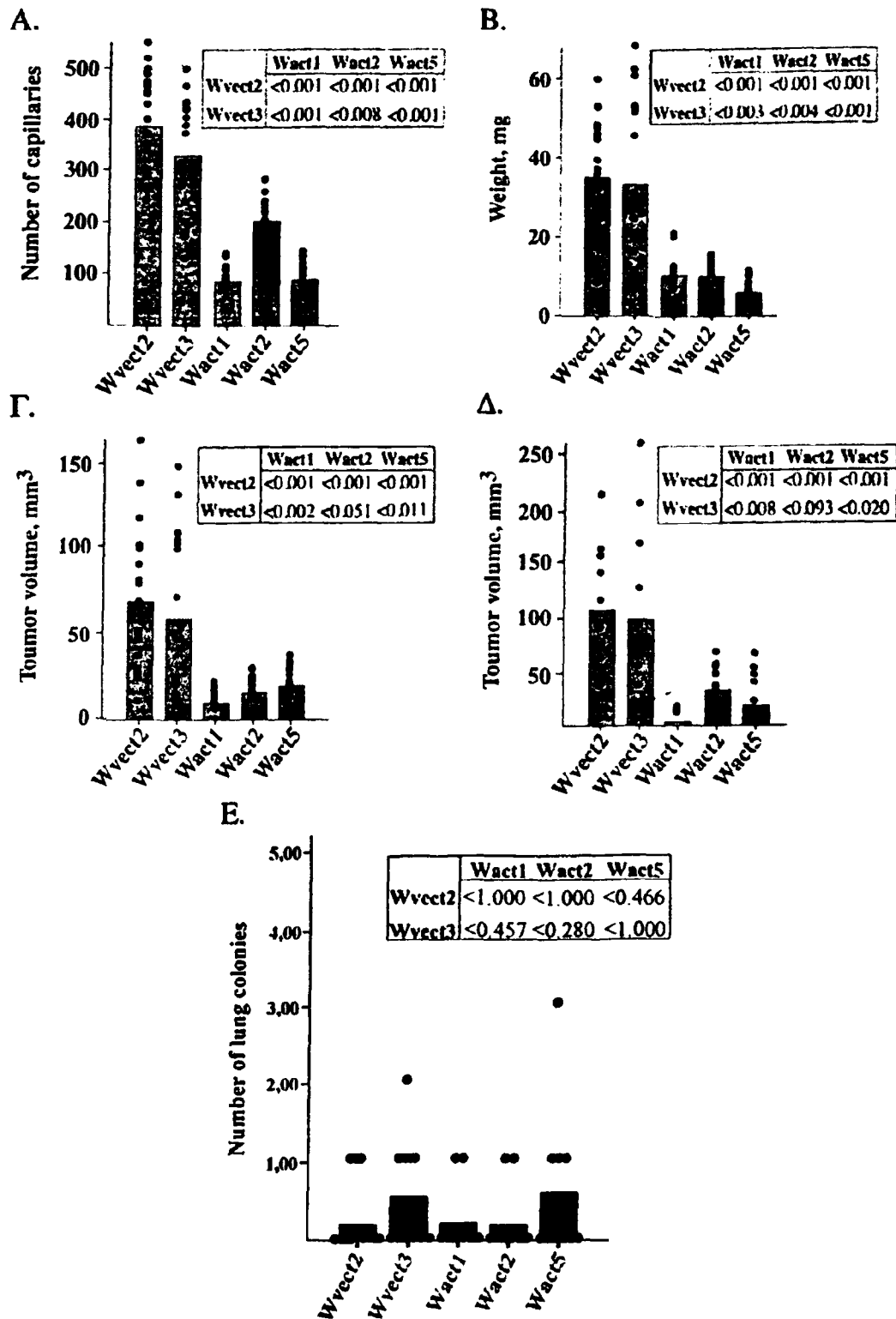
### **3.1.2 Η ακτιβίνη A αναστέλλει την ανάπτυξη όγκων νευροβλαστώματος σε δοκιμασίες ξενομοσχευμάτων σε ποντίκια· οι ξενομοσχευματικοί όγκοι έχουν μειωμένη αγγείωση**

Για την μελέτη της δράσης της ακτιβίνης A *in vivo* πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες ογκογένεσης σε ποντίκια. Όλες οι *in vivo* δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στην Νορβηγία σε συνεργασία με τον Dr. E. Rofstad. Οι κλώνοι που εκφράζουν ακτιβίνη A αυξάνονται με αργότερο ρυθμό σαν ξενομοσχεύματα σε ποντίκια σε σύγκριση με τους WAC2 κλώνους μάρτυρες, Wvect2 και Wvect3, που προήλθαν ύστερα από διαμόλυνση με φορέα που δεν περιέχει κάποιο γονίδιο (Εικόνα 5, Β-Δ). Πράγματι, επτά ημέρες μετά την ενδοδερμική εμφύτευση στα πλευρά, σε ανοσοανεπαρκή ποντίκια το μέγεθος των όγκων ήταν σημαντικά μικρότερο και στους τρεις κλώνους που εκφράζουν ακτιβίνη A σε σύγκριση με τους κλώνους μάρτυρες, Wvect2 και Wvect3 (Εικόνα 5, Β και Γ). Στο ίδιο χρονικό διάστημα, ο αριθμός των αγγείων ήταν σημαντικά μειωμένος στους κλώνους Wact1, Wact2, και Wact5 σε σύγκριση με τους κλώνους-μάρτυρες (Εικόνα 5, Α). Στα ποντίκια, τα οποία θυσιάστηκαν τέσσερις εβδομάδες μετά την ενδοδερμική εμφύτευση, οι WAC2 κλώνοι που εκφράζουν ακτιβίνη A συνέχισαν να δείχνουν μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης (Εικόνα 5, Δ). Επίσης, σε δοκιμασίες μετάστασης στον πνεύμονα δεν υπήρξε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των WAC2 κλώνων που εκφράζουν ακτιβίνη A σε σύγκριση με τους κλώνους μάρτυρες (Εικόνα 5, Ε).

### **3.2 Η ακτιβίνη A ρυθμίζει σημαντικές ανταποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων**

Τα πειράματα σε ποντίκια έδειξαν σαφώς ότι η έκφραση της ακτιβίνης A αναστέλλει την ανάπτυξη ξενομοσχευματικών όγκων και ότι οι όγκοι αυτοί έχουν μειωμένη αγγειογένεση. Η παρατήρηση αυτή, σε συνδυασμό με προηγούμενα πειράματα της ομάδας μας χρησιμοποιώντας την δοκιμασία της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης, κατέδειξε ότι η ακτιβίνη A, παράλληλα με άλλες δραστηριότητες της, είναι επίσης ένας αναστολέας της αγγειογένεσης. Η διαδικασία της αγγειογένεσης περιλαμβάνει τρία σημαντικά στάδια όπως η διάσπαση της βασικής αγγειακής μεμβράνης, η μετανάστευση των ενδοθηλιακών





Εικόνα 5. Οι κλώνοι που εκφράζουν ακτιβίνη A μεγαλώνουν πιο αργά ως ξενομοσχεύματα σε ποντίκια σε σύγκριση με τους κλώνους μάρτυρες Wvect2 και Wvect3. Αθυμικά ποντίκια (nude mice) BALB/c *nu/nu*, εμβολιάστηκαν ενδοδερμικά με  $1 \times 10^6$  κύτταρα WAC2 διαμολυσμένα είτε με φορέα που περιέχει την ακτιβίνη A (Wact1, Wact2 και Wact5) είτε με φορέα μάρτυρα (Wvect2 και Wvect3). Ο αριθμός των αγγείων (Α), το βάρος (Β) το μέγεθος (Γ και Δ) και η μεταστατική ικανότητα (Ε) των όγκων που προέρχονται από τα κύτταρα που εκφράζουν ακτιβίνη A, προσδιορίστηκαν μετά από 7 (Α-Γ) ή 28 (Δ) ημέρες και συγκρίθηκαν με αυτούς που προέρχονται από κύτταρα μάρτυρες. Τα σύμβολα (γεμάτοι κύκλοι) συμβολίζουν τον αριθμό των ποντικίων και οι ενθέσεις δείχνουν την στατιστική σημαντικότητα ( $P$ ). Κριτήριο σημαντικότητας της τάξης  $p < 0,005$  χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις.

κυττάρων στον εξωκυττάριο χώρο και ο πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων για τον σχηματισμό του νεοσύστατου αγγείου. Αναζητήσαμε λοιπόν ενδείξεις για την δράση της ακτιβίνης A σε καθένα από αυτά τα στάδια.

### **3.2.1 Η ακτιβίνη A αναστέλλει την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων στα ενδοθηλιακά κύτταρα**

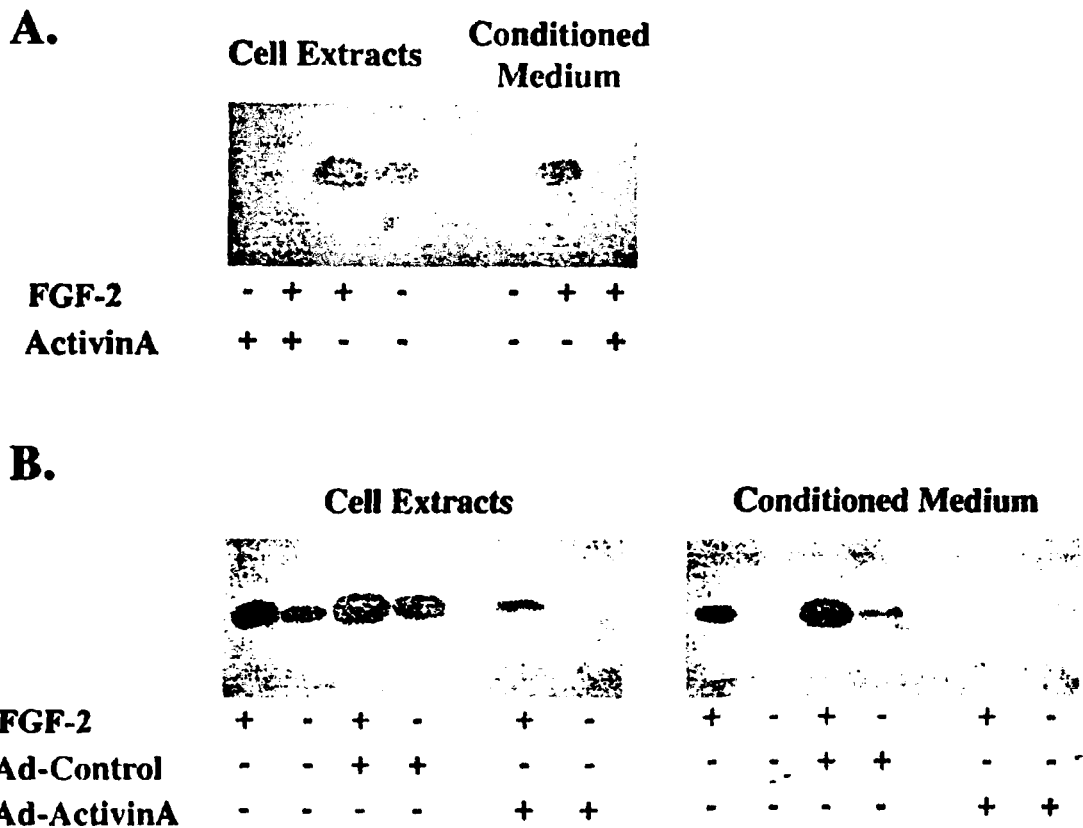
Αγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας (FGF-2) διεγείρουν την έκκριση ποικίλων πρωτεασών και ενεργοποιητών του πλασμινογόνου από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μια διαδικασία που συνεπάγεται την διάσπαση της βασικής μεμβράνης.

Για να εξετάσουμε εάν η ακτιβίνη A αλλάζει την ισορροπία πρωτεόλυσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα πραγματοποιήσαμε πειράματα ζυμογραφίας. Για τον σκοπό αυτό, υπερκείμενα και κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν από κύτταρα BBCE, τα οποία είχαν διεγερθεί με FGF-2 ή ακτιβίνη A ή με FGF-2 και ακτιβίνη A. Η ανάλυση ζυμογραφίας έδειξε ότι ο παράγοντας FGF-2 (2,5 ng/ml) αυξάνει την δραστικότητα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ουροκινάσης (u-PA), ενώ η ακτιβίνη A (60 ng/ml) την μειώνει σημαντικά (Εικόνα 6, A). Επιπλέον, κυτταρικά εκχυλίσματα και υπερκείμενα από κύτταρα BBCE που επεξεργάστηκαν με τον παράγοντα FGF-2 μαζί με ακτιβίνη A έδειξαν ότι η ενεργότητα της u-PA αναστέλλεται από την ακτιβίνη A σε βασικές συνθήκες (μόνο ορός), αλλά και μετά από επαγωγή με FGF-2 (Εικόνα 6, A).

Παρόμοια, κυτταρικά εκχυλίσματα και υπερκείμενα από κύτταρα BBCE, τα οποία μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) ή GFP και ακτιβίνη A (Ad-Activin A), έδειξαν ότι η Ad-Activin A αναστέλλει την FGF-2 επαγόμενη αλλά και την βασική ενεργότητα της u-PA (Εικόνα 6, B).

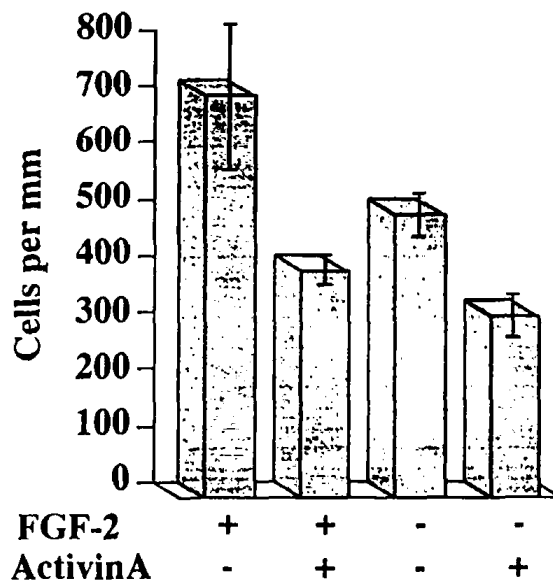
### **3.2.2 Η ακτιβίνη A αναστέλλει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων**

Με δεδομένη την δράση της ακτιβίνης A στην αλλαγή της πρωτεολυτικής ισορροπίας, θελήσαμε να διερευνήσουμε την δράση της στην μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλή κινητική ενεργότητα, και αυτή τους η λειτουργία είναι πολύ σημαντική για την διατήρηση της αγγειακής πλαστικότητας. Η μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργεια μπορεί να ρυθμιστεί με τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Προς αυτό τον σκοπό πραγματοποιήθηκαν



Εικόνα 6. Η ακτιβίνη Α αναστέλλει την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Α, Πλήρεις καλλιέργειες BBCE κυττάρων, εκτέθηκαν είτε μόνο σε θρεπτικό υλικό, είτε μόνο στον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα FGF-2 (2,5 ng/ml), είτε μόνο σε ακτιβίνη Α (60 ng/ml) είτε σε FGF-2 και ακτιβίνη Α. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα και τα υπερκείμενα των καλλιεργειών αναλύθηκαν ως προς την πρωτεολυτική ικανότητά τους σε δοκιμασίες ζυμογραφίας. Β, Κύτταρα BBCE σε πλήρεις καλλιέργειες μολύνθηκαν για δύο ώρες με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και ακτιβίνη Α (Ad-ActivinA). Στις μολυσμένες καλλιέργειες έγινε επεξεργασία με FGF-2 (2,5 ng/ml) για συνολικό διάστημα 24 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα και τα υπερκείμενα των καλλιεργειών αναλύθηκαν όπως και στην περίπτωση Α. Τα ζυμογράμματα (Α και Β) φωτογραφήθηκαν σε σκοτεινό υπόβαθρο ύστερα από ολονύχτια επώαση στους 37 °C.

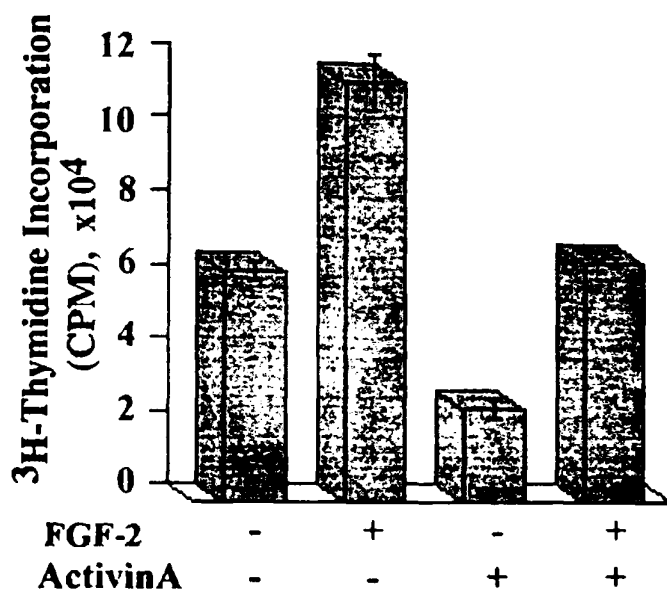
πειράματα όπου η επιφάνεια κυττάρων BBCE σε καλλιέργεια είχε τραυματιστεί. Η παρουσία του παράγοντα FGF-2 ώθησε τα κύτταρα να μετακινηθούν προς την κατεύθυνση της τραυματισμένης περιοχής. Τα αποτελέσματα στην Εικόνα 7 δείχνουν ότι παρουσία ακτιβίνης Α (50 ng/ml) προκαλείται μείωση του αριθμού κυττάρων που μετακινούνται στην τραυματισμένη περιοχή. Επιπλέον, είναι φανερό ότι η ακτιβίνη Α μείωσε και την FGF-2 επαγομένη αλλά και την βασική μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων που παρατηρείται απουσία FGF-2.



**Εικόνα 7. Η ακτιβίνη Α αναστέλλει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων.** Πλήρες ταπήτιο BBCE κυττάρων χαραχτηκε ελαφρά με το πλαστικό ρύγχος πιπέτας. Οι τραυματισμένες καλλιέργειες εκτέθηκαν είτε μόνο σε θρεπτικό υλικό, είτε μόνο σε FGF-2 (2,5 ng/ml), είτε μόνο σε ακτιβίνη Α (60 ng/ml) είτε σε FGF-2 και ακτιβίνη Α για 8 ώρες. Τα κύτταρα τα οποία πέρασαν στην τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά mm τραυματισμένης περιοχής. Τέσσερα πεδία μετρήθηκαν για κάθε πειραματική διαδικασία (περίπου 300 κύτταρα σε κάθε πείραμα).

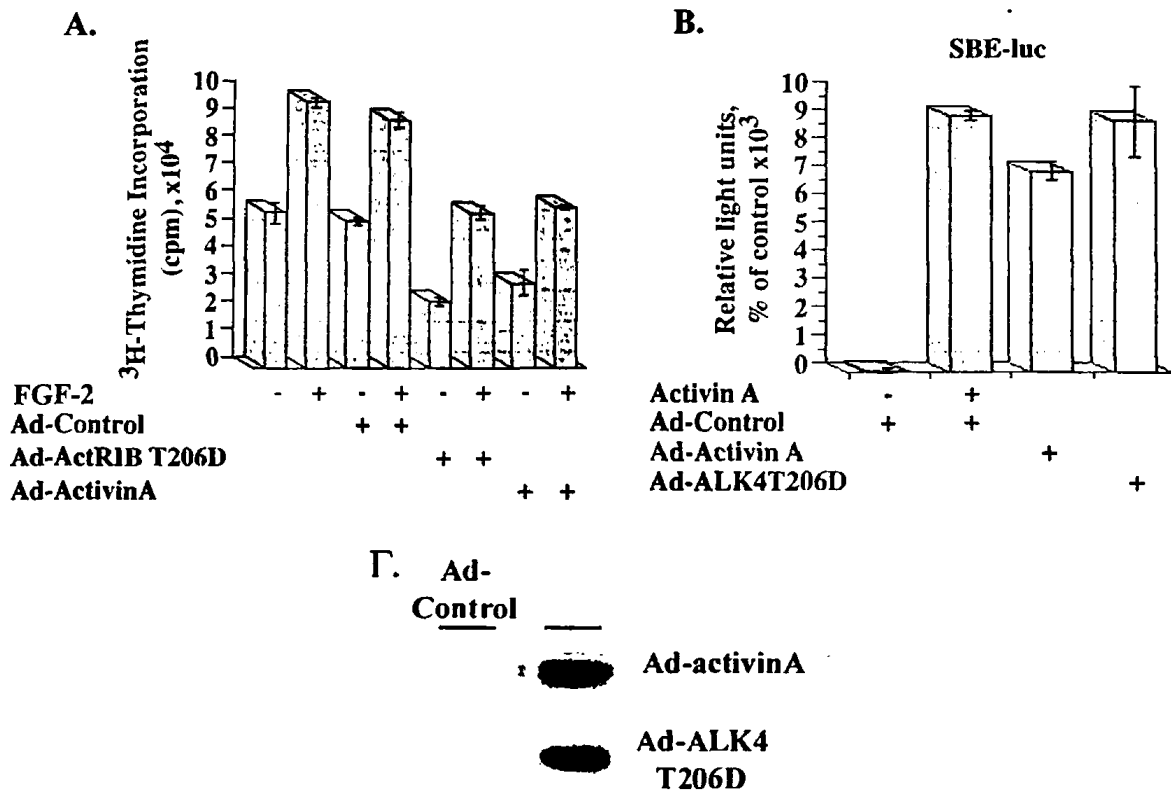
### 3.2.3 Η ακτιβίνη Α αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων

Έχει προηγουμένα αναφερθεί ότι η ακτιβίνη Α αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό διαφόρων τύπων ενδοθηλιακών κυττάρων (McCarthy and Bicknell, 1993). Όπως προαναφέρθηκε πρόσφατα, μέλη της ερευνητικής ομάδας μας έδειξαν ότι η ακτιβίνη Α αναστέλλει την αγγειογένεση *in vivo* (Breit et al., 2000). Αγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο FGF-2 και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF επάγουν την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και τελικά την διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων για την δημιουργία ενός καινούριου αγγείου. Η σημασία των αγγειογενετικών παραγόντων σε παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος είναι πολύ μεγάλη. Για να μελετήσουμε την δράση της ακτιβίνης Α στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες θυμιδίνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE. Η ακτιβίνη Α (50 ng/ml) ανέστειλε την ενσωμάτωση [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης στα κύτταρα BBCE όταν αυτά είχαν επεξεργαστεί με FGF-2 (2,5 ng/ml) (Εικόνα 8). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση της ενσωμάτωσης [<sup>3</sup>H] θυμιδίνης απουσία αυξητικών παραγόντων (Εικόνα 8). Φαίνεται λοιπόν ότι η ακτιβίνη Α δεν αναστέλλει μόνο τον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και τα βασικά επίπεδα πολλαπλασιασμού.



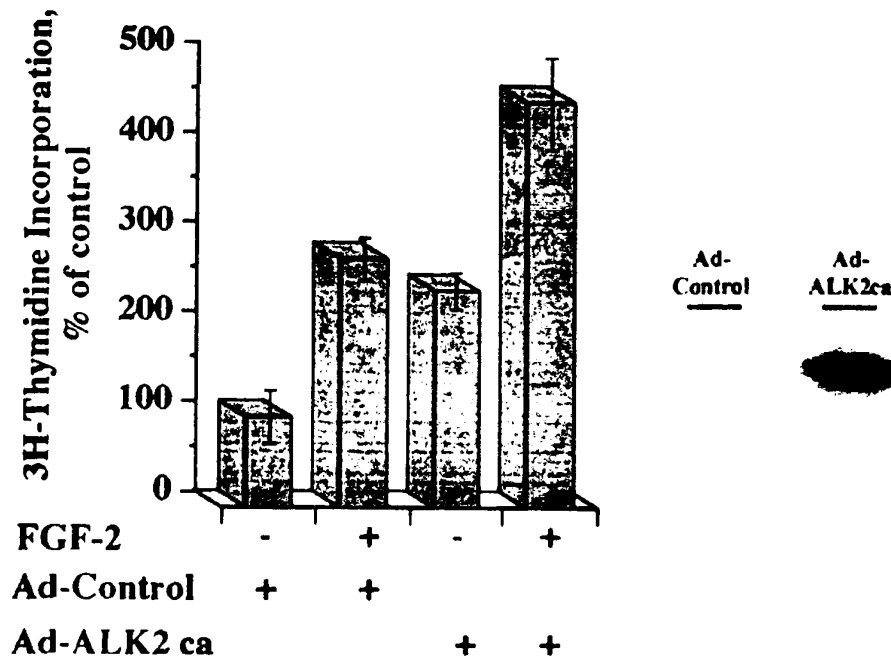
**Εικόνα 8.** Η ακτιβίνη Α αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κύτταρα BBCE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 24 φρεατίων σε συγκέντρωση 80.000 κυττάρων ανά φρεάτιο. Οι καλλιέργειες εκτέθηκαν είτε μόνο σε θρεπτικό υλικό είτε μόνο στον ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα FGF-2 (2,5 ng/ml), είτε μόνο σε ακτιβίνη Α (60 ng/ml) είτε σε FGF-2 και ακτιβίνη Α για 24 ώρες. Για τις τελευταίες 4 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα 1  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]μεθύλοθυμιδίνης. Η ραδιενέργεια από τριάδες φρεατίων μετρήθηκε σε μετρητή β-σπινθηρισμού.

Για επιβεβαίωση, κύτταρα BBCE μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control), είτε GFP και ακτιβίνη Α (Ad-Activin A) είτε GFP και την συνεχώς ενεργή μορφή του τύπου I υποδοχέα της ακτιβίνης Α (Ad-ALK4T206D). Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία θυμιδίνης έδειξαν ότι τόσο ο αδενοϊός που εκφράζει ακτιβίνη Α αλλά και ο αδενοϊός που εκφράζει τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης Α αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων απουσία και παρουσία FGF-2, όπως ακριβώς και η ακτιβίνη που χορηγείται στα κύτταρα εξωγενώς (Εικόνα 9, Α). Για να επιβεβαιώσουμε εάν τα επίπεδα έκφρασης των αδενοϊών Ad-Activin A και Ad-ALK4T206D είναι αρκετά για μέγιστη δραστηριότητα αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων εξετάσαμε την ικανότητά τους να επάγουν την Smad εξαρτώμενη μεταγραφή. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα BBCE που μολύνθηκαν με τους παραπάνω αδενοϊούς, διαμολύνθηκαν με την κατασκευή που αποτελείται από πέντε αντίγραφα της αλληλουχίας όπου συνδέονται οι Smad πρωτεΐνες (Smad-binding element, SBE) και είναι συζευγμένο με το γονίδιο της λουσιφεράσης (SBE-luc). Οι Ad-Activin A και Ad-ALK4T206D επάγουν την Smad-εξαρτώμενη σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της ακτιβίνης Α που προστίθεται εξωγενώς (Εικόνα 9, Β).



**Εικόνα 9.** Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν ακτιβίνη A ή τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. **A**, Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ActRIB T206D), είτε GFP και ακτιβίνη A (Ad-ActivinA). Την επόμενη ημέρα έγινε επεξεργασία των κυττάρων με τον παράγοντα FGF-2 (2,5 ng/ml) για 24 ώρες. Για τις τελευταίες 4 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα 1  $\mu\text{Ci/ml}$  [<sup>3</sup>H]μεθύλοθυμιδίνης. Η ραδιενέργεια από τριάδες φρεατίων μετρήθηκε σε μετρητή β-σπινθηρισμού. **B**, Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ActRIB T206D), είτε GFP και ακτιβίνη A (Ad-ActivinA) και στην συνέχεια διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές SBE-luc και CMV- $\beta$ -gal. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0.2% NCS και μετά από 8 ώρες χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνη A. Μετά από επιπλέον επώαση 16 ωρών, οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις  $\beta$ -gal. **Γ**, Κυτταρικά εκχυλίσματα BBCE κυττάρων μολυσμένα με τους αδενοϊούς Ad-Control, Ad-ALK4T206D και Ad-ActivinA ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE. Η ανίχνευση των Ad-Activin και Ad-ALK4T206D έγινε με τα αντισώματα αντι-ακτιβίνης A και αντι-HA αντίστοιχα.

Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ακτιβίνη A και τον υποδοχέα ALK4T206D είναι ειδική, αφού μόλυνση με αδενοϊό που εκφράζει την συνεχώς ενεργή μορφή του υποδοχέα ALK2 (Ad-ALK2ca) δεν έχει το ίδιο αποτέλεσμα (Εικόνα 10). Αντίθετα, φαίνεται ότι ο υποδοχέας ALK2ca επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό δεν είναι παράξενο αφού ο ALK2, ο οποίος μεταδίδει σήματα από την οικογένεια παραγόντων BMPs, επάγει αγγειογενετικές ανταποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων (Valdimarsdottir et al., 2002).



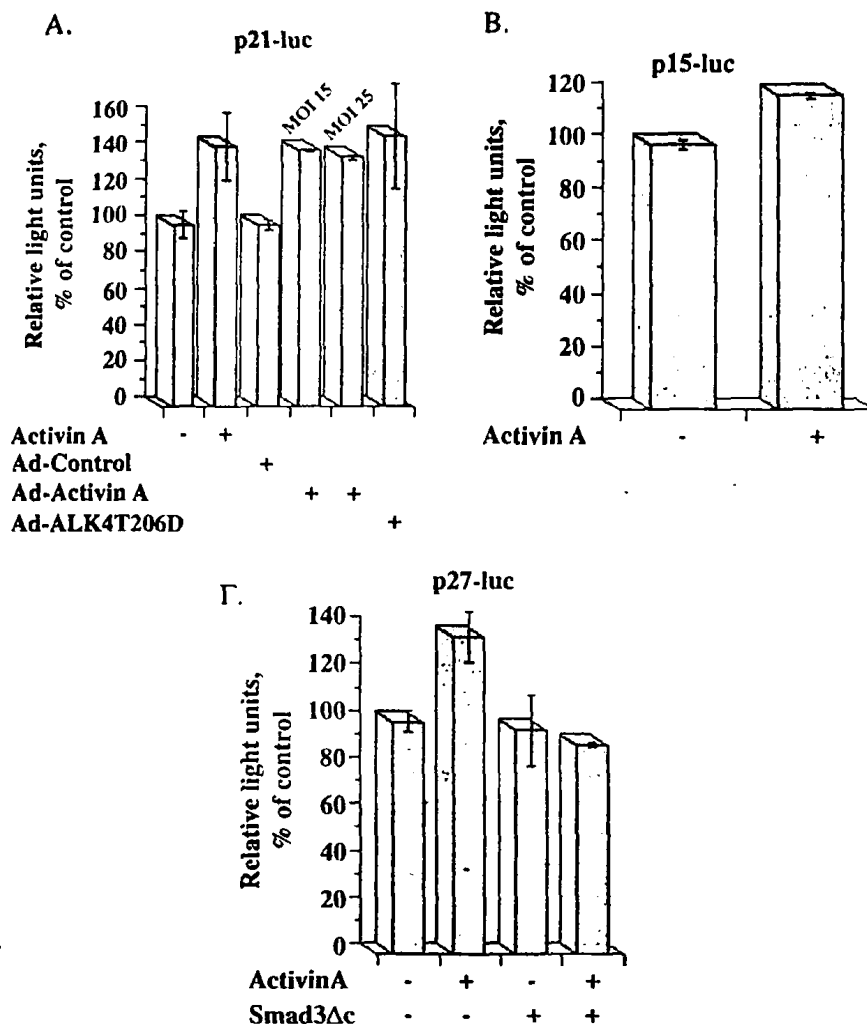
Εικόνα 10. Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ακτιβίνη A είναι ειδική. Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα ALK2 (Ad-ALK2ca). Την επόμενη ημέρα έγινε επεξεργασία των κυττάρων με τον παράγοντα FGF-2 (2,5 ng/ml) για 24 ώρες. Για τις τελευταίες 4 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα 1 μCi/ml [<sup>3</sup>H]μεθύλοθυμιδίνης. Η ραδιενέργεια από τριάδες φρεατίων μετρήθηκε σε μετρητή β-σπινθηρισμού (αριστερό πλαίσιο). Κυτταρικά εκχυλίσματα από μολυσμένα κύτταρα BBCE συλλέχτηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE και η έκφραση της Ad-ALK2ca ανιχνεύτηκε με αντίσωμα HA (δεξί πλαίσιο).

### 3.2.3.1. Η ακτιβίνη A επάγει αναστολές του κυτταρικού κύκλου

Το γεγονός ότι η ακτιβίνη A αναστέλλει τον βασικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μας ώθησε να εξετάσουμε την επίδραση που μπορεί να έχει σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο. Είναι γνωστό από βιβλιογραφικές αναφορές ότι μέλη της οικογένειας του παράγοντα TGF-β αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό διαφόρων κυτταρικών σειρών μέσω των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.

Έτσι λοιπόν, μελετήσαμε την δράση της ακτιβίνης A στους υποκινητές τριών κλασικών αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, p15, p21 και p27, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με το γονίδιο της λουσιφεράσης, εξετάζοντας την μεταγραφική τους ικανότητα απουσία ή παρουσία ακτιβίνης A. Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE που διαμολύνθηκαν με την κατασκευή p21-luc παρουσίασαν σχετικά μικρή αλλά επαναλήψιμη μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή p21 παρουσία ακτιβίνης A (Εικόνα 11, A). Σε παρόμοιες πειραματικές διαδικασίες, BBCE κύτταρα που διαμολύνθηκαν με την

κατασκευή p15-luc παρουσίασαν ακόμη μικρότερη αύξηση στην μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή p15 παρουσία ακτιβίνης A (Εικόνα 11, B).



**Εικόνα 11. Η ακτιβίνη A επηρεάζει την δράση των αναστολέων των κύκλινο-εξαρτώμενων κινασών.** A, Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και ακτιβίνη A (Ad-ActivinA) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ALK4T206D) και στην συνέχεια διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές p21-luc and CMV-β-gal. Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε 0,2% ορό και μετά από επώαση 8 ωρών στα κύτταρα που δεν μολύνθηκαν (NI) χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A. Μετά από συνολική επώαση 24 ωρών πραγματοποιήθηκε μέτρηση των σχετικών μονάδων φωτός. B, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές p15-luc και CMV-β-gal. Την επόμενη ημέρα, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% περιεχόμενο σε ορό και 8 ώρες αργότερα χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A. Τα κύτταρα επώαστηκαν για επιπλέον 16 ώρες πριν την μέτρηση των σχετικών μονάδων φωτός. Γ, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές p27-luc, CMV-β-gal και είτε με τον φορέα μάρτυρα είτε με την μη ενεργή μορφή της Smad3 (Smad3Δc) και έγινε επεξεργασία των κυττάρων όπως στην περίπτωση B. Όλες οι σχετικές μονάδες φωτός ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal.

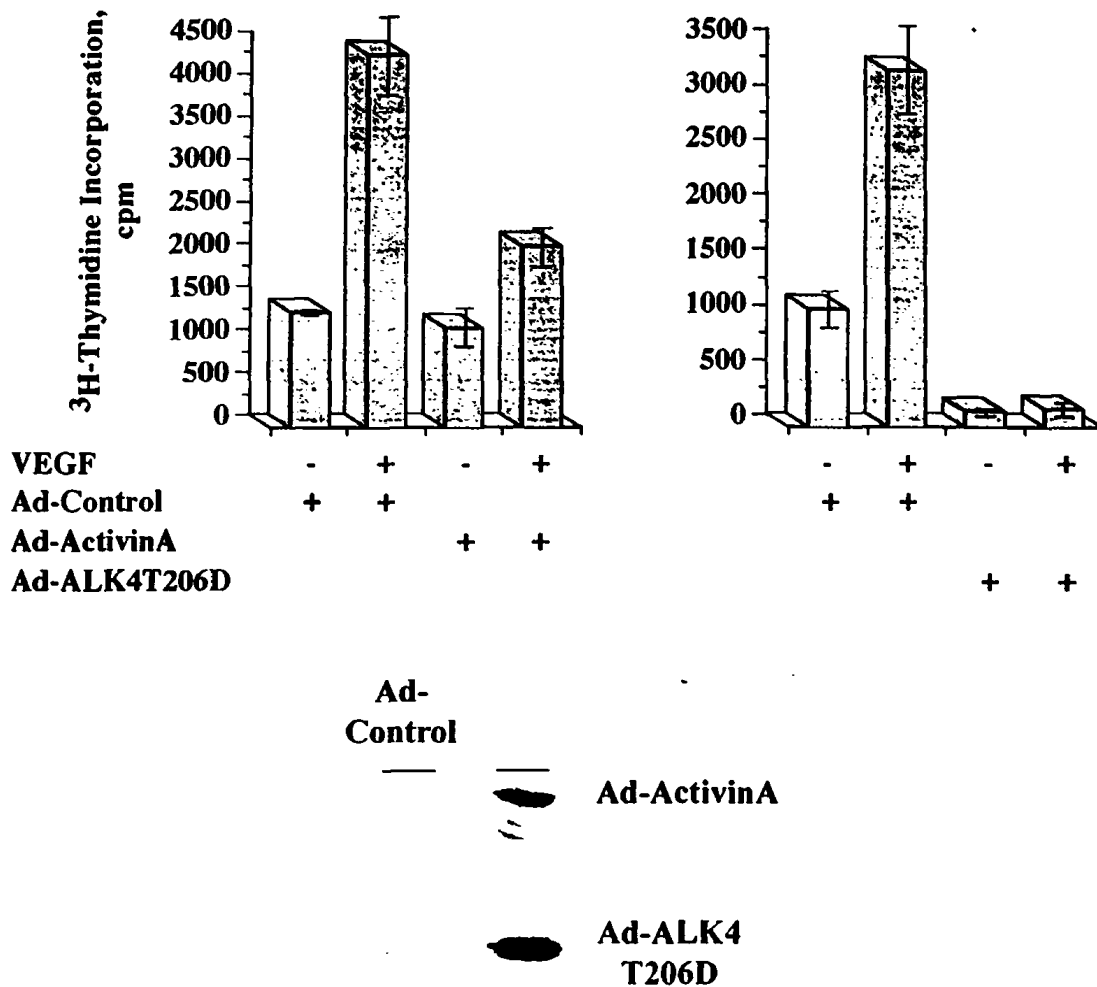


Η αύξηση αυτή επιβεβαιώθηκε με μόλυνση κυττάρων BBCE που εκφράζουν p21-luc με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε ακτιβίνη A και GFP (Ad-Activin A) είτε την συνεχώς ενεργή μορφή του τύπου I υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ALK4T206D). Έτσι, κύτταρα που μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει την ακτιβίνη A ή την ενεργή μορφή του υποδοχέα ALK4 παρουσίασαν την ίδια μεταγραφική ενεργοποίηση του υποκινητή p21 όπως και η ακτιβίνη A (Εικόνα 11, Α). Είναι αξιοσημείωτο ότι η χρήση του αδενοϊού της ακτιβίνης A σε υψηλότερα επίπεδα μόλυνσης δεν οδήγησε σε επιπλέον μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου του p21 (Εικόνα 11, Α). Πιθανά, αυστηροί μηχανισμοί ρύθμισης του υποκινητή του γονιδίου p21 αλλά και των υποκινητών των άλλων αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, δεν επιτρέπουν υπερβολική αύξηση του επιπέδου των αναστολέων παρά την παρουσία αυξανόμενων δόσεων ακτιβίνης A. Παρόμοια, κύτταρα BBCE τα οποία διαμολύνθηκαν με την κατασκευή p27-luc, παρουσίασαν επίσης μικρή μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου p27 παρουσία ακτιβίνης A (Εικόνα 11, Γ). Μάλιστα, η αύξηση αυτή ήταν εξαρτημένη από την ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, αφού συνδιαμόλυνση με την αρνητική μη ενεργή μορφή της Smad3 (Smad3Δc) ανέστειλε την ενεργοποίηση αυτή (Εικόνα 11, Γ).

### 3.2.3.2 Η ακτιβίνη A αναστέλλει μιτογόνα σηματοδοτικά μονοπάτια

Η ισορροπία μεταξύ κυκλινών και των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών είναι πολύ σημαντική για την πρόοδο των κυττάρων από την G1 στην S φάση του κυτταρικού κύκλου. Η μικρή αύξηση των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών από την ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μας ώθησε να διερευνήσουμε την δράση της σε μιτωτικά σήματα.

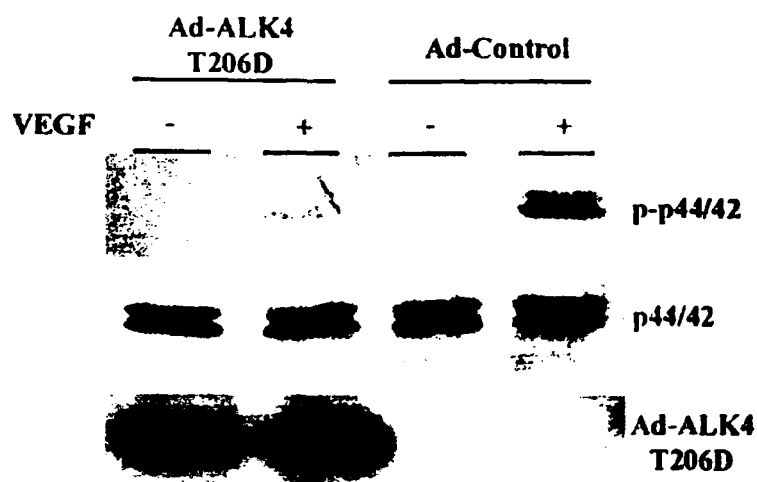
Ο παράγοντας VEGF είναι ένας από τους πιο σημαντικούς αυξητικούς παράγοντες των ενδοθηλιακών κυττάρων και για τον σκοπό αυτό θελήσαμε να μελετήσουμε την επίδραση που μπορεί να έχει η ακτιβίνη A στον VEGF. Έτσι, πραγματοποιήσαμε δοκιμασίες θυμιδίνης σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE. Κύτταρα μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control), είτε GFP και ακτιβίνη A (Ad-Activin A) είτε GFP και την συνεχώς ενεργή μορφή του τύπου I υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ALK4T206D). Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία θυμιδίνης έδειξαν ότι οι αδενοϊοί Ad-Activin A και Ad-ALK4T206D αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων απουσία και παρουσία VEGF (Εικόνα 12).



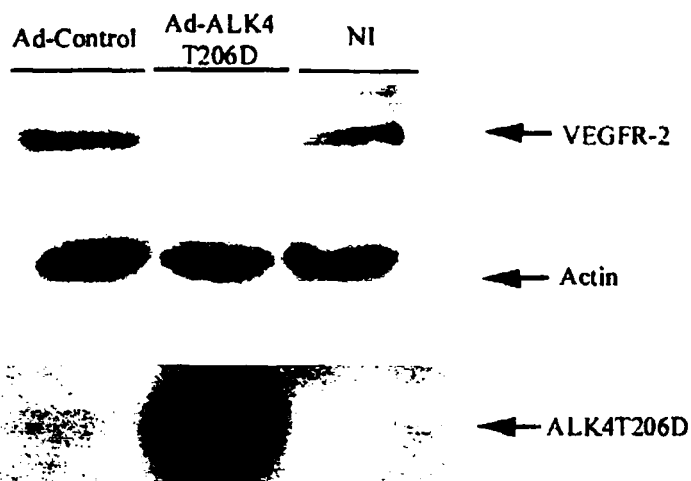
Εικόνα 12. Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί που εκφράζουν ακτιβίνη A ή τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία VEGF. Κύτταρα HUVE (επάνω πλαίσιο) μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ALK4T206D), είτε GFP και ακτιβίνη A (Ad-ActivinA). Την επόμενη ημέρα έγινε επεξεργασία των κυττάρων με VEGF (50 ng/ml) για 24 ώρες. Για τις τελευταίες 6 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα 1 μCi/ml [<sup>3</sup>H]μεθύλοθυμιδίνης. Η ραδιενέργεια από τριάδες φρεατίων μετρήθηκε σε μετρητή β-σπινθηρισμού. Εκχυλίσματα κυττάρων μολυσμένων με τους αδενοϊούς Ad-Control, Ad-ALK4T206D και Ad-ActivinA ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE. Η αντίσπινθηση των Ad-Activin και Ad-ALK4T206D έγινε με τα αντισώματα αντι-ακτιβίνης A και αντι-HA αντίστοιχα (κάτω πλαίσιο).

Ο παράγοντας VEGF επάγει μιτωτικά σήματα, και αυτό είναι φανερό από την ισχυρή ενεργοποίηση που προκαλεί στις κινάσες ERK1/2 (Εικόνα 13). Η μόλυνση όμως με την συνεχώς ενεργή μορφή του τύπου I υποδοχέα ALK4 (Ad-ALK4T206D) ανέστειλε αυτήν την επαγωγή, ενώ η μόλυνση με τον αδενοϊό μάρτυρα δεν είχε καμία επίδραση (Εικόνα 13). Φαίνεται λοιπόν πως η ακτιβίνη A είναι ισχυρός αναστολέας μιτωτικών μονοπατιών που επάγονται από τον παράγοντα VEGF.

Πράγματι, κύτταρα HUVE που μολύνθηκαν με τον αδενοϊό Ad-ALK4T206D παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα VEGFR-2 σε σύγκριση με αυτά



**Εικόνα 13.** Η συνεχώς ενεργή μορφή του υποδοχέα ALK4 αναστέλλει μιτωτικά σήματα από τον VEGF. Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ALK4T206D). Την επόμενη ημέρα, έγινε επεξεργασία των κυττάρων με τον παράγοντα VEGF (50 ng/ml) για 24 ώρες. Η ανίχνευση της έκφρασης των φωσφορυλιωμένων μορφών ERK1/2 (p-p44/42) έγινε με ειδικό αντίσωμα φωσφο-p44/42 ενώ η ολική έκφραση των ERK1/2 έγινε με αντίσωμα p44/42. Η έκφραση του υποδοχέα ALK4T206D (κάτω πλαίσιο) ανιχνεύτηκε με αντίσωμα αντι-HA.



**Εικόνα 14.** Η συνεχώς ενεργή μορφή του υποδοχέα ALK4 αναστέλλει την έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2. Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control) είτε GFP και τον συνεχώς ενεργό υποδοχέα της ακτιβίνης A (Ad-ALK4T206D) και κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχτηκαν 24 ώρες αργότερα. Η ανίχνευση της έκφρασης του υποδοχέα VEGFR-2 έγινε με ειδικό αντίσωμα αντι-VEGFR-2 (πάνω πλαίσιο), ενώ η έκφραση του υποδοχέα ALK4T206D (κάτω πλαίσιο) ανιχνεύτηκε με αντίσωμα αντι-HA. Για τα ολικά ποσά πρωτεΐνης (κεντρικό πλαίσιο) χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ενάντια στην ακτίνη.

που έχουν μολυνθεί με τον αδενοϊό μάρτυρα (Ad-Control) ή με αυτά που δεν έχουν μολυνθεί (Εικόνα 14).

### 3.3 Η ακριβής θέση των Smad πρωτεϊνών στα ενδοθηλιακά κύτταρα παίζει σημαντικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος από τους υποδοχείς της ακτιβίνης A

Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ακτιβίνη A δρα όχι μόνο ως καταστολέας όγκων νευροβλαστώματος αλλά αναστέλλει και βασικές αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ακτιβίνη A μετάγει σήματα μέσω των τύπου II και τύπου I υποδοχέων οι οποίοι ενεργοποιούν τις Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή (βλ. 1.3.4.3), η πρωτεΐνη SARA είναι απαραίτητος μεσολαβητής για την μετάδοση σήματος γιατί εξασφαλίζει την σωστή τοποθέτηση των Smad πρωτεϊνών σε περιοχές της μεμβράνης που περιέχουν τον υποδοχέα (Tsukazaki et al., 1998). Η περιοχή δακτυλίου FYVE της SARA παίζει σημαντικό ρόλο στην σωστή θέση της και επομένως των Smad. Εικάζεται ότι η FYVE περιοχή της SARA σε αναλογία με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν δακτυλίους FYVE (Stenmark and Aasland, 1999), συνδέεται με μεμβρανικά λιπίδια του τύπου 3-φωσφορικής φωσφατιδυλικής ινοσιτόλης (PI(3)P). Επειδή τα λιπίδια αυτά εισάγονται στα πρώιμα ενδοσώματα οι μελετημένες πρωτεΐνες με FYVE περιοχές εντοπίζονται στα οργανίδια αυτά. Έτσι, ελέγξαμε i) την δυνατότητα η SARA να εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, και ii) τον πιθανό ρόλο της εντόπισης αυτής στην ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών από την ακτιβίνη A.

Η αντίληψη ότι ενεργοποιημένοι υποδοχείς συνδέονται με μόρια μεταγωγής σήματος σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου εικάζεται για πολύ καιρό (Ceresa and Schmid, 2000). Επιπλέον, η μεμβρανική μεταφορά παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της θέσης των μεταγωγικών συνδέσεων καθώς και στην αποικοδόμηση και/ή στην ανακύκλωση των υποδοχέων (Leof, 2000). Στην περίπτωση των υποδοχέων του TGFβ/ακτιβίνης, γνωρίζουμε λίγα πράγματα για το πώς η ενδοκυττάρωση και η μεταφορά των υποδοχέων επηρεάζει την οργάνωση, την τοπολογία και την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού πρόσδεμα-υποδοχέας-SARA-Smad. Αφού, η SARA συνδέεται στις εσωτερικές μεμβράνες μέσω της περιοχής FYVE, είναι πιθανό να παρέχει τον συνδετικό κρίκο μεταξύ μεμβρανικής μεταφοράς και μεταγωγής σήματος από TGF-β/ακτιβίνη. Για τον λόγο αυτό θεωρήσαμε σημαντική την μελέτη του ενδοκυττάρου εντοπισμού της SARA καθώς και πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την λειτουργία των ενδοσωμάτων ώστε να

εξετάσουμε την συνεισφορά της ενδοκυττάριας μεταφοράς στον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης A.

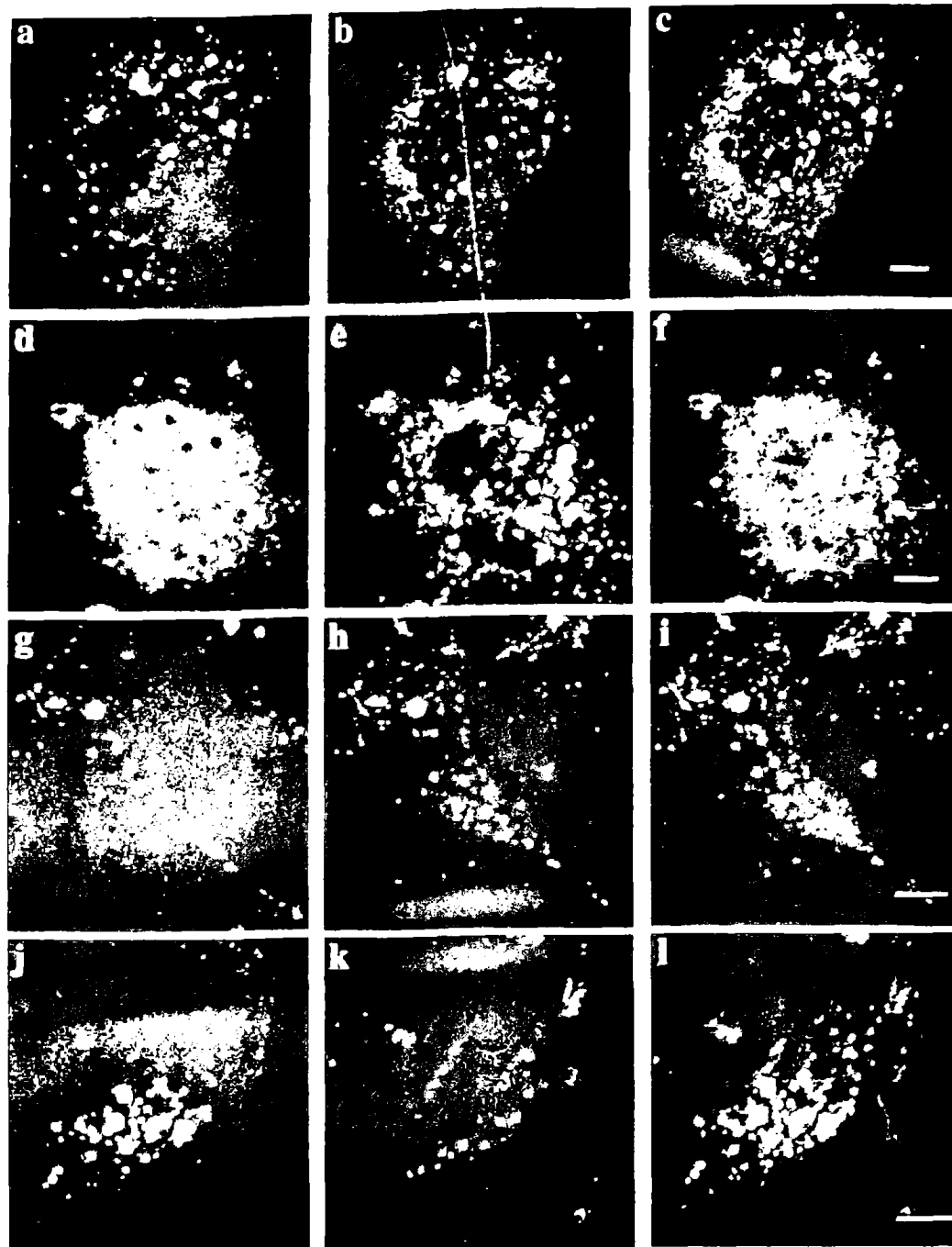
### 3.3.1 Η SARA εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα

Για να προσδιορίσουμε σε ποιο ενδοκυττάριο διαμέρισμα εντοπίζεται η SARA εκφράσαμε τον φυσιολογικό τύπο της SARA, η οποία είναι σημασμένη με μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων Flag (Flag-tagged SARA), σε ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE και εξετάσαμε τον συνεντοπισμό της με μάρτυρες των διαφόρων κυτταρικών διαμερισμάτων. Όπως έχει και προηγουμένα αναφερθεί (Tsukazaki et al., 1998), η SARA εντοπίζεται σε ενδοκυττάρια κυστίδια (Εικόνα 15, a). Επιπλέον υπάρχει μεγάλου βαθμού συνεντοπισμός της SARA με τον μάρτυρα των πρώιμων ενδοσωμάτων EEA1 σε αυτά τα ενδοκυττάρια κυστίδια υποδεικνύοντας έτσι ότι τα κυστίδια αυτά είναι τα πρώιμα ενδοσώματα (Εικόνα 15, a-c). Παρ' όλα αυτά κάποια κυστίδια θετικά για την SARA ήταν αρνητικά για τον μάρτυρα EEA1. Σε επίπεδα μεγάλης έκφρασης η SARA αυξάνει το μέγεθος των πρώιμων ενδοσωμάτων υποδηλώνοντας έτσι τον πιθανό ρόλο της SARA στην σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων.

Επιπλέον πειράματα με δύο άλλους μάρτυρες των πρώιμων ενδοσωμάτων επιβεβαίωσαν ότι η SARA βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα. Έτσι, υπήρξε καλός συνεντοπισμός της SARA με την Rab5Q79L που είναι η μορφή της Rab5 πρωτεΐνης με ανεπαρκή ενεργότητα GTPase (Εικόνα 15, d-f). Το ίδιο καλός συνεντοπισμός υπήρξε και με την ενδοκυτταρωμένη τρανσφερίνη (Εικόνα 15, g-i). Όμως, ο συνεντοπισμός δεν ήταν τέλειος, αφού κυστίδια θετικά για την SARA ήταν αρνητικά για την Rab5 ή για την τρανσφερίνη. Τέλος, δεν υπήρξε καθόλου συνεντοπισμός της SARA με τον μάρτυρα των όψιμων ενδοσωμάτων LysoTracker (Εικόνα 15, j-l). Φαίνεται λοιπόν από τα παραπάνω ότι η SARA εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα πιθανότατα μέσω της περιοχής FYVE που συνδέεται με τα μεμβρανικά λιπίδια PI(3)P.

### 3.3.2 Η περιοχή FYVE της SARA συνδέεται με το μεμβρανικό λιπίδιο PI(3)P και είναι επαρκής για την στόχευση της SARA στο πρώιμο ενδοσώμα

Οι πρωτεΐνες EEA1 και Hrs που περιέχουν την περιοχή FYVE έχουν εντοπιστεί στα πρώιμα ενδοσώματα και έχει δειχθεί ότι εκτός από την περιοχή FYVE χρειάζονται και επιπλέον αλληλουχίες αμινοξέων για την στόχευση των πρωτεϊνών αυτών στα ενδοσώματα (Raiborg et al., 2001; Simonsen et al., 1999).

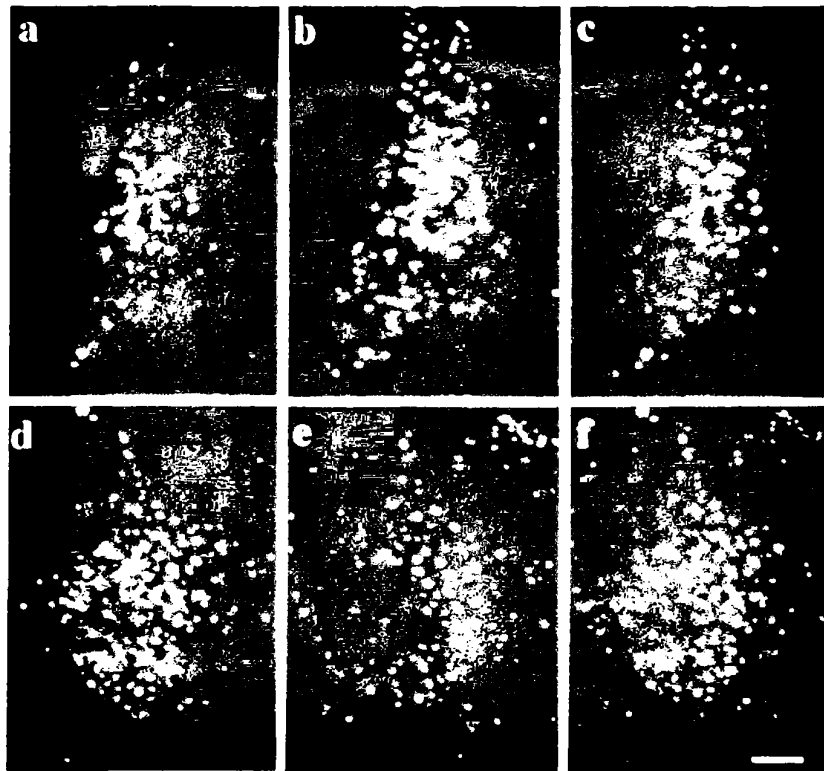


Εικόνα 15. Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της SARA σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Κύτταρα CE μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους ιούς δαμαλίτιδας, οι οποίοι εκφράζουν την T7 A πολυμεράση, και διαμολύνθηκαν με κατασκευές που περιέχουν Flag-SARA ή τον πρόπρωτο υποδοχέα της τρανσφερίνης ή την GFP-Rab5Q79L. Τα κύτταρα ξεβράστηκαν με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας το αντίσωμα anti-Flag (a, e, g, και j) τον εντοπισμό της SARA. Η EEA1 εντοπίστηκε με ειδικό αντίσωμα (b), ενώ η Rab5Q79L εντοπίστηκε άμεσα παρατηρώντας τον φθορισμό της πρωτεΐνης GFP (d). Οι υποδοχείς της τρανσφερίνης σημάνθηκαν με την εισαγωγή φθορίζουσας τρανσφερίνης εξα-transferrin (h), και τα όψιμα ενδοσώματα ή λυσοσώματα εντοπίστηκαν με tracker (k). Η επικάλυψη των εικόνων φαίνεται στο c, f, i και l. Η μπάρα μήκους στοιχεί σε 10 μm.

α να εξετάσουμε εάν το ίδιο συμβαίνει και με την SARA εκφράσαμε μόνο την ή FYVE (κατάλοιπα αμινοξέων 574-660) συντηγμένη με το επίτοπο c-Myc (Myc-



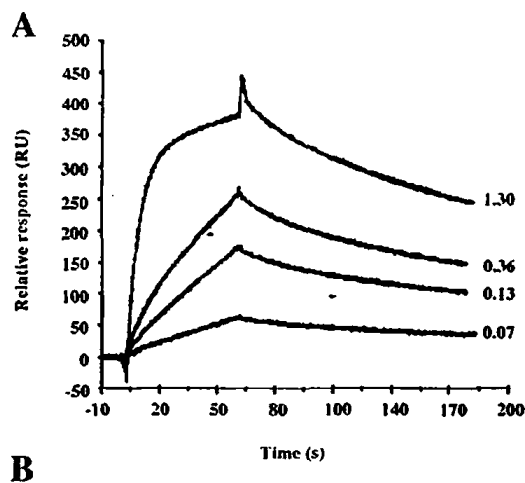
tagged). Σε αντίθεση με την περιοχή FYVE των EEA1 και Hrs, η πρωτεΐνη αυτή εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα μαζί με τον μάρτυρα των πρώιμων ενδοσωμάτων EEA1 (Εικόνα 16, d-f).



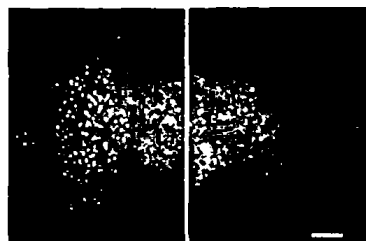
Εικόνα 16. Η περιοχή FYVE της SARA είναι επαρκής για την στόχευσή της στα πρώιμα ενδοσώματα. Κύτταρα BHK διαμολύνθηκαν είτε με την ολικού μήκους μορφή της SARA (a) είτε με την ελάχιστη περιοχή FYVE της SARA που περιλαμβάνει τα αμινοξέα από 574 έως 660 (SARA574-660) (d). Στην συνέχεια έγινε επεξεργασία των κυττάρων με ανοσοφθορισμό χρησιμοποιώντας αντίσωμα αντι-Myc. Η ενδογενής EEA1 εντοπίστηκε στα ίδια κύτταρα με ειδικό αντίσωμα αντι-EEA1 (b και e). Η επικάλυψη των εικόνων φαίνεται στο c και f. Η μπάρα μήκους αντιστοιχεί σε 10 μm.

Το γεγονός ότι η περιοχή FYVE της SARA είναι επαρκής για την στόχευσή της στα πρώιμα ενδοσώματα υποδηλώνει ότι η FYVE περιοχή της SARA έχει μεγαλύτερη συγγένεια για PI(3)P απ' ό,τι οι περιοχές FYVE των EEA1 και Hrs. Έτσι, αναζητήσαμε περισσότερες ενδείξεις για την σύνδεση της FYVE περιοχής της SARA με PI(3)P με την μέθοδο SPR (surface plasmon resonance). Ένα μίγμα λιπιδίων που περιέχει 2% PI(3)P ακινητοποιήθηκε πάνω σε έναν επιφανειακό αισθητήρα και η καταγραφή των διαγραμμάτων έγινε ύστερα από ένεση της SARA498-660 συντηγμένης με την τρανσφεράση S της γλουταθειόνης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (Εικόνα 17, A). Βρέθηκε ότι η περιοχή FYVE της SARA συνδέεται ισχυρά με PI(3)P, ενώ η σταθερά διάστασης,  $K_D$ , υπολογίστηκε στα 30 nM (Εικόνα 17, A). Η τιμή αυτή είναι λίγο μικρότερη από τις τιμές που έχουν υπολογιστεί για τις πρωτεΐνες EEA1 και Hrs (45 και 38

nM αντίστοιχα) (Gaullier et al., 2000; Gillooly et al., 2000). Η διαφορά αυτή αν και μικρή μπορεί να λογοδοτήσει για την στόχευση της περιοχής FYVE της SARA στα πρώιμα ενδοσώματα σε αντίθεση με τις πρωτεΐνες EEA1 και Hrs. Για να εξετάσουμε εάν η σύνδεση της SARA στις μεμβράνες *in vivo* απαιτεί την ενεργότητα της κινάσης PI3 για την παραγωγή PI(3)P, κύτταρα που εκφράζουν την SARA επεξεργάστηκαν με τον αναστολέα της PI 3-κινάσης wortmannin (100 nM). Πράγματι, παρουσία wortmannin, η SARA απομακρύνθηκε από τα πρώιμα ενδοσώματα υποδηλώνοντας έτσι ότι η εντόπιση της SARA στις μεμβράνες, όπως και για τις πρωτεΐνες EEA1 και Hrs, απαιτεί την ενεργότητα PI3-κινάσης (Εικόνα 17, Β). Φαίνεται από τα παραπάνω αποτελέσματα ότι η στόχευση της SARA στα πρώιμα ενδοσώματα γίνεται μέσω της σύνδεσης της περιοχής FYVE με μεμβρανικά λιπίδια PI(3)P.



B

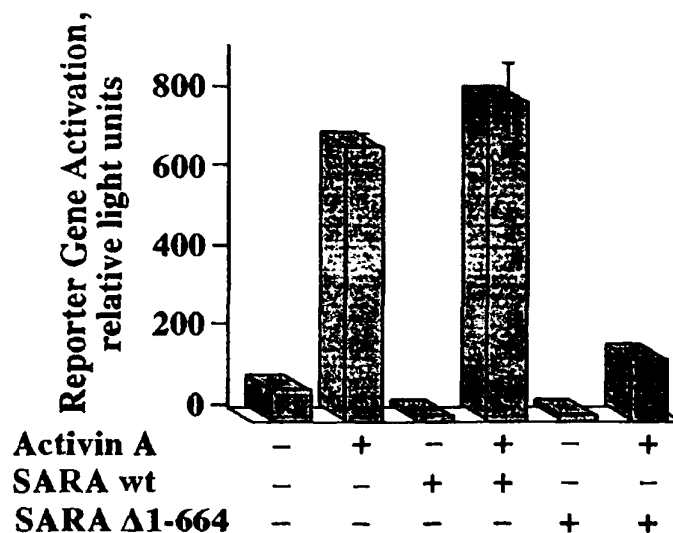


**Εικόνα 17.** Κινητική σύνδεσης και αποσύνδεσης της περιοχής FYVE της SARA με το λιπίδιο PI(3)P και απομάκρυνση της SARA από τις μεμβράνες με wortmannin. **A**, διαγράμματα με την μέθοδο SPR (surface plasmon resonance) προήλθαν ύστερα από ένεση της περιοχής FYVE της SARA στις συγκεντρώσεις (μg) που αναφέρονται. Η σταθερά διάστασης,  $K_D$ , για την σύνδεση της περιοχής FYVE με PI(3)P υπολογίστηκε στα 30 nM. **B**, Κύτταρα BHK που διαμολύνθηκαν με Myc-SARA επωάστηκαν απουσία (αριστερό πλαίσιο) ή παρουσία (δεξί πλαίσιο) wortmannin. Στην συνέχεια έγινε επεξεργασία των κυττάρων με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα 9E10 για τον εντοπισμό της SARA. Η μπάρα μήκους αντιστοιχεί σε 10 μm.



### 3.3.3 Η SARA συμμετέχει στην μεταγωγή σήματος από ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Είναι γνωστό ότι η SARA είναι απαραίτητος μεσολαβητής για την μετάδοση σήματος από τον παράγοντα TGF- $\beta$  αλλά δεν έχει εξακριβωθεί αν συμμετέχει και στην μεταγωγή σήματος από ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Για αυτόν τον στόχο, χρησιμοποιήθηκε κατασκευή που αποτελείται από πέντε αντίγραφα της αλληλουχίας όπου συνδέονται οι Smad πρωτεΐνες (Smad-binding element, SBE) και είναι συζευγμένο με το γονίδιο της λουσιφεράσης (SBE-luc). Έτσι, ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με SBE-luc και τον φυσιολογικό τύπο της SARA ή με SBE-luc και την μεταλλαγμένη μορφή της SARA που δεν περιέχει την περιοχή FYVE, SARA $\Delta$ 1-664, και συνεπώς δεν μπορεί να συνδεθεί στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων (Tsukazaki et al., 1998). Η SARA δεν επηρεάζει την μεταγραφή από το στοιχείο SBE-luc παρουσία ακτιβίνης A, σε αντίθεση με την μεταλλαγμένη μορφή SARA $\Delta$ 1-664, που αναστέλλει σχεδόν ολοκληρωτικά την εξαρτώμενη από ακτιβίνη A μεταγραφή από την κατασκευή αναφοράς SBE-luc (Εικόνα 18). Φαίνεται λοιπόν ότι η SARA προσελκύει τις Smad πρωτεΐνες στο ενεργό από ακτιβίνη A σύμπλοκο υποδοχέων παίζοντας έτσι ενεργό ρόλο στην μεταγωγή σήματος από την ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

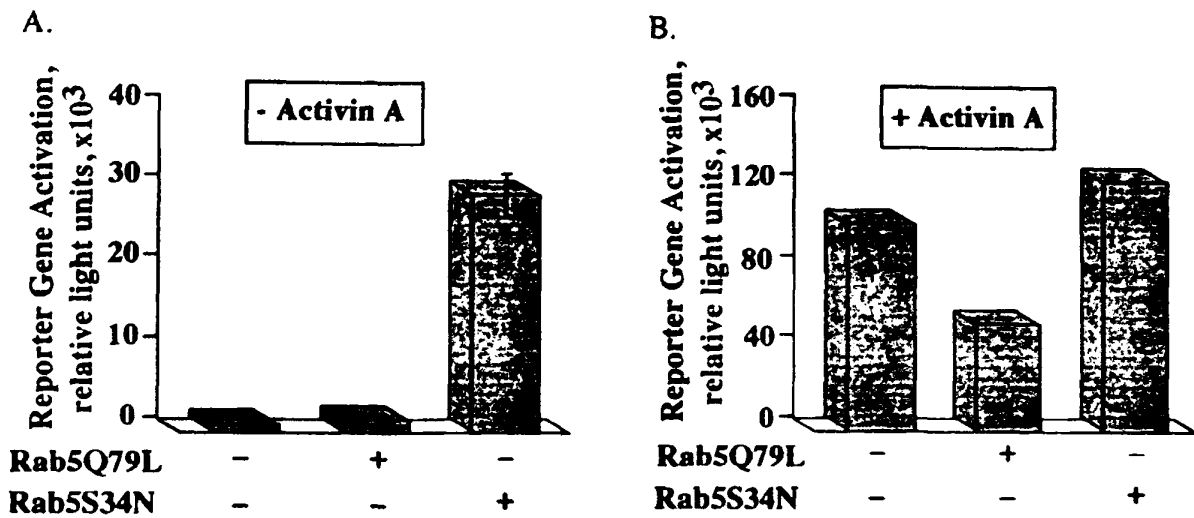


Εικόνα 18. Μεταλλαγμένες μορφές της SARA που δεν περιέχουν την περιοχή FYVE αναστέλλουν την μεταγωγή σήματος από ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές SBE-luc, CMV- $\beta$ -gal και είτε τον φορέα μάρτυρα είτε τον φυσιολογικό τύπο της SARA είτε την SARA $\Delta$ 1-664, και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 8 ώρες. Στην συνέχεια έγινε επεξεργασία των κυττάρων με 50 ng/ml ακτιβίνης A και ακολούθησε επώαση για επιπλέον 16 ώρες. Οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις  $\beta$ -gal. Τα δεδομένα είναι η μέση τιμή  $\pm$  S.D. από τριπλές μετρήσεις.

### 3.3.4 Η ενδοκυττάρωση και η σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων επηρεάζουν την μεταγραφική ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών

Αφού λοιπόν η SARA βρίσκεται στα πρώιμα ενδοσώματα είναι εύλογο το ερώτημα που γεννιέται για τον ρόλο της ενδοκυττάρωσης στο σηματοδοτικό μονοπάτι της ακτιβίνης A. Για να εξετάσουμε τον πιθανό ρόλο των ενδοσωμάτων στην ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από TGFβ/ακτιβίνη μελετήσαμε την επίδραση της πρωτεΐνης Rab5 στις μεταγραφικές ρυθμίσεις των Smad πρωτεϊνών. Μέλη της οικογένειας Rab5 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της μεμβρανικής κυκλοφορίας. Η Rab5 βρίσκεται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης, στα πρώιμα ενδοσώματα και σε κυστίδια επικαλυπτόμενα με κλαθρίνη. Υπερέκφραση του φυσιολογικού τύπου καθώς και της συνεχώς ενεργής μορφής της Rab5, Rab5Q79L, οδηγεί στην αύξηση του ρυθμού εσωτερίκευσης ενδοκυττάρων δεικτών και επάγει την σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων αυξάνοντας έτσι το μέγεθός τους (Stenmark et al., 1994). Από την άλλη μεριά, η επικρατούσα αρνητική μορφή της Rab5, Rab5S34N, αναστέλλει την ενδοκυττάρωση και την σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων (Stenmark et al., 1994).

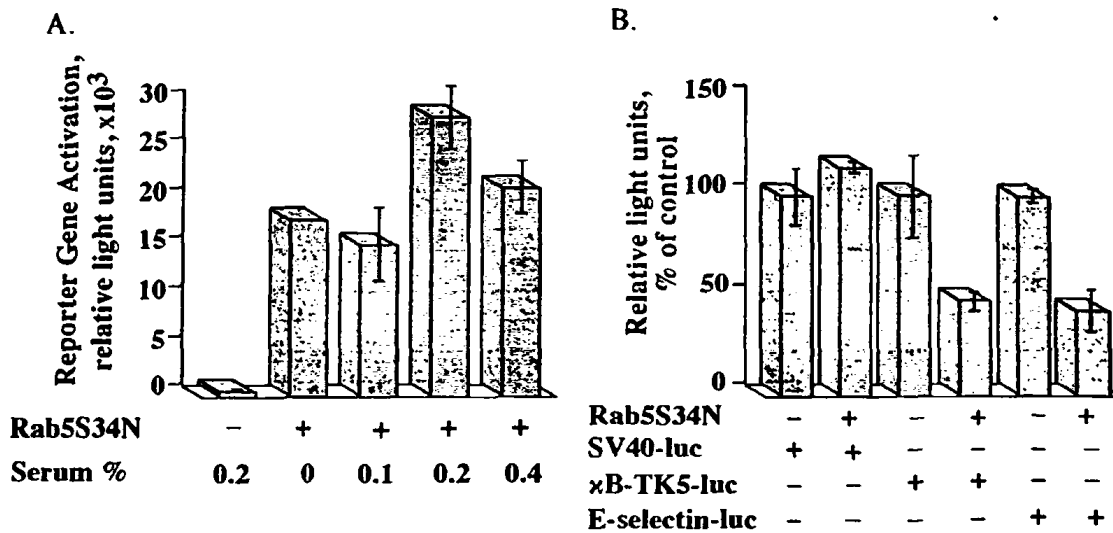
Ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν με την Rab5Q79L, ή με την Rab5S34N και εξετάστηκε η επίδρασή τους στην μεταγραφή από την κατασκευή αναφοράς SBE-luc. Είναι αξιοσημείωτο, ότι απουσία ακτιβίνης A, η Rab5S34N αυξάνει δραματικά την μεταγραφική ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών (Εικόνα 19, A). Παρουσία ακτιβίνης A, η Rab5Q79L, προκάλεσε 50% μείωση, ενώ η Rab5S34N προκάλεσε μια μικρή αύξηση της επαγόμενης από ακτιβίνη A μεταγραφής (Εικόνα 19, B). Για να αποκλείσουμε την πιθανή απελευθέρωση του παράγοντα TGF-β ή ακτιβίνης A από τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την Rab5S34N, και συνεπώς την ενεργοποίηση της μεταγραφής μέσω κάποιας αυτοκρινικής διαδικασίας, συλλέξαμε θρεπτικό υλικό από κύτταρα BBCE που εκφράζουν Rab5S34N και το εξετάσαμε σε κύτταρα που έχουν διαμολυνθεί με την κατασκευή αναφοράς SBE-luc. Δεν υπήρξε καμία αύξηση της μεταγραφής από το SBE-luc λόγω εκκρινόμενων μορίων από την Rab5S34N. Επειδή στην εργασία αυτή όλα τα πειράματα μεταγραφής απουσία προσδέματος πραγματοποιήθηκαν παρουσία 0,2% ορού, κρίθηκε απαραίτητο να εξετάσουμε, εάν μικροποσότητες TGF-β και ακτιβίνης, που μπορεί να περιέχονται σε αυτό το ποσοστό ορού, είναι ικανές να ενεργοποιήσουν την μεταγραφή από SBE-luc επηρεάζοντας έτσι τα αποτελέσματά μας. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δοκιμασίες αναφοράς είτε σε συνθήκες πλήρης απώλειας ορού είτε σε συνθήκες με αυξανόμενες ποσότητες ορού. Τα αποτελέσματα στην Εικόνα 20 A, αποδεικνύουν ότι η



**Εικόνα 19.** Η Rab5S34N επάγει την μεταγραφική ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών ανεξάρτητα από επαγωγή με ακτιβίνη A. Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal και είτε τον φορέα μάρτυρα είτε την Rab5Q79L είτε την Rab5S34N, και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 8 ώρες. Τα κύτταρα στην συνέχεια επώαστηκαν απουσία (A) ή παρουσία (B) 50 ng/ml ακτιβίνης A και για 16 ώρες πριν την μέτρηση των σχετικών μονάδων φωτός. Η επαγωγή από την Rab5S34N (A) και η αναστολή από την Rab5Q79L είναι στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,001$ ).

δράση της Rab5S34N στην μεταγραφική ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται από την παρουσία ή την απουσία ορού. Επιπλέον, για να αποκλείσουμε το ενδεχόμενο της μη ειδικής ενεργοποίησης της μεταγραφής από την Rab5S34N εξετάσαμε την δράση της Rab5S34N σε κατασκευές αναφοράς που περιέχουν τους υποκινητές της E-σελεκτίνης, του SV-40, και του NF-κB. Η Rab5S34N όχι μόνο δεν ενεργοποιεί την μεταγραφή από αυτούς τους υποκινητές, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις προκαλεί και μια μικρή αναστολή (Εικόνα 20, B).

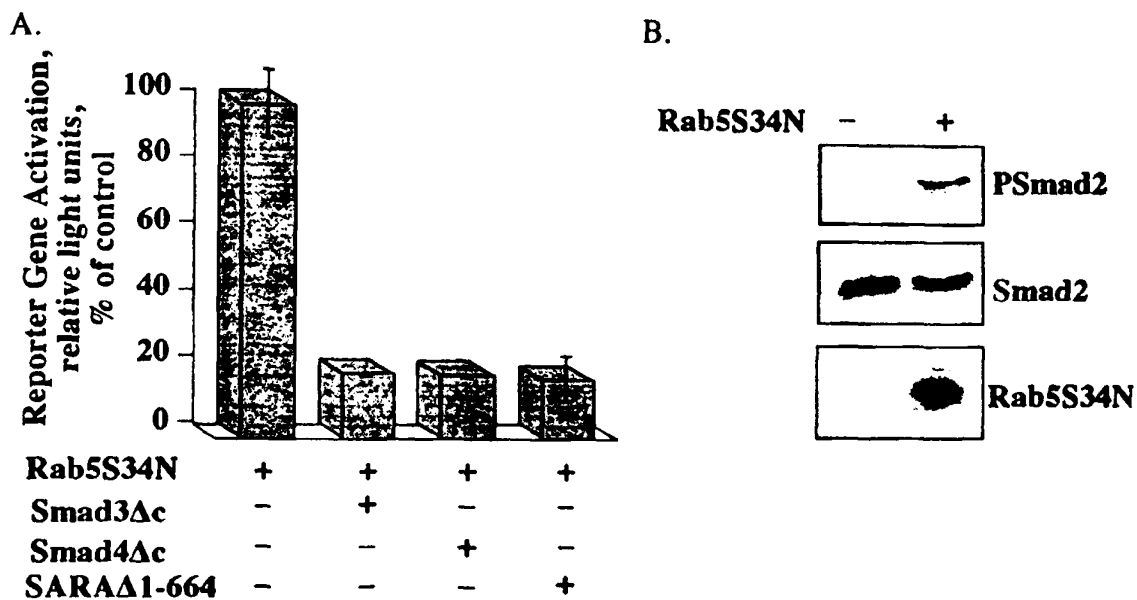
Επειδή η Smad3 συνδέεται στο SBE και επειδή η ενεργοποίηση της μεταγραφής από την κατασκευή αναφοράς SBE-luc συνεπάγεται την απελευθέρωση της Smad3 και μετακίνησή της στον πυρήνα σε σύμπλοκο με την Smad4, μελετήσαμε την επίδραση της Rab5S34N στα ενδοθηλιακά κύτταρα με ταυτόχρονη διαμόλυνση της επικρατούσας αρνητικής μορφής της Smad3, (Smad3Δc) ή της επικρατούσας αρνητικής μορφής της Smad4 (Smad4Δc). Πράγματι, η αύξηση της μεταγραφής από την Rab5S34N μειώθηκε δραματικά παρουσία της Smad3Δc ή της Smad4Δc (Εικόνα 21, A). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε η μεταλλαγμένη επικρατούσα αρνητική μορφή της SARA, SARAΔ1-664, που δεν περιέχει την περιοχή FYVE αλλά διατηρεί την ικανότητα να συνδέεται με τις Smad πρωτεΐνες.



**Εικόνα 20.** Η επαγωγή της μεταγραφικής ενεργοποίησης των Smad πρωτεϊνών από την Rab5S34N είναι ειδική. **A,** Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal και είτε τον φορέα μάρτυρα είτε την Rab5S34N και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0, 0,1, 0,2 και 0,4% ορό για επιπλέον 24 ώρες πριν την μέτρηση σχετικών μονάδων φωτός. **B,** Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές, Rab5S34N, CMV-β-gal και είτε SV40-luc, είτε κB-TK5-luc είτε E-selectin-luc και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 24 ώρες πριν την μέτρηση σχετικών μονάδων φωτός. Τα τελευταία εκφράστηκαν ως ποσοστιαίες τιμές από τα πειραματικά φρεάτια στα οποία κάθε κατασκευή αναφοράς διαμολύνθηκε μαζί με την CMV-β-gal (100%). Όλα τα δεδομένα είναι η μέση τιμή ± S.D. από τριπλές μετρήσεις.

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η Rab5S34N προκαλεί την απελευθέρωση της Smad3 από τα πρώιμα ενδοσώματα και την μετακίνησή της στον πυρήνα ύστερα από ετεροδιμερισμό με την Smad4. Επειδή όμως για να συμβεί κάτι τέτοιο χρειάζεται οι Smad να φωσφορυλιωθούν από τους TGF-β/ακτιβίνη υποδοχείς αναζητήσαμε ενδείξεις για την κατάσταση φωσφορυλίωσης των Smad μετά από υπερέκφραση της Rab5S34N. Πράγματι, όταν η Rab5S34N υπερεκφράζεται σε κύτταρα COS προκαλεί δραματική αύξηση στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Smad2 πρωτεΐνης (Εικόνα 21, B).

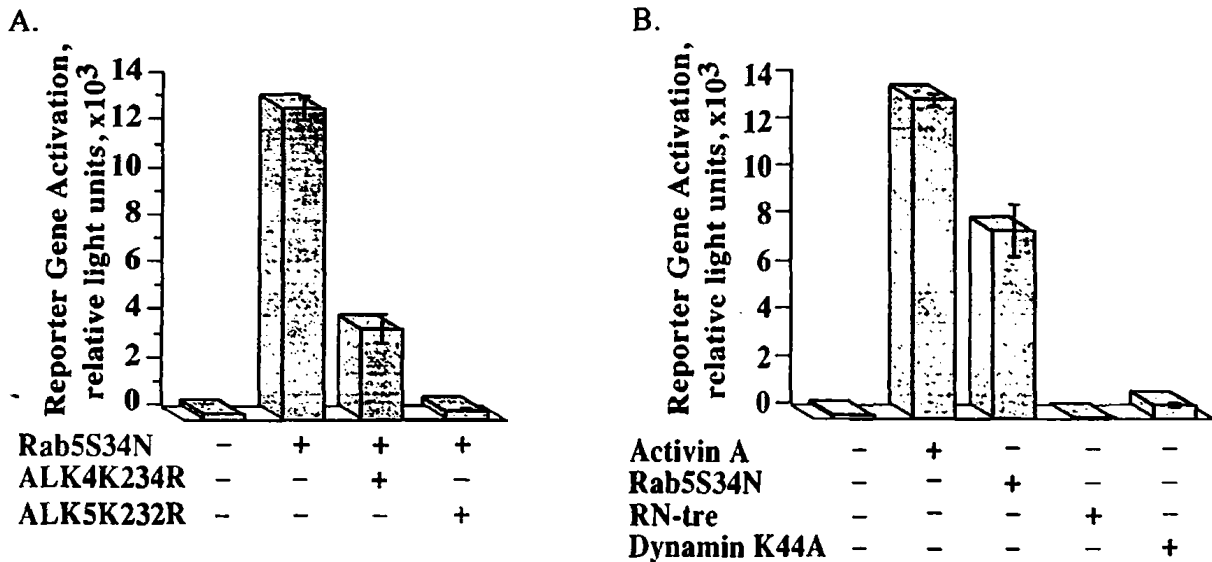
Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως η Rab5S34N απελευθερώνει φωσφορυλιωμένες Smad από το σύμπλοκο με την SARA ενεργοποιώντας έτσι την Smad εξαρτώμενη μεταγραφή. Επειδή στις βιβλιογραφικές αναφορές αναφέρεται πως ένα μεγάλο μέρος των Smad πρωτεϊνών βρίσκεται συνδεδεμένο στους μικροσωληνίσκους (Dong et al., 2000) εξετάσαμε εάν η έκφραση της Rab5S34N έχει αρνητική δράση στους μικροσωληνίσκους. Κάτι τέτοιο δεν ισχύει όπως έδειξαν τα αποτελέσματά μας από συνεστιακή μικροσκοπία, αποκλείοντας έτσι το γεγονός η Rab5S34N να αλλάζει το δίκτυο μικροσωληνίσκων και να απελευθερώνει τις Smad από αυτό.



**Εικόνα 21.** Η δράση της Rab5S34N στην Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή απουσία ακτιβίνης A γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης των Smad πρωτεϊνών. **A.** Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal, Rab5S34N και είτε τον φορέα μάρτυρα είτε τις κατασκευές Smad3Δc, Smad4Δc ή SARAΔ1-664, και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0.2% ορό για επιπλέον 24 ώρες πριν την μέτρηση σχετικών μονάδων φωτός. Η αναστολή από τις μεταλλαγμένες μορφές των Smad και της SARA είναι στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,001$ ). **B.** Κύτταρα COS διαμολύνθηκαν με Smad2 Myc-tagged μόνο ή σε συνδυασμό με Rab5S34N Myc-tagged. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα επεξεργάστηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα αντί-Myc και αντί-φωσφο-Smad2.

Επιπλέον, συνδιαμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων με τις μορφές τύπου I υποδοχέων χωρίς ενεργότητα κινάσης, ALK4K234R και ALK5K232R, ανέστειλε την δράση της Rab5S34N στην μεταγραφική ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών (Εικόνα 22, A). Είναι γνωστό ότι οι τύπου II υποδοχείς της ακτιβίνης A έχουν συνεχή ενεργότητα κινάσης και φωσφορυλιώνουν συνεχώς τους τύπου I υποδοχείς. Αυτή η ενεργοποίηση δεν είναι αποδοτική απουσία ακτιβίνης A, γιατί η σύνδεση της τελευταίας στους τύπου II υποδοχείς οδηγεί στην αύξηση της συγγενείας τους με τους τύπου I υποδοχείς και αποδοτική φωσφορυλίωση των τελευταίων. Φαίνεται λοιπόν, ότι η Rab5S34N αναστέλλοντας την σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων, δημιουργεί συνθήκες εμπλουτισμού των τύπου I και II υποδοχέων στα πρώιμα ενδοσώματα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των τύπου I υποδοχέων και της φωσφορυλίωσης των Smad πρωτεϊνών απουσία ακτιβίνης A. Πράγματι, διαμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων με την RN-tre μια Rab5 GAP η οποία αναστέλλει την ενδοκυττάρωση απενεργοποιώντας την Rab5 στην κυτταρική μεμβράνη, έδειξε ότι η RN-tre δεν αυξάνει την μεταγραφική ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών (Εικόνα 22, B). Παρομοίως, αναστολή της ενδοκυττάρωσης από κυστίδια επικαλυπτόμενα με κλαθρίνη και καβεολίνη με την επικρατούσα αρνητική μορφή της δυναμίνης K44A, δεν

αύξησε την μεταγραφική ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών (Εικόνα 22, Β). Φαίνεται λοιπόν, ότι η φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών από την Rab5S34N οφείλεται στον εμπλουτισμό των υποδοχέων τύπου II και I στα πρώιμα ενδοσώματα, γεγονός το οποίο οδηγεί στην φωσφορυλίωση των τύπου I υποδοχέων και φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών απουσία ακτιβίνης A.

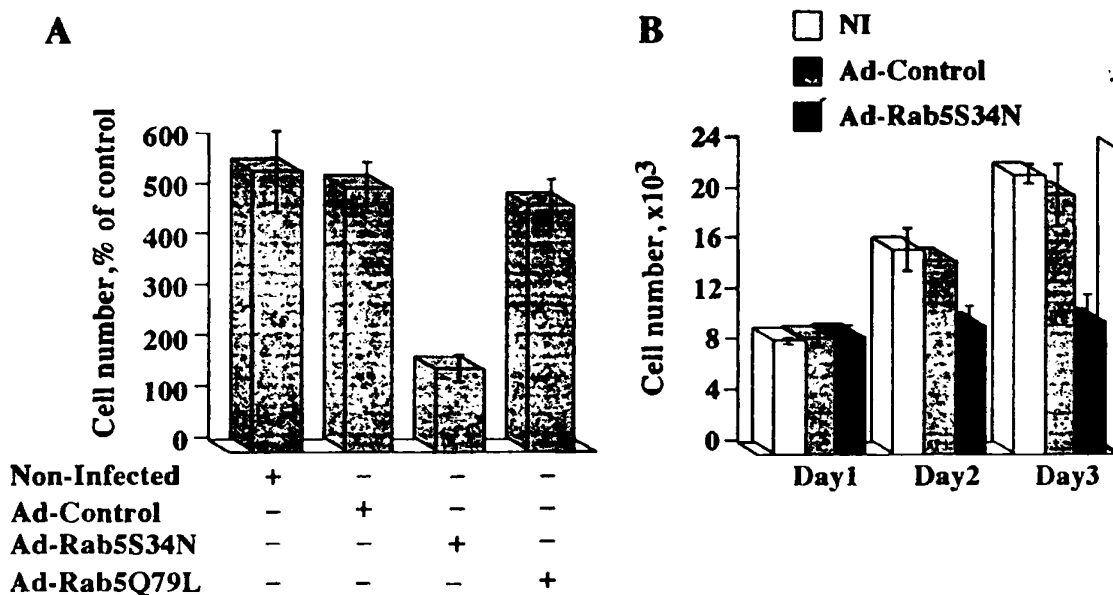


Εικόνα 22. Η δράση της Rab5S34N στην Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή απουσία ακτιβίνης A ανατρέπεται από την παρουσία των μη ενεργών υποδοχέων τύπου I, ενώ αναστολείς της ενδοκυττάρωσης δεν έχουν την ίδια δράση με την Rab5S34N. **A**, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal, και είτε με τον φορέα μάρτυρα είτε την Rab5S34N μόνο είτε την Rab5S34N μαζί με ALK4K234R είτε την Rab5S34N μαζί με ALK5K232R και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 24 ώρες πριν την μέτρηση σχετικών μονάδων φωτός. Η αναστολή από τις μεταλλαγμένες μορφές των ALK υποδοχέων είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,001$ ). **B**, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν παροδικά με κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal, και είτε με τον φορέα μάρτυρα είτε την Rab5S34N είτε την RN-tre είτε την δυναμίνη K44A και 24 ώρες αργότερα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 24 ώρες πριν την μέτρηση σχετικών μονάδων φωτός. Για τον πειραματικό θετικό μάρτυρα (στήλες 1 και 2) και 24 ώρες μετά την διαμόλυνση με SBE-luc, CMV-β-gal, και τον φορέα μάρτυρα, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% ορό για επιπλέον 8 ώρες. Τα κύτταρα επώαστηκαν στην συνέχεια με 50 ng/ml ακτιβίνη A για 16 ώρες πριν την μέτρηση των σχετικών μονάδων φωτός. Οι διαφορές μεταξύ των RN-tre και δυναμίνης K44A έναντι της Rab5S34N είναι στατιστικά σημαντικές ( $p < 0,001$ ). Όλα τα δεδομένα είναι η μέση τιμή  $\pm$  S.D. από τριπλές μετρήσεις.

### 3.3.5 Η Rab5S34N αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και των κερατινοκυττάρων

Θελήσαμε να εξετάσουμε αν η υπερέκφραση της Rab5S34N, ταυτόχρονα με την ενεργοποίηση της μεταγραφικής ενεργότητας των Smad πρωτεϊνών, μπορεί να μιμηθεί την δράση της ακτιβίνης A σε περισσότερο πολύπλοκες κυτταρικές λειτουργίες όπως αυτή του

πολλαπλασιασμού. Πράγματι, ενδοθηλιακά κύτταρα BBCE που μολύνθηκαν με αδενοϊό που εκφράζει την Rab5S34N δεν ανταποκρίνονται στον επαγόμενο από FGF-2 πολλαπλασιασμό όταν αυτά συγκριθούν με κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί ή με κύτταρα που μολύνθηκαν μόνο με τον αδενοϊό μάρτυρα (Εικόνα 23, A). Παράλληλα τα κύτταρα που έχουν μολυνθεί με αδενοϊό που εκφράζει την Rab5Q79L πολλαπλασιάζονται κανονικά (Εικόνα 23, A). Παρομοίως, κερατινοκύτταρα που έχουν μολυνθεί με αδενοϊό που εκφράζει την Rab5S34N δεν ανταποκρίνονται στον επαγόμενο από ορό πολλαπλασιασμό (Εικόνα 23, B). Είναι λοιπόν πιθανό, η επίδραση της Rab5S34N στην φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών αλλά και στην ενεργοποίηση της μεταγραφής να μιμείται την δράση της ακτιβίνης A μέσω των ενεργοποιημένων από τους υποδοχείς Smad πρωτεϊνών.



**Εικόνα 23. Η Rab5S34N αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. A,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν με ανασυνδυασμένους αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP είτε GFP και Rab5S34N είτε GFP και Rab5Q79L για 2 ώρες. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα τρυψινοποιήθηκαν και 5.000 κύτταρα τοποθετήθηκαν ανά φρεάτιο και 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα επώαστηκαν με 2,5 ng/ml FGF-2. Τριάδες φρεατίων μετρήθηκαν 2 μέρες αργότερα με μετρητή Coulter Counter. Η αναστολή από τον αδενοϊό Ad-Rab5S34N σε σύγκριση με τον αδενοϊό μάρτυρα Ad-Control είναι στατιστικά σημαντική ( $p < 0,001$ ). **B,** Κύτταρα HaCaT τοποθετήθηκαν σε φρεάτια σε συγκέντρωση 10.000 κύτταρα/φρεάτιο, και μολύνθηκαν για δύο ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP είτε GFP και Rab5S34N. Κύτταρα από τριάδες φρεατίων μετρήθηκαν για τρεις συνεχόμενες ημέρες ξεκινώντας την μία ημέρα μετά την μόλυνση. Η αναστολή από τον αδενοϊό Ad-Rab5S34N σε σύγκριση με τον αδενοϊό μάρτυρα Ad-Control είναι στατιστικά σημαντική την δεύτερη ( $p < 0,005$ ) και την τρίτη ημέρα ( $p < 0,006$ ). Όλα τα δεδομένα είναι η μέση τιμή  $\pm$  S.D. από τριπλές μετρήσεις.

**3.4 Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A δεν εξαρτάται μόνο από την ενεργοποίηση του μονοπατιού Smad αλλά και από μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών.**

Η ακτιβίνη A χαρακτηρίστηκε ως προς την ικανότητά της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό ενδοθηλιακών κυττάρων. Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι σαφές ότι η ανασταλτική δράση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό γίνεται διαμέσου του υποδοχέα ALK4 (Εικόνα 9, κεφάλαιο 3.2.3), ενώ ο υποδοχέας ALK2 αυξάνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 10, κεφάλαιο 3.2.3). Είναι όμως γνωστό ότι ο ALK4 μετάγει παραπέρα τα σήματά του διαμέσου φωσφορυλίωσης των Smad2/3 πρωτεϊνών, οι οποίες δημιουργούν σύμπλοκα με την Smad4, και έτσι μεταφερόμενες στον πυρήνα ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση. Δημιουργείται έτσι το ερώτημα εάν αμφότερες οι Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες είναι εξίσου σημαντικές για την αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A. Έτσι, η ενότητα αυτή στοχεύει να απαντήσει στο ερώτημα εάν εξαρτάται η αναστολή του πολλαπλασιασμού από την μεταγωγική οδό ακτιβίνης A/ALK4/Smad2 ή την οδό ακτιβίνης A/ALK4/Smad3 ή ίσως και από τις δύο οδούς.

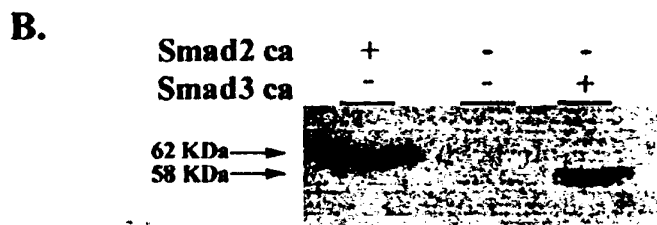
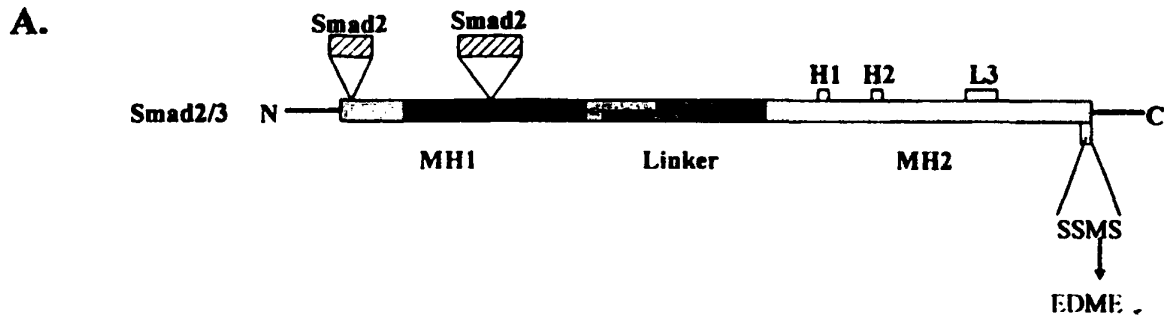
Επιπλέον, ο TGF- $\beta$ , και κατ' επέκταση η ακτιβίνη A, ενεργοποιούν και άλλους διαμεσολαβητές, οι οποίοι θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην αντιπολλαπλασιαστική δράση. Πράγματι, έχει αναφερθεί ότι παρουσία TGF- $\beta$  η φωσφατάση PP2A μπορεί να αποφωσφορυλιώνει, διαμέσου του υποδοχέα τύπου I (T $\beta$ RI), την κινάση p70<sup>S6K</sup> που είναι απαραίτητη για την πρόοδο στην G1/S φάση του κυτταρικού κύκλου (Griswold-Prenner et al., 1998; Petritsch et al., 2000). Έτσι λοιπόν, η απενεργοποίηση της p70<sup>S6K</sup> κινάσης (p70<sup>S6K</sup>) συμμετέχει στη αντιπολλαπλασιαστική δράση του TGF- $\beta$  (βλέπε κεφάλαιο 1.3.6.1 και 4), ενώ για την ακτιβίνη A τέτοιες μελέτες δεν έχουν γίνει ακόμη. Έτσι, το άλλο ερώτημα της ενότητας αυτής στοχεύει στην διαλεύκανση της συμμετοχής των Smad ανεξάρτητων μονοπατιών στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ακτιβίνη A.

#### **3.4.1 Αμφότερες οι Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες μετάγουν αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα**

Για να απαντήσουμε στο ερώτημα της σχετικής συνεισφοράς της ενεργοποίησης των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A, αλλά και να επιβεβαιώσουμε την συμμετοχή των Smad πρωτεϊνών στον πολλαπλασιασμό των

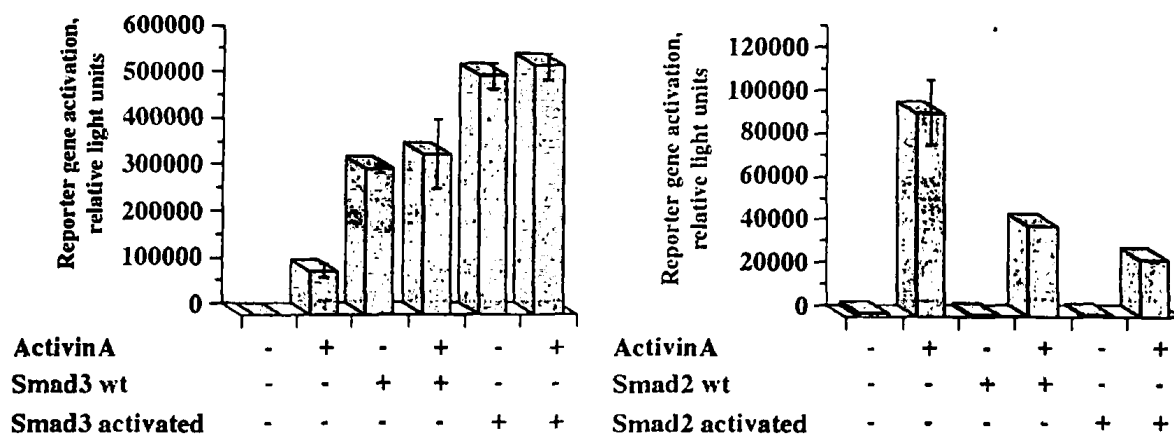


ενδοθηλιακών κυττάρων κατασκευάσαμε τις μόνιμα ενεργές μορφές των Smad2 και Smad3. Οι Smad2 και Smad3 ενεργοποιούνται σε πολλαπλά σημεία φωσφορυλίωσης (SSMS) από τον υποδοχέα τύπου I της ακτιβίνης A στο καρβόξυ-τελικό άκρο τους. Η αντικατάσταση των σερινών σε γλουταμικό έχει δείξει ότι κρατά τις Smad στην ενεργοποιημένη τους μορφή (Liu et al., 1997b; Macias-Silva et al., 1996; Souchelnytskyi et al., 1997). Στην εικόνα 24 (A και B) φαίνεται η αλλαγή των αμινοξέων αυτών αλλά και η έκφραση των κατασκευών μετά από παροδική διαμόλυνση σε κύτταρα BBCE.



Εικόνα 24. Οι μόνιμα ενεργές μορφές των Smad2 και Smad3. A, Σχηματική παρουσίαση της δομής των Smad2 και Smad3 και η αντικατάσταση των σερινών σε γλουταμικό. B, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές που περιέχουν είτε την ενεργοποιημένη μορφή της Smad2 ή της Smad3. Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν μετά από 24 ώρες και ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών έγινε με αντίσωμα 9E10 (αντι-Myc).

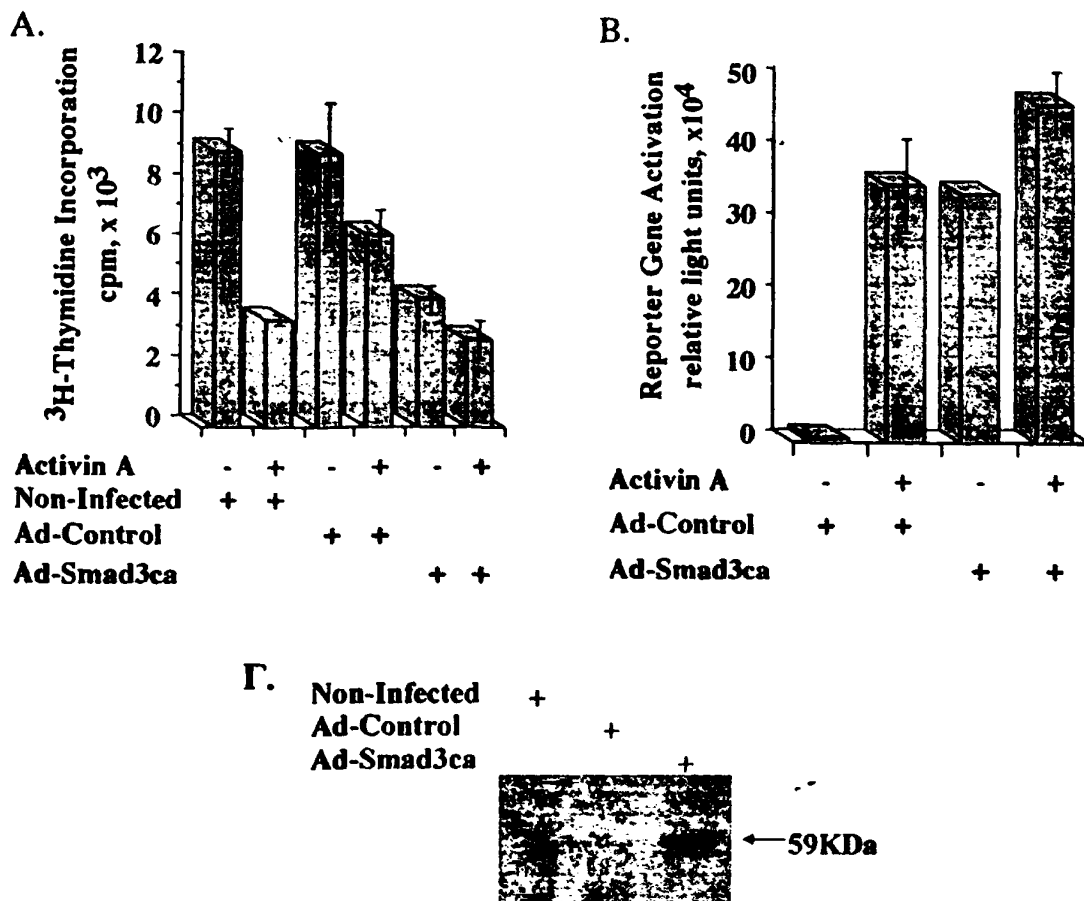
Επιπλέον, θελήσαμε να ελέγξουμε την ειδικότητα των κατασκευών αυτών χρησιμοποιώντας συγκεκριμένα στοιχεία ανταπόκρισης των Smad πρωτεϊνών (Εικόνα 25). Έτσι, ελέγξαμε την ικανότητα των μόνιμα ενεργών μορφών αναφορικά με την επαγωγή της μεταγραφής από το στοιχείο ανταπόκρισης SBE. Πράγματι, η μόνιμα ενεργή Smad3 (Εικόνα 25) επάγει την μεταγραφή τουλάχιστον πέντε φορές παραπάνω απ' ότι η ακτιβίνη, ενώ η μόνιμα ενεργή Smad2 στην ίδια δοκιμασία δεν έχει την ικανότητα να επάγει την μεταγραφή αφού δεν μπορεί να συνδεθεί στο DNA χωρίς την συνεργασία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Εικόνα 25, δεξί πλαίσιο).



**Εικόνα 25.** Η μόνιμα ενεργή μορφή της Smad3 επάγει την Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή απουσία ακτιβίνης A, ενώ η μόνιμα ενεργή μορφή της Smad2 όχι. A, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal και είτε τον φορέα μάρτυρα, είτε τον φυσιολογικό τύπο της Smad3 (Smad3 wt) είτε την μόνιμα ενεργή μορφή της Smad3 (Smad3 activated). Την επόμενη ημέρα τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% NCS και μετά από 8 ώρες χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A. Μετά από επιπλέον επώαση 16 ωρών οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal. B, Κύτταρα BBCE διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές SBE-luc, CMV-β-gal και είτε τον φορέα μάρτυρα, είτε τον άγριο τύπο της Smad2 (Smad2 wt) είτε την μόνιμα ενεργή μορφή της Smad2 (Smad2 activated) και επεξεργάστηκαν με ακριβώς τον ίδιο τρόπο όπως στην περίπτωση A.

Για να διερευνήσουμε περαιτέρω τον ρόλο των Smad πρωτεϊνών στην επαγόμενη από ακτιβίνη A αναστολή του πολλαπλασιασμού κατασκευάσαμε ανασυνδυασμένο αδενοϊό που εκφράζει την μόνιμα ενεργή μορφή της Smad3. Έτσι, εξετάσαμε τον πολλαπλασιασμό κυττάρων BBCE που μολύνθηκαν με τον αδενοϊό της ενεργοποιημένης Smad3 σε δοκιμασίες θυμιδίνης. Η μόνιμα ενεργή μορφή της Smad3 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως ακριβώς και η ακτιβίνη A στα μη μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 26, A). Σε παράλληλες δοκιμασίες ο ίδιος αδενοϊός επάγει την Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή σε επίπεδα ανάλογα με αυτά της ακτιβίνης A (Εικόνα 26, B).

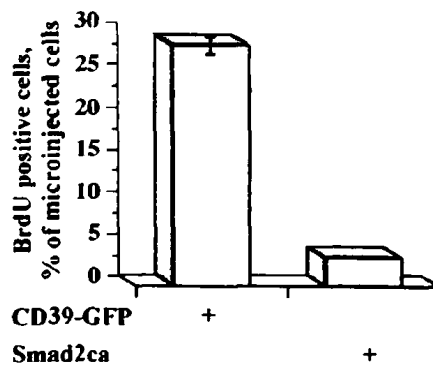
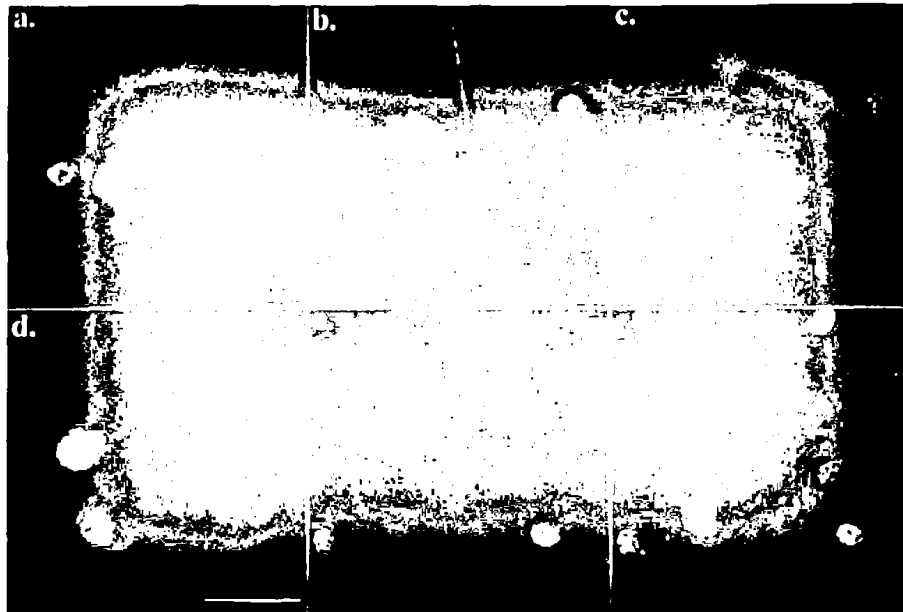
Η κατασκευή ανασυνδυασμένων αδενοϊών που εκφράζουν την μόνιμα ενεργή μορφή της Smad2 ήταν δύσκολη γιατί δεν υπήρξε ικανοποιητική αναπαραγωγή αδενοϊών με αποτέλεσμα την πολύ χαμηλή έκφραση της πρωτεΐνης. Η επικοινωνία με άλλους ερευνητές έδειξε ότι η αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών της φυσιολογικής Smad2, της επικρατούσας αρνητικής μορφής αλλά και της μόνιμα ενεργής μορφής για άγνωστους μέχρι στιγμής λόγους είναι δύσκολη (Dr. Peter ten Dijke, προσωπική επικοινωνία). Για τον λόγο αυτό εξετάσαμε την δράση της μόνιμα ενεργής μορφής της Smad2 σε δοκιμασίες ενσωμάτωσης βρωμοδεοξουριδίνης (BrdU). Έτσι, σε κύτταρα



**Εικόνα 26.** Η μόνιμα ενεργή μορφή της Smad3 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. **A,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν για 2 ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control), είτε GFP και την ενεργή μορφή της Smad3 (Ad-Smad3ca). Μετά από 24 ώρες χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A και για τις τελευταίες 4 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα 1  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]μεθύλοθυμιδίνης. Η ραδιενέργεια από τριάδες φρεατίων μετρήθηκε σε υγρό βήτα σπινθηρισμό. **B,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control), είτε GFP και την Smad3ca (Ad-Smad3ca) για 2 ώρες, και στην συνέχεια διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές SBE-luc και CMV- $\beta$ -gal. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% NCS και μετά από 8 ώρες χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A. Μετά από επιπλέον επώαση 16 ωρών οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις  $\beta$ -gal. **Γ,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν όπως ακριβώς και στην περίπτωση A, και κυτταρικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα αντι-Myc.

BBCE πραγματοποιήθηκαν μικροενέσεις DNA είτε με την μόνιμα ενεργή μορφή της Smad2 (Εικόνα 27, d), είτε με την διαμεμβρανική περιοχή της CD39 συζευγμένη με την πρωτεΐνη GFP (CD39-GFP) σαν μάρτυρα (Εικόνα 27, a). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση της μόνιμα ενεργής μορφής της Smad2 αναστέλλει σημαντικά την ενσωμάτωση της BrdU (d-f) σε σύγκριση με τα κύτταρα που εκφράζουν CD39-GFP, τα οποία έδειξαν 30 % ποσοστό πολλαπλασιασμού (a-c).

Έτσι, φαίνεται ότι η ενεργοποίηση αμφοτέρων των Smad2 και Smad3 από την ακτιβίνη A είναι σε θέση να μετάγει αντιπολλαπλασιαστικά μηνύματα στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



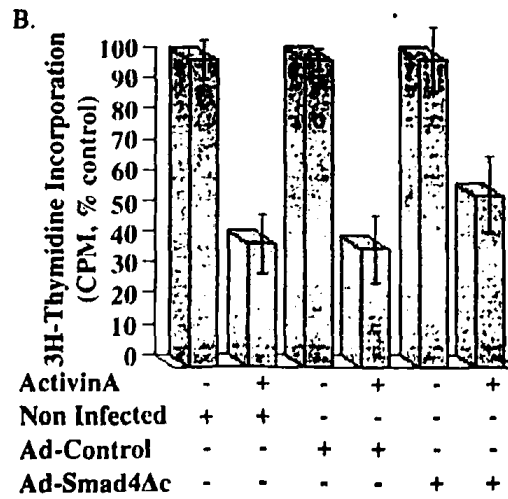
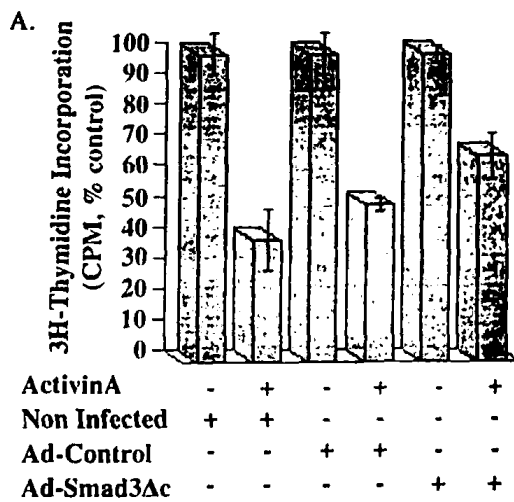
**Εικόνα 27.** Η μόνιμα ενεργή μορφή της Smad2 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Α, Σε κύτταρα BBCE πραγματοποιήθηκαν μικροενέσεις είτε με την κατασκευή CD39-GFP, είτε με την κατασκευή Smad2ca. Μετά από 24 ώρες, χορηγήθηκε BrdU για 3 ώρες και τα κύτταρα επεξεργάστηκαν με ανοσοφθορισμό με αντίσωμα αντι-GFP (a) για τον εντοπισμό της CD39-GFP, αντι-Myc για τον εντοπισμό της Smad2ca (d) και αντι-BrdU (b και e) για τον εντοπισμό των κυττάρων που πολλαπλασιάζονται. Η επικάλυψη των εικόνων φαίνεται στα πλαίσια c και f. Η μπάρα μήκους αντιστοιχεί σε 50μm. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων (κάτω πλαίσιο) εκφράστηκε ως % ποσοστό θετικών κυττάρων για την ενσωμάτωση της BrdU σε σχέση με τον ολικό αριθμό κυττάρων τα οποία εκφράζουν CD39-GFP ή Smad2ca.

### 3.4.2 Η αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A δεν εξαρτάται αποκλειστικά από την ενεργοποίηση των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών

Θελήσαμε να αναζητήσουμε ενδείξεις για το αν και κατά πόσο το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών είναι απαραίτητο για την δράση της ακτιβίνης A στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Προς αυτό τον σκοπό μόλυνε κύτταρα BBCE με αδενοϊούς που εκφράζουν τις επικρατείς αρνητικές μορφές των Smad3 (Ad-Smad3Δc) ή Smad4 (Ad-Smad4Δc) και εξετάσαμε αν η ακτιβίνη A διατηρεί την ικανότητά της να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ακτιβίνη A, όπως ήταν αναμενόμενο ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των μη μολυσμένων κυττάρων αλλά και των κυττάρων εκείνων που μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς μάρτυρες που εκφράζουν είτε μόνο GFP ή μόνο LacZ (Εικόνα 28, A και B). Η μόλυνση BBCE κυττάρων με τους αδενοϊούς Ad-Smad3Δc ή Ad-Smad4Δc ανέστειλε την δράση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων κατά 20% (Εικόνα 28, A και B). Για να επιβεβαιώσουμε αν η έκφραση των πρωτεϊνών Smad3Δc και Smad4Δc από τους ανασυνδυασμένους αδενοϊούς ήταν αρκετή για να αναστρέψει την δράση της ακτιβίνης A, εξετάσαμε τους αδενοϊούς αυτούς ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν την μεταγραφική ενεργότητα των Smad πρωτεϊνών. Έτσι κύτταρα BBCE αρχικά μολύνθηκαν με τους αδενοϊούς Ad-Smad3Δc ή Ad-Smad4Δc, χρησιμοποιώντας πάντα το ίδιο ποσοστό μόλυνσης (MOI) με την παραπάνω δοκιμασία, και στην συνέχεια διαμολύνθηκαν με την κατασκευή που αποτελείται από πέντε αντίγραφα της αλληλουχίας όπου συνδέονται οι Smad πρωτεΐνες (Smad-binding element, SBE) και είναι συζευγμένο με το γονίδιο της λουσιφεράσης (SBE-luc). Οι Ad-Smad3Δc και Ad-Smad4Δc ανέστειλαν σχεδόν ολοκληρωτικά την επαγόμενη από ακτιβίνη A Smad εξαρτώμενη μεταγραφή (Εικόνα 28, Δ).

### 3.4.3 Η αναστολή της p70<sup>S6K</sup> συμμετέχει στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A

Το γεγονός ότι οι επικρατούσες αρνητικές μορφές των Smad πρωτεϊνών αδυνατούν να αναστρέψουν την δράση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, υποδηλώνουν ότι το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών είναι σημαντικό για την δράση της ακτιβίνης A αλλά δεν είναι το μοναδικό. Η αλληλεπίδραση της υπομονάδας Ba της φωσφατάσης 2A (PP2A) με τον υποδοχέα τύπου I του παράγοντα TGF-β (TβRI)

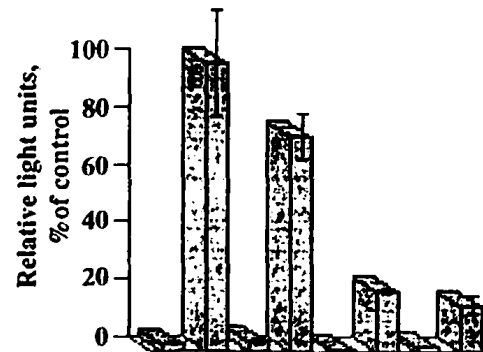


**Γ.**

Ad-Control	+		
Ad-Smad4Δc		+	
Ad-Smad3Δc	-	-	+



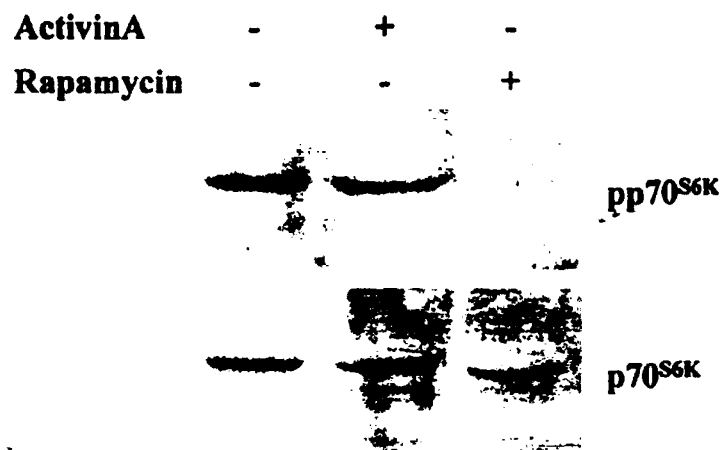
**Δ.**



ActivinA	-	+	-	+	-	+	-	+
Non Infected	+	+	-	-	-	-	-	-
Ad-Control	-	-	+	+	-	-	-	-
Ad-Smad3Δc	-	-	-	-	+	+	-	-
Ad-Smad4Δc	-	-	-	-	-	-	+	+

**Εικόνα 28.** Οι επικρατούσες αρνητικές μορφές των Smad πρωτεϊνών δεν αναστρέφουν πλήρως την δράση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. **A,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν για 2 ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control), είτε GFP και την Smad3Δc (Ad-Smad3Δc). Μετά από 24 ώρες χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A και για τις τελευταίες 4 ώρες προστέθηκε στα κύτταρα 1 μCi/ml [<sup>3</sup>H]μεθύλοθυμιδίνης. Η ραδιενέργεια από τριπλά φρεάτια μετρήθηκε σε υγρό βήτα σπινθηρισμού. **B,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν για 2 ώρες με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε μόνο GFP (Ad-Control), είτε GFP και την Smad4Δc (Ad-Smad4Δc) και επεξεργάστηκαν όπως στην περίπτωση A. **Γ,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν και όπως ακριβώς και στις περιπτώσεις A και B. Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχτηκαν 24 ώρες αργότερα και ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-PAGE. Η ανίχνευση της έκφρασης των Ad-Smad3Δc και Ad-Smad4Δc έγινε με αντίσωμα αντι-FLAG. **Δ,** Κύτταρα BBCE μολύνθηκαν είτε με τον αδενοϊό Ad-Control, είτε με τον Ad-Smad3Δc, είτε με τον Ad-Smad4Δc για 2 ώρες, και στην συνέχεια διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές SBE-luc και CMV-β-gal. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υλικό με 0,2% NCS και μετά από 8 ώρες χορηγήθηκαν 50 ng/ml ακτιβίνης A. Μετά από επιπλέον επώαση 16 ωρών οι σχετικές μονάδες φωτός μετρήθηκαν και ομαλοποιήθηκαν για την αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις β-gal.

(Griswold-Prenner et al., 1998), και το γεγονός ότι ο TGF- $\beta$  αναστέλλει την κινάση p70<sup>S6K</sup> (Petritsch et al., 2000) που αποτελεί στόχο της φωσφατάσης PP2A, μας ώθησε να μελετήσουμε την δράση της ακτιβίνης στην κινάση αυτή. Κυτταρικά εκχυλίσματα από ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της κινάσης p70<sup>S6K</sup> αναστέλλεται μετά από την χορήγηση ακτιβίνης A (Εικόνα 29). Παράλληλα η προσθήκη ραπαμυκίνης ως θετικό μάρτυρα και γνωστού αναστολέα της κινάσης p70<sup>S6K</sup> (Abraham, 1998; Jefferies et al., 1997) ανέστειλε πλήρως την δράσης της κινάσης. Είναι λοιπόν πιθανόν, η ακτιβίνη A να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω Smad-εξαρτώμενων αλλά και Smad-ανεξάρτητων μονοπατιών.



**Εικόνα 29.** Η ακτιβίνη A αναστέλλει την φωσφορυλίωση της κινάσης p70<sup>S6K</sup>. Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC επώαστηκαν μόνο με θρεπτικό υλικό ή με 100 ng/ml ακτιβίνη A ή με 30 nM ραπαμυκίνη. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν μετά από 30 λεπτά και τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση και στην συνέχεια επεξεργάστηκαν με ανάλυση κατά Western. Η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης μορφής της p70<sup>S6K</sup> (pp70<sup>S6K</sup>) αλλά και της συνολικής ποσότητας της κινάσης (p70<sup>S6K</sup>), ανιχνεύθηκαν με τα αντίστοιχα αντισώματα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

**Η ακτιβίνη A αναστέλλει το ρυθμό ανάπτυξης και την αγγειογένεση ξενομοσχευματικών νευροβλαστωμάτων σε ποντίκια**

Ο ρόλος της ακτιβίνης A στην καρκινογένεση έχει διερευνηθεί ελάχιστα. Ως μέλος της υπεροικογένειας του παράγοντα TGF- $\beta$ , ο οποίος είναι ισχυρός αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, η ακτιβίνη A αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό πολλών φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων (Chen et al., 2002). Επίσης, η ακτιβίνη A επάγει την απόπτωση σε κύτταρα ήπατος HepG2 (Zauberman et al., 1997) και σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη LNCaP (Zhang et al., 1997). Περισσότερα άμεσα δεδομένα αναφορικά με το ρόλο της ακτιβίνης A στην καρκινογένεση δεν υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία. Προς την κατεύθυνση αυτή, πρόσφατες μελέτες, στις οποίες συμμετείχε το εργαστήριο στο οποίο εκπονήθηκε η διατριβή αυτή, έδειξαν ότι η ενίσχυση του N-Myc ογκογονιδίου σε νευροβλαστώματα μειώνει την έκφραση της ακτιβίνης A ρυθμίζοντας αρνητικά τη μεταγραφή του γονιδίου της. Επιπλέον, στις ίδιες μελέτες δείχθηκε ότι η ακτιβίνη A όχι μόνο έχει αντιπολλαπλασιαστική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα *in vitro*, αλλά αναστέλλει επίσης την δημιουργία αγγείων στην δοκιμασία αγγειογένεσης στην χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσού όρνιθας *in vivo* (Fotsis et al., 1999; Breit et al., 2000).

Η ρύθμιση της έκφρασης της ακτιβίνης A από N-Myc ογκογονίδιο και οι αντιαγγειογενετικές ιδιότητές της υπέδειξαν σαφώς ότι η ακτιβίνη A μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των συμπαγών όγκων. Στα πλαίσια αυτά, η ενεργοποίηση διαφόρων ογκογονιδίων, όπως του N-Myc στα νευροβλαστώματα, κατά την διάρκεια του κακοήθη μετασχηματισμού μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση ενός αντιμιτωτικού και αντιαγγειογενετικού παράγοντα, δηλ. της ακτιβίνης A, αυξάνοντας τον κακοήθη φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. Θελήσαμε λοιπόν να διερευνήσουμε τη δυνατότητα ότι η επανέκφραση της ακτιβίνης A σε κύτταρα νευροβλαστώματος πράγματι αναστρέφει τον κακοήθη φαινότυπο των κυττάρων αυτών. Έτσι, επανεισήγαμε το cDNA της ακτιβίνης A, με σταθερή διαμόλυνση, σε κύτταρα νευροβλαστώματος WAC2, τα οποία είχαν πολλαπλάσια έκφραση του N-Myc ογκογονιδίου σε σχέση με κύτταρα νευροβλαστώματος πρώτου σταδίου (SH-EP007). Στο φορέα έκφρασης, το cDNA της ακτιβίνης A ήταν κάτω από τη ρύθμιση του υποκινητή CMV με αποτέλεσμα να μπορεί να εκφράζεται παρά την υψηλή έκφραση του N-Myc ογκογονιδίου. Πράγματι, όλοι οι κυτταρικοί κλώνοι των WAC2 κυττάρων, οι οποίοι εξέφραζαν την ακτιβίνη A (Wact1, Wact2, και Wact5), είχαν



σαφώς μειωμένο πολλαπλασιασμό σε σχέση με τα WAC2 αλλά και τα SH-EP007 κύτταρα. Προς επιβεβαίωση, μόλυνση κυττάρων WAC2 με αδενοϊό, ο οποίος εκφράζει την ακτιβίνη A, είχε το ίδιο αποτέλεσμα. Επιπλέον, οι κυτταρικοί κλώνοι Wact1, Wact2, και Wact5 δημιούργησαν ξενομοσχευματικούς όγκους σε ποντίκια, οι οποίοι είχαν μικρότερη αγγείωση και αναπτύσσονταν με πολύ βραδύτερο ρυθμό σε σχέση με κλώνους-μάρτυρες. Έτσι, η επανέκφραση της ακτιβίνης A στα νευροβλαστώματα αναστρέφει τον κακοήθη φαινότυπό τους παρά την συνεχιζόμενη υψηλή έκφραση του N-Myc ογκογονιδίου.

Ο βραδύς ρυθμός ανάπτυξης των ξενομοσχευματικών νευροβλαστωμάτων, τα οποία εκφράζουν την ακτιβίνη A, προφανώς οφείλεται στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των νευροβλαστωματικών κυττάρων και την μείωση της αγγείωσης των όγκων, εάν και δεν είναι δυνατός ο επιμερισμός του ποσοστού συμμετοχής του κάθε μηχανισμού. Αναφορικά με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, η δράση της ακτιβίνης είναι παρόμοια με αυτή του TGF-β. Ο TGF-β είναι ισχυρός αναστολέας του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θεωρείται πλέον σαν ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Πράγματι, τα γονίδια τα οποία εκφράζουν τους υποδοχείς του, και τις Smad 2 και 4 πρωτεΐνες υφίστανται μεταλλάξεις σε σειρά καρκίνων καθιστώντας τους καρκίνους αυτούς ανθεκτικούς στη ανασταλτική δράση του TGF-β (de Caestecker et al., 2000; Derynck et al., 2001; Moustakas and Heldin, 2002). Παρομοίως, μεταλλάξεις του υποδοχέα ALK4 της ακτιβίνης A έχουν παρατηρηθεί σε όγκους της υπόφυσης (Alexander et al., 1996).

Η μειωμένη αγγείωση των ξενομοσχευματικών νευροβλαστωμάτων, τα οποία εκφράζουν ακτιβίνη A, ενισχύει ισχυρά την άποψη ότι η ακτιβίνη A έχει αντιαγγειογενετική δράση και ευθυγραμμίζεται σαφώς με την αντιαγγειογενετική δράση της τελευταίας στη δοκιμασία της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης νεοσσού όρνιθας (Breit et al., 2000). Η αντιαγγειογενετική δράση της ακτιβίνης A σαφώς την διαφοροποιεί στο σημείο αυτό από τον TGF-β. Πράγματι, ο TGF-β, ενώ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργειες, σαφώς διεγείρει την νεοαγγείωση στον κερατοειδή των κουνελιών και την χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη νεοσσών όρνιθας (Roberts and Sporn, 1989; Yang and Moses, 1990). Επιπλέον, αρκετά μοντέλα υποδεικνύουν σημαντικό ρόλο για τον από τους όγκους εκκρινόμενο TGF-β1 στην αγγειογένεση των όγκων. Υπερέκφραση του TGF-β1 σε διαμολυσμένα κύτταρα προστατικού καρκινώματος ή ωοθηκών Κινέζικου χοιριδίου προκάλεσε σημαντική αύξηση της νεοπλασματικής αγγειογένεσης σε ανοσοκατασταλμένα ποντίκια (Stearns et al., 1999; Ueki et al., 1992). Τοπική χορήγηση εξουδετερωτικών αντισωμάτων του TGF-

β1 ελάττωσε σημαντικά την αγγειογένεση των όγκων (Ueki et al., 1992). Τα δεδομένα αυτά, μαζί με την παρατήρηση ότι ο TGF-β υπερεκφράζεται συχνά σε τελικά στάδια αρκετών καρκίνων (Gorsch et al., 1992; Walker and Dearing, 1992) οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι ο TGF-β παίζει διπλό ρόλο στο καρκίνο. Σε μερικούς καρκίνους ή σε αρχικά στάδια του κακοήθου μετασχηματισμού, ο TGF-β μπορεί πράγματι να αποτελεί εμπόδιο στην ανάπτυξη των καρκίνων λόγω της ανασταλτικής του πολλαπλασιασμού δράσης του. Σε άλλους καρκίνους όμως ή σε μεταγενέστερα στάδια του κακοήθου μετασχηματισμού, ο TGF-β μπορεί να υπερεκφράζεται επάγοντας το κακοήθου φαινότυπο διαμέσου ενεργοποίησης της αγγειογένεσης και ανάπτυξης ανοσοκαταστολής (Letterio and Roberts, 1998; Derynck et al., 2001; Wakefield and Roberts, 2002; Roberts and Wakefield, 2003).

Το συμπέρασμα αναφορικά με την δυαδική δράση του TGF-β στον καρκίνο ενισχύεται επίσης από την ικανότητά του να προκαλεί επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση αυξάνοντας τον μεταστατικό φαινότυπο πολλών καρκίνων (Oft et al., 1996; Portella et al., 1998, Wakefield and Roberts, 2002). Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη δείχνει γλαφυρά τον δυαδικό ρόλο του TGF-β στον καρκίνο (Siegel et al., 2003). Στη μελέτη αυτή οι ερευνητές δημιούργησαν διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία εξέφραζαν είτε τον μόνιμα ενεργό υποδοχέα τύπου I του TGF-β, είτε την επικρατή αρνητική μορφή του υποδοχέα τύπου II του TGF-β. Κατόπιν, διασταύρωσαν τα ποντίκια αυτά με διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία εξέφραζαν ενεργοποιημένες μορφές του ογκογονιδίου Neu. Ο μόνιμα ενεργός υποδοχέα τύπου I του TGF-β οδήγησε σε εμφάνιση όγκων του μαστού με μακρύτερο λανθάνοντα χρόνο, ενώ παράλληλα αύξησε την συχνότητα εξωαγγειακών μεταστάσεων στους πνεύμονες. Αντίθετα, η επικρατή αρνητική μορφή του υποδοχέα τύπου II του TGF-β οδήγησε σε ακριβώς το αντίθετο. Ο λανθάνων χρόνος εμφάνισης όγκων στους μαστούς ήταν μικρότερος, όπως επίσης και η συχνότητα εμφάνισης εξωαγγειακών μεταστάσεων στους πνεύμονες. Αυτό δείχνει σαφέστατα ότι ο TGF-β μπορεί να αναχαιτίζει την ανάπτυξη της καρκινικού όγκου διαμέσου αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ενώ παράλληλα, στον ίδιο όγκο, μπορεί να επάγει την μετάσταση. Σε αυτό το σημείο η ακτιβίνη A φαίνεται να διαφέρει. Σε πειράματα εκτίμησης του μεταστατικού δυναμικού των κλώνων Wact1, Wact2 και Wact5, οι οποίοι εκφράζουν ακτιβίνη A, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά σε σχέση με τους κλώνους-μάρτυρες αναφορικά με την συχνότητα μεταστάσεων στους πνεύμονες.

Συμπερασματικά, υπάρχουν ομοιότητες, αλλά και σαφείς διαφορές, αναφορικά με τον ρόλο του TGF-β και της ακτιβίνης A στον κακοήθου μετασχηματισμό. Η βασική ομοιότητα

αναφέρεται στην άμεση και ισχυρή αντιπολλαπλασιαστική δράση την οποία έχουν σε πλειάδα καρκινικών κυττάρων. Υπάρχουν όμως και σαφείς διαφορές. Η έκφραση της ακτιβίνης A μειώθηκε στα νευροβλαστώματα σαν αποτέλεσμα της ενίσχυσης του N-Myc ογκογονιδίου, ενώ σε προχωρημένα στάδια του κακοήθου μετασχηματισμού η έκφραση του TGF- $\beta$  αυξάνεται σε πολλούς καρκίνους. Η ακτιβίνη A έχει αντιαγγειογενετική δράση, ενώ ο TGF- $\beta$  φέρεται να προάγει την νεοπλασματική αγγειογένεση. Ο TGF- $\beta$  επάγει την επιθηλιακή-μεσεγχυματική μεταδιαφοροποίηση αυξάνοντας τον μεταστατικό φαινότυπο πολλών καρκίνων, ενώ κάτι τέτοιο δεν έχει αναφερθεί για την ακτιβίνη A, εάν και η πιθανότητα αυτή δεν έχει διερευνηθεί εντατικά. Στα δικά μας πειράματα τουλάχιστο δεν φάνηκε να προάγει την συχνότητα μεταστάσεων στα νευροβλαστώματα. Στα πλαίσια αυτά χορήγηση TGF- $\beta$  σε καρκίνους είναι προβληματική και παρακινδυνευμένη. Ενώ μπορεί να έχει ευεργετικές επιδράσεις αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, εάν φυσικά δεν υπάρχουν μεταλλάξεις στους υποδοχείς του ή τις Smad πρωτεΐνες, μπορεί παράλληλα να επάγει την αγγειογένεση και την μετάσταση με αμφίβολο τελικό ευεργετικό αποτέλεσμα. Η ακτιβίνη A φαίνεται να μην μοιράζεται αυτούς τους κινδύνους και κατά συνέπεια η αντικαρκινική της δράση πρέπει να τύχει εντατικότερης μελέτης.

### **Η ακτιβίνη A αναστέλλει σημαντικές αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων**

Η ανασταλτική δράση της ακτιβίνης στην αγγειογένεση των ξενομοσχευματικών νευροβλαστωμάτων σαφώς ενισχύει προηγούμενα αποτελέσματα, στα οποία συμμετείχε και η ομάδα μας, τα οποία έδειξαν ότι η ακτιβίνη A έχει αντιαγγειογενετική δράση στην δοκιμασία της χοριοαλλαντοϊκής μεμβράνης όρνιθας (Breit et al., 2000). Με δεδομένο ότι τα μέχρι τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι η ακτιβίνη A είναι ένας αντιαγγειογενετικός παράγοντας, θελήσαμε να διερευνήσουμε την δράση της ακτιβίνης A σε συγκεκριμένες και σημαντικές αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πράγματι, η ακτιβίνη A ανέστειλε την παραγωγή ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, κατά τον σχηματισμό νέων αγγείων είναι απαραίτητη η τοπική αποδόμηση της βασικής μεμβράνης του προϋπάρχοντος αγγείου, μέσω της καλά ρυθμιζόμενης συνεργασίας μεταξύ πρωτεολυτικών ενζύμων και των αναστολέων τους. Η διαδικασία αυτή διευκολύνει την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία, όπου και πολλαπλασιάζονται.

Αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, η δράση της ακτιβίνης A φαίνεται να διαμεσολαβείται μέσω του ALK-4 υποδοχέα. Πράγματι, μόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων με αδενοϊούς, οι οποίοι εξέφραζαν τον μόνιμα ενεργό υποδοχέα ALK-4T206D, οδήγησε σε σαφή αναστολή του πολλαπλασιασμού, όπως και η εξωγενώς χορηγούμενη ακτιβίνη A. Την ίδια δράση είχε και ο αδενοϊός ο οποίος εξέφραζε την ακτιβίνη A. Αντίθετα, ο αδενοϊός, ο οποίος εξέφραζε τον μόνιμα ενεργό ALK-2, οδήγησε σε ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επειδή ο ALK-2 συνδέεται με τον ActRIIB παλαιότερα θεωρούνταν ότι η ακτιβίνη A σηματοδοτεί μέσω του υποδοχέα αυτού. Άποψη, η οποία δεν ισχύει πλέον. Σήμερα, ο ALK-2 θεωρείται ότι μεταγεί σήματα από τους BMP και ειδικότερα από τον BMP-6, θεωρείται ότι έχει αγγειογενετική δράση (Valdimarsdottir et al., 2002) γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας πειράματα.

Τόσο η εξωγενώς χορηγούμενη ακτιβίνη A, όσο και οι αδενοϊοί, οι οποίοι εξέφραζαν την ακτιβίνη A ή τον ALK-4T206D υποδοχέα ανέστειλαν τόσο τον βασικό (οροεξαρτώμενο), όσο και τον επαγόμενο (από τον FGF-2 και τον VEGF) πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πράγματι, δείξαμε ότι η ακτιβίνη A, όπως είναι αναμενόμενο (βλέπε Εισαγωγή), επάγει την έκφραση των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p15, p21 και p27 αναστέλλοντας την είσοδο των ενδοθηλιακών κυττάρων στην S φάση. Παράλληλα, η ακτιβίνη A, αλλά και ο μόνιμα ενεργός υποδοχέας της ALK-4T206D, μείωσαν δραστικά την έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2 του VEGF αναστέλλοντας την δραστικότητα του τελευταίου και φυσικά τα μιτωτικά σηματοδοτικά μονοπάτια του και ειδικότερα αυτό των ERK1/2 MAPK κινασών. Παρόμοια δράση έχει αναφερθεί και για τον TGF- $\beta$  (Kivinen and Laiho, 1999; Reimann et al., 1997). Έτσι, δεν είναι παράξενο ότι η ακτιβίνη A είναι σε θέση να αναστέλλει και τον βασικό αλλά και τον επαγόμενο, τουλάχιστον από τον VEGF, πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Φυσικά, παραμένει να διευκρινιστεί εάν η αναστολή του FGF-2, ή και άλλων αγγειογενετικών παραγόντων, από την ακτιβίνη A βασίζεται σε κάποια εξειδικευμένη παρέμβαση σε σηματοδοτικά μονοπάτια ή διαμεσολαβείται αποκλειστικά από την επαγωγή των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών.

Συμπερασματικά, η ακτιβίνη A αναστέλλει σημαντικές για την αγγειογένεση αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως την παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων, την μετανάστευση και το πολλαπλασιασμό. Η δράση της ακτιβίνης A στον πολλαπλασιασμό διαμεσολαβείται από τον ALK4 υποδοχέα και είναι αποτέλεσμα αύξησης της έκφρασης αναστολέων του κυτταρικού κύκλου, όπως των p15, p21 και p27,

αλλά και αναστολής μιτωτικών σημάτων, όπως αυτών του VEGF διαμέσου αρνητικής ρύθμισης της έκφρασης του υποδοχέα VEGFR-2.

### Η ενδοκυττάρωση και τα πρώιμα ενδοσώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών από την ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Η αντίληψη ότι ενεργοποιημένοι υποδοχείς συνδέονται με μόρια μεταγωγής σήματος σε συγκεκριμένες περιοχές του κυττάρου εικάζεται για πολύ καιρό (Ceresa and Schmid, 2000). Επιπλέον, η μεμβρανική μεταφορά παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της θέσης σηματοδοτικών διασυνδέσεων καθώς και της αποικοδόμησης και/ή ανακύκλωσης υποδοχέων (Leof, 2000). Στην περίπτωση των υποδοχέων του TGF-β/ακτιβίνης, γνωρίζουμε λίγα πράγματα για το πώς η ενδοκυττάρωση και η μεταφορά των υποδοχέων επηρεάζει την οργάνωση, την τοπολογία και την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού πρόσδεμα-υποδοχέας II-υποδοχέας I-SARA-Smad. Αφού, η SARA συνδέεται στις εσωτερικές μεμβράνες μέσω της περιοχής FYVE (Tsukazaki et al., 1998), είναι πιθανό να παρέχει τον συνδετικό κρίκο μεταξύ μεμβρανικής μεταφοράς και μεταγωγής σήματος από τον TGF-β/ακτιβίνη. Για τον λόγο αυτό θεωρήσαμε σημαντική την μελέτη του ενδοκυττάρου εντοπισμού της SARA καθώς και πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την λειτουργία των ενδοσωμάτων ώστε να εξετάσουμε την συνεισφορά της ενδοκυττάριας μεταφοράς στον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού της ακτιβίνης A.

Χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία, αποδείξαμε ότι η SARA εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα, μια παρατήρηση που υποδεικνύει ότι σήματα που προέρχονται από τις πρωτεΐνες Smad μεταδίδονται από το πρώιμο ενδόσωμα. Παραπέρα πειράματα έδειξαν ότι η περιοχή FYVE της SARA ήταν αρκετή για την στόχευση της στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων. Μέχρι σήμερα, οι πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν περιοχή FYVE, χρειάζονται επιπλέον περιοχές πρόσδεσης για την στόχευση τους στα πρώιμα ενδοσώματα. Έτσι, για παράδειγμα, η EEA1 και η Rabenosyn5, εκτός από την περιοχή FYVE, απαιτούν και την σύνδεση μιας διπλανής περιοχής στην ενδοσωματική πρωτεΐνη Rab5GTP για την στόχευση τους στο ενδόσωμα (Nielsen et al., 2000; Simonsen et al., 1998). Πράγματι, ποσοτικοποίηση της σταθεράς σύνδεσης-αποσύνδεσης (surface plasmon resonance) έδειξαν ότι η περιοχή FYVE της SARA έχει μεγαλύτερη συγγένεια ( $K_D$  30 nM) από αυτή των πρωτεϊνών Hrs ( $K_D$  38 nM) και EEA1 ( $K_D$  45 nM) για τα μεμβρανικά φωσφολιπίδια PI(3)P. Επειδή ο διμερισμός της περιοχής FYVE αυξάνει την σταθερά σύνδεσης-αποσύνδεσης για τις μεμβράνες που περιέχουν PI(3)P (Gillooly et al., 2000; Sankaran et al., 2001), είναι πιθανό η περιοχή FYVE της SARA να έχει μεγαλύτερη τάση να

διμερίζεται σε σχέση με τις πρωτεΐνες EEA1 και Hrs. Φυσικά δεν μπορούμε να απορρίψουμε πλήρως την πιθανότητα ότι η ελάχιστη περιοχή FYVE της SARA που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματά μας περιέχει άλλα στοιχεία πρόσδεσης που πιθανόν να συμβάλουν στον διμερισμό ή στην στόχευση στα ενδοσώματα.

Ο εντοπισμός της SARA στα πρώιμα ενδοσώματα μας ώθησε να διερευνήσουμε σε μεγαλύτερο βάθος την σχέση μεταξύ ενδοσωμάτων και μεταγωγής του σήματος από την οικογένεια του TGF-β/ακτιβίνης. Θεωρήσαμε ότι κάποιο είδος ρύθμισης πρέπει να υπάρχει στο επίπεδο αυτού του οργανιδίου και ότι πρωτεΐνες, όπως η Rab5, οι οποίες ρυθμίζουν την λειτουργία του ενδοσώματος, μπορεί να εμπλέκονται στην μεταγωγή σήματος. Επιπλέον, η Rab5 εμπλέκεται στην μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (epidermal growth factor receptor, EGFR) (Lanzetti et al., 2000) και επάγεται από τον ίδιο τον παράγοντα EGF (Barbieri et al., 2000). Η εντυπωσιακή παρατήρηση της παρούσας εργασίας είναι ότι η Rab5S34N, η επικρατής αρνητική μορφή της Rab5, επάγει την Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή απουσία των παραγόντων TGF-β/ακτιβίνης σε συνθήκες απουσίας ορού. Η ενεργοποίηση αυτή σχετίζεται και με την φωσφορυλίωση και την μεταβίβαση των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση των Smad πρωτεϊνών από την Rab5S34N είναι ανεξάρτητη από άμεσες δράσεις όπως είναι η αυτόκρινική δράση από τους παράγοντες TGF-β/ακτιβίνη ή ο αποπολυμερισμός των μικροσωληνίσκων. Είναι γνωστό ότι οι μικροσωληνίσκοι δεσμεύουν τις μη φωσφορυλιωμένες Smad πρωτεΐνες, και ο αποπολυμερισμός του δικτύου των μικροσωληνίσκων ελευθερώνει ενεργές φωσφορυλιωμένες Smad με έναν μηχανισμό άγνωστο έως τώρα (Dong et al., 2000). Επειδή η φωσφορυλίωση των Smad από την Rab5S34N συμβαίνει σε συνθήκες απουσίας ορού, και επειδή έχει προηγουμένα αποδειχτεί ότι οι υποδοχείς τύπου II και I του παράγοντα TGF-β συνδέονται φυσικά και λειτουργικά μεταξύ τους ανεξάρτητα από την παρουσία προσδέματος (Feng and Derynck, 1996), είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η Rab4S34N μπορεί να ενισχύει τα χαμηλά επίπεδα ενεργοποίησης των TGF-β/ακτιβίνης υποδοχέων. Αυτό υποστηρίζεται από το την παρατήρηση ότι επικρατούσες αρνητικές μορφές των ALK4 και ALK5 αναστέλλουν την από την Rab5S34N προκαλούμενη ενεργοποίηση της Smad-εξαρτώμενης μεταγραφής.

Το γεγονός ότι η Rab5S34N αναστέλλει την ενδοκυττάρωση, την ανακύκλωση και την σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων (Stenmark et al., 1994), τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής προτείνουν έναν ρυθμιστικό ρόλο της μεμβρανικής μεταφοράς στην ένταση με την οποία μετάγονται τα σήματα από τα διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Η

αμελητέα δράση που μπορεί να έχει ο σχηματισμός ενεργοποιημένων συμπλόκων από υποδοχείς του TGF-β/ακτιβίνης στην Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή μπορεί να ενισχυθεί σε μεγάλο βαθμό από την Rab5S34N. Η ενίσχυση αυτή δεν προέρχεται από την μείωση του ρυθμού ενδοκυττάρωσης, αφού αναστέλλοντας την ενδοκυττάρωση από την κυτταροπλασματική μεμβράνη με έκφραση της RN-τε δεν αύξησε την Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή. Παρομοίως, δεν υπήρξε καμία αύξηση στην Smad-εξαρτώμενη μεταγραφή έπειτα από αναστολή της εξαρτώμενης από κλαθρίνη και caveolae-εξαρτώμενης ενδοκυττάρωσης (Henley et al., 1998; Oh et al., 1998; Zwaagstra et al., 2001) από την επικρατή αρνητική μορφή της δυναμίνης K44A (Papini et al., 1997; van der Bliek et al., 1993). Εναλλακτικά, η Rab5 θα μπορούσε να δρα με άμεση πρόσδεση σε μόρια τα οποία εμπλέκονται στα μονοπάτια μεταγωγής σήματος από TGF-β/ακτιβίνη ή επηρεάζοντας την ενεργότητα κινάσης των υποδοχέων ρυθμίζοντας για παράδειγμα κινάσες ή φωσφατάσες που συνδέονται με τους υποδοχείς (Griswold-Prenner et al., 1998). Οι ενδείξεις προς αυτή την κατεύθυνση είναι ελάχιστες αφού δεν βρήκαμε άμεσες συνδέσεις μεταξύ της Rab5 και της SARA ή των Smad2/3 πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας το σύστημα yeast-two-hybrid.

Συμπερασματικά, το πρώιμο ενδόσωμα πρέπει να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών από την ακτιβίνη A, αλλά και τον TGF-β, αναδεικνύοντας το ρόλο της μεμβρανικής κυκλοφορίας και της εσωτερικοποίησης των υποδοχέων στην ενεργοποίηση καθοδικών σημάτων.

### **Η ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών δεν διαμεσολαβεί αποκλειστικά την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ακτιβίνη A**

Ένα σημαντικό μέρος των δράσεων του TGF-β, και κατ' επέκταση της ακτιβίνης A, διαμεσολαβείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Κάθε μία από τις Smad2 και Smad3 πρωτεΐνες, διαμέσου ειδικών αλληλεπιδράσεων με μεταγραφικούς παράγοντες και ενεργοποιητές ή αποσιωπητές της μεταγραφής (βλέπε εισαγωγή), μπορεί να ρυθμίσει την μεταγραφή σειράς ανεξαρτήτων γονιδίων. Σε κάθε ανταπόκριση στη ακτιβίνη A μπορούν να συμμετέχουν γονίδια, τα οποία ρυθμίζονται αποκλειστικά από την Smad2 ή την Smad3 ή και τις δύο. Αυτό το σημείο δεν είναι ακόμη πλήρως διευκρινισμένο, δηλαδή σε πιο ποσοστό συμμετέχει η ενεργοποίηση της Smad2 και της Smad3 στη συνολική ανταπόκριση στο μονοπάτι των Smad. Για να απαντήσουμε στο ερώτημα της αποκλειστικότητας ή συνεισφοράς της ενεργοποίησης των Smad2 και Smad3 πρωτεϊνών στην αντιπολλαπλασιαστική δράση της ακτιβίνης A στα ενδοθηλιακά κύτταρα κατασκευάσαμε και χρησιμοποιήσαμε τις μόνιμα ενεργές μορφές των Smad2 και Smad3

πρωτεϊνών. Επιλέξαμε την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων σαν σημείο ελέγχου γιατί είναι μια από τις σημαντικότερες αποκρίσεις στην διαδικασία της αγγειογένεσης, αλλά και διότι υπάρχουν αρκετά δεδομένα για την αναστολή του πολλαπλασιασμού σε άλλους τύπους κύτταρων.

Τα πειραματικά μας δεδομένα δείχνουν σαφώς ότι η μόνιμα ενεργή μορφή της Smad2 και της Smad3, ανεξάρτητα ή μια της άλλης, είναι σε θέση να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πράγματι, έχει βρεθεί ότι υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση και λειτουργική συνεργασία του μεταγραφικού παράγοντα Sp1 με τις Smad2, Smad3 και Smad4 πρωτεΐνες για την επαγωγή των γονιδίων των αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p15 και p21 (Feng et. al., 2000; Pardali et.al., 2000). Εάν και μόνο η Smad2 και η Smad4 έχουν βρεθεί να μεταλλάσσονται σε ανθρώπινους καρκίνους (Eppert et. al., 1996; Riggins et. al., 1997), είναι γνωστό ότι Smad3<sup>-/-</sup> ποντίκια αναπτύσσουν καρκίνους του παχέος εντέρου (Zhu et. al., 1998). Άλλωστε, κύτταροπλασματικά συμπλέγματα της Smad3 με p107, E2F4/5 και DP1 μετακινούνται στον πυρήνα με την Smad4, όπου αναστέλλουν την μεταγραφή του c-Myc γονιδίου (Chen et. al., 2002). Το c-Myc είναι μεταγραφικός ενεργοποιητής του πολλαπλασιασμού (Eisenman 2001; Grandori et. al., 2000) και η αναστολή του από την Smad3 σαφώς μπορεί να συμμετέχει στην αντιμιτωτική δράση της τελευταίας. Παράλληλα όμως, επειδή το c-Myc είναι αναστολέας της μεταγραφής του p15 (Warner et. al., 1999) και του p21 (Claassen and Hann, 2000), η αναστολή του συμμετέχει στην επαγωγή των γονιδίων αυτών του από την Smad3.

Φαίνεται λοιπόν, ότι το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών συμμετέχει στο σύνολο του στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, γεγονός το οποίο ισχύει και για τα ενδοθηλιακά κύτταρα σύμφωνα με τα δικά μας πειράματα. Σειρά όμως δεδομένων δείχνουν ότι τι μονοπάτι των Smad δεν είναι ο αποκλειστικός διαμεσολαβητής της αναστολής του πολλαπλασιασμού από τον TGF-β και την ακτιβίνη A. Πράγματι, κύτταρα με απενεργοποίηση αμφοτέρων των αλληλόμορφων του γονιδίου της Smad4, με απάλειψη ή/και μεταλλάξεις, διατηρούν μερικά ή ολικά την ικανότητα να αναστέλλονται από τον TGF-β (Dai et al., 1999a; Dai et al., 1999b; Fink et al., 2001). Επιπλέον, στοχευμένη απενεργοποίηση της Smad4 με ομόλογο ανασυνδυασμό σε ποντικίσσιους ινοβλάστες δεν καταργεί την ανασταλτική στον πολλαπλασιασμό δράση του TGF-β (Sirard et.al., 2000). Πράγματι, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως δείξαμε στη παρούσα μελέτη, η ανασταλτική δράση της ακτιβίνης A αναστρέφεται κατά μόνο κατά 20-30% από την έκφραση επικρατών αρνητικών μορφών των Smad3 και Smad4 πρωτεϊνών. Άλλα μονοπάτια, όπως



των MAPK κινασών, τα οποία ενεργοποιούνται από μέλη της οικογένειας του TGF-β, μπορούν να συμμετέχουν είτε ανεξάρτητα είτε σε συνεργασία με τις Smad για την αναστολή του πολλαπλασιασμού (Engel et al., 1999; Hanafusa et al., 1999; Yue and Mulder, 2000) (Για ανασκόπηση βλέπε (Wakefield and Roberts, 2002)).

Πρόσφατες μελέτες για τον μηχανισμό με τον οποίο ο παράγοντας TGF-β αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων έδειξαν ότι εκτός από το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών, η κινάση  $p70^{S6K}$  παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Πράγματι, ο ενεργοποιημένος από τον TGF-β υποδοχέας TβRI συνδέεται και ενεργοποιεί την Βα υπομονάδα της φωσφατάσης PP2A (PP2A-Bα) (Griswold-Prenner et al., 1998). Η PP2A-Bα προσελκύει τις υπομονάδες PP2A-Aβ και PP2A-C για σύνδεση και αποφωσφορυλίωση της  $p70^{S6K}$  κινάσης (Petritsch et al., 2000). Η κινάση  $p70^{S6K}$  ρυθμίζει την μεταφραστική υπερέκφραση mRNA μεταγραφημάτων, τα οποία κωδικοποιούν ριβοσωματικές πρωτεΐνες και παράγοντες επιμήκυνσης της πρωτεϊνοσύνθεσης (Jefferies et al., 1994). Οι πρωτεΐνες αυτές είναι σημαντικές για το πέρασμα από την  $G_1$  στην  $S$  φάση (Lane et al., 1993, Pearson and Thomas, 1995). Έτσι, η αποφωσφορυλίωση της  $p70^{S6K}$  κινάσης από τον TGF-β στα επιθηλιακά κύτταρα σταματά τα κύτταρα στην  $G_1$  φάση του κυτταρικού κύκλου (Petritsch et al., 2000). Στη παρούσα μελέτη, η ακτιβίνη A μείωσε σημαντικά τη φωσφορυλίωση της  $p70^{S6K}$  κινάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα τονίζοντας την σημασία του μονοπατιού αυτού. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι στην παραπάνω μελέτη (Petritsch et al., 2000), ενώ ενεργοποίηση είτε του μονοπατιού των Smad είτε της  $p70^{S6K}$  κινάσης οδηγούσε σε αναστολή του πολλαπλασιασμού, αναστολή του ενός ή του άλλου μονοπατιού δεν ανέστρεφε την από τον TGF-β προκαλούμενη αναστολή του πολλαπλασιασμού. Μόνο σύγχρονη αναστολή και των δύο μονοπατιών ήταν σε θέση να καταργήσει την από τον TGF-β προκαλούμενη αναστολή. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται φαίνεται να ισχύουν και για την ακτιβίνη A αναφορικά με την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πράγματι, στη μελέτη μας, ενώ οι μόνιμα ενεργείς μορφές της Smad2 και Smad3 ανέστειλαν το πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι επικρατείς αρνητικές μορφές της Smad3 και Smad4 ανέστρεψαν την ανασταλτική δράση της ακτιβίνης A μόνο κατά 20-30%. Σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η ακτιβίνη A ήταν σε θέση να μειώσει την φωσφορυλίωση της  $p70^{S6K}$  κινάσης, φαίνεται ότι τα μονοπάτια των Smad και της  $p70^{S6K}$  κινάσης παίζουν σημαντικό ρόλο για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ακτιβίνη A, εάν και παραπέρα πειράματα προς την κατεύθυνση αυτή είναι επιβεβλημένα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

## Περίληψη στα Ελληνικά

Η αγγειογένεση, η δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα, είναι μια διαδικασία απαραίτητη για την πρόοδο του κακοήθι μετασχηματισμού και της μετάστασης. Η νεοπλασματική αγγειογένεση ενεργοποιείται είτε από την υποξία είτε από μεταλλάξεις ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Μελετήσαμε την ενεργοποίηση της αγγειογένεσης στα νευροβλαστώματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ενίσχυση και υπερέκφραση του *N-myc* ογκογονιδίου. Η ενίσχυση του *N-myc* ογκογονιδίου είναι συχνό φαινόμενο στα προχωρημένα στάδια του νευροβλαστώματος και συσχετίζεται με κακή πρόγνωση και αυξημένη νεοαγγείωση.

Σε προηγούμενες μελέτες, η ακτιβίνη A χαρακτηρίστηκε ως μόριο που ρυθμίζεται από το *N-myc* και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η ακτιβίνη A ανήκει στην υπεροικογένεια του παράγοντα TGF- $\beta$ , ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην διάρκεια της εμβρυογένεσης, αλλά και στην διατήρηση της ομοιόστασης των ιστών κατά την ενήλικη ζωή. Μέλη της οικογένειας TGF- $\beta$ /ακτιβίνης μετάγουν σήματα μέσω διαμεμβρανικών υποδοχών τύπου I και II με ενεργότητα σερίνης/θρεονίνης. Ο τύπου II υποδοχέας φωσφορυλιώνει τον τύπου I υποδοχέα ο οποίος στη συνέχεια ενεργοποιεί τους διαμεσολαβητές Smad2 και Smad3. Οι τελευταίοι συνδέονται με τη Smad4 και το σύμπλοκο που δημιουργείται μετατοπίζεται στο πυρήνα όπου ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων στόχων. Η πρωτεΐνη SARA παίζει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία αφού προσελκύει τη Smad2 και τη Smad3 στους τύπου I υποδοχείς για φωσφορυλίωση.

Στην παρούσα εργασία, δείξαμε ότι η ακτιβίνη A αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό κυττάρων νευροβλαστώματος και ότι κλώνοι οι οποίοι εκφράζουν ακτιβίνη A παρουσιάζουν ελαττωμένη νεοαγγείωση και ανάπτυξη όταν ενοφθαλμίζονται σαν ξενομοσχεύματα σε ποντίκια. Επιπλέον, δείξαμε ότι η ακτιβίνη A αναστέλλει σημαντικές αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως είναι η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης, η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός. Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί, οι οποίοι εκφράζουν είτε ακτιβίνη A είτε την συνεχώς ενεργή μορφή του τύπου I υποδοχέα (ALK4) μπορούν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών

κυττάρων από τους αγγειογενετικούς παράγοντες FGF-2 και VEGF. Η ακτιβίνη A αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων αυξάνοντας τη μεταγραφή υποκινητών αναστολέων των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών, όπως ο p15, p21 και p27, αλλά και ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση του υποδοχέα VEGFR-2. Αναστέλλεται με τον τρόπο αυτό το μιτωτικό μονοπάτι του VEGF μέσω των ERK1/2 κινασών.

Η μεταγωγή σήματος από την ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα διερευνήθηκε με περισσότερη λεπτομέρεια, φανερώνοντας το σημαντικό ρόλο των πρώιμων ενδοσωμάτων στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος από τις Smad πρωτεΐνες. Η SARA όχι μόνο εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα, αλλά και η περιοχή FYVE είναι αρκετή για τη στόχευσή της στις μεμβράνες των ενδοσωμάτων. Η έκφραση της SARA πρωτεΐνης που δεν περιέχει την περιοχή FYVE αναστέλλει την μεταγωγή σήματος από την ακτιβίνη A στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, η επικρατούσα αρνητική μορφή της Rab5 πρωτεΐνης (Rab5S34N) οδηγεί στη φωσφορυλίωση και τη μετακίνηση των Smad στο πυρήνα, προκαλώντας σε ενεργοποίηση της Smad-εξαρτώμενης μεταγραφής. Το γεγονός ότι η αναστολή της ενδοκυττάρωσης από την RN-tre και την επικρατούσα αρνητική μορφή της δυναμίνης δεν οδηγούν στην ενεργοποίηση της Smad-εξαρτώμενης μεταγραφής, υποδηλώνει ότι η δράση της Rab5S34N πιθανώς έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού αποδόμησης ή ανακύκλωσης ενεργοποιημένων συμπλόκων υποδοχέων προκαλώντας την συσσώρευσή τους στα πρώιμα ενδοσώματα.

Πέρα από το ρόλο των πρώιμων ενδοσωμάτων στην ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, οι τελευταίες δεν φαίνονται να είναι οι αποκλειστικοί διαμεσολαβητές όλων των δράσεων της ακτιβίνης A. Πράγματι, ενώ οι μόνιμα ενεργείς μορφές της Smad2 και Smad3 ανέστειλαν το πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι επικρατούσες αρνητικές μορφές της Smad3 και Smad4 ανέστρεψαν την ανασταλτική δράση της ακτιβίνης A μόνο κατά 20-30%. Σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η ακτιβίνη A ήταν σε θέση να μειώσει την φωσφορυλίωση της p70<sup>S6K</sup> κινάσης, μιας σημαντικής για το πέρασμα από την G<sub>1</sub> στην S φάση κινάσης, φαίνεται ότι εκτός από την ενεργοποίηση του μονοπατιού των Smad συμμετέχει και η απενεργοποίηση της p70<sup>S6K</sup> κινάσης για την αναστολή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από την ακτιβίνη A.

Συμπερασματικά, αναδείχθηκε ο σημαντικός ρόλος της ακτιβίνης A στην διαδικασία του κακοήθη μετασχηματισμού, τεκμηριώθηκε η αντιαγγειογενετική της δράση και αποκαλύφθηκαν καινούριες πτυχές στην μεταγωγή του σήματος της στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

**Περίληψη στα Αγγλικά-Summary**

Angiogenesis, the generation of new vessels from pre-existing ones, is an indispensable prerequisite for the progression and metastasis of solid tumors. Tumor angiogenesis appears to be regulated either by hypoxia or by mutations of oncogenes and tumor suppressor genes. We have addressed activation of angiogenesis in neuroblastoma, a malignancy characterised by the near-exclusive amplification and overexpression of the *N-myc* oncogene. Amplification of *N-myc* oncogene is a frequent event in advanced stages of human neuroblastomas and correlates with poor prognosis and enhanced vascularization.

In our previous studies, activin A was identified as an *N-myc*-regulated molecule, which can regulate endothelial cell proliferation. Activin A belongs to the TGF- $\beta$  superfamily of secreted polypeptide growth factors that play critical roles during embryogenesis and in maintaining tissue homeostasis in adult life. The TGF- $\beta$ /activin family members signal through heteromeric complexes of transmembrane type I and type II serine-threonine kinase receptors. The type II receptor kinase phosphorylates the type I receptor kinase which in turn phosphorylates the downstream transducer proteins Smad2 and Smad3. The latter associates with Smad4 and the resulting complex translocates to the nucleus, where they control the transcription of target genes. The Smad-binding protein SARA recruits Smad2 and Smad3 for phosphorylation by the type I receptors.

In the present study we show that activin A inhibits the proliferation of neuroblastoma cells and that activin A-expressing xenograft tumors in mice exhibit reduced neovascularization and suppressed growth. Moreover, we show that activin A inhibits endothelial cell responses important for angiogenesis, such as degradation of extracellular matrix, migration and proliferation. Recombinant adenoviruses expressing activin A and the constitutively active type I receptor (ALK4) can inhibit proliferation induced by the angiogenic factors FGF-2 and VEGF, mimicking the effects of exogenously introduced activin A. Activin A inhibits endothelial cell proliferation not only by increasing transcriptional activity from specific CdkI promoters like p15, p21 and p27, but also by inhibiting the VEGF-induced mitogenic pathway ERK1/2 via down regulation of VEGFR-2 expression.

We have also explored in more detail the activin A signaling in endothelial cells, and we have found a critical role for the early endocytic compartment in regulating Smad-dependent signaling. Not only is SARA localized to on early endosomes, but also its

minimal FYVE finger sequence is sufficient for early endosomal targeting. Expression of a SARA mutant protein lacking the FYVE finger inhibits downstream activin A signaling in endothelial cells. Moreover, a dominant-negative mutant of Rab5, a crucial protein for early endosome dynamics, causes phosphorylation and nuclear translocation of Smads leading to constitutive transcriptional activation of a Smad-dependent promoter in endothelial cells. As inhibition of endocytosis using the K44A negative mutant of dynamin and RN-tre did not lead to activation of Smad-dependent transcription, the effects of the dominant-negative Rab5 are likely to be a consequence of altered membrane trafficking of constitutively formed TGF- $\beta$ /activin type I/II receptor complexes at the level of early endosomes.

Beyond the role of early endosomes in activation of Smads, the latter do not appear to mediate exclusively all actions of activin A. Indeed, whereas constitutively active forms of Smad2 and Smad3 inhibited endothelial cell proliferation, dominant negative forms of Smad3 and Smad4 reversed this inhibition by only 20-30%. In conjunction with the observation that activin A reduced activation of p70<sup>S6K</sup> kinase, an important protein for progression through G<sub>1</sub>, these data indicate that in addition to activation of Smads, deactivation of p70<sup>S6K</sup> kinase contributes to the antimitotic effects of activin A in endothelial cells.

Collectively, we have showed that activin A plays an important role in malignant transformation, we have documented its antiangiogenic action, and we have found novel aspects of activin A signaling in endothelial cells.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abraham, R. T. (1998). Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 10, 330-336.
- Akiyoshi, S., Inoue, H., Hanai, J., Kusanagi, K., Nemoto, N., Miyazono, K., and Kawabata, M. (1999). c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor-beta signaling through interaction with smads. *J Biol Chem* 274, 35269-35277.
- Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A., Burn, J., and Diamond, A. G. (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217, 42-53.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.
- Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., and Isner, J. M. (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 18, 3964-3972.
- Attisano, L., Wrana, J. L., Cheifetz, S., and Massague, J. (1992). Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68, 97-108.
- Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E., and Massague, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* 16, 1066-1073.
- Baish, J. W., and Jain, R. K. (2000). Fractals and cancer. *Cancer Res* 60, 3683-3688.
- Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D., and Foidart, J. M. (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 4, 923-928.
- Baker, J. C., and Harland, R. M. (1996). A novel mesoderm inducer, *Madr2*, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10, 1880-1889.

- Barbieri, M. A., Roberts, R. L., Gumusboga, A., Highfield, H., Alvarez-Dominguez, C., Wells, A., and Stahl, P. D. (2000). Epidermal growth factor and membrane trafficking: EGF receptor activation of endocytosis requires rab5a. *Journal of Cell Biology* 151, 539-550.
- Bayless, K. J., Salazar, R., and Davis, G. E. (2000). RGD-dependent vacuolation and lumen formation observed during endothelial cell morphogenesis in three-dimensional fibrin matrices involves the alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *Am J Pathol* 156, 1673-1683.
- Bein, K., Ware, J. A., and Simons, M. (1998). Myb-dependent regulation of thrombospondin 2 expression. Role of mRNA stability. *J Biol Chem* 273, 21423-21429.
- Belletti, B., Ferraro, P., Arra, C., Baldassarre, G., Bruni, P., Staibano, S., De Rosa, G., Salvatore, G., Fusco, A., Persico, M. G., and Viglietto, G. (1999). Modulation of in vivo growth of thyroid tumor-derived cell lines by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene. *Oncogene* 18, 4860-4869.
- Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103, 159-165.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., and Moses, H. L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 27-36.
- Bitzer, M., von Gersdorff, G., Liang, D., Dominguez-Rosales, A., Beg, A. A., Rojkind, M., and Bottinger, E. P. (2000). A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA. *Genes Dev* 14, 187-197.
- Bourdeau, A., Dumont, D. J., and Letarte, M. (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia [see comments]. *J Clin Invest* 104, 1343-1351.
- Breit, S., Ashman, K., Wilting, J., Rossler, J., Hatzi, E., Fotsis, T., and Schweigerer, L. (2000). The N-myc oncogene in human neuroblastoma cells: down-regulation of an angiogenesis inhibitor identified as activin A. *Cancer Res* 60, 4596-4601.
- Brew, K., Dinakarandian, D., and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477, 267-283.

- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B., and Zerial, M. (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70, 715-728.
- Carmeliet, P. (1999a). Basic Concepts of (Myocardial) Angiogenesis: Role of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin. *Curr Interv Cardiol Rep* 1, 322-335.
- Carmeliet, P. (1999b). Developmental biology. Controlling the cellular brakes. *Nature* 401, 657-658.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.
- Carmeliet, P., and Collen, D. (2000). Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 902, 249-262; discussion 262-244.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeyer, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J. C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P. A., and Shima, D. T. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5, 495-502.
- Ceresa, B. P., and Schmid, S. L. (2000). Regulation of signal transduction by endocytosis. *Current Opinion in Cell Biology* 12, 204-210.
- Chai, J., Wu, J. W., Yan, N., Massague, J., Pavletich, N. P., and Shi, Y. (2003). Features of a Smad3 MH1-DNA complex. Roles of water and zinc in DNA binding. *J Biol Chem* 278, 20327-20331.
- Chen, C. R., Kang, Y., Siegel, P. M., and Massague, J. (2002). E2F4/5 and p107 as Smad Cofactors Linking the TGFbeta Receptor to c-myc Repression. *Cell* 110, 19-32.
- Chen, W., Woodruff, T. K., and Mayo, K. E. (2000). Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins. *Endocrinology* 141, 1263-1272.
- Chen, X., Rubock, M. J., and Whitman, M. (1996). A transcriptional partner for MAD proteins in TGF-beta signalling [published erratum appears in *Nature* 1996 Dec 19-26;384(6610):648]. *Nature* 383, 691-696.



- Chen, X., Weisberg, E., Fridmacher, V., Watanabe, M., Naco, G., and Whitman, M. (1997). Smad4 and FAST-1 in the assembly of activin-responsive factor. *Nature* 389, 85-89.
- Chen, Y. G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., and Massague, J. (1998). Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12, 2144-2152.
- Chen, Y. G., and Massague, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem* 274, 3672-3677.
- Colvin, J. S., Bohne, B. A., Harding, G. W., McEwen, D. G., and Ornitz, D. M. (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 12, 390-397.
- Dai, J. L., Bansal, R. K., and Kern, S. E. (1999a). G1 cell cycle arrest and apoptosis induction by nuclear Smad4/Dpc4: phenotypes reversed by a tumorigenic mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1427-1432.
- Dai, J. L., Schutte, M., Bansal, R. K., Wilentz, R. E., Sugar, A. Y., and Kern, S. E. (1999b). Transforming growth factor-beta responsiveness in DPC4/SMAD4-null cancer cells. *Mol Carcinog* 26, 37-43.
- Dameron, K. M., Volpert, O. V., Tainsky, M. A., and Bouck, N. (1994). Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265, 1582-1584.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E., and Schmid, S. L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic clathrin coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127, 915-934.
- Datto, M. B., Yu, Y., and Wang, X. F. (1995). Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 270, 28623-28628.
- Davis, S., Gale, N. W., Aldrich, T. H., Maisonpierre, P. C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., and Yancopoulos, G. D. (1994). Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266, 816-819.
- de Caestecker, M. P., Piek, E., and Roberts, A. B. (2000). Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, 1388-1402.

- Deng, C. X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M. M., Daugherty, C., Ornitz, D. M., and Leder, P. (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* 8, 3045-3057.
- Denkler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J. M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 17, 3091-3100.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29, 117-129.
- Derynck, R., Gelbart, W. M., Harland, R. M., Heldin, C. H., Kern, S. E., Massague, J., Melton, D. A., Mlodzik, M., Padgett, R. W., Roberts, A. B., Smith, J., Thomsen, G. H., Vogelstein, B., and Wang, X. F. (1996). Nomenclature: vertebrate mediators of TGFbeta family signals. *Cell* 87, 173.
- Dettman, R. W., Denetclaw, W., Jr., Ordahl, C. P., and Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 193, 169-181.
- Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., and Akhurst, R. J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121, 1845-1854.
- Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Feng, X.-H., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (2000). microtubule binding to smads may regulate TGFβ activity. *Molecular Cell* 5, 27-34.
- Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. (1998). Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 282, 946-949.
- Dyer, M. A., Farrington, S. M., Mohn, D., Munday, J. R., and Baron, M. H. (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development* 128, 1717-1730.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276, 12477-12480.

- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J., and Chersesh, D. A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4, 915-924.
- Engel, M. E., McDonnell, M. A., Law, B. K., and Moses, H. L. (1999). Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor- beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 274, 37413-37420.
- Esslinger, C. W., Jongeneel, C. V., and MacDonald, H. R. (1998). Survival-independent function of NF-kappaB/Rel during late stages of thymocyte differentiation. *Mol Immunol* 35, 847-852.
- Eto, Y., Tsuji, T., Takezawa, M., Takano, S., Yokogawa, Y., and Shibai, H. (1987). Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 142, 1095-1103.
- Fang, J., Wang, S. Q., Smiley, E., and Bonadio, J. (1997). Genes coding for mouse activin beta C and beta E are closely linked and exhibit a liver-specific expression pattern in adult tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 655-661.
- Feng, X. H., and Derynck, R. (1996). Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF) beta signaling pathways by heteromeric cytoplasmic domains of TGF-beta receptors. *J Biol Chem* 271, 13123-13129.
- Feng, X. H., and Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* 16, 3912-3923.
- Feng, X. H., Lin, X., and Derynck, R. (2000). Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15(Ink4B) transcription in response to TGF-beta. *Embo J* 19, 5178-5193.
- Fernandez, A., Udagawa, T., Schwesinger, C., Beecken, W., Achilles-Gerte, E., McDonnell, T., and D'Amato, R. (2001). Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *J Natl Cancer Inst* 93, 208-213.
- Fernandez, B., Buehler, A., Wolfram, S., Kostin, S., Espanion, G., Franz, W. M., Niemann, H., Doevendans, P. A., Schaper, W., and Zimmermann, R. (2000). Transgenic myocardial overexpression of fibroblast growth factor-1 increases coronary artery density and branching. *Circ Res* 87, 207-213.

- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Fink, S. P., Swinler, S. E., Lutterbaugh, J. D., Massague, J., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Willson, J. K., and Markowitz, S. (2001). Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res* 61, 256-260.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* 1, 27-31.
- Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66-70.
- Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., and Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* 126, 3015-3025.
- Fotsis, T., Breit, S., Lutz, W., Rossler, J., Hatzi, E., Schwab, M., and Schweigerer, L. (1999). Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *Eur J Biochem* 263, 757-764.
- G, H. t., Neidhardt, H., Schneider, C., and Pohl, J. (1995). Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain. *Biochem Biophys Res Commun* 206, 608-613.
- Gale, N. W., Baluk, P., Pan, L., Kwan, M., Holash, J., DeChiara, T. M., McDonald, D. M., and Yancopoulos, G. D. (2001). Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol* 230, 151-160.
- Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M. H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P. A., Wiegand, S. J., and Yancopoulos, G. D. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3, 411-423.
- Gale, N. W., and Yancopoulos, G. D. (1999a). Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13, 1055-1066.

- Gale, N. W., and Yancopoulos, G. D. (1999b). Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13, 1055-1066.
- Gaullier, J.-M., Ronning, E., Gillooly, D. J., and Stenmark, H. (2000). Interaction of the EEA1 FYVE finger with phosphatidylinositol 3-phosphate and early endosomes. Role of conserved residues. *Journal of Biological Chemistry* 275, 24595-24600.
- Gaullier, J. M., Simonsen, A., D'Arrigo, A., Bremnes, B., Stenmark, H., and Aasland, R. (1998). FYVE fingers bind PtdIns(3)P [letter; comment]. *Nature* 394, 432-433.
- Gendron, R. L., Adams, L. C., and Paradis, H. (2000). Tubedown-1, a novel acetyltransferase associated with blood vessel development. *Dev Dyn* 218, 300-315.
- Gerber, H. P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149-1159.
- Gerety, S. S., Wang, H. U., Chen, Z. F., and Anderson, D. J. (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4, 403-414.
- Gillooly, D. J., Morrow, I. C., Lindsay, M., Gould, R., Bryant, N. J., Gaullier, J.-M., Parton, R. G., and Stenmark, H. (2000). Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO Journal* 19, 4577-4588.
- Gittenberger-de Groot, A. C., DeRuiter, M. C., Bergwerff, M., and Poelmann, R. E. (1999). Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1589-1594.
- Goede, V., Schmidt, T., Kimmina, S., Kozian, D., and Augustin, H. G. (1998). Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest* 78, 1385-1394.
- Gomez, C. M., and Palazzo, M. G. (1998). Pulmonary artery catheterization in anaesthesia and intensive care. *Br J Anaesth* 81, 945-956.
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6624-6628.
- Gorlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 607-660.

- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., and ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *Embo J* 21, 1743-1753.
- Griswold-Prenner, I., Kamibayashi, C., Maruoka, E. M., Mumby, M. C., and Derynck, R. (1998). Physical and functional interactions between type I transforming growth factor  $\beta$  receptors and  $\beta$ 1, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol Cell Biol* 18, 6595-6604.
- Gronroos, E., Hellman, U., Heldin, C. H., and Ericsson, J. (2002). Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol Cell* 10, 483-493.
- Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H., and Kern, S. E. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271, 350-353.
- Hall, C. V., Jacob, P. E., Ringold, G. M., and Lee, F. (1983). Expression and regulation of Escherichia coli lacZ gene fusions in mammalian cells. *J Mol Appl Genet* 2, 101-109.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor- $\beta$ -induced gene expression. *J Biol Chem* 274, 27161-27167.
- Hanai, J., Chen, L. F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W. Y., Guo, W. H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M. J., Stavnezer, J., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ito, Y. (1999). Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline  $\alpha$  promoter. *J Biol Chem* 274, 31577-31582.
- Hashimoto, O., Nakamura, T., Shoji, H., Shimasaki, S., Hayashi, Y., and Sugino, H. (1997). A novel role of follistatin, an activin-binding protein, in the inhibition of activin action in rat pituitary cells. Endocytotic degradation of activin and its acceleration by follistatin associated with cell-surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 272, 13835-13842.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 186-197.

- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Jr., Wrana, J. L., and Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* 89, 1165-1173.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-2514.
- Helbling, P. M., Saulnier, D. M., and Brandli, A. W. (2000). The receptor tyrosine kinase EphB4 and ephrin-B ligands restrict angiogenic growth of embryonic veins in *Xenopus laevis*. *Development* 127, 269-278.
- Henley, J. R., Krueger, E. W., Oswald, B. J., and McNiven, M. A. (1998). Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 141, 85-99.
- Hlatky, L., Hahnfeldt, P., and Folkman, J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* 94, 883-893.
- Hocevar, B. A., Brown, T. L., and Howe, P. H. (1999). TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *Embo J* 18, 1345-1356.
- Holash, J., Davis, S., Papadopoulos, N., Croll, S. D., Ho, L., Russell, M., Boland, P., Leidich, R., Hylton, D., Burova, E., Ioffe, E., Huang, T., Radziejewski, C., Bailey, K., Fandl, J. P., Daly, T., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., and Rudge, J. S. (2002). VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11393-11398.
- Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (1999a). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994-1998.
- Holash, J., Wiegand, S. J., and Yancopoulos, G. D. (1999b). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18, 5356-5362.
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1, 149-153.

- Hoodless, P. A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M. B., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85, 489-500.
- Hoodless, P. A., Tsukazaki, T., Nishimatsu, S., Attisano, L., Wrana, J. L., and Thomsen, G. H. (1999). Dominant-negative Smad2 mutants inhibit activin/Vg1 signaling and disrupt axis formation in *Xenopus*. *Dev Biol* 207, 364-379.
- Hu, P. P., Shen, X., Huang, D., Liu, Y., Counter, C., and Wang, X. F. (1999). The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 274, 35381-35387.
- Hua, X., Miller, Z. A., Wu, G., Shi, Y., and Lodish, H. F. (1999). Specificity in transforming growth factor beta-induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interactions of promoter DNA, transcription factor muE3, and Smad proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13130-13135.
- Hughes, P. E., Alexi, T., Williams, C. E., Clark, R. G., and Gluckman, P. D. (1999). Administration of recombinant human Activin-A has powerful neurotrophic effects on select striatal phenotypes in the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 92, 197-209.
- Iavarone, A., and Massague, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 387, 417-422.
- Iavarone, A., and Massague, J. (1999). E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 19, 916-922.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622-626.
- Inman, G. J., Nicolas, F. J., and Hill, C. S. (2002). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol Cell* 10, 283-294.
- Ishisaki, A., Yamato, K., Hashimoto, S., Nakao, A., Tamaki, K., Nonaka, K., ten Dijke, P., Sugino, H., and Nishihara, T. (1999). Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem* 274, 13637-13642.





- Ishisaki, A., Yamato, K., Nakao, A., Nonaka, K., Ohguchi, M., ten Dijke, P., and Nishihara, T. (1998). Smad7 is an activin-inducible inhibitor of activin-induced growth arrest and apoptosis in mouse B cells. *J Biol Chem* 273, 24293-24296.
- Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C. H., Heldin, N. E., and ten Dijke, P. (1998). Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* 273, 29195-29201.
- Iyer, N. V., Kotch, L. E., Agani, F., Leung, S. W., Laughner, E., Wenger, R. H., Gassmann, M., Gearhart, J. D., Lawler, A. M., Yu, A. Y., and Semenza, G. L. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12, 149-162.
- Jang, C. W., Chen, C. H., Chen, C. C., Chen, J. Y., Su, Y. H., and Chen, R. H. (2002). TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol* 4, 51-58.
- Jefferies, H. B., Fumagalli, S., Dennis, P. B., Reinhard, C., Pearson, R. B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *Embo J* 16, 3693-3704.
- Kardassis, D., Papakosta, P., Pardali, K., and Moustakas, A. (1999). c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. *J Biol Chem* 274, 29572-29581.
- Katayama, T., Shiota, K., and Takahashi, M. (1990). Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. *Mol Cell Endocrinol* 69, 179-185.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., and Wrana, J. L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* 6, 1365-1375.
- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.
- Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., Addeo, R., Makuuchi, M., and Esumi, H. (2000). Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood* 95, 189-197.

- Kingsley, D. M. (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8, 133-146.
- Kivinen, L., and Laiho, M. (1999). Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21Cip1/Waf1 induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta. *Cell Growth Differ* 10, 621-628.
- Kockx, M. M., and Knaapen, M. W. (2000). The role of apoptosis in vascular disease. *J Pathol* 190, 267-280.
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L., and Gridley, T. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14, 1343-1352.
- Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J., and Massague, J. (1997). The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11, 984-995.
- Kuo, C. J., Farnebo, F., Yu, E. Y., Christofferson, R., Swearingen, R. A., Carter, R., von Recum, H. A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., D'Amato, R., Folkman, J., and Mulligan, R. C. (2001). Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4605-4610.
- Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2001). Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Ran-dependent manner. *Mol Biol Cell* 12, 1079-1091.
- Labbe, E., Silvestri, C., Hoodless, P. A., Wrana, J. L., and Attisano, L. (1998). Smad2 and Smad3 positively and negatively regulate TGF beta-dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2. *Mol Cell* 2, 109-120.
- Laiho, M., Weis, F. M., Boyd, F. T., Ignatz, R. A., and Massague, J. (1991). Responsiveness to transforming growth factor-beta (TGF-beta) restored by genetic complementation between cells defective in TGF-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 266, 9108-9112.
- Landstrom, M., Heldin, N. E., Bu, S., Hermansson, A., Itoh, S., ten Dijke, P., and Heldin, C. H. (2000). Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells. *Curr Biol* 10, 535-538.

- Lanzetti, L., Rybin, V., Malabarba, M. G., Christoforidis, S., Scita, G., Zerial, M., and Di Fiore, P. P. (2000). The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through rab5. *Nature* 408, 374-377.
- Larsson, J., Goumans, M. J., Sjostrand, L. J., van Rooijen, M. A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C. L., and Karlsson, S. (2001). Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *Embo J* 20, 1663-1673.
- Le Buanec, H., D'Anna, R., Lachgar, A., Zagury, J. F., Bernard, J., Ittele, D., d'Alessio, P., Hallez, S., Giannouli, C., Burny, A., Bizzini, B., Gallo, R. C., and Zagury, D. (1999). HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomed Pharmacother* 53, 424-431.
- Lee, S. H., Schloss, D. J., and Swain, J. L. (2000). Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem* 275, 33679-33687.
- Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C. E., Rytomaa, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C. S., Beug, H., and Downward, J. (2000). Raf induces TGFbeta production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* 14, 2610-2622.
- Leof, E. B. (2000). Growth factor receptor signalling: location, location, location. *Trends Cell Biol* 10, 343-348.
- Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8, 1875-1887.
- Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., and Goldberg, M. A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* 270, 13333-13340.
- Li, D. Y., Sorensen, L. K., Brooke, B. S., Urness, L. D., Davis, E. C., Taylor, D. G., Boak, B. B., and Wendel, D. P. (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284, 1534-1537.
- Li, J. M., Nichols, M. A., Chandrasekharan, S., Xiong, Y., and Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem* 270, 26750-26753.

- Liberati, N. T., Datto, M. B., Frederick, J. P., Shen, X., Wong, C., Rougier-Chapman, E. M., and Wang, X. F. (1999). Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4844-4849.
- Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., and Hebbel, R. P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* *105*, 71-77.
- Lindahl, P., Bostrom, H., Karlsson, L., Hellstrom, M., Kalen, M., and Betsholtz, C. (1999). Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis. *Curr Top Pathol* *93*, 27-33.
- Lindahl, P., Hellstrom, M., Kalen, M., and Betsholtz, C. (1998). Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* *9*, 407-411.
- Lindahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P., and Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* *277*, 242-245.
- Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., and Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* *321*, 779-782.
- Liu, B., Dou, C. L., Prabhu, L., and Lai, E. (1999). FAST-2 is a mammalian winged-helix protein which mediates transforming growth factor beta signals. *Mol Cell Biol* *19*, 424-430.
- Liu, F., Pouppnot, C., and Massague, J. (1997a). Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* *11*, 3157-3167.
- Liu, X., Sun, Y., Constantinescu, S. N., Karam, E., Weinberg, R. A., and Lodish, H. F. (1997b). Transforming growth factor beta-induced phosphorylation of Smad3 is required for growth inhibition and transcriptional induction in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 10669-10674.
- Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T., and Kourembanas, S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* *77*, 638-643.
- Lo, R. S., Chen, Y. G., Shi, Y., Pavletich, N. P., and Massague, J. (1998). The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J* *17*, 996-1005.
- Lopez-Ocejo, O., Vilorio-Petit, A., Bequet-Romero, M., Mukhopadhyay, D., Rak, J., and Kerbel, R. S. (2000). Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6

- oncoprotein activates the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. *Oncogene* 19, 4611-4620.
- Luo, K., Stroschein, S. L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S., and Zhou, Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signaling. *Genes Dev* 13, 2196-2206.
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87, 1215-1224.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M., and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* 273, 25628-25636.
- Maisonpierre, P. C., Goldfarb, M., Yancopoulos, G. D., and Gao, G. (1993). Distinct rat genes with related profiles of expression define a TIE receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* 8, 1631-1637.
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277, 55-60.
- Makitie, T., Summanen, P., Tarkkanen, A., and Kivela, T. (1999). Microvascular loops and networks as prognostic indicators in choroidal and ciliary body melanomas. *J Natl Cancer Inst* 91, 359-367.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-752.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67, 753-791.
- Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Mathews, L. S., and Vale, W. W. (1991). Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65, 973-982.
- Mathews, L. S., Vale, W. W., and Kintner, C. R. (1992). Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in *Xenopus* embryos. *Science* 255, 1702-1705.

- Matzuk, M. M., Kumar, T. R., and Bradley, A. (1995a). Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374, 356-360.
- Matzuk, M. M., Kumar, T. R., Vassalli, A., Bickenbach, J. R., Roop, D. R., Jaenisch, R., and Bradley, A. (1995b). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature* 374, 354-356.
- Mazars, A., Lallemand, F., Prunier, C., Marais, J., Ferrand, N., Pessah, M., Cherqui, G., and Atfi, A. (2001). Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 276, 36797-36803.
- McCarthy, S. A., and Bicknell, R. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. *J Biol Chem* 268, 23066-23071.
- McGregor, L. M., McCune, B. K., Graff, J. R., McDowell, P. R., Romans, K. E., Yancopoulos, G. D., Ball, D. W., Baylin, S. B., and Nelkin, B. D. (1999). Roles of *trk* family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4540-4545.
- Meitar, D., Crawford, S. E., Radmaker, A. W., and Cohn, S. L. (1996). Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol* 14, 405-414.
- Miyake, T., Irahara, M., Shitukawa, K., Yasui, T., and Aono, T. (1993). Interaction of activin A and gonadal steroids on FSH secretion from primary cultured rat anterior pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 194, 413-419.
- Moro, A., Santos, A., Arana, M. J., and Perea, S. E. (2000). Activation of the human p27(Kip1) promoter by IFNalpha 2b. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 31-34.
- Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2002). From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 16, 1867-1871.
- Moustakas, A., and Kardassis, D. (1998). Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6733-6738.
- Mu, F. T., Callaghan, J. M., Steele-Mortimer, O., Stenmark, H., Parton, R. G., Campbell, P. L., McCluskey, J., Yeo, J. P., Tock, E. P., and Toh, B. H. (1995). EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 270, 13503-13511.



- Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., and Sukhatme, V. P. (1995a). Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer Res* 55, 6161-6165.
- Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X. M., Foster, D., Brugge, J. S., and Sukhatme, V. P. (1995b). Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375, 577-581.
- Murata, M., Eto, Y., Shibai, H., Sakai, M., and Muramatsu, M. (1988). Erythroid differentiation factor is encoded by the same mRNA as that of the inhibin beta A chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2434-2438.
- Murphy, C., Saffrich, R., Grummt, M., Gournier, H., Rybin, V., Rubino, M., Auvinen, P., Lutcke, A., Parton, R. G., and Zerial, M. (1996). Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature* 384, 427-432.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631-635.
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., and Matrisian, L. M. (2000). Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18, 1135-1149.
- Nielsen, E., Christoforidis, S., Uttenweiler-Joseph, S., Miaczynska, M., Dewitte, F., Wilm, M., Hoflack, B., and Zerial, M. (2000). Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151, 601-612.
- O'Brien, T. S., and Harris, A. L. (1995). Angiogenesis in urological malignancy. *Br J Urol* 76, 675-682.
- Oft, M., Heider, K. H., and Beug, H. (1998). TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 8, 1243-1252.
- Oh, P., McIntosh, D. P., and Schnitzer, J. E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* 141, 101-114.
- Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., and Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2626-2631.

- Olofsson, B., Jeltsch, M., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1999). Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 10, 528-535.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Chen, C., and Folkman, J. (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 2, 689-692.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.
- Orlandi, A., Ehrlich, H. P., Ropraz, P., Spagnoli, L. G., and Gabbiani, G. (1994). Rat aortic smooth muscle cells isolated from different layers and at different times after endothelial denudation show distinct biological features in vitro. *Arterioscler Thromb* 14, 982-989.
- Ornitz, D. M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays* 22, 108-112.
- Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M. M. (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179, 297-302.
- Papini, E., Satin, B., Bucci, C., de Bernard, M., Telford, J. L., Manetti, R., Rappuoli, R., Zerial, M., and Montecucco, C. (1997). The small GTP binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *EMBO J* 16, 15-24.
- Pardali, K., Kurisaki, A., Moren, A., ten Dijke, P., Kardassis, D., and Moustakas, A. (2000). Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 275, 29244-29256.
- Parry, T. J., Cushman, C., Gallegos, A. M., Agrawal, A. B., Richardson, M., Andrews, L. E., Maloney, L., Mokler, V. R., Wincott, F. E., and Pavco, P. A. (1999). Bioactivity of anti-angiogenic ribozymes targeting Flt-1 and KDR mRNA. *Nucleic Acids Res* 27, 2569-2577.
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., and Rafii, S. (2000). Expression of



- VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952-958.
- Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* 3, 565-577.
- Pepper, M. S., Belin, D., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. D. (1990). Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111, 743-755.
- Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B. Y., Hicklin, D. J., Radinsky, R., and Dinney, C. P. (1999). Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 5, 257-265.
- Petritsch, C., Beug, H., Balmain, A., and Oft, M. (2000). TGF-beta inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest. *Genes Dev* 14, 3093-3101.
- Pettersson, A., Nagy, J. A., Brown, L. F., Sundberg, C., Morgan, E., Jungles, S., Carter, R., Krieger, J. E., Manseau, E. J., Harvey, V. S., Eckelhoefer, I. A., Feng, D., Dvorak, A. M., Mulligan, R. C., and Dvorak, H. F. (2000). Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Invest* 80, 99-115.
- Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J Cell Sci* 112, 4557-4568.
- Pierreux, C. E., Nicolas, F. J., and Hill, C. S. (2000). Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 20, 9041-9054.
- Poole, T. J., Finkelstein, E. B., and Cox, C. M. (2001). The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 220, 1-17.
- Prewett, M., Huber, J., Li, Y., Santiago, A., O'Connor, W., King, K., Overholser, J., Hooper, A., Pytowski, B., Witte, L., Bohlen, P., and Hicklin, D. J. (1999). Antivascular endothelial growth factor receptor (fetal liver kinase 1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors. *Cancer Res* 59, 5209-5218.

- Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., and Heissig, B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2, 826-835.
- Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K., and Gelbart, W. M. (1995). Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 139, 241-254.
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D.-J., D'Arrigo, A., Stang, E., and Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *Journal of Cell Science* 114, 2255-2263.
- Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D., and Kerbel, R. S. (1995a). Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 14, 263-277.
- Rak, J., Mitsuhashi, Y., Bayko, L., Filmus, J., Shirasawa, S., Sasazuki, T., and Kerbel, R. S. (1995b). Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55, 4575-4580.
- Rak, J., Yu, J. L., Klement, G., and Kerbel, R. S. (2000). Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5, 24-33.
- Randall, R. A., Germain, S., Inman, G. J., Bates, P. A., and Hill, C. S. (2002). Different Smad2 partners bind a common hydrophobic pocket in Smad2 via a defined proline-rich motif. *Embo J* 21, 145-156.
- Reimann, T., Hempel, U., Krautwald, S., Axmann, A., Scheibe, R., Seidel, D., and Wenzel, K. W. (1997). Transforming growth factor-beta1 induces activation of Ras, Raf-1, MEK and MAPK in rat hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 403, 57-60.
- Reynisdottir, I., and Massague, J. (1997). The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. *Genes Dev* 11, 492-503.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9, 1831-1845.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.
- Rofstad, E. K., and Halsor, E. F. (2000). Vascular endothelial growth factor, interleukin 8, platelet-derived endothelial cell growth factor, and basic fibroblast growth factor

- promote angiogenesis and metastasis in human melanoma xenografts. *Cancer Res* 60, 4932-4938.
- Roman, B. L., and Weinstein, B. M. (2000). Building the vertebrate vasculature: research is going swimmingly. *Bioessays* 22, 882-893.
- Rubin, L. L., and Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22, 11-28.
- Rucker, H. K., Wynder, H. J., and Thomas, W. E. (2000). Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res Bull* 51, 363-369.
- Ryan, H. E., Lo, J., and Johnson, R. S. (1998). HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17, 3005-3015.
- Saez, E., Rutberg, S. E., Mueller, E., Oppenheim, H., Smoluk, J., Yuspa, S. H., and Spiegelman, B. M. (1995). c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell* 82, 721-732.
- Sankaran, V. G., Klein, D. E., Sachdeva, M. M., and Lemmon, M. A. (2001). High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3- phosphate requires intact phospholipid but not FYVE domain oligomerization. *Biochemistry* 40, 8581-8587.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., and Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 274, 8949-8957.
- Sato, T. N., Qin, Y., Kozak, C. A., and Audus, K. L. (1993). Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9355-9358.
- Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., and Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 376, 70-74.
- Schiffer, M., Bitzer, M., Roberts, I. S., Kopp, J. B., ten Dijke, P., Mundel, P., and Bottinger, E. P. (2001). Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. *J Clin Invest* 108, 807-816.
- Schubert, D., Kimura, H., LaCorbiere, M., Vaughan, J., Karr, D., and Fischer, W. H. (1990). Activin is a nerve cell survival molecule. *Nature* 344, 868-870.
- Schweigerer, L., Breit, S., Wenzel, A., Tsunamoto, K., Ludwig, R., and Schwab, M. (1990). Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of

- human neuroblastoma cells: Evidence for induction of autocrine growth activity. *Cancer Res* 50, 4411-4416.
- Seftor, E. A., Meltzer, P. S., Schatteman, G. C., Gruman, L. M., Hess, A. R., Kirschmann, D. A., Seftor, R. E., and Hendrix, M. J. (2002). Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 44, 17-27.
- Sekelsky, J. J., Newfeld, S. J., Raftery, L. A., Chartoff, E. H., and Gelbart, W. M. (1995). Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139, 1347-1358.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O<sub>2</sub> homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8, 588-594.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3, 400-408.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62-66.
- Shen, X., Li, J., Hu, P. P., Waddell, D., Zhang, J., and Wang, X. F. (2001). The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 276, 15362-15368.
- Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1998). Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* 94, 585-594.
- Shibuya, M., Ito, N., and Claesson-Welsh, L. (1999). Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 59-83.
- Shih, S. C., and Claffey, K. P. (1999). Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem* 274, 1359-1365.
- Shin, D., Garcia-Cardena, G., Hayashi, S., Gerety, S., Asahara, T., Stavrakis, G., Isner, J., Folkman, J., Gimbrone, M. A., Jr., and Anderson, D. J. (2001). Expression of

ephrinB2 identifies a stable genetic difference between arterial and venous vascular smooth muscle as well as endothelial cells, and marks subsets of microvessels at sites of adult neovascularization. *Dev Biol* 230, 139-150.

Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., and Klagsbrun, M. (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223, 1296-1299.

Shioda, T., Lechleider, R. J., Dunwoodie, S. L., Li, H., Yahata, T., de Caestecker, M. P., Fenner, M. H., Roberts, A. B., and Isselbacher, K. J. (1998). Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9785-9790.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.

Siegel, P. M., Shu, W., Cardiff, R. D., Muller, W. J., and Massague, J. (2003). Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8430-8435.

Simonsen, A., Gaullier, J. M., D'Arrigo, A., and Stenmark, H. (1999). The Rab5 effector EEA1 interacts directly with syntaxin-6. *J Biol Chem* 274, 28857-28860.

Simonsen, A., Lippe, R., Christoforidis, S., Gaullier, J. M., Brech, A., Callaghan, J., Toh, B. H., Murphy, C., Zerial, M., and Stenmark, H. (1998). EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion [see comments]. *Nature* 394, 494-498.

Slack, J. L., and Bornstein, P. (1994). Transformation by v-src causes transient induction followed by repression of mouse thrombospondin-1. *Cell Growth Differ* 5, 1373-1380.

Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., and Bussolino, F. (1999). Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo J* 18, 882-892.

Souchelnytskyi, S., Nakayama, T., Nakao, A., Moren, A., Heldin, C. H., Christian, J. L., and ten Dijke, P. (1998). Physical and functional interaction of murine and *Xenopus* Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor- beta receptors. *J Biol Chem* 273, 25364-25370.

- Souchelnytskyi, S., Tamaki, K., Engstrom, U., Wernstedt, C., ten Dijke, P., and Heldin, C. H. (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 272, 28107-28115.
- Stearns, M. E., Garcia, F. U., Fudge, K., Rhim, J., and Wang, M. (1999). Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res* 5, 711-720.
- Stefanec, T. (2000). Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 117, 841-854.
- Stenmark, H., and Aasland, R. (1999). FYVE-finger proteins – effectors of an inositol lipid. *Journal of Cell Science* 112, 4175-4183.
- Stenmark, H., Aasland, R., Toh, B. H., and D'Arrigo, A. (1996). Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* 271, 24048-24054.
- Stenmark, H., Parton, R. G., Steele-Mortimer, O., Lötcke, A., Gruenberg, J., and Zerial, M. (1994). Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* 13, 1287-1296.
- Streit, M., Velasco, P., Brown, L. F., Skobe, M., Richard, L., Riccardi, L., Lawler, J., and Detmar, M. (1999). Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 155, 441-452.
- Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q., and Luo, K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286, 771-774.
- Sun, Y., Liu, X., Eaton, E. N., Lane, W. S., Lodish, H. F., and Weinberg, R. A. (1999a). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell* 4, 499-509.
- Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H. F., and Weinberg, R. A. (1999b). SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12442-12447.
- Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171-1180.

- Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D. M., Zhou, H., Oldmixon, E. H., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1998). Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282, 468-471.
- Sutter, G., Ohlmann, M., and Erfle, V. (1995). Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* 371, 9-12.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002). Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 277, 39919-39925.
- Taipale, J., Makinen, T., Arighi, E., Kukk, E., Karkkainen, M., and Alitalo, K. (1999). Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr Top Microbiol Immunol* 237, 85-96.
- Tajima, Y., Goto, K., Yoshida, M., Shinomiya, K., Sekimoto, T., Yoneda, Y., Miyazono, K., and Imamura, T. (2003). Chromosomal region maintenance 1 (CRM1)-dependent nuclear export of Smad ubiquitin regulatory factor 1 (Smurf1) is essential for negative regulation of transforming growth factor-beta signaling by Smad7. *J Biol Chem* 278, 10716-10721.
- Takahashi, Y., Kitadai, Y., Bucana, C. D., Cleary, K. R., and Ellis, L. M. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55, 3964-3968.
- Tamaru, M., and Narumi, S. (1999). E-selectin gene expression is induced synergistically with the coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1beta but not tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 274, 3753-3763.
- Ten Dijke, P., Goumans, M. J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191, 1-16.
- Thomsen, G., Woolf, T., Whitman, M., Sokol, S., Vaughan, J., Vale, W., and Melton, D. A. (1990). Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63, 485-493.
- Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., and Yancopoulos, G. D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 6, 460-463.
- Toi, M., Hoshina, S., Takayanagi, T., and Tominaga, T. (1994). Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 85, 1045-1049.

- Tretter, Y. P., Hertel, M., Munz, B., ten Bruggencate, G., Werner, S., and Alzheimer, C. (2000). Induction of activin A is essential for the neuroprotective action of basic fibroblast growth factor in vivo. *Nat Med* 6, 812-815.
- Tsuchida, K., Mathews, L. S., and Vale, W. W. (1993). Cloning and characterization of a transmembrane serine kinase that acts as an activin type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11242-11246.
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95, 779-791.
- Tsukita, S., and Furuse, M. (1999). Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9, 268-273.
- Udagawa, T., Fernandez, A., Achilles, E. G., Folkman, J., and D'Amato, R. J. (2002). Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J* 16, 1361-1370.
- Ueki, N., Nakazato, M., Ohkawa, T., Ikeda, T., Amuro, Y., Hada, T., and Higashino, K. (1992). Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim Biophys Acta* 1137, 189-196.
- Ulloa, L., Doody, J., and Massague, J. (1999). Inhibition of transforming growth factor-beta/SMAD signalling by the interferon-gamma/STAT pathway. *Nature* 397, 710-713.
- Underwood, P. A., Bean, P. A., and Whitelock, J. M. (1998). Inhibition of endothelial cell adhesion and proliferation by extracellular matrix from vascular smooth muscle cells: role of type V collagen. *Atherosclerosis* 141, 141-152.
- Valdimarsdottir, G., Goumans, M. J., Rosendahl, A., Brugman, M., Itoh, S., Lebrin, F., Sideras, P., and Ten Dijke, P. (2002). Stimulation of id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 106, 2263-2270.
- Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClintock, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., and Spiess, J. (1986). Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321, 776-779.



- van den Driesche, S., Mummery, C. L., and Westermann, C. J. (2003). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on transforming growth factor beta signaling in vasculogenesis and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 58, 20-31.
- van der Blik, A. M., Redelmeier, T. E., Danke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M., and Schmid, S. L. (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *The Journal of Cell Biology* 122, 553-563.
- Vassalli, A., Matzuk, M. M., Gardner, H. A., Lee, K. F., and Jaenisch, R. (1994). Activin/inhibin beta B subunit gene disruption leads to defects in eyelid development and female reproduction. *Genes Dev* 8, 414-427.
- Vassalli, J. D., Dayer, J. M., Wohlwend, A., and Belin, D. (1984). Concomitant secretion of prourokinase and of a plasminogen activator-specific inhibitor by cultured human monocytes-macrophages. *J Exp Med* 159, 1653-1668.
- Viloria-Petit, A., Crombet, T., Jothy, S., Hicklin, D., Bohlen, P., Schlaeppli, J. M., Rak, J., and Kerbel, R. S. (2001). Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 61, 5090-5101.
- Vlodavsky, I., Bar-Shavit, R., Ishai-Michaeli, R., Bashkin, P., and Fuks, Z. (1991). Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem Sci* 16, 268-271.
- Wakefield, L. M., and Roberts, A. B. (2002). TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12, 22-29.
- Wang, H. U., Chen, Z. F., and Anderson, D. J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741-753.
- Warner, B. J., Blain, S. W., Seoane, J., and Massague, J. (1999). Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol* 19, 5913-5922.
- Watanabe, M., Masuyama, N., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leucine-rich nuclear export signal. *EMBO Rep* 1, 176-182.
- Weidner, N., Semple, J. P., Welch, W. R., and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8.
- Wilkinson, D. G. (2000). Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly. *Int Rev Cytol* 196, 177-244.

- Woodroffe, C., Muller, W., and Ruther, U. (1992). Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice. *DNA Cell Biol* 11, 587-592.
- Wotton, D., Lo, R. S., Lee, S., and Massague, J. (1999). A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97, 29-39.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F., and Massague, J. (1992). TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 71, 1003-1014.
- Wu, D. D., Lai, M., Hughes, P. E., Sirimanne, E., Gluckman, P. D., and Williams, C. E. (1999). Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin A following hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Brain Res* 835, 369-378.
- Wu, G., Chen, Y. G., Ozdamar, B., Gyuricza, C. A., Chong, P. A., Wrana, J. L., Massague, J., and Shi, Y. (2000). Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. *Science* 287, 92-97.
- Xiao, Z., Latek, R., and Lodish, H. F. (2003). An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene* 22, 1057-1069.
- Xiao, Z., Liu, X., Henis, Y. I., and Lodish, H. F. (2000a). A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7853-7858.
- Xiao, Z., Liu, X., and Lodish, H. F. (2000b). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J Biol Chem* 275, 23425-23428.
- Xiao, Z., Watson, N., Rodriguez, C., and Lodish, H. F. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling of Smad1 conferred by its nuclear localization and nuclear export signals. *J Biol Chem* 276, 39404-39410.
- Xu, L., Alarcon, C., Col, S., and Massague, J. (2003). Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. *J Biol Chem*.
- Xu, L., Chen, Y. G., and Massague, J. (2000). The nuclear import function of Smad2 is masked by SARA and unmasked by TGFbeta-dependent phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2, 559-562.
- Xu, L., Kang, Y., Col, S., and Massague, J. (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell* 10, 271-282.

- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R. I., Ornitz, D. M., Leder, P., and Deng, C. (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* 125, 753-765.
- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E. B., Weinmaster, G., and Gridley, T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8, 723-730.
- Yagi, K., Goto, D., Hamamoto, T., Takenoshita, S., Kato, M., and Miyazono, K. (1999). Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. Comparison with wild-type Smad2 and Smad3. *J Biol Chem* 274, 703-709.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E., and Matsumoto, K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* 270, 2008-2011.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., and Nakao, K. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92-96.
- Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., and Kato, S. (1999). Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor-beta signaling through smad proteins. *J Biol Chem* 274, 12971-12974.
- Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Toriyabe, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Kato, S. (1999). Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science* 283, 1317-1321.
- Yin, J. J., Selander, K., Chirgwin, J. M., Dallas, M., Grubbs, B. G., Wieser, R., Massague, J., Mundy, G. R., and Guise, T. A. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103, 197-206.
- Ying, S. Y. (1988). Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 9, 267-293.

- Yingling, J. M., Datto, M. B., Wong, C., Frederick, J. P., Liberati, N. T., and Wang, X. F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol Cell Biol* 17, 7019-7028.
- Yue, J., and Mulder, K. M. (2000). Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a Smad-dependent pathway. *J Biol Chem* 275, 30765-30773.
- Zagzag, D., Hooper, A., Friedlander, D. R., Chan, W., Holash, J., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., and Grumet, M. (1999). In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumor angiogenesis. *Exp Neurol* 159, 391-400.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y. C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Bottinger, E. P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6686-6691.
- Zawel, L., Dai, J. L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Kern, S. E. (1998). Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* 1, 611-617.
- Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D. J., Hemmati-Brivanlou, A., and Derynck, R. (2001). Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 974-979.
- Zhang, Y., Feng, X., We, R., and Derynck, R. (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383, 168-172.
- Zhang, Y., Feng, X. H., and Derynck, R. (1998). Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF-beta-induced transcription [published erratum appears in *Nature* 1998 Dec 3;396(6710):491]. *Nature* 394, 909-913.
- Zhang, Y., Musci, T., and Derynck, R. (1997). The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol* 7, 270-276.
- Zhong, T. P., Rosenberg, M., Mohideen, M. A., Weinstein, B., and Fishman, M. C. (2000). gridlock, an HLH gene required for assembly of the aorta in zebrafish. *Science* 287, 1820-1824.
- Zhou, S., Zawel, L., Längauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer. *Mol Cell* 2, 121-127.