



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«ΧΩΡΟΧΡΟΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ
ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΤΟΥ VEGFR2 ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»**

**ΕΥΑΓΓΕΛΗ ΓΟΥΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**«ΧΩΡΟΧΡΟΝΙΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ
ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ ΜΕΤΑΞΥ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΩΣΗΣ ΚΑΙ
ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΤΟΥ VEGFR2 ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ»**

**ΕΥΑΓΓΕΛΗ ΓΟΥΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2019

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

Ημερομηνία αίτησης της κ. Γούλα Ευαγγελής: 13-1-2014

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 759^ο/14-2-2014

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Χριστοφορίδης Σάββας, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Φώτης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Carol Murphy, ερευνήτρια Β' IBE-ITE

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 26-3-2014

«Χωροχρονική οργάνωση και μηχανισμοί επικοινωνίας μεταξύ ενδοκυττάρωσης και ρυθμιζόμενης έκκρισης κατά τη σηματοδότηση του VEGFR2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 867^ο/25-9-2018

Φώτης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μιχαηλίδης Θεολόγος	Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Γενετικής, του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Λεονταρίτης Γεώργιος	Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Murphy Carol	Ερευνήτρια Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (IBE-ITE)
Fachelmayer Frank,	Ερευνήτης Β' του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών, ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (IBE-ITE)

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 2-4-2019

Ιωάννινα 8-4-2019

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας



Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο Φεβρουάριος 2014-Μάρτιος 2019 στο Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας Ιωαννίνων του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB) του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) και στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, του Τμήματος Ιατρικής, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη. Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με χρηματοδότηση (Υποτροφία στην υποψήφια διδάκτωρ) από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στα πλαίσια της Πράξης «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με την συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου, καθώς και με χρηματοδότηση από το Πρόγραμμα «ARISTEIA II» για την υλοποίηση του ερευνητικού έργου «Ενδοκυττάρωση, ρυθμιζόμενη έκκριση, και μεταγωγή του σήματος στα ενδοθηλιακά κύτταρα: Συντονισμός, μοριακοί μηχανισμοί και επιπτώσεις σε ασθένειες των αγγείων», που χρηματοδοτήθηκε από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» (ΕΣΠΑ 2007-2013).

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή και επιβλέπων της παρούσας διατριβής κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την ένταξή μου στην ερευνητική του ομάδα καθώς και για τις ιδέες και εμπειρίες που αποκόμισα από την συνεργασία μας, όλα αυτά τα χρόνια. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την εκτίμηση και εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση και συμβουλές του για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Θεόδωρο Φώτη και την Ερευνήτρια Β' κ. Carol Murphy, για την συμμετοχή τους στην αξιολόγηση και τις χρήσιμες υποδείξεις τους για την βελτίωση της παρούσας διατριβής. Τους ευχαριστώ επίσης για την γενναιόδωρη υλικοτεχνική υποστήριξη που πρόσχαρα μου πρόσφερε το εργαστήριό τους, όποτε την χρειάστηκα. Οφείλω να ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Ερευνητή Β' κ. F. FackelMayer, τον Αν. Καθ. κ. Θ. Μιχαηλίδη, τον Επίκουρο Καθ. κ. Π. Κούκλη και τον Επίκουρο Καθ. κ. Γ. Λεονταρίτη για το χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση και τις χρήσιμες επίσης υποδείξεις τους.

Ευχαριστώ ακόμη τα προγενέστερα μέλη του εργαστηρίου Σοφία Ζωγράφου και Δημήτρη Μπασαγιάννη για την εκπαίδευση που μου προσέφεραν σε πειραματικές τεχνικές. Ευχαριστώ ιδιαίτερος την Βασιλική Λαζάνη για την πολύτιμη συνεργασία μας και την συνεισφορά της σε μέρος των πειραμάτων της παρούσας διατριβής, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα και Βάλια Καραμάνη, για την πρόσχαρη διάθεσή τους για βοήθεια. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους εξωτερικούς συνεργάτες, τον κ. Αϊβαλιώτη Μιχάλη και την κ. Μαρίνα Ιωάννου για την αξιόλογη συνεργασία, την κ. Σοφία Μπέλλου για την βοήθειά της στην εκμάθηση της συνεστιακής μικροσκοπίας STED, καθώς και όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος δύο πολύ αγαπημένες φίλες, συμπορεύτριες όλα αυτά τα χρόνια και μέλη του εργαστηρίου, Δέσποινα Γκέκα και Κατερίνα Γαλανοπούλου, για την αμέριστη συμπαράσταση και προσωπική υποστήριξή τους. Τις ευχαριστώ θερμά για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφεραν σε κάθε δυσκολία, για τις συζητήσεις μας σε ερευνητικά ζητήματα, για την ενθάρρυνση και για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου, στην γιαγιά μου Ελένη και στον παππού μου Κωνσταντίνο, για την φροντίδα που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια των σπουδών μου καθώς και στις ξαδέρφες μου Ευγενία και Εύα Γούλα για την ενθάρρυνση και υποστήριξη των επιλογών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
1.1. Ενδοθηλιακή λειτουργία και ομοιόσταση	11
1.2. Τα εκκριτικά οργανίδια Weibel-Palade Bodies (WPBs).....	12
1.3. Βιοσύνθεση του von Willebrand factor (vWF) – Σχηματισμός των WPBs.....	15
1.4. Οδοί έκκρισης του von Willebrand Factor	19
1.5. Μοριακοί μηχανισμοί της εξωκυττάρωσης των WPBs.....	22
1.5.1. Προτεινόμενα μοντέλα εξωκυτταρικής σύντηξης	22
1.5.2. Μοριακοί μηχανισμοί - Σηματοδοτικά μονοπάτια επαγόμενης εξωκυττάρωσης.....	25
1.6. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης.....	30
1.6.1. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων	32
1.6.2. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του VEGFR2	33
1.7. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του VEGFR2	35
1.8. Σύντομη ανασκόπηση των κλασσικών/συμβατικών (conventional) και μη (unconventional) οδών πρωτεϊνικής έκκρισης	37
1.9. Οι πρωτεΐνες Galectins	41
1.10. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	47
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	49
2.1. Αντιδραστήρια και αντισώματα	49
2.2. Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC).....	50
2.3. Καλλιέργεια Ανθρώπινων Ενδοθηλιακών Κυττάρων HUVEC	51
2.4. Διαμόλυνση και επιμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων.....	52
2.4.1. Διαμόλυνση με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs)	52
2.4.2. Διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (cDNA)	53
2.5. Κατασκευές πλασμιδιακών φορέων έκφρασης cDNAs	53
2.6. Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR).....	55
2.7. Ενεργοποίηση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προς επαγωγή της έκκρισης των WPBs.....	57
2.8. Δοκιμασίες χημικών αναστολέων	58
2.8.1 Αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 με χρήση χημικών αναστολέων και μελέτη της επίδρασης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs	58

2.9. Δοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) για την ποσοτική μέτρηση του εκκρινόμενου vWF	59
2.10. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης	60
2.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western	61
2.11.1. Μελέτη του βαθμού διαλυτοποίησης του VEGFR2 μετά από επαγωγή με VEGF	62
2.12. Παρασκευή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	63
2.13. Έμμεσος ανοσοφθορισμός	65
2.14. Μελέτη του ενδοκυττάριου εντοπισμού του VEGFR2 και των WPBs σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα	65
2.15. Συνεστιακή μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (time-lapse video microscopy)	66
2.16. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)	67
2.17. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM) με χρήση υπερδιακριτικής ικανότητας (Stimulated Emission Depletion, STED)	67
2.18. Πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs) με χρήση nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS)	68
2.19. Δοκιμασία πρωτεϊνικού ανταγωνισμού “Competition assay” για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Galectin-1	69
2.20. Έλεγχος εντοπισμού της galectin-1 στα WPBs με γνωστούς πρωτεϊνικούς δείκτες αυτών (P-selectin, Rab27a, Rab3a, Rab3d)	70
2.21. Μελέτη της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης των WPBs με πειράματα πρόσληψης αντισωμάτων έναντι του vWF (“anti-vWF antibody internalization assay”) για την διερεύνηση του μηχανισμού έκκρισης της galectin-1	70
2.22. Δοκιμασίες εισόδου (“internalization assays”) ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 στα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων	71
2.22.1. Μελέτη της πρόσληψης της ανασυνδυασμένης galectin-1-flag στα WPBs, απουσία επαγωγής της έκκρισης	71
2.22.2. Μελέτη της πρόσληψης της ανασυνδυασμένης galectin-1 στα WPBs μετά από επαγωγή της έκκρισης με VEGF/bFGF/ATP	72
2.23. Έμμεσος προσδιορισμός της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης των WPBs, ως πιθανός μηχανισμός εισόδου της galectin-1 στα WPBs - πειράματα απομάκρυνσης της εκκρινόμενης galectin-1	73
2.24. Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση	73

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	75
3.1. Παραγωγή πλασμιδίων και έλεγχος αντισωμάτων.....	75
3.2. Ο ρόλος των διαφορετικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη από VEGF εξωκυττάρωση των WPBs.....	81
3.2.1. Αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 με χρήση χημικών αναστολέων και μελέτη της επίδρασης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs	82
3.2.2. Αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 με πειράματα αποσιώπησης (siRNAs) και μελέτη της επίδρασης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs	84
3.3. Ταυτόχρονη ιχνηλάτηση της διακίνησης του VEGFR2 και της εξωκυττάρωσης των WPBs.....	87
3.4. Πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων μορίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs)	94
3.4.1. Εύρεση του ενεργοποιητή, ή συνδυασμού ενεργοποιητών, που παρουσιάζει την βέλτιστη απόδοση επαγωγής της έκκρισης των WPBs	94
3.4.2. Πρωτεομική ανάλυση σε ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs) μετά από ενεργοποίηση με VEGF/bFGF/ATP	95
3.5. Η Galectin-1 συνεντοπίζεται με το κύριο μόριο των WPBs, την πρωτεΐνη vWF, σε ένα μικρό υποσύνολο των WPBs στα HUVECs	101
3.6. Έλεγχος της εξειδίκευσης του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης galectin-1 με ανοσοφθορισμό.....	103
3.7. Η Galectin-1 εντοπίζεται σε ένα υποσύνολο των WPBs, σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων HUVEC.....	107
3.8. Η πρωτεΐνη galectin-1 συνεντοπίζεται με γνωστούς πρωτεϊνικούς δείκτες των WPBs.....	107
3.9. Συνεστιακή μικροσκοπία STED υψηλής ανάλυσης επιβεβαιώνει την παρουσία της Galectin-1 στα WPBs	111
3.10. Η πρωτεΐνη galectin-1 εντοπίζεται στα WPBs που υπέστησαν “kiss-and-run” εξωκυττάρωση μετά από επαγωγή με VEGF/bFGF/ATP	115
3.11. Διερεύνηση της εισόδου ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 στα WPBs, μέσω του μηχανισμού "kiss-and-run", κατά την ιδιοσυστατική έκκριση	122
3.12. Η απομάκρυνση της εκκρινόμενης galectin-1 μειώνει την παρουσία της στα WPBs που υφίστανται ιδιοσυστατική έκκριση	132
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	135
4.1. Συσχέτιση μεταξύ της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και της επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα	135

4.1.1. Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα.....	135
4.2. Ο VEGFR2 αλληλεπιδρά με τα WPBs	136
4.3. Προτεινόμενο μοντέλο της χωρο-χρονικής οργάνωσης του ενδοκυτταρωμένου VEGFR2, της σηματοδότησης και της εξωκυττάρωσης των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα	137
4.4. Εύρεση του ρόλου της Rab15 στην επικοινωνία μεταξύ VEGFR2-θετικών ενδοσωμάτων και των WPBs.....	140
4.5. Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης Galectin-1 στα WPBs	140
4.6. “Kiss-and-run” εξωκυττάρωση: Προτεινόμενος μηχανισμός εισόδου της πρωτεΐνης Galectin-1 στα WPBs.....	143
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ.....	145
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)	149
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	153

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

HUVECs	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
WBPs	Weibel-Palade bodies
vWF	von Willebrand Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
RTKs	Receptor Tyrosine Kinases
AKT/PKB	Protein Kinase B
ERK1/2	Extracellular Regulated Kinases 1/2
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAPKAP2/3	MAPK-activating protein kinase-2 and 3
p38 MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinase
PI3K	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate
PKC	Protein Kinase C
PKC-δ	Protein Kinase C- δ
PLC-γ	Phosphoinositide phospholipase C- γ
IP₃	Inositol (1,4,5)-trisphosphate
DAG	1,2-diacylglycerol
PKA	Protein Kinase A
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase
NO	Nitric Oxide
PMA	Phorbol Myristate Acetate
EIPA	5-N-Ethyl-N-isopropyl amiloride
Rbnk5	Rabankyrin-5

EEA1	Early Endosome Antigen 1
GTPase ARF6	GTPase ADP-ribosylation factor 6
CME	Clathrin-Mediated Endocytosis
CIE	Clathrin-Independent Endocytosis
CLICs	Clathrin and dynamin Independent Carriers
GEEC	Glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein (GPI-AP) Enriched Early Endosomal Compartments
AP	Adaptor Proteins
TGN	<i>trans</i> -Golgi network
Sp	Signal peptide
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
ATP	Adenosine Triphosphate
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
IL-8	Interleukin 8
Ang1	Angiopoietin 1
NSF	<i>N</i> -ethylmaleimide-Sensitive Factor
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
<i>v</i>-SNARE	<i>vesicle</i> -SNARE
<i>t</i>-SNARE	<i>target</i> -SNARE
ECM	Extracellular Matrix
CPS	Conventional Protein Secretion
UPS	Unconventional Protein Secretion
MVB	Multivesicular Bodies
Gal-1	Galectin-1
CRD	Carbohydrate-Recognition Domain

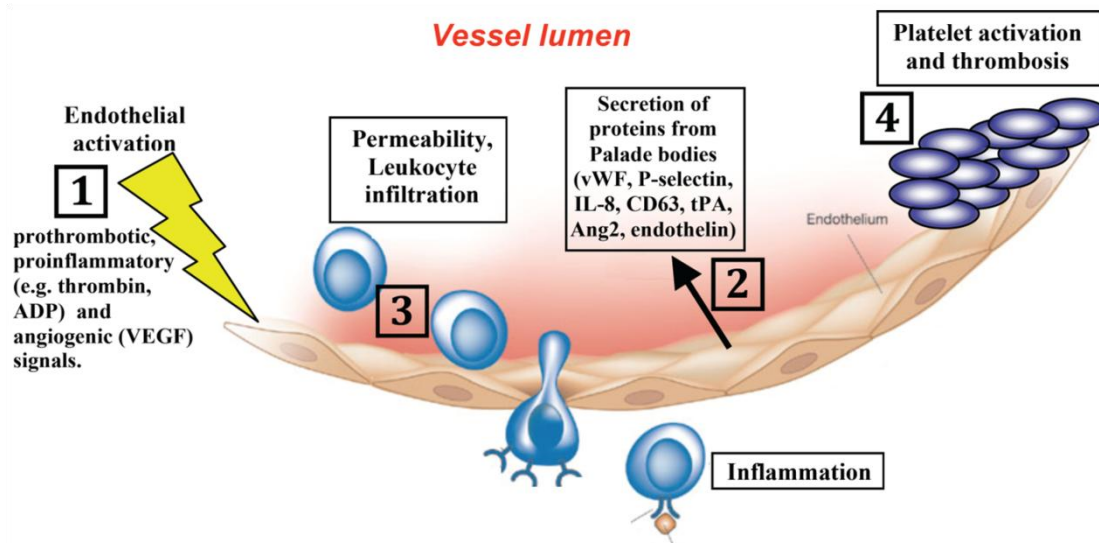
Gal	Galactose
Glu	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamine
GalNac	<i>N</i> -Acetylgalactosamine
Man	Mannose
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
IL-1β	Interleukin 1 beta
ER	Endoplasmic reticulum
GTP	Guanosine Triphosphate
NRCAM	Neural -cell adhesion molecule
PDI	Protein disulfide-isomerase
PGK1	Phosphoglycerate kinase
PNGase F	Peptide:N-glycosidase F
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
FCS	Fetal Calf Serum
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
nLC-MS/MS	Nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
LSCM	Laser Scanning Confocal Microscopy
STED	Stimulated Emission Depletion

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ενδοθηλιακή λειτουργία και ομοιόσταση

Το ενδοθήλιο αποτελείται από μία μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία καλύπτουν το εσωτερικό τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων (Aird et al., 2006; Dudley et al., 2012). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί η πολικότητα της μεμβράνης τους και η διάκρισή της σε δύο πλευρές: Την κορυφαία (apical), η οποία βρίσκεται προς τον αυλό των αγγείων και τη βασεοπλευρική (basolateral), η οποία έρχεται σε επαφή με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) και τους γειτονικούς ιστούς (Pries et al, 2000; Van der Wouden et al., 2003). Το ενδοθήλιο δεν παρέχει απλά ένα δομικό φραγμό μεταξύ της αγγειακής κυκλοφορίας και του περιβάλλοντος ιστού, αλλά εμφανίζει ένα μοναδικό πολυλειτουργικό ρόλο με κρίσιμες βασικές και επαγόμενες μεταβολικές και συνθετικές λειτουργίες. Έτσι, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εξασφαλίζουν την ομαλή ροή του αίματος μέσω αναστολής της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και επιπλέον ελέγχουν το τόνο των αγγείων. Ακόμη, είναι σημαντικός ο ρόλος του ενδοθηλίου σε συνθήκες τραύματος, καθώς συμμετέχουν στην επούλωση μέσω αναγέννησης των τραυματισμένων αγγείων.

Όμως, το ενδοθήλιο συμμετέχει επίσης σε βασικές παθολογικές λειτουργίες. Έτσι, το ενεργοποιημένο ενδοθήλιο έχει καίριο ρόλο στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την δημιουργία θρόμβωσης καθώς και στην φλεγμονώδη απόκριση (Εικόνα 1). Επιπροσθέτως τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση αλλά και στον καρκίνο (Dudley 2012; Polverini, 2002). Κατά συνέπεια η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών παθολογικών καταστάσεων, όπως οι καρδιαγγειακές και οι φλεγμονώδεις παθήσεις αλλά και η μη φυσιολογική αγγειογένεση στους όγκους (Cines et al., 1998; Deanfield et al., 2007; Lerman and Zeiher, 2005; Sumpio et al., 2002).

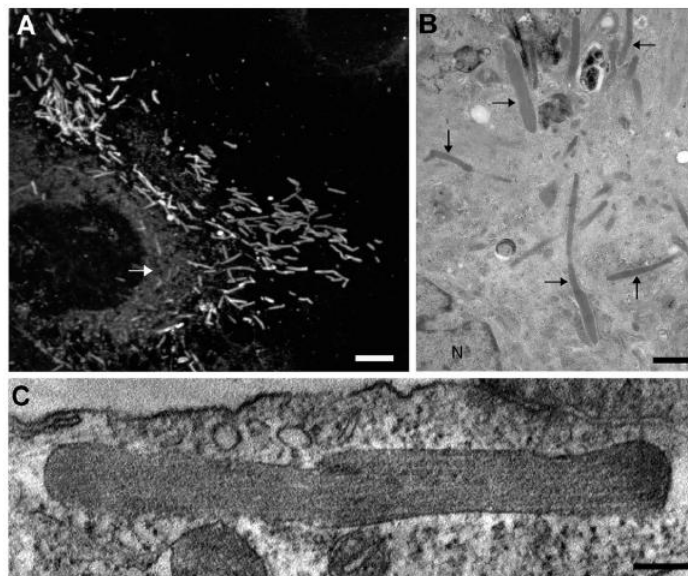


Εικόνα 1. Ενδοθηλιακή απόκριση σε εξωγενή σήματα: ο διττός ρόλος του ενδοθηλίου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν ένα αγγειακό φραγμό, υπεύθυνο για την ομαλή λειτουργία του αγγειακού συστήματος εξασφαλίζοντας αντι-θρομβωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Παρουσία προ-θρομβωτικών, προ-φλεγμονώδων και αγγειογενετικών αποκρίσεων (1) τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν βιομόρια από τα αποθηκευμένα οργανίδια, Weibel-Palade Bodies (2). Ανάμεσα στα μόρια που εκκρίνονται υπάρχουν παράγοντες (όπως IL-8, P-selectin von Willebrand factor) που συμμετέχουν σε ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένων της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων προκαλώντας φλεγμονή (3), καθώς και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων επιτελώντας λειτουργίες της θρόμβωσης (4).

1.2. Τα εκκριτικά οργανίδια Weibel-Palade Bodies (WPBs)

Καίριο ρόλο στις παραπάνω λειτουργίες του ενδοθηλίου παίζουν μόρια, τα οποία εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από κατάλληλο ερέθισμα. Τέτοια εκκρινόμενα μόρια, με ρυθμιστική δράση στη φλεγμονή, τη θρόμβωση, την αγγειογένεση και τον τόνο των αγγείων, είναι για παράδειγμα η P-Selectin, ο παράγοντας von Willebrand, η αγγειοποιητίνη, η ενδοθηλίνη, κ.α. (Εικόνα 1). Τα μόρια αυτά βρίσκονται αποθηκευμένα σε εξειδικευμένα οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα επονομαζόμενα Weibel-Palade bodies (στο εξής WPBs) (Metcalf et al., 2008; Rondaj et al., 2006; Weibel and Palade, 1964). Η εξοκυστική των WPBs, παρουσία των κατάλληλων χημικών ερεθισμάτων, προκαλεί την απελευθέρωση των μορίων αυτών στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας αιμοστατικές, ανοσολογικές αλλά και φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Εικόνα 1). Η ανακάλυψη των WPBs πραγματοποιήθηκε από τους Edward Weibel και George Palade (Weibel and Palade, 1964) στους οποίους και οφείλουν το όνομά τους, όταν παρατήρησαν κυτταροπλασματικά οργανίδια «ραβδωτού» σχήματος, όπως περιγράφουν, σε ενδοθηλιακά κύτταρα αρτηριών σε ανθρώπινο πνεύμονα

μετά από παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα εν λόγω οργανίδια αποτελούν πλέον χαρακτηριστικό γνώρισμα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο αριθμός των WPBs και η σύστασή τους ποικίλει μεταξύ των διαφόρων ενδοθηλιακών ιστών ως απόκριση του διαφορετικού περιβάλλοντος, στο οποίο εκτίθενται. Από πλευράς μεγέθους, σε γενικές γραμμές το μήκος των εν λόγω οργανιδίων κυμαίνεται από 1-5 μm και το πλάτος 0,1-0,2 μm (Metcalf et al., 2008; Michaux et al., 2006b; Lowenstein et al., 2005; Sadler, 1998). Παρόμοια με άλλα εκκριντικά οργανίδια, όπως τα κοκκία των ενδοκρινών και νευροενδοκρινών κυττάρων, τα WPBs σχηματίζονται στο δίκτυο trans-Golgi (Metcalf et al., 2008; Rondaij et al., 2006; Weibel and Palade, 1964) και στην συνέχεια υφίστανται ωρίμανση πριν τη συσσώρευσή τους στο κυτταρόπλασμα και την επακόλουθη εξωκυττάρωσή τους μετά από κατάλληλη διέγερση. Στην Εικόνα 2 (A) απεικονίζεται η δομή των WPBs μετά από χρώση έναντι του von Willebrand factor, του κύριου πρωτεϊνικού τους συστατικού (Wagner et al., 1982). Ηλεκτρονική μικροσκοπία (Εικόνα 2 B,C) αποδεικνύει επίσης την ακανόνιστη δομή των WPBs με τη χαρακτηριστική εμφάνιση ραβδώσεων (Valentijn et al., 2011), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα εν λόγω οργανίδια υφίστανται ομοτυπική σύντηξη.



Εικόνα 2. Μορφολογία των WPBs σε ενδοθηλιακό κύτταρο (HUVEC) σε συνθήκες ηρεμίας. (A) Μικροσκοπία φθορισμού μετά από χρώση με αντίσωμα έναντι του von Willebrand factor αποκαλύπτει τα πολυάριθμα επιμήκη WPBs εντός του κυττάρου. Με λευκό βέλος απεικονίζεται το ER (Scale bar, 5 μm). (B) Ηλεκτρονική μικροσκοπία αναδεικνύει τα WPBs (βέλη), (N, nucleus. Scale bar, 1 μm). (C) Εγκάρσια ηλεκτρονική τομογραφία ενός WPB αναδεικνύει το ακανόνιστο σχήμα του, όπως καθίσταται εμφανές από το κατά μήκος ακανόνιστο όριο της πλασματικής του μεμβράνης, πιθανά ως αποτέλεσμα ομοτυπικής σύντηξης, καθώς και τις εσωτερικές ραβδώσεις (Scale bar, 200 nm) (Valentijn et al., 2011).

Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης von Willebrand Factor (vWF) στα WPBs πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Wagner et al., το 1982. Το δεύτερο μόριο που ταυτοποιήθηκε ήταν ο υποδοχέας των λευκοκυττάρων P-selectin (Bonfanti et al., 1989; McEver et al., 1989), μια ενδιαφέρουσα ανακάλυψη, δεδομένης της εμπλοκής των WPBs στην απόκριση της φλεγμονής. Στον πίνακα 1 (McCormack et al., 2017) απεικονίζεται ένα σύνολο πρωτεϊνών που εντοπίζονται στα WPBs, υπεύθυνα για ένα εύρος κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της θρόμβωσης, της φλεγμονής, της αγγειογένεσης αλλά και του τόνου των αγγείων (Rondaij et al., 2006).

WPB cargoes	
WBP component	Function
VWF	Mechano-sensitive binding platform involved in many WPB functions, including haemostasis/thrombosis, inflammation, angiogenesis
Tissue plasminogen activator	Fibrinolysis
P-selectin	Leucocyte receptor
IL-8	Inflammation
CD63	P-selectin co-factor
Eotaxin-3	Inflammation
Endothelin	Vascular tonicity
Endothelin-converting enzyme	Vascular tonicity
Calcitonin gene-related peptide	Vascular tonicity
Angiopoietin-2	Angiogenesis
Osteoprotegerin	Vascular homeostasis

Πίνακας 1. Συστατικά των WPBs. Απεικονίζεται ένα σύνολο πρωτεϊνών (cargoes) που εντοπίζονται στα WPBs, καθώς και οι λειτουργίες που επιτελούν (McCormack et al., 2017).

Ο von Willebrand Factor αποτελεί απαραίτητο παράγοντα για τη βιογένεση των οργανιδίων WPBs, καθώς ετερόλογη έκφραση της εν λόγω πρωτεΐνης σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί στο σχηματισμό ψευδο-WPBs, όμοιων με αυτά των ενδοθηλιακών κυττάρων (Metcalf et al., 2008) (Blagoveshchenskaya et al., 2002; Michaux, 2003; Wagner et al., 1991). Τα παραπάνω υποστηρίζουν μία συσχέτιση μεταξύ της βιοσύνθεσης του vWF και της βιογένεσης των οργανιδίων στα οποία εντοπίζεται (WPBs), μία διαπίστωση που αναγνωρίζεται όλο και περισσότερο. Αν και η παρουσία του vWF είναι καθοριστική για το σχηματισμό των WPBs, ο κυτταρικός μηχανισμός ο οποίος ελέγχει το σχηματισμό αυτών των οργανιδίων φαίνεται να

επηρεάζει επίσης τη δομική διάταξη του vWF και σαφώς τη λειτουργία του στην κυκλοφορία του αίματος (Ferraro et al., 2014, 2016; Lui-Roberts et al., 2005; Michaux et al., 2006; Wagner et al., 1991).

1.3. Βιοσύνθεση του von Willebrand factor (vWF) – Σχηματισμός των WPBs

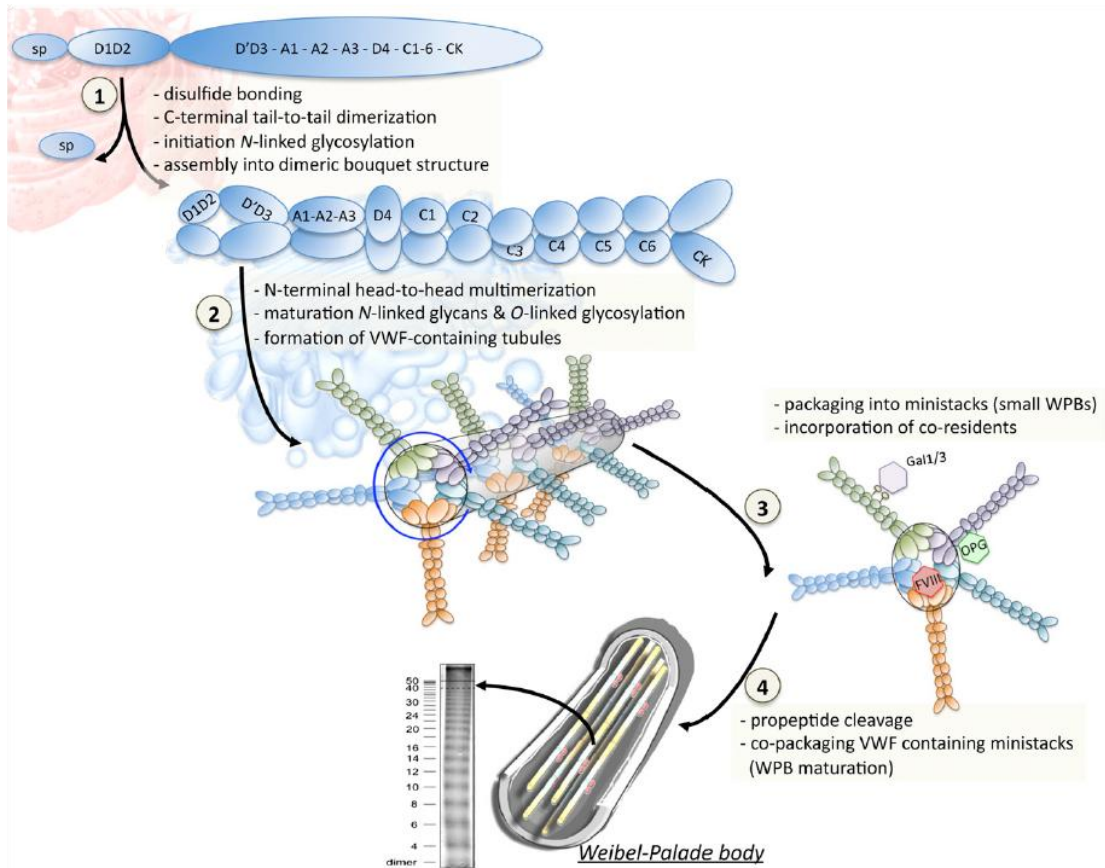
Η πρωτεΐνη von Willebrand Factor, ως η κύρια γλυκοπρωτεΐνη των WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και πρωτεΐνη των μεγακαρυοκυττάρων, είναι επίσης κυρίως γνωστή για τη συμβολή της στην αιμοστατική διαδικασία: Μεσολαβεί στην προσκόλληση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων σε θέσεις αγγειακής βλάβης, καθώς και στη μεταφορά του παράγοντα πήξης VIII (FVIII) (η πρωτεΐνη αυτή απουσιάζει στην κληρονομική διαταραχή της αιμοφιλίας A) στην κυκλοφορία του αίματος, προστατεύοντας τον από πρωτεολυτική αποικοδόμηση στο πλάσμα (Lenting et al., 2012; Sadler, 1998). Οι δράσεις αυτές φαίνεται να ρυθμίζονται από αλλοστερικούς μηχανισμούς και ενδεχομένως από υδροδυναμικές διατμητικές δυνάμεις (shear forces).

Το κύριο μόριο von Willebrand Factor αποτελείται από ταυτόσημες υπομονάδες, σχηματίζοντας πολυμερή συνδεδεμένα μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, το μέγεθος των οποίων φτάνει έως και >20.000 kDa. Μεταλλάξεις στο γονίδιο του vWF μπορούν να διαταράξουν αυτή τη σύνθετη βιοσυνθετική διαδικασία σε διάφορα στάδια και να επηρεάσουν τη συναρμολόγηση, την ενδοκυττάρια στόχευση αλλά και ακόλουθη έκκριση των πολυμερών του vWF. Η ανεπάρκεια του vWF οδηγεί στη νόσο του von Willebrand (VWD) που αποτελεί τη μεγαλύτερη κοινή κληρονομική διαταραχή αιμορραγίας.

Κάθε μονομερές μόριο του vWF αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) στο αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης (22 αμινοξέα), υπεύθυνο για τη στόχευση της πρωτεΐνης στο ενδοπλασματικό δίκτυο (το πεπτίδιο σχάζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο), το προπεπτίδιο (περιοχές D1-D2, 741 αμινοξέα, 100 kDa) που αποκόπτεται στο Golgi και την ώριμη πρωτεΐνη (περιοχές D'-CK, 2050 αμινοξέα, 260 kDa), ώστε το τελικό προϊόν μετάφρασης να αποτελείται από 2.813 αμινοξέα. Το 95% της πρωτεϊνικής ακολουθίας του vWF αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μοτίβα, τα οποία διατάσσονται στην ακολουθία D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK (Metcalf et al., 2008; Pannekoek & Voorberg, 1989; Sadler, 1998; Valentijn et al.,

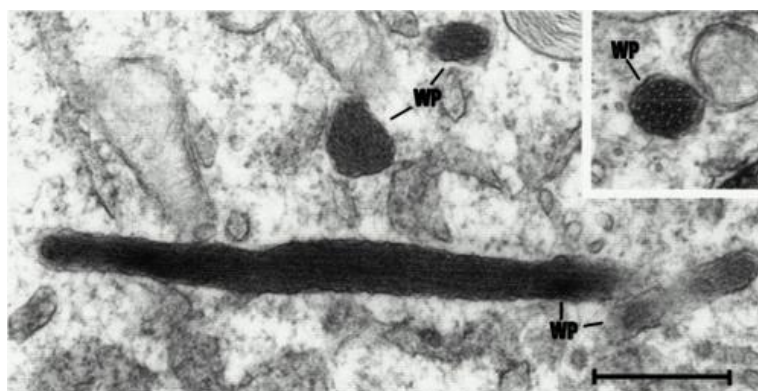
2011; Wagner & Marder, 1983) ή σύμφωνα με πιο πρόσφατες μελέτες στην ακολουθία D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK (Lenting et al., 2015; Rauch et al., 2013; Zhou et al., 2012).

Η αλληλουχία του vWF περιέχει μια ασυνήθιστα υψηλή περιεκτικότητα σε αμινοξέα κυστεΐνης (8,2%), ποσοστό σχεδόν τετραπλάσιο του μέσου όρου που παρατηρείται σε άλλες ανθρώπινες πρωτεΐνες (2,3%) (Shapiro et al., 2014). Η μοναδικότητα της αλληλουχίας αυτής καθιστά εφικτό το διμερισμό αρχικά του vWF στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνών της καρβοξυ-τελικής περιοχής (“tail-to-tail” dimerization) και ακολούθως τον πολυμερισμό (“head-to-head”) στο Golgi. Το αναπτυσσόμενο πολυμερές οργανώνεται σε μία ελικοειδή δομή που επιτρέπει στον vWF να συμπυκνώνεται περίπου 100 φορές, διευκολύνοντας την αποθήκευσή του και προσίδοντάς του ραβδωτό/σωληνοειδές σχήμα (Lenting et al., 2015). Πρόσθετες τροποποιήσεις στο δίκτυο trans Golgi (TGN) περιλαμβάνουν την πρωτεολυτική απομάκρυνση του προπεπτιδίου (το ελαφρώς όξινο περιβάλλον που επικρατεί στο Golgi ευνοεί τη σύνδεση του προπεπτιδίου με τον ώριμο vWF) από την πρωτεάση φουρίνη καθώς και μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η N- και O-γλυκοζυλίωση (Hannah et al., 2002; Michaux & Cutler, 2004; Romani de Wit & van Mourik, 2001; Sadler, 1998; Van Mourik et al., 2002). Το προπεπτίδιο του vWF διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη συγκρότηση των πολυμερών του, καθώς επάγει το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ γειτονικών αμινο-τελικών περιοχών (D'-D3) (Metcalf et al., 2008) εντός του πολυμερούς και απουσία αυτού ο πολυμερισμός καθίσταται αδύνατος (Verweij et al., 1987). Ο πολυμερισμός του von Willebrand Factor συνεχίζεται στο εσωτερικό των WPBs κατά το τελικό στάδιο της ωρίμανσής τους (Εικόνα 3).

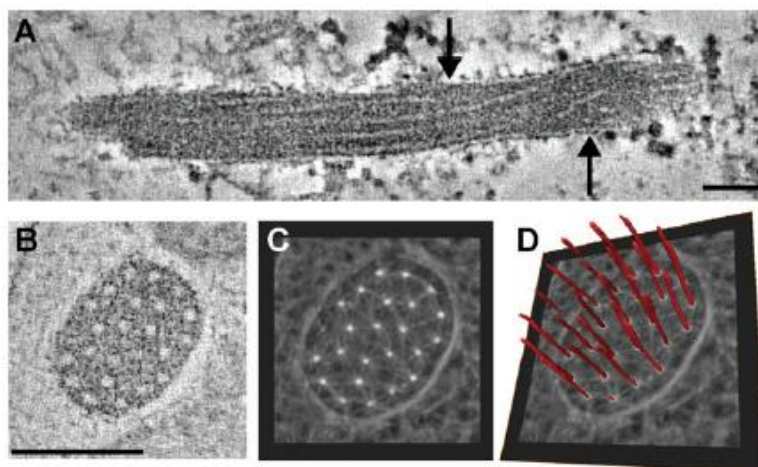


Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση των επιμέρους βημάτων στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του von Willebrand Factor (vWF). Η βιοσύνθεση του vWF διακρίνεται από μια σειρά διαδοχικών βημάτων, που τελικά οδηγεί στη βιογένεση των ενδοθηλιακών εκκριτικών οργανιδίων, των WPBs. (Βήμα 1). Αμέσως μετά την είσοδο του πρόδρομου vWF στο ενδοπλασματικό δίκτυο, το σηματοδοτικό πεπτίδιο αποκόπτεται και το πρόδρομο μόριο διμερίζεται μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ κυστεϊνών της καρβοξυ-τελικής περιοχής. Το διμερές που σχηματίζεται αποτελεί υπόβαθρο για την περαιτέρω N-γλυκοζυλίωση και τον ακόλουθο πολυμερισμό. (Βήμα 2). Κατά την άφιξη στη συσκευή Golgi, το όξινο pH και η σχετικώς υψηλή συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} , προάγουν τον πολυμερισμό και την οργάνωση των διμερών σε δομή «φουρκέτας» (bouquet), στην οποία τα διμερή ευθυγραμμίζονται παράλληλα μεταξύ τους. Επιπλέον, το περιβάλλον αυτό ευνοεί τον πολυμερισμό μέσω σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ γειτονικών αμινοτελικών περιοχών (D'-D3), μια διαδικασία, η οποία καταλύεται από το προπεπτίδιο. Το αναπτυσσόμενο πολυμερές οργάνεται σε μία ελικοειδή δομή, που επιτρέπει στον vWF να συμπυκνώνεται περίπου 100 φορές προσδίδοντάς του ραβδωτό/σωληνοειδές σχήμα. Σε αυτή την ελικοειδή δομή, το προπεπτίδιο (περιοχές D1-D2) και οι περιοχές D'-D3 σχηματίζουν το κοίλο τοίχωμα του σωληνίσκου ενώ το υπόλοιπο μέρος της πρωτεΐνης vWF (περιοχές A1-CK) προεξέχει προς τα έξω, καταλαμβάνοντας το χώρο μεταξύ των σωληνίσκων, προσδίδοντας στα WPBs τη χαρακτηριστική δομή ραβδώσεων, που παρατηρείται σε εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η ωρίμανση του vWF συνεχίζεται επίσης μέσω της N- και O-γλυκοζυλίωσης, που πραγματοποιείται κατά τη διέλευση του πρόδρομου vWF στο Golgi. (Βήμα 3). Οι σωληνοειδείς διαμορφώσεις του vWF συναρμολογούνται στα λεγόμενα "ministacks" που αντιπροσωπεύουν την αρχική δομή των WPBs. (Βήμα 4) Στο δίκτυο trans Golgi, η συσσωμάτωση του vWF στα λεγόμενα "ministacks" προάγει την περαιτέρω ωρίμανση και το σχηματισμό μεγαλύτερων WPBs. Επιπλέον, στο δίκτυο αυτό πραγματοποιείται και η πρωτεολυτική σχάση του προπεπτιδίου από την πρωτεάση φουρίνη. Ανάλυση του vWF των ενδοθηλιακών κυττάρων έδειξε την παρουσία πολυμερών του vWF με μοριακό βάρος μεγαλύτερο αυτών που υπάρχουν στο πλάσμα. (Lenting et al., 2015).

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ο von Willebrand Factor στα ώριμα πλέον WPBs διακρίνεται με τη μορφή εσωτερικών ραβδώσεων/σωληνίσκων, έντονης ηλεκτρονικής πυκνότητας και με προσανατολισμό παράλληλο με τον επιμήκη άξονά τους σε διαμήκη τομή, ενώ σε εγκάρσια τομή οι σωληνίσκοι εμφανίζονται ως «δακτυλίδια» με ένα κενό πυρήνα να περιβάλλεται από ένα χώρο έντονης ηλεκτρονικής πυκνότητας (Sadler et al., 1998; Valentijn et al., 2008; Wagner et al., 1991; Weibel, E. R., 2012; Zenner et al., 2007) (Εικόνα 4 A,B).



Εικόνα 4A. Ηλεκτρονική τομογραφία των WPBs σε διαμήκη και εγκάρσια τομή. WP: Weibel-Palade body. Scale bar 0.5 μ m. (Figure courtesy of Elisabeth Cramer, H^opital Henri Mondor, Creteil, France) (Sadler, J.E., 1998).

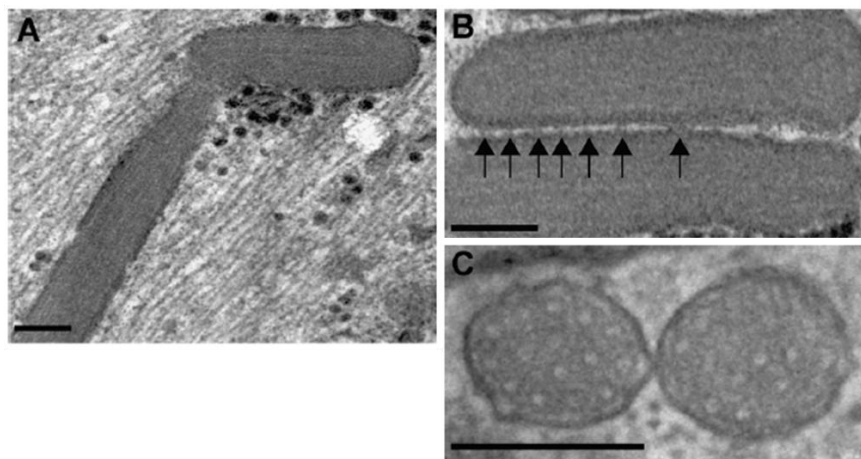


Εικόνα 4B. (A) Ηλεκτρονική τομογραφία ενός διαμήκους διατεταγμένου WPB και (B) εγκάρσια τομή ενός WPB. (C, D) Μοντελοποίηση των σωληνίσκων του vWF σε εγκάρσια τομή (Valentijn et al., 2008).

Οι Michaux et al. (2006) αναφέρουν επίσης ότι το μέγεθος των WPBs σχετίζεται άμεσα με το βαθμό έκφρασης και της ακόλουθης συμπύκνωσης του vWF στη χαρακτηριστική σωληνοειδή του δομή στο Golgi. Υποστηρίζεται ότι η δομή αυτή

ευνοείται από την αλληλεπίδραση του προπεπτιδίου (περιοχές D1-D2) με τις πρώτες τρεις περιοχές (D'-D3-A1) του ώριμου vWF, η οποία φαίνεται να διευκολύνεται από το όξινο pH του περιβάλλοντος στο Golgi. Η συγκεκριμένη μελέτη έδειξε ότι, είτε η έκφραση μόνο του προπεπτιδίου (περιοχές D1-D2) ή μόνο του ώριμου vWF (D'-CK περιοχές) υπό φυσιολογικές συνθήκες, οδηγεί στο σχηματισμό σφαιρικών δομών που είναι θετικές για τον vWF. Συν-έκφραση των δύο *in trans* οδήγησε στο σχηματισμό επιμηκυσμένων WPBs (με την χαρακτηριστική σωληνοειδή δομή), υποδεικνύοντας ότι τόσο το προπεπτίδιο όσο και ο ώριμος vWF είναι απαραίτητα για τον επιμήκη σχηματισμό αυτών.

Μια άλλη ακόμη εκδοχή για το σχηματισμό των WPBs σχετίζεται με φαινόμενα ομοτυπικής σύντηξης ανώριμων WPBs μεταξύ τους, μια διαδικασία που θα μπορούσε να εξηγεί την ετερογένεια που τα διακρίνει (Lenting et al., 2015; Valentijn et al., 2008) (Εικόνες 2, 5).

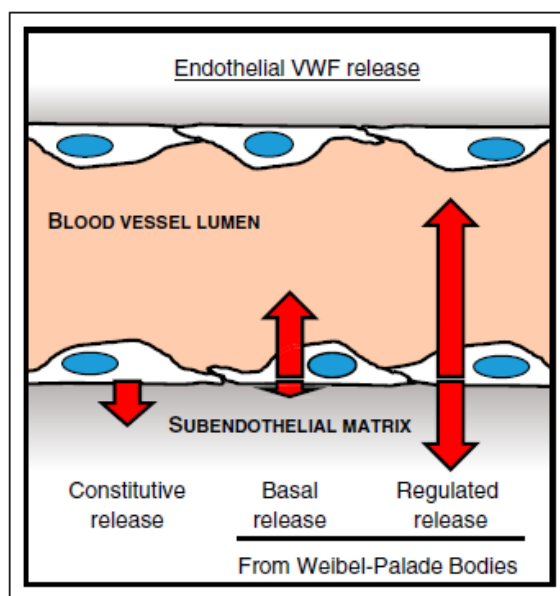


Εικόνα 5. Φαινόμενα ομοτυπικής σύντηξης των WPBs. (A, B, C) Εικόνες δύο διαστάσεων από δύο WPBs, όπου απεικονίζονται τα σημεία σύντηξης μεταξύ τους. Η σύντηξη πραγματοποιείται (A) στα άκρα, (B) κατά μήκος των αξόνων τους (τα βέλη απεικονίζουν σημεία έντονης ηλεκτρονικής πυκνότητας που αντιπροσωπεύουν σημεία επαφών) και (C) εγκάρσια τομή από δύο WPBs που έρχονται σε στενή επαφή. Scale bars = 100 nm. (Valentijn et al., 2008).

1.4. Οδοί έκκρισης του von Willebrand Factor

Ο vWF αποτελεί ένα τυπικό παράδειγμα μιας εκκρινόμενης πρωτεΐνης. Τα μοριακά γεγονότα που αφορούν τα στάδια και τις οδούς έκκρισης του vWF εμφανίζουν αρκετές ομοιότητες με πλήθος άλλων εκκρινόμενων πρωτεϊνών, σε αντίθεση με τη βιοσύνθεση αυτού, όπου φαίνεται να αποτελεί μία ιδιαίτερη διαδικασία.

Η έκκριση του vWF πραγματοποιείται τόσο από την κορυφαία (apical) όσο και από την πλαγιοβασική (basolateral) πλευρά των ενδοθηλιακών κυττάρων και μέσω τριών εκκριτικών οδών: Την επαγόμενη (regulated), τη βασική (basal) και τη συστατική (constitutive) έκκριση, με διαφορετική ωστόσο πολικότητα (McCormack et al., 2017; GIBLIN et al., 2008). Τόσο η επαγόμενη όσο και η βασική έκκριση του vWF πραγματοποιείται μέσω της εξωκυττάρωσης των WPBs, έχοντας ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερών του vWF. Η επαγόμενη έκκριση πραγματοποιείται μετά από επαγωγή με κάποιο ενεργοποιητή, όπως η θρομβίνη, η ισταμίνη, η επινεφρίνη, η αγγειοπρεσίνη, κ.α. (Rondaij et al., 2006, Valentijn et al., 2011, Wagner et al., 1990) (Πίνακας 2, McCormack et al., 2017). Αντίθετα, η βασική έκκριση πραγματοποιείται συνεχώς, ενδεχομένως λόγω της μηχανικής διέγερσης που δέχονται τα ενδοθηλιακά κύτταρα από την κυκλοφορία του αίματος. Τέλος, η τρίτη οδός οδηγεί στην ιδιοσυστατική απελευθέρωση του vWF μέσω κυστιδίων, όχι των αποθηκευτικών WPBs κι επομένως διακρίνεται από χαμηλό επίπεδο πολυμερισμού (Lopes da Silva & Cutler, 2016; McCormack et al., 2017). (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της πολικότητας των διαφορετικών οδών έκκρισης του von Willebrand Factor στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Με βέλη απεικονίζεται η κατεύθυνση έκκρισης του vWF, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε από την κορυφαία πλευρά (προς την πλευρά του αυλού των αγγείων) (αφορά κυρίως τη βασική και την επαγόμενη έκκριση), είτε από την πλαγιοβασική πλευρά των ενδοθηλιακών κυττάρων (προς την πλευρά του υποενδοθηλιακού πλέγματος), η οποία αφορά κυρίως την ιδιοσυστατική έκκριση, αλλά και ένα μικρό μέρος της βασικής και ένα ποσοστό της επαγόμενης έκκρισης (Lopes da Silva & Cutler, 2016).

Η πολικότητα η οποία διακρίνει τις διαφορετικές οδούς έκκρισης του vWF, σχετίζεται σαφώς με το λειτουργικό ρόλο των πολυμερών του vWF που εκκρίνονται. Για παράδειγμα, η επαγόμενη έκκριση εξαιρετικά μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερών του vWF (UL/ULVWF) πραγματοποιείται από την κορυφαία πλευρά του ενδοθηλίου και απαιτεί ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων (π.χ. λόγω τραύματος ή φλεγμονής). Η απελευθέρωση των υψηλού μοριακού βάρους πολυμερών του vWF στοχεύει στην πρόσδεση των αιμοπεταλίων στον αυλό των αγγείων, επιτελώντας λειτουργίες της θρόμβωσης μέσω σχηματισμού του αιμοστατικού θρόμβου αλλά και της φλεγμονής (Argy et al., 2002). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η νόσος του von Willebrand (VWD), στην οποία η ανεπάρκεια του vWF (λόγω μεταλλάξεων στο γονίδιο του vWF) στο πλάσμα αυτών των ασθενών σχετίζεται με σοβαρά προβλήματα αιμορραγίας. Η βασική έκκριση είναι ακόμη υπεύθυνη για την παρουσία μεγάλου μοριακού βάρους πολυμερών του vWF στο πλάσμα. Αντιθέτως, η ιδιοσυστατική έκκριση χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) πολυμερών του vWF αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του δεσμευμένου με το κολλαγόνο vWF στον υποενδοθηλιακό συνδετικό ιστό. Παράλληλα, εξυπηρετεί τη δέσμευση των αιμοπεταλίων, στο σημείο του τραυματισμού.

Endothelial cell agonists	
Agonist	Reference
ATP, ATP	(Palmer et al., 1994)
Ca ²⁺ ionophore	(Loesberg et al., 1983)
Ceramide	(Bhatia et al., 2004)
Complement components (C5b, C6, C7, C8, C9)	(Foreman et al., 1994; Hattori et al., 1989)
Epinephrine (adrenaline)	(Vischer and Wollheim, 1997)
Fibrin	(Ribes et al., 1987)
Histamine	(Hamilton and Sims, 1987)
Hydrogen peroxide*	(Matsushita et al., 2005a)
Hypoxia	(Pinsky et al., 1996)
IL-1, IL-6, IL-8, TNF α	(Bernardo et al., 2004; Giddings and Shall, 1987; Paleolog et al., 1990)
Leukotrienes	(Datta et al., 1995)
NO*	(Matsushita et al., 2003)
Ox-LDL	(Vora et al., 1997)
PMA	(Giddings and Shall, 1987)
Radiation	(Hallahan et al., 1998)
Reactive oxygen species	(Vischer et al., 1995)
Serotonin	(Palmer et al., 1994)
Shear stress	(Galbusera et al., 1997)
Shiga toxin 1B and 2B	(Nolasco et al., 2005)
Sphingosine-1 phosphate	(Matsushita et al., 2004)
Thrombin	(Levine et al., 1982)
Trauma	(Reidy et al., 1989)
VEGF	(Matsushita et al., 2005b)

*Inhibitor of WPB exocytosis.

Πίνακας 2. Σύνοψη των χημικών παραγόντων/ρυθμιστών της εξωκυττάρωσης των WPBs (αναφορικά με την επαγόμενη έκκριση). Με αστεράκι επισημαίνονται οι αναστολείς της εξωκυττάρωσης των WPBs. Για κάθε χημικό παράγοντα/ρυθμιστή που αναφέρεται στον παραπάνω πίνακα αντιστοιχεί ενδεικτική βιβλιογραφική αναφορά (McCormack et al., 2017).

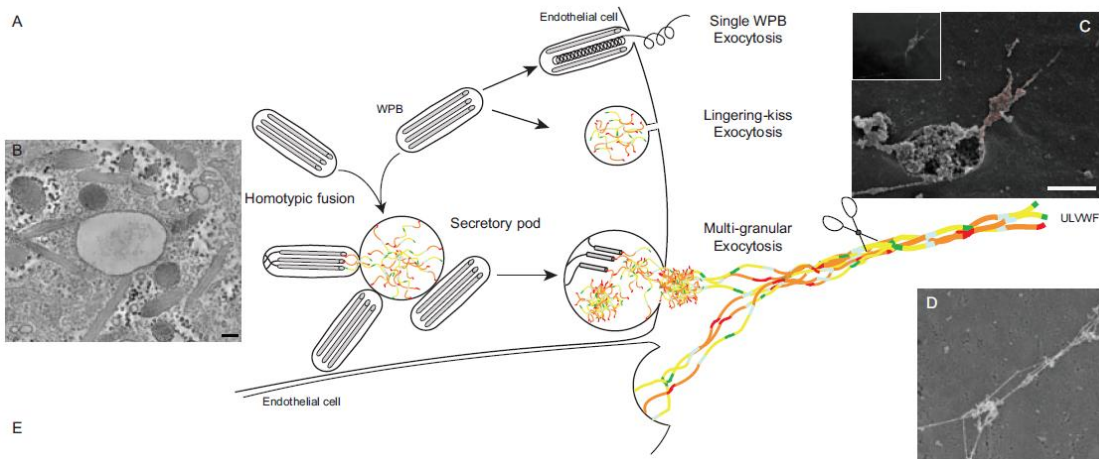
1.5. Μοριακοί μηχανισμοί της εξωκυττάρωσης των WPBs

1.5.1. Προτεινόμενα μοντέλα εξωκυτταρικής σύντηξης

Όπως αναφέρεται από τους Valentijn & Eikenboom (2013), έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για την επαγόμενη εξωκυττάρωση των ώριμων WPBs (Εικόνες 7, 9):

- i. **“single WPB exocytosis”** (Nightingale et al., 2011),
- ii. **“lingering-kiss”, ανάλογη της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης** (η οποία συμβαίνει κατά την απελευθέρωση των συναπτικών κυστιδίων στα νευροενδοκρινικά κύτταρα) (Babich et al., 2008, Valentijn et al., 2011) και
- iii. **“multigranular exocytosis”** (Kiskin et al., 2014; Stevenson et al., 2017; Valentijn et al., 2010).

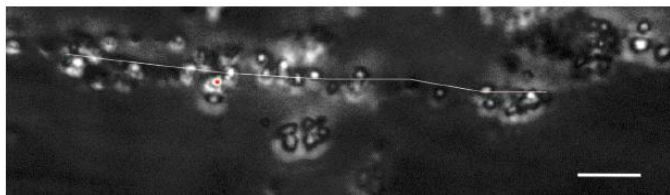
Στο μοντέλο “single WPB exocytosis”, ένα Weibel-Palade body συντήκεται πλήρως με την πλασματική μεμβράνη με ή χωρίς το σχηματισμό ενός δακτυλίου αποτελούμενο από ακτίνη-μυοσίνη, γύρω από αυτό που βοηθά στην εξώθηση του περιεχομένου του (Han et al., 2017; Nightingale et al., 2009, 2011), ενώ στο μοντέλο της πολυκυστιδιακής εξωκυττάρωσης (“multigranular exocytosis”), πολλά ανώριμα WPBs συντήκονται μεταξύ τους μέσω ομοτυπικής σύντηξης (“homotypic fusion”) (Valentijn et al., 2008), οδηγώντας στη δημιουργία μίας σφαιρικής δομής γνωστής ως “secretory pod”, λίγο πριν την εξωκυττάρωσή της. Αναφορικά με το μοντέλο “lingering-kiss” ή “kiss-and-run”, η εξωκυττάρωση των WPBs πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας ενός μικρού πόρου (10-12 nm) κατά τη μερική σύντηξη του Weibel-Palade body με την πλασματική μεμβράνη, επιτρέποντας την επιλεκτική απελευθέρωση μορίων με μικρό μοριακό βάρος (π.χ P-selectin, IL-8) αλλά όχι του von Willebrand Factor. Η ύπαρξη των διαφορετικών οδών εξωκυττάρωσης για τα WPBs φαίνεται να εξυπηρετεί την ενδοθηλιακή λειτουργία, καθώς μέσω των διαφορετικών αυτών οδών ελέγχεται τόσο η ποσότητα όσο και το είδος του πρωτεϊνικού φορτίου που απελευθερώνεται.



Εικόνα 7. Προτεινόμενα μοντέλα επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs – Δομή του εκκρινόμενου von Willebrand Factor. (A) Σχηματική αναπαράσταση των διαφορετικών τρόπων της επαγόμενης έκκρισης των WPBs. Στο μοντέλο “single WPB exocytosis” ένα Weibel-Palade body συντήκεται με την πλασματική μεμβράνη και ο vWF εκκρίνεται (πάνω). Σύμφωνα με το μοντέλο “lingering-kiss” τα WPBs κατά την εξωκυττάρωσή τους στρογγυλοποιούνται και το περιεχόμενό τους εξωκυττάρωνεται μέσω ενός μικρού πόρου, που σχηματίζεται στο στάδιο της σύντηξής τους με την πλασματική μεμβράνη (μέση). Κατά την πολυκυστιδιακή εξωκυττάρωση (“multigranular exocytosis”) τα WPBs υφίστανται ομοτυπική σύντηξη έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας σφαιρικής εκκριτικής δομής (“secretory pod”), που αποτελεί χώρο συγκέντρωσης του vWF λίγο πριν την έκκριση (κάτω). (B). Ηλεκτρονική τομογραφία της δομής “secretory pod”, η οποία φαίνεται να περιβάλλεται από πολλαπλά WPBs. (C). Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, στην οποία απεικονίζεται ο πόρος της πλασματικής μεμβράνης και η ίνα του vWF που απελευθερώθηκε. Η ανίχνευση του vWF πραγματοποιήθηκε με χρήση αντισώματος έναντι αυτού συζευγμένου με σωματίδια χρυσού (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα). Στο ένθετο (άσπρο πλαίσιο) απεικονίζεται το πίσω μέρος της εικόνας της ίνας του vWF και το πρότυπο κατανομής των σωματιδίων χρυσού. (D). Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης απεικονίζει το δίκτυο από τις εκκρινόμενες ίνες του vWF στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού κυττάρου. Scale bars: 500 nm (B); 1 μm (C, D) (Valentijn & Eikenboom, 2013).

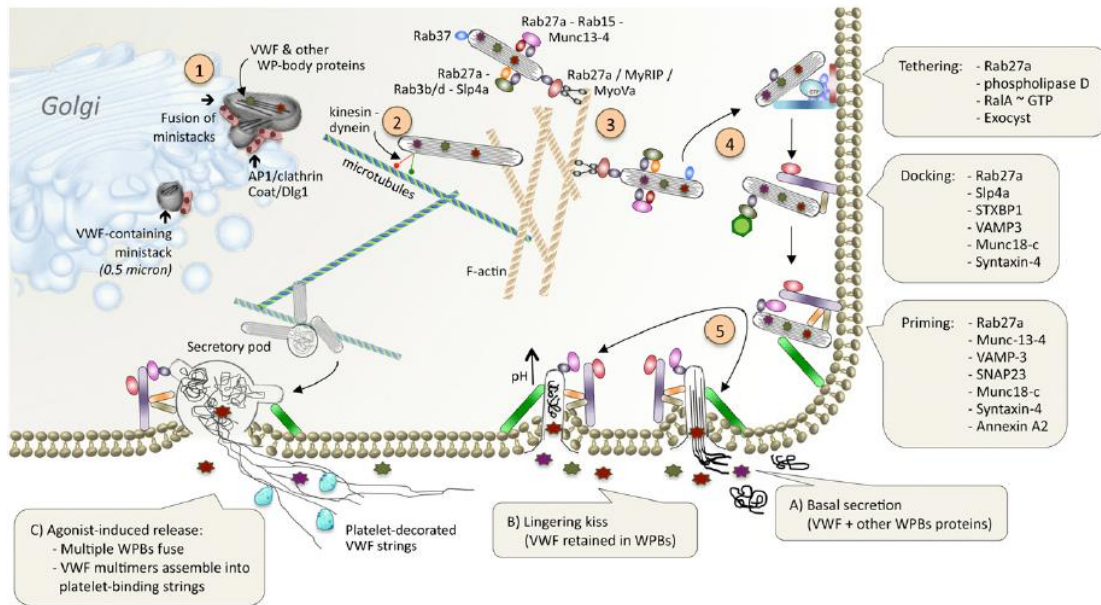
Έχει αναφερθεί ότι ο εκκρινόμενος vWF υιοθετεί μια διαφορετική διαμόρφωση από αυτή που έχει μέσα στα WPBs (Valentijn & Eikenboom, 2013) (Εικόνα 8). Τα πολυμερή του vWF (UL/ULVWF) μετά την επαγόμενη έκκριση των WPBs σχηματίζουν εξαιρετικά μεγάλες ίνες που μπορούν να φτάσουν αρκετά χιλιοστά σε μήκος, οι οποίες παραμένουν δεσμευμένες στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων (Dong et al., 2002). Η διαδικασία αυτή φαίνεται να διαμεσολαβείται από αλλαγές στο pH στο εσωτερικό του Weibel-Palade body, όπου από όξινο γίνεται ουδέτερο κατά την εξωκυττάρωσή του, γεγονός που εξασθενεί τη δράση του προπεπτιδίου επιφέροντας το «ξεδίπλωμα» των πολυμερών. Σε συνθήκες στρες (shear stress) τα αιμοπετάλια προσδένονται στις ίνες αυτές, προσδίδοντας μία χαρακτηριστική δομή «ίνας με χάντρες» (Dong et al., 2002; Chauhan et al., 2007; Motto et al., 2005) (Εικόνα 8). Η διάσπαση των

ινών αυτών (UL/ULVWF) από την μεταλλοπρωτεάση του πλάσματος ADAMTS13 (Dong et al., 2002; Valentijn & Eikenboom, 2013) έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του vWF στο πλάσμα, όπου αποκτά μία πιο σφαιρική δομή η οποία πλέον μπορεί να προσδέσει αιμοπετάλια μόνο σε ειδικές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα μετά από shear stress (Moake et al., 1986).



Εικόνα 8. Αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τον vWF σε συνθήκες shear stress (shear flow ($\gamma = 4,000 \text{ s}^{-1}$)). Για λόγους απλούστευσης, η ίνα του vWF επισημαίνεται με λευκή γραμμή. Τα αιμοπετάλια ($1 \mu\text{m}$) προσδένονται στην ίνα του vWF όταν ο ρυθμός ροής είναι $\gamma = 3.500 \text{ s}^{-1}$. (Scale bar, $10 \mu\text{m}$.) (Schneider et al., 2007).

Ο μηχανισμός της έκκρισης των εκκριτικών οργανιδίων/κυστιδίων είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, η οποία φαίνεται να περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία ενδιάμεσα στάδια πριν την τελική σύντηξη (fusion) με την πλασματική μεμβράνη: “tethering”, “docking” και “priming” (Εικόνα 9). Στην περίπτωση της επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs, αρκετοί μηχανισμοί από τα παραπάνω στάδια είναι ακόμη ασαφείς. Ωστόσο, γνωρίζουμε ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες στη μεμβράνη των WPBs στρατολογούνται μία σειρά από πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Rab-GTPασών Rab27A, Rab3 (ισομορφές A, B, D), Rab15, Rab33 και Rab37 (Knop et al., 2004; Zografou et al., 2012). Αν και η δράση αυτών των Rab πρωτεϊνών στην εξωκυττάρωση δεν είναι σαφής, οι Rab3 και Rab15 έχουν βρεθεί να συμμετέχουν σε γεγονότα επαγόμενης εξωκυττάρωσης του vWF (Bierings et al., 2012; Knop et al., 2004; Zografou et al., 2012). Στα παραπάνω γεγονότα επαγόμενης εξωκυττάρωσης βρέθηκαν να εμπλέκονται επίσης και άλλες πρωτεΐνες-ρυθμιστές (effectors), όπως η Munc 13-4 (γνωστή και ως UNC13D), αφού βρέθηκε να σχηματίζει σύμπλοκο με τις Rab27a και Rab15 στα WPBs (Zografou et al., 2012), καθώς και η Slp4-a που αλληλεπιδρά με τις Rab27a και Rab3 (ισομορφές B and D), επάγοντας την έκκριση του vWF (Bierings et al., 2012; McCormack et al. 2017).



Εικόνα 9. Σχηματική σύνοψη των ενδιάμεσων σταδίων κατά τη βασική και επαγόμενη έκκριση του vWF από τα WPBs. (Βήμα 1) Ο σχηματισμός των WPBs στο Golgi ακολουθείται από την κάλυψη του πρωτεϊνικού τους καλύμματος από τις πρωτεΐνες κλαθρίνη/AP1/Dlg1. (Βήμα 2) Τα WPBs μετακινούνται προς την περιφέρεια του κυττάρου μετά από πρόσδεση στους μικροσωληνίσκους μέσω του συμπλόκου κινεσίνης/δυνείνης (kinesin/dynein). (Βήμα 3) Η ακόλουθη πρόσδεσή τους στα ινίδια ακτίνης πραγματοποιείται μέσω του πρωτεϊνικού συμπλόκου Rab27a/MyRIP/MyoVa. Τα WPBs προσελκύουν, επίσης, μία σειρά από άλλες πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον εκκριτικό μηχανισμό συμπεριλαμβανομένων των Rab3, Rab15, Rab27a, Rab37, Munc13-4 και Slp4a. (Βήμα 4) Η έκκριση του πρωτεϊνικού φορτίου των WPBs πραγματοποιείται μέσω μιας σειράς ενδιάμεσων σταδίων: “tethering”, “docking”, “priming”, πριν την τελική σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη (fusion), καθένα από τα οποία διαμεσολαβείται από διαφορετικές πρωτεΐνες (τελεστές). (Βήμα 5) Η έκκριση του vWF από τα WPBs πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών εκκριτικών οδών: (A) η βασική έκκριση που οδηγεί στην απελευθέρωση του vWF και άλλων πρωτεϊνών από τα WPBs, (B) σε σπάνιες περιπτώσεις, η έκκριση πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους από τα WPBs (π.χ IL-8), αλλά όχι του vWF, πραγματοποιείται μέσω ενός μικρού πόρου που σχηματίζεται κατά την σύντηξη του WPB με την πλασματική μεμβράνη (“lingering kiss”), (C) μαζική έκκριση πολυμερών του vWF παρατηρείται κατά την πολυκυστιδιακή εξωκυττάρωση (“multigranular exocytosis”) μέσω της δομής “secretory pod” (Lenting et al., 2015).

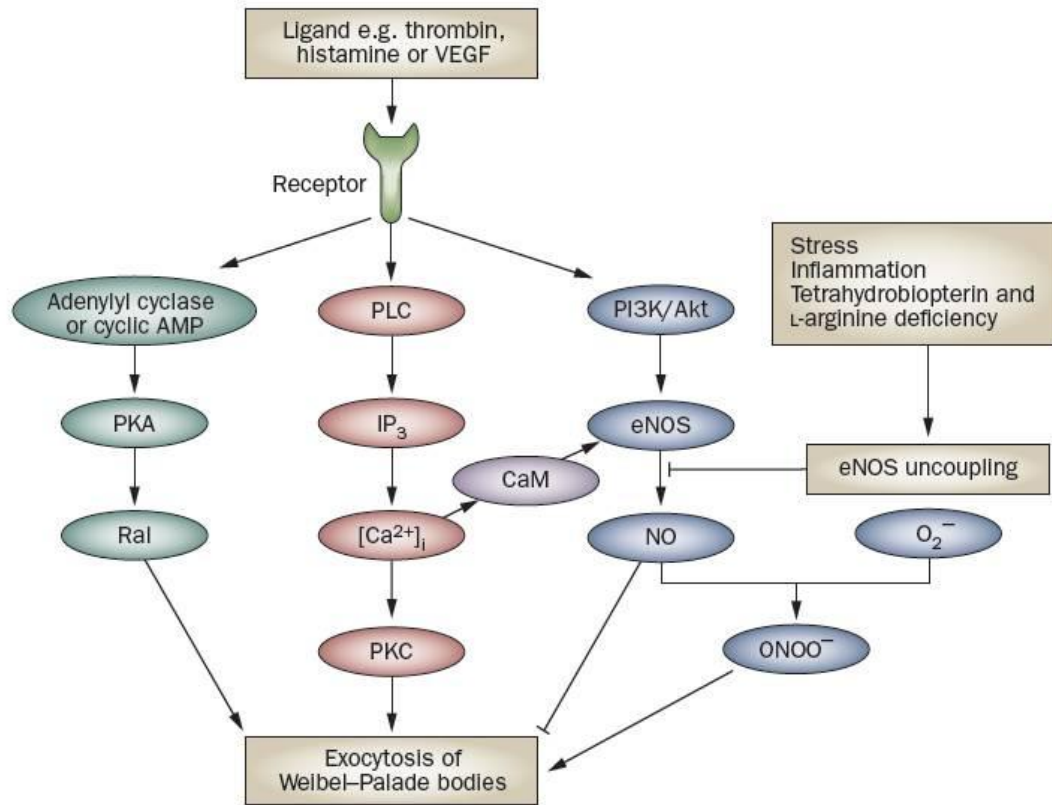
1.5.2. Μοριακοί μηχανισμοί - Σηματοδοτικά μονοπάτια επαγόμενης εξωκυττάρωσης

Ο μηχανισμός της εξωκυττάρωσης των WPBs αποτελεί μία αρκετά περίπλοκη διαδικασία, δεδομένου των πολυάριθμων ενεργοποιητών της έκκρισης (Πίνακας 2), καθένας από τους οποίους ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Σε γενικές γραμμές, η δράση των εν λόγω ενεργοποιητών της έκκρισης φαίνεται να εντάσσεται σε 2 κατηγορίες, σε αυτούς που επάγουν την αύξηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του Ca^{2+} και σε αυτούς που ενεργοποιούν την παραγωγή του cAMP (Rondaj et al., 2006) (Πίνακας 3).

Secretagogue	Mediator
Thrombin	Ca ²⁺
Histamine	Ca ²⁺
Peptido-leukotrienes	Ca ²⁺
Complement components	Ca ²⁺
Superoxide anion	Ca ²⁺
VEGF	Ca ²⁺
Sphingosine-1 phosphate	Ca ²⁺
Ceramide	Ca ²⁺
Purine nucleotides	Ca ²⁺ /cAMP
Serotonin	cAMP
Epinephrine	cAMP
Vasopressin	cAMP

Πίνακας 3. Σύνοψη των ενεργοποιητών της εξωκυττάρωσης των *Weibel-Palade bodies* και των ενδιάμεσων τελεστών σηματοδότησης. Οι ενεργοποιητές κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες ανάλογα με το αν η δράση τους διαμεσολαβείται από ιόντα Ca²⁺ ή από το cAMP (Rondaij et al., 2006).

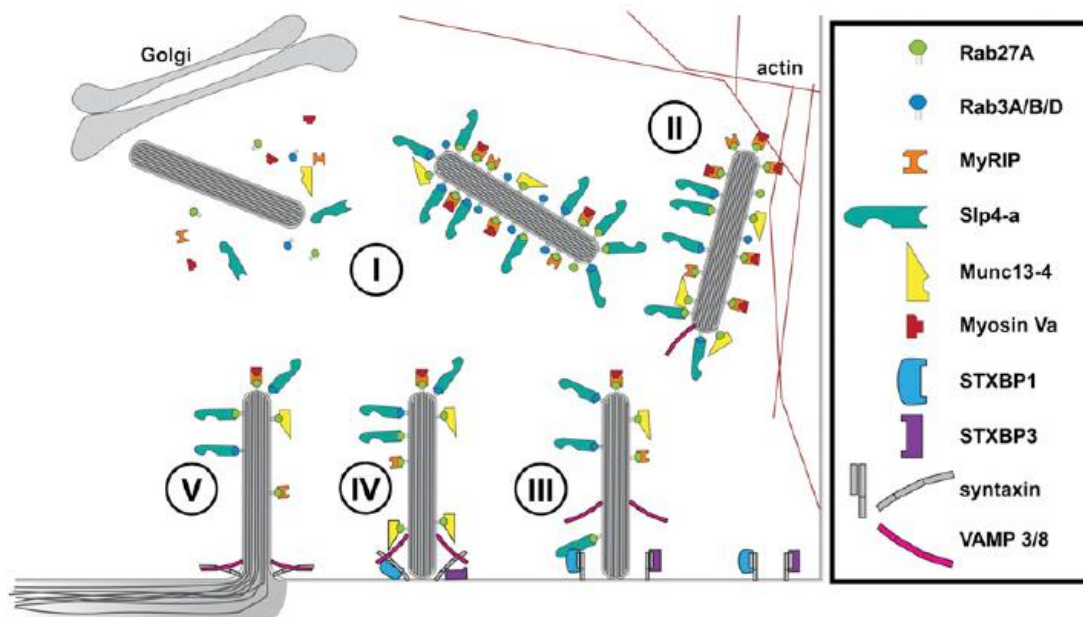
Τα πιο καλά μελετημένα παραδείγματα ενεργοποιητών αποτελούν οι πρωτεΐνες θρομβίνη και επινεφρίνη (γνωστή και ως αδρεναλίνη), οι οποίες μεταβιβάζουν σήματα έκκρισης μέσω των ιόντων Ca²⁺ και του cAMP, αντίστοιχα (Πίνακας 3). Ένα απλοποιημένο μοντέλο της δράσης αυτών των ενεργοποιητών και των ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων που επάγουν φαίνεται στην Εικόνα 10 (Goligorsky et al., 2009).



Εικόνα 10. Σηματοδοτικά μονοπάτια εξωκυττάρωσης των WPBs. Η δέσμευση των πρωτεϊνών θρομβίνη, ισταμίνη ή VEGF στους υποδοχείς (GPCRs) (G protein-coupled receptors) και VEGFR2, αντίστοιχα, επάγει την έκκριση των WPBs μέσω, ωστόσο, της ενεργοποίησης διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών που διαμεσολαβούνται από την μετακίνηση διαφορετικών μορίων μεταγωγής του σήματος και συγκεκριμένα μέσω των ιόντων Ca^{2+} και του cAMP. Συγκεκριμένα το μονοπάτι αύξησης της συγκέντρωσης των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{2+} επάγεται μέσω της ενεργοποίησης της PLCγ και ακολούθως της καλμομοδουλίνης (CaM) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ενώ το μονοπάτι του κυκλικού AMP (cAMP) περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και ακολούθως της πρωτεΐνης Ral (GTPάση) που συνδέεται με τον κυτταροσκελετό. Η παραγωγή, ωστόσο, του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μέσω της ενεργοποίησης της PI3K/Akt φαίνεται να αναστέλλει την έκκριση των WPBs. Τόσο το μονοπάτι της PI3K/Akt όσο και η CaM ενεργοποιούν τη συνθάση του NO (eNOS), η οποία ευθύνεται για την παραγωγή του NO και την ακόλουθη αναστολή της έκκρισης. Το NO αντιδρά, ωστόσο, με ιόν υπεροξειδίου (O_2^-) παράγοντας υπεροξυνιτρώδες ($ONOO^-$) επάγοντας την έκκριση (Goligorsky et al., 2009).

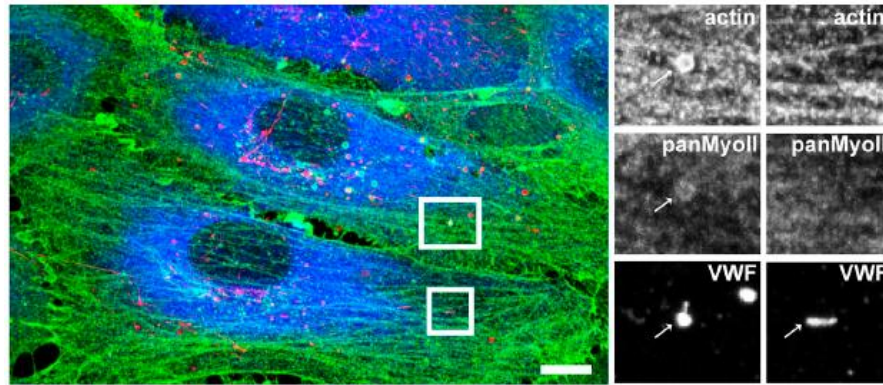
Σύμφωνα με το παραπάνω απλοποιημένο μοντέλο, όπως αναφέρουν οι Rondaij et al (2006), η αύξηση των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{2+} φαίνεται να επάγεται μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης PLCγ, έχοντας ως επακόλουθο την ενεργοποίηση της καλμοδοουλίνης (CaM) (Birch et al., 1992; Eijnden-Schrauwen et al., 1997) και της PKC, ενώ αυτή του κυκλικού AMP (cAMP) φαίνεται να επάγει την έκκριση των WPBs μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) (Kaufmann et al., 2000; Vischer et al., 1997) και της πρωτεΐνης Ral, επιφέροντας αλλαγές στην αναδιάταξη του κυτταροσκελετού. Παράδοξο

αποτελεί το γεγονός, ότι η παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO), που διαμεσολαβείται από την ενεργοποίηση της PI3K/Akt και ακολούθως της eNOS (συνθάση του NO), προκαλεί αναστολή της έκκρισης. Παρόμοια δράση στην εξωκυττάρωση των WPBs έχει και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Υποστηρίζεται ότι η δράση του NO εκτελείται στο μηχανισμό της μεμβρανικής σύντηξης των WPBs με την πλασματική μεμβράνη μέσω παρεμπόδισης της δράσης του παράγοντα NSF (Nethylmaleimide-sensitive factor), εμποδίζοντας ουσιαστικά την αποσυναρμολόγηση των συμπλόκων v-SNARE (πρωτεΐνη στο κυστίδιο του δότη) και t-SNARE (πρωτεΐνη στη μεμβράνη του δέκτη), μέσω των οποίων επιτελείται η μεμβρανική σύντηξη, με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες αυτές να μην μπορούν να ανακυκλωθούν και να συμμετάσχουν σε νέους κύκλους μεμβρανικής σύντηξης (Matsushita et al., 2003; Nickel & Rabouille, 2009). Όπως αναφέρουν οι McCormack et al (2017), στη μεμβράνη των WPBs έχουν βρεθεί οι v-SNARE πρωτεΐνες VAMP3 και VAMP8 (Matsushita et al., 2003; Pulido et al., 2011) οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες t-SNAREs, syntaxin-4 και SNAP23, της πλασματικής μεμβράνης (Pulido et al., 2011; Zhu et al., 2014). Οι δύο t-SNAREs και η v-SNARE VAMP3 βρέθηκε να επηρεάζουν την εξωκυττάρωση των WPBs. Έτσι, αναστολή της δράσης της VAMP3 βρέθηκε να αναστέλλει την έκκριση του vWF στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Matsushita et al., 2003; Pulido et al., 2011). Παρομοίως, η έλλειψη τόσο της SNAP23 (Han et al., 2017) όσο και της syntaxin-4 (Fu et al., 2005) αναστέλλει την έκκριση των WPBs. Ακόμη, η STXBP1 (Syntaxin-binding protein 1) είναι θετικός ρυθμιστής της έκκρισης, καθότι η έλλειψή της μειώνει την επαγόμενη έκκριση των WPBs (van Breevoort et al., 2014). Στη μεμβράνη των WPBs, η STXBP1 αλληλεπιδρά με τις t-SNAREs syntaxin-1/2 μέσω της Rab27A και του ρυθμιστή της Slp4-a, επιφέροντας τη σύντηξη των WPBs με την πλασματική μεμβράνη (van Breevoort et al., 2014) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11. Μοριακός μηχανισμός σύντηξης των WPBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. (I) Στα νεοσυντιθέμενα WPBs στρατολογούνται οι GTPάσες Rab27A, Rab3A/B/D, καθώς και οι πρωτεΐνες τελεστές τους (effectors) Slp4-a, Munc13-4 και MyRIP/Myosin Va. (II) Τα WPBs συνδέονται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού μέσω των πρωτεϊνικών συμπλόκων Myosin Va and MyRIP. (III) Η πρωτεΐνη STXBP1 (Syntaxin-binding protein 1) προσδένει τα WPBs στην πλασματική μεμβράνη στις t-SNAREs (syntaxin-2/3) μέσω των Slp4-a και Rab27A, ενώ η STXBP3 (Munc18c) συνδέεται με τη syntaxin-4 (Fu et al., 2005). (IV) Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών t-SNAREs, αποτελούμενα από τις syntaxins, προσδένονται με τις v-SNAREs VAMP3/8 που βρίσκονται στη μεμβράνη των WPBs μέσω της Munc13-4. (V) Η σύντηξη των WPBs με την πλασματική μεμβράνη οδηγεί στην απελευθέρωση του πρωτεϊνικού φορτίου των WPBs στον αυλό των αγγείων (van Breevoort et al., 2014).

Πρόσφατη μελέτη επισημαίνει επίσης τον ρόλο της πρωτεΐνης Zyxin (focal adhesion protein) στη ρύθμιση της εξωκυττάρωσης των WPBs, μέσω αλληλεπίδρασης με τη συνδεόμενη με ινίδια ακτίνης α-ακτινίνη (α-actinin), πριν το τελικό στάδιο της σύντηξης των οργανιδίων αυτών με την πλασματική μεμβράνη (Han et al., 2017). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, η απορρύθμιση της Zyxin επιφέρει ανασταλτικές δράσεις στην επαγόμενη και διαμεσολαβούμενη από το cAMP εξωκυττάρωση των WPBs. Όπως υποστηρίζεται άλλωστε από τους Nightingale et al. (2011), στο τελικό στάδιο της σύντηξης, κατά την επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs, η εξώθηση του πρωτεϊνικού τους περιεχομένου διευκολύνεται από την συμπίεση ενός «δακτυλίου» που σχηματίζεται από δυναμίνη και ινίδια ακτίνης/μυοσίνης II (Εικόνα 12).



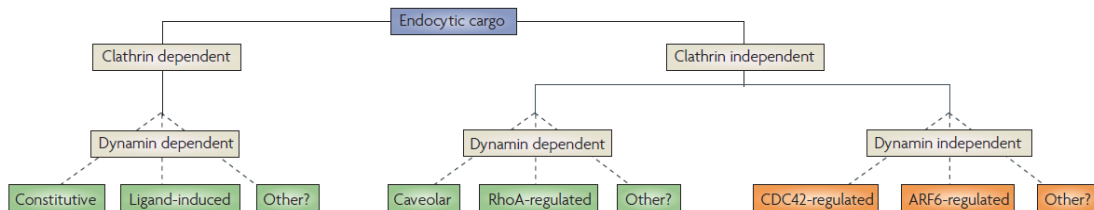
Εικόνα 12. Στρατολόγηση των ινιδίων ακτίνης/μυοσίνης II στο τελικό στάδιο εξωκυττάρωσης των WPBs. Συνεστιακή μικροσκοπία (*confocal microscopy*) σε διεγερμένα με PMA (100 ng/ml) κύτταρα HUVE, για 5 λεπτά, και ακόλουθη χρώση για ακτίνη (πράσινο), VWF (κόκκινο) και panMyoII (μπλε). Τα μεγενθυμένα ένθετα (δεξιά) δείχνουν ένα σφαιρικό Weibel-Palade body που εξωκυττάρωνεται, και το δακτύλιο από ακτίνη/μυοσίνη (actin/panMyoII), που σχηματίζεται κατά την εξωκυττάρωση αυτού, καθώς και ένα Weibel-Palade body που δεν εξωκυττάρωθηκε (επιμηκνόμενο) χωρίς εμφανή σχηματισμό του δακτυλίου ακτίνης. Με βέλη απεικονίζεται η στρατολόγηση της ακτίνης και μυοσίνης II στο Weibel-Palade body που εξωκυττάρωνεται. Scale bar, 10 μm (Nightingale et al., 2011).

Παρόλα αυτά, πολύ λίγα είναι γνωστά για το πώς ο συνδυασμός διαφόρων επαγωγέων και σηματοδοτικών μονοπατιών επηρεάζει την έκκριση των WPBs. Επιπλέον, η δράση διαφόρων επαγωγέων στο ίδιο σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Για παράδειγμα, τόσο ο VEGF όσο και η ισταμίνη επάγουν την έκκριση των WPBs μέσω αύξησης του ενδοκυττάρου Ca^{2+} , σε μικρότερο ωστόσο ποσοστό ο VEGF και μάλιστα κυρίως μέσω της ενεργοποίησης της PKC- δ , σε αντίθεση με την ισταμίνη, η οποία αν και ενεργοποιεί την PKC- δ επάγει την έκκριση κυρίως μέσω της αύξησης των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) (Lorenzi et al., 2008).

1.6. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης

Η κυτταρική σηματοδότηση φαίνεται να είναι άρρικτα συνδεδεμένη με την ενδοκυττάρωση. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα παρουσιάζουν τουλάχιστον δύο κύρια μονοπάτια ενδοκυττάρωσης: το μονοπάτι που είναι εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη κλαθρίνη (Mousavi et al., 2004; Roth, M.G., 2005; Traub, L.M., 2005) και το ανεξάρτητο από την κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης (Mayor & Pagano, 2007). Η ελεγχόμενη από την πρωτεΐνη κλαθρίνη ενδοκυττάρωση επιτελείται τόσο από την ίδια την πρωτεΐνη κλαθρίνη όσο και από την παρουσία προσαρμοστικών πρωτεϊνών (adaptor proteins, AP)

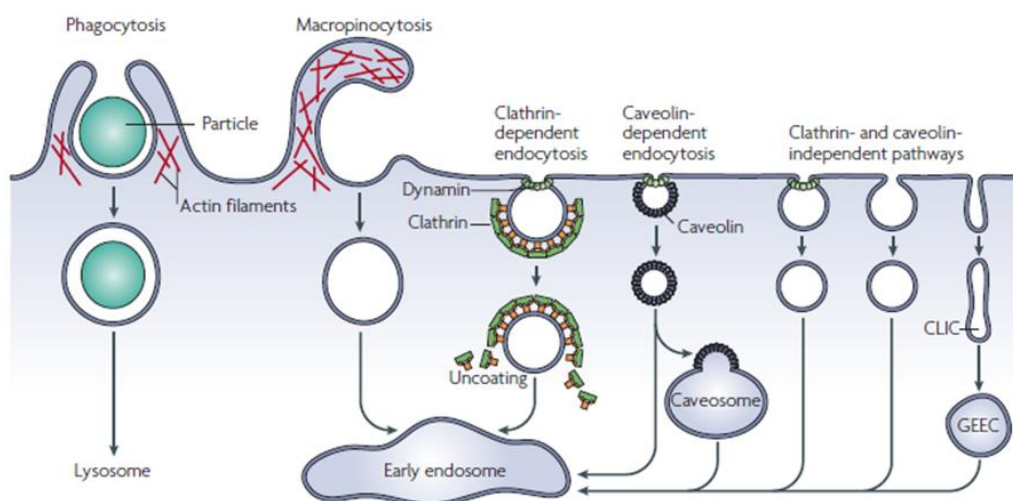
και πρωτεϊνικών συμπλόκων, που συνδέονται με την κλαθρίνη. Η ρύθμιση ωστόσο της αποκοπής των εγκολπώσεων των κυστιδίων κλαθρίνης διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη δυναμίνη, η οποία καθορίζει το διαχωρισμό της ενδοκυττάρωσης σε δύο μεγάλες κατηγορίες: στην εξαρτώμενη και στην ανεξάρτητη από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωση (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Προτεινόμενο μοντέλο ταξινόμησης του συνόλου των διαφορετικών ενδοκυτταρικών οδών. Η ενδοκυττάρωση ταξινομείται σε 2 μεγάλες κατηγορίες: Στην διαμεσολαβούμενη από την πρωτεΐνη κλαθρίνη (clathrin-dependent) και στην ανεξάρτητη από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωση (clathrin-independent, CI). Ο διαχωρισμός των ανεξάρτητων από την κλαθρίνη (CI) οδών ενδοκυττάρωσης βασίζεται στο αν εμπλέκεται η δράση της GTPάσης δυναμίνη: εξαρτώμενη από δυναμίνη (dynamain dependent) και ανεξάρτητη από τη δυναμίνη (dynamain independent) ενδοκυττάρωση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της εξαρτώμενης από δυναμίνη ενδοκυττάρωσης αποτελούν η ενδοκυττάρωση μέσω της caveolin (πρωτεΐνη που εντοπίζεται σε εξειδικευμένες περιοχές της πλασματικής μεμβράνης γνωστές ως “lipid rafts”) και τον ακόλουθο σχηματισμό των εγκολπώσεων caveolae της μεμβράνης, καθώς επίσης και η ενδοκυττάρωση που ρυθμίζεται από την GTPάση RhoA. Αντιθέτως, η ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης από τις GTPάσες CDC42 και ARF6 είναι ανεξάρτητη από την πρωτεΐνη δυναμίνη (Mayor & Pagano, 2007).

Ανεξάρτητα από την πρωτεΐνη κλαθρίνη και τη διαμεσολαβούμενη από δυναμίνη ενδοκυττάρωση, ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η ενδοκυττάρωση μέσω της πρωτεΐνης καβεολίνης (caveolin), που αποτελεί το κύριο πρωτεϊνικό δομικό συστατικό περιοχών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που είναι γνωστές ως «λιπιδιακές σχεδίες» (“lipid rafts”) (Lingwood et al., 2010; Pike, L.J., 2003). Πρόκειται για περιοχές της πλασματικής μεμβράνης, οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια, γεγονός που τις καθιστά λιγότερο ρευστές. Οι «λιπιδιακές σχεδίες» διαδραματίζουν ιδιαίτερο ρόλο λειτουργώντας ως κέντρο διαμερισματοποίησης της κυτταρικής σηματοδότησης (de Laurentiis et al., 2007). Αν και η οργάνωση των εγκολπώσεων caveolae διαφέρει δομικά και λειτουργικά από αυτών της κλαθρίνης, η αποκοπή τους από την πλασματική μεμβράνη και συνεπώς η ενδοκυττάρωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις εγκολπώσεις αυτές, ελέγχεται επίσης από την πρωτεΐνη δυναμίνη (dynamain dependent endocytosis). Τέλος, η ενδοκυττάρωση μεγάλων όγκων εξωκυττάρου φορτίου (fluid phase endocytosis) αποτελεί

μία ξεχωριστή περίπτωση ενδοκυττάρωσης, που ελέγχεται κυρίως από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού και είναι ανεξάρτητη της πρωτεΐνης δυναμίνη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η μικρο- και η μακροπινοκυττάρωση (Amyere et al., 2002; Kerr et al., 2009; Mayor & Pagano, 2007; Swanson et al., 1995) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Σύνοψη του συνόλου των διαφορετικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης. Η ενδοκυττάρωση μεγάλων εξωκυττάρων σωματιδίων πραγματοποιείται μέσω της φαγοκυττάρωσης και της μακροπινοκυττάρωσης (fluid phase endocytosis) μετά από αναδιοργάνωση των ινιδίων ακτίνης του κυτταροσκελετού της πλασματικής μεμβράνης. Τα περισσότερα εσωτερικευμένα φορτία καταλήγουν στα πρώιμα ενδοσώματα, είτε μέσω των κυστιδίων εξαρτώμενων από κλαθρίνη ή καβεολίνη είτε μέσω ενδιάμεσων κυστιδίων, που είναι ανεξάρτητα από τις πρωτεΐνες κλαθρίνη και δυναμίνη, γνωστά ως CLICs (clathrin and dynamin independent carriers), που επίσης προέρχονται από την πλασματική μεμβράνη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδιάμεσος σταθμός πριν την είσοδο του εξωκυττάρου φορτίου στα ενδοσώματα αποτελεί το διαμέρισμα GEEC (πρώιμα ενδοσώματα που είναι πλούσια σε GPI-αγκυροβολημένες πρωτεΐνες, glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein enriched early endosomal compartment) (Mayor & Pagano, 2007).

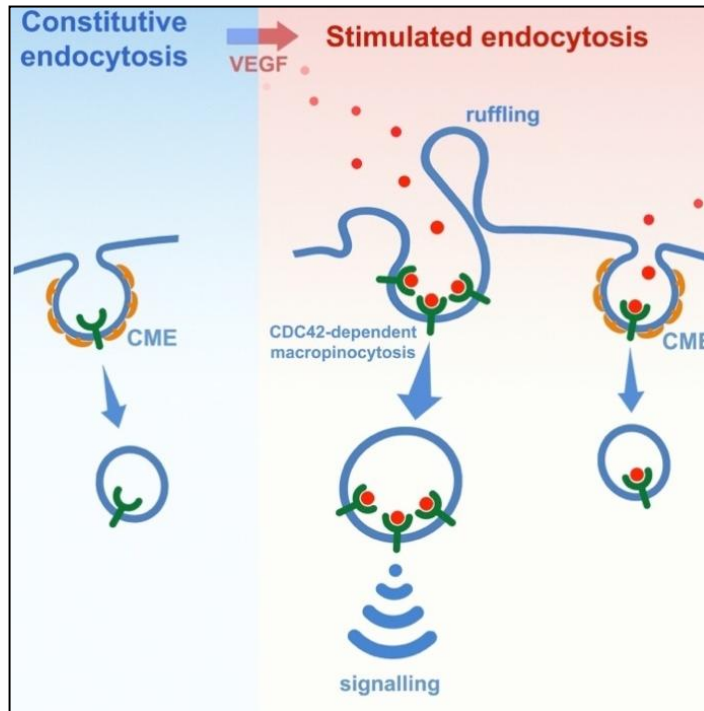
1.6.1. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων

Ένας από τους πιο σημαντικούς ενεργοποιητές της εξωκυττάρωσης των WPBs είναι ο VEGF (Lorenzi et al., 2008; Matsushita et al., 2005b; Xiong et al., 2009), ο οποίος ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του, τον VEGFR2. Η ενεργοποίηση του VEGFR2 προκαλεί την ενδοκυττάρωσή του και την ακόλουθη μετακίνησή του στα ενδοσώματα. Μέχρι πριν περίπου δύο δεκαετίες επικρατούσε η άποψη ότι η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων έχει ως μοναδικό σκοπό τον τερματισμό της μεταγωγής του σήματος, ως αποτέλεσμα της μεταφοράς τους στα ενδοσώματα/λυσosώματα,

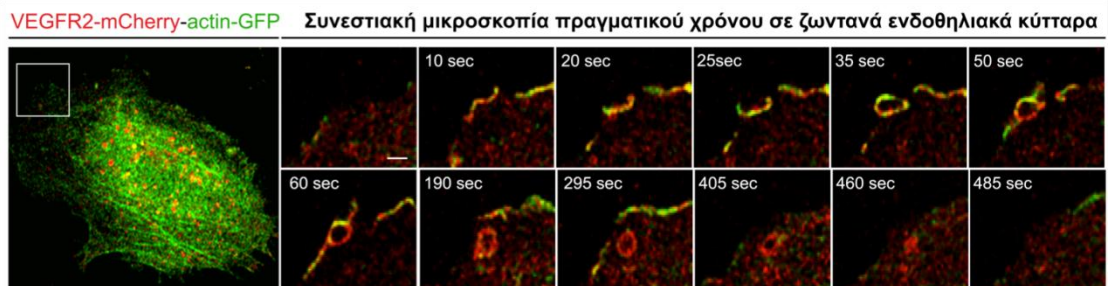
όπου πραγματοποιείται η αποικοδόμησή τους (Bruns et al., 2010; Ewan et al., 2006; Gaengel & Betsholtz, 2013). Ωστόσο, τα ενδοσώματα δεν είναι απλά ενδιάμεσοι σταθμοί πριν τη μεταφορά των υποδοχέων στα λυσοσώματα, αλλά είναι δυναμικά οργανίδια, όπου οι υποδοχείς συναντούν και ενεργοποιούν καθοδικά σηματοδοτικά μόρια (Gaengel & Betsholtz, 2013; Pálffy et al., 2012; Perret et al., 2005). Είναι επίσης ενδιαφέρον το γεγονός, ότι οι υποδοχείς ενεργοποιούν διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα ενδοσώματα από αυτά που ενεργοποιούν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Έτσι, τα ενδοσώματα αναγνωρίζονται πλέον σαν σηματοδοτικά διαμερίσματα που ρυθμίζουν τη φύση, ένταση και διάρκεια της μεταγωγής του σήματος (McMahon & Boucrot, 2011; Miaczynska et al., 2004; Sorkin & von Zastrow, 2009). Για το σκοπό αυτό, οι υποδοχείς εξερευνούν ένα σύνθετο δίκτυο διαφόρων μονοπατιών ενδοκυττάρωσης που οδηγούν σε διακριτά ενδοσώματα, ενεργοποιώντας εκεί διαφορετικά καθοδικά μόρια. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο η ενδοκυττάρωση ελέγχει τη σηματοδότηση, δεν είναι ο ίδιος για κάθε υποδοχέα. Διαφορετικοί υποδοχείς ακολουθούν διαφορετικά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, προκειμένου να αναδείξουν την εξειδικευμένη δράση τους (Mayor & Pagano, 2007) (Εικόνα 14).

1.6.2. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του VEGFR2

Συγκεκριμένα για τον VEGFR2, μόλις πρόσφατα διαλευκάνθηκαν τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσής του και η σημασία τους στη λειτουργία του υποδοχέα *in vitro* και *in vivo*, σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα HUVEC. Σε συνθήκες ηρεμίας, ο VEGFR2 βρέθηκε να ενδοκυτταρώνεται ιδιοσυστατικά μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης, γεγονός που του επιτρέπει να προστατεύεται από πρωτεολυτική σχάση (shedding) από ένζυμα της κυτταρικής επιφάνειας (Basagiannis & Christoforidis, 2016). Αντίθετα με τη διαμεσολαβούμενη από κλαθρίνη ιδιοσυστατική ενδοκυττάρωση του VEGFR2, η επαγωγή με VEGF προκαλεί ενδοκυττάρωση του VEGFR2, κατά κύριο λόγο, μέσω μακροπinoκυττάρωσης και δευτερευόντως μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης (Basagiannis et al., 2016) (Εικόνα 15). Τα νέα αυτά δεδομένα ήταν απρόσμενα δεδομένου ότι μέχρι σήμερα το μοναδικό γνωστό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 ήταν το μονοπάτι της κλαθρίνης (Bhattacharya et al., 2005; Bruns et al., 2010; Bruns et al., 2012; Ewan et al., 2006; Gourlaouen et al., 2013; Lampugnani et al., 2006; Lee et al., 2014; Nakayama et al., 2013; Sawamiphak et al., 2010; Tessneer et al., 2014).



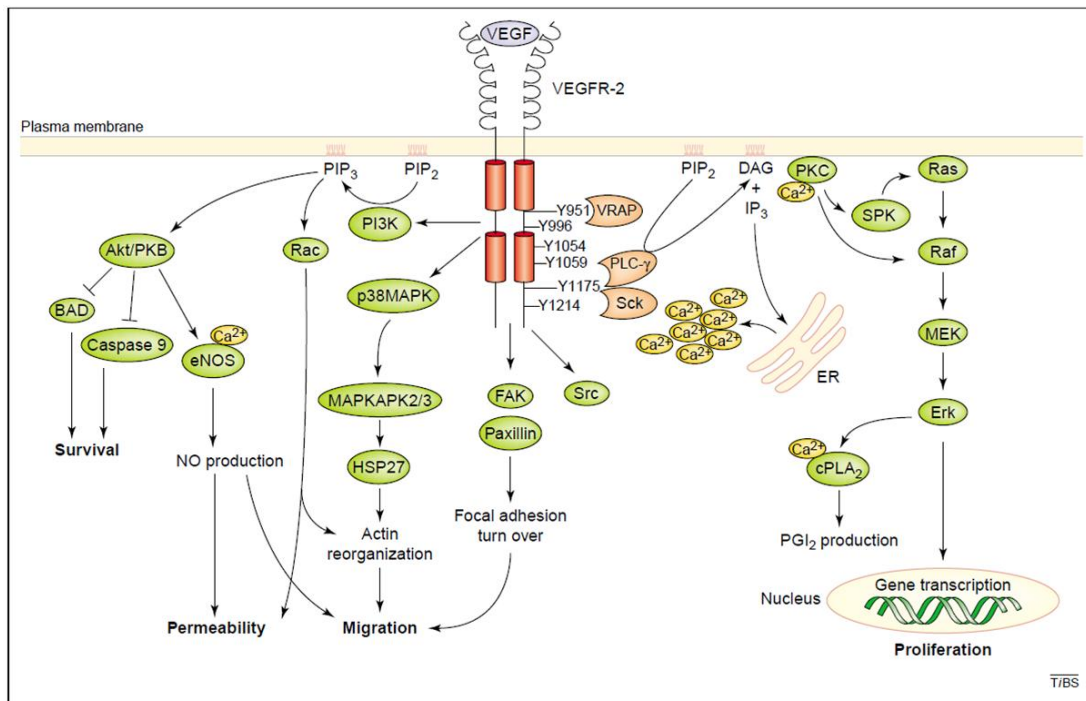
Εικόνα 15. Σχηματική αναπαράσταση των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2. Αριστερά: Απουσία VEGF (συνθήκες ηρεμίας), ο VEGFR2 ενδοκυττάρωνεται αποκλειστικά μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης (CME). Όμως, ενεργοποίηση με VEGF (βλέπε δεξιά) προκαλεί αναδιάταξη της μεμβράνης (ruffling) και ενδοκυττάρωση του VEGFR2 μέσω μακροπinoκυττάρωσης, ενώ ένα μικρό ποσοστό του υποδοχέα ενδοκυττάρωνεται μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης. Η μακροπinoκυττάρωση είναι αναγκαία για την ενεργοποίηση καθοδικών μορίων, ενώ η ενδοκυττάρωση μέσω κλαθρίνης δεν παίζει ρόλο στη μεταγωγή του σήματος του VEGFR2 (Basagiannis et al., 2016).



Εικόνα 16. Ο VEGFR2 ενδοκυττάρωνεται μέσω μακροπinoκυττάρωσης. Συνεστική μικροσκοπία ζωντανών ενδοθηλιακών κυττάρων δείχνει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 (με κόκκινο χρώμα) σε περιοχές της μεμβράνης που συμβαίνει έντονη αναδιοργάνωση της ακτίνης (ruffling) (με πράσινο χρώμα). (Αριστερά) Ενδοθηλιακό κύτταρο σεσημασμένο με VEGFR2-mcherry και ακτίνη-EGFP. (Δεξιά) Μεγέθυνση υπο-περιοχής της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που επισημαίνεται με άσπρο πλαίσιο. Ο VEGF ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλεί αναδιοργάνωση της ακτίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (πράσινο), η οποία οδηγεί σε σταδιακή δημιουργία ευμεγεθών κυστιδίων (μακροπinoσωμάτων), θετικών για τον VEGFR2 (κόκκινο) (Basagiannis et al., 2016).

1.7. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια του VEGFR2

Ο VEGFR2 ανήκει στην κατηγορία των υποδοχέων με δράση κινάσης της τυροσίνης. Οι υποδοχείς αυτής της κατηγορίας ενεργοποιούν διαφορετικά ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια προκαλώντας ένα πλήθος κυτταρικών αποκρίσεων. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση του VEGFR2 και η μετάδοση του ενδοκυττάριου σήματός του, πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης τουλάχιστον τριών διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών: Το μονοπάτι της κινάσης της 3-φωσφορικής ινσιτόλης (PI3K) και πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt/PKB), το μονοπάτι της ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C-γ (PLCγ), το οποίο ενεργοποιεί ακολούθως τη σηματοδοτική οδό της (1,4,5)-τριφωσφορικής ινσιτόλης (IP3) και της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) (Εικόνες 10, 17).



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση του καταρράκτη κυτταρικής σηματοδότησης του ενεργοποιημένου VEGFR2. Η πρόσδεση του VEGF στην εξωκυττάρια περιοχή του VEGFR2 επάγει τον διμερισμό και την αυτοφωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων τυροσίνης στο ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Πολλές ενδοκυττάριες πρωτεΐνες όπως, η πρωτεΐνη VRAP (VEGFR-associated protein), η Sck και η φωσφολιπάση Cγ (PLC)-γ δεσμεύονται σε συγκεκριμένα κατάλοιπα τυροσίνης μέσω των περιοχών (SH2), οδηγώντας στη φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών. Η ενεργοποίηση της PLC-γ προκαλεί την υδρόλυση του μεμβρανικού φωσφολιπιδίου (4,5)-διφωσφορική-φωσφατιδυλο-ινσιτόλη (PIP2), η οποία οδηγεί στη δημιουργία των δεύτερων αγγελιοφόρων 1,2-διακυλογλυκερόλης (DAG) και (1,4,5)-τριφωσφορικής ινσιτόλης (IP3). Η DAG είναι ένας φυσιολογικός ενεργοποιητής της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), ενώ η IP3 δεσμεύεται σε έναν συγκεκριμένο υποδοχέα που υπάρχει στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER), με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των ενδοκυττάριων ιόντων Ca^{2+} προκαλώντας αύξηση στα επίπεδα της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης του Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Πολλές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων της Src, της κινάσης

της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης (PI3K), την κινάση της εστιακής προσκόλλησης (FAK) και την ενεργοποιημένη από μιτογόνο p38 πρωτεϊνική κινάση (p38 MAPK), ενεργοποιούνται από τον VEGFR-2 μέσω ενός άγνωστου μηχανισμού. Καθοδικά σηματοδοτικά μόρια μεταδίδουν σήματα που οδηγούν σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών όπως η επιβίωση, η διαπερατότητα, η μετανάστευση και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός. Συντομογραφίες: cPLA2: κυτοσολική φωσφολιπάση A2, eNOS: ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, Erk: εξωκυττάρια ρυθμιζόμενη κινάση, HSP27: θερμικού σοκ πρωτεΐνη 27, MAPKAP 2/3: ενεργοποιημένη από MAPK πρωτεϊνική κινάση -2 και 3, NO: μονοξείδιο του αζώτου, PGI2: προστακυκλίνη, PIP3: (3,4,5)-τριφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, Sck: πρωτεΐνη τύπου Shc, SPK: κινάση της σφιγγοσίνης, VEGF: αγγειακός αυξητικός παράγοντας των ενδοθηλιακών κυττάρων (Michael J. Cross et al., 2003).

Παρά τις πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης του υποδοχέα VEGFR2, λίγα μόρια έχουν ταυτοποιηθεί να αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτόν. Ανάμεσα σε αυτά είναι η PLCγ, η οποία μετά από σύνδεση με τη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 1175 (pTyr1175), επάγει μέσω της PKC, την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη των Raf-MEK1/2-ERK1/2 ενεργοποιώντας έτσι τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Εκτός από την PLCγ, η ενεργοποίηση της ERK1/2 φαίνεται να επάγεται και μέσω του κλασικού σηματοδοτικού μονοπατιού Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 καθοδικά του VEGFR2. Η ενεργοποίηση επίσης της PI3K καθοδικά του VEGFR2 και ακολούθως της Akt/PKB προάγει σήματα επιβίωσης, απόπτωσης αλλά και αγγειογένεσης (Εικόνα 17), καθώς και απελευθέρωσης του NO (Kliche et al., 2001) (Εικόνα 10). Η φωσφορυλίωση επίσης του VEGFR2 στη θέση Tyr1214, ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μόριο CDC42, οδηγώντας στη φωσφορυλίωση της p38 MAPK, επηρεάζοντας τόσο την αγγειακή διαπερατότητα αλλά και τη μετανάστευση των κυττάρων μέσω αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού.

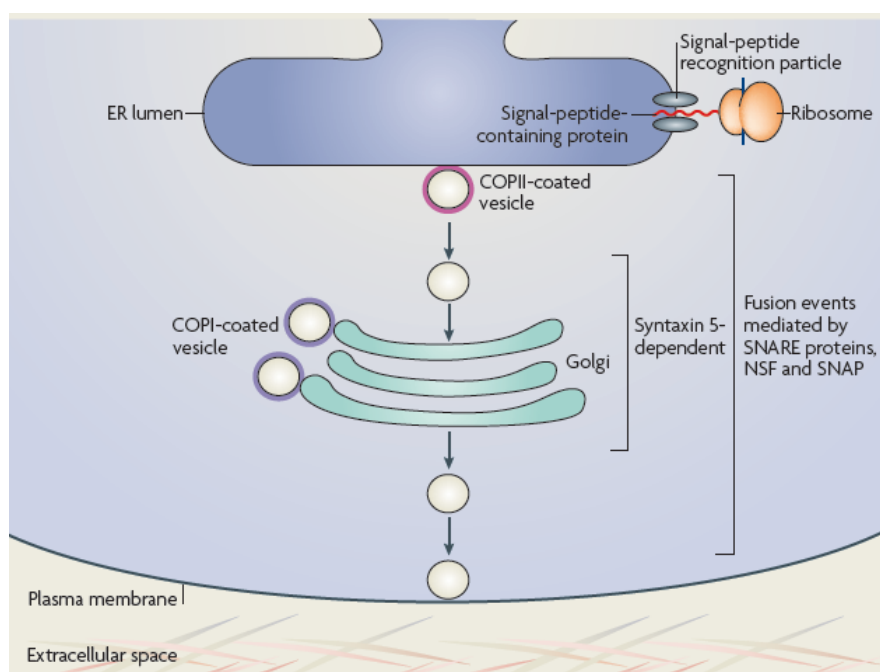
Περιορισμένος ωστόσο αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών τονίζουν το ρόλο της σηματοδότησης του VEGFR2 στην εξωκυττάρωση των WPBs (Goligorsky et al., 2009; LORENZI et al., 2008; Xiong et al., 2009) αλλά οι ακριβείς ρόλοι των ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων παραμένουν ασαφείς. Σύμφωνα με τους Xiong et al. (2009), η ενεργοποίηση του VEGFR2 φαίνεται να επάγει την εξωκυττάρωση των WPBs κατά μεγαλύτερο ποσοστό (70%) μέσω άμεσης ενεργοποίησης της PLC-γ (μετά από δέσμευση στη θέση pTyr1175) και της ακόλουθης αύξησης των επιπέδων του ενδοκυττάρου Ca^{2+} , ενώ η έκκριση του υπόλοιπου 30% του εκκρινόμενου vWF επάγεται μέσω της διαμεσολαβούμενης από τον VEGF, μικρής αλλά ωστόσο σημαντικής αύξησης του κυκλικού AMP (cAMP), έχοντας ως επακόλουθο την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Να σημειωθεί ακόμη, ότι η αναστολή της PI3K (με χρήση των χημικών αναστολέων wortmannin ή LY294002) αλλά και της συνθάσης του NO (eNOs) (με χρήση του χημικού αναστολέα L-NMMA) αποτυγχάνουν να αναστείλουν τουλάχιστον σε πρώτη

φάση (acute treatment) τόσο την επαγόμενη από ισταμίνη όσο και από τον VEGF εξωκυττάρωση των WPBs (LORENZI et al., 2008), υποδηλώνοντας την δράση εναλλακτικών μονοπατιών ενεργοποίησης της έκκρισης. Συγκεκριμένα για τον VEGFR2, οι Lorenzi et al (2008) υποστηρίζουν ότι ο ενεργοποιημένος VEGFR2 μεταβιβάζει σήματα έκκρισης των WPBs μέσω ενεργοποίησης της ισομορφής δ της πρωτεϊνικής κινάσης C, PKC-δ. Τα παραπάνω εγείρουν σημαντικά ερωτήματα σχετικά με το ρόλο των ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων αλλά και της αλληλεπίδρασης των διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών καθοδικά του VEGFR2 στην επαγόμενη από VEGF εξωκυττάρωση των WPBs.

1.8. Σύντομη ανασκόπηση των κλασσικών/συμβατικών (conventional) και μη (unconventional) οδών πρωτεϊνικής έκκρισης

Οι περισσότερες εκκριτικές πρωτεΐνες (“typical secretory proteins”) περιέχουν στο άμινο-τελικό τους άκρο ή εσωτερικά στην αλληλουχία τους, ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide, sp), υπεύθυνο για την κατεύθυνση αυτών και τη διαλογή τους στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ). Από το ΕΔ, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται στον εξωκυτταρικό χώρο ή στην πλασματική μεμβράνη μέσω του βιοσυνθετικού εκκριτικού μονοπατιού ΕΔ-Golgi (Lee et al., 2004; Nickel & Rabouille, 2009), γνωστού και ως συμβατικό/κλασσικό μονοπάτι πρωτεϊνικής έκκρισης (“conventional protein secretion”, CPS) (Daniels et al., 2017; Ding et al., 2012). Η μεταφορά των εκκρινόμενων πρωτεϊνών στο εν λόγω εκκριτικό μονοπάτι διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες COPII και COPI, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συγκρότηση του πρωτεϊνικού καλύμματος των κυστιδίων στο ΕΔ και στο Golgi, που αποτελούν ενδιάμεσους φορείς μεταφοράς αυτών πριν την έκκριση (Nickel & Rabouille, 2009) (Εικόνα 18). Αυτή η οδός της συμβατικής έκκρισης αποτελεί τον τυπικό τρόπο, με τον οποίο οι πρωτεΐνες εξωκυτταρώνονται. Ωστόσο, ένας σημαντικός αριθμός κυτταροπλασματικών αλλά και μεμβρανικών πρωτεϊνών, οι οποίες δε διαθέτουν τη σηματοδοτική αλληλουχία (signal peptide) για στόχευση στο ΕΔ και ακολούθως στο Golgi, εκκρίνονται μέσω άλλων μη συμβατικών εκκριτικών οδών (“unconventional protein secretion”, UPS) (Dimou et al, 2018; Nickel, 2010; Nickel & Rabouille, 2009; Nickel, & Seedorf 2008; Rabouille, 2017) μέσω μιας ποικιλίας ασαφών έως σήμερα μοριακών μηχανισμών. Η μη συμβατική έκκριση φαίνεται να λειτουργεί ως ένας προσαρμοστικός μηχανισμός ανάλογα με τις λειτουργίες του κυττάρου, ο οποίος οδηγεί στην έκκριση πρωτεϊνών, αποφεύγοντας μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως η Ο- και η

N-συνδεδεμένη γλυκοζυλίωση, που συμβαίνουν στο ΕΔ/Golgi και που σαφώς επηρεάζουν τη λειτουργία των πρωτεϊνών (Steringer et al., 2015). Κλασσικά παραδείγματα πρωτεϊνών που εκκρίνονται μη συμβατικά αποτελούν οι πρωτεΐνες FGF2 (basic fibroblast growth factor) (Engling, 2002; Mignatti et al., 1992; Steringer et al., 2015), οι ιντερλευκίνες (IL) 1β (Rubartelli et al., 1990) και 1α (Siders et al., 1993; Tarantini et al., 2000), αλλά και οι πρωτεΐνες galectins (Hughes, 1999; Manjithaya & Subramani, 2011) (Πίνακας 4). Στην περίπτωση των πρωτεϊνών galectins έχει προταθεί από τους Nickel & Rabouille (2009), ότι η δέσμευσή τους σε ολιγοσακχαρίτες των πρωτεϊνών εντός του αυλού του ΕΔ/Golgi, θα μπορούσε να προκαλέσει συσσωμάτωση (aggregation) και εσφαλμένη αναδίπλωση (misfolding), γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει το λόγο αποκλεισμού των πρωτεϊνών αυτών από το συμβατικό μονοπάτι έκκρισης.

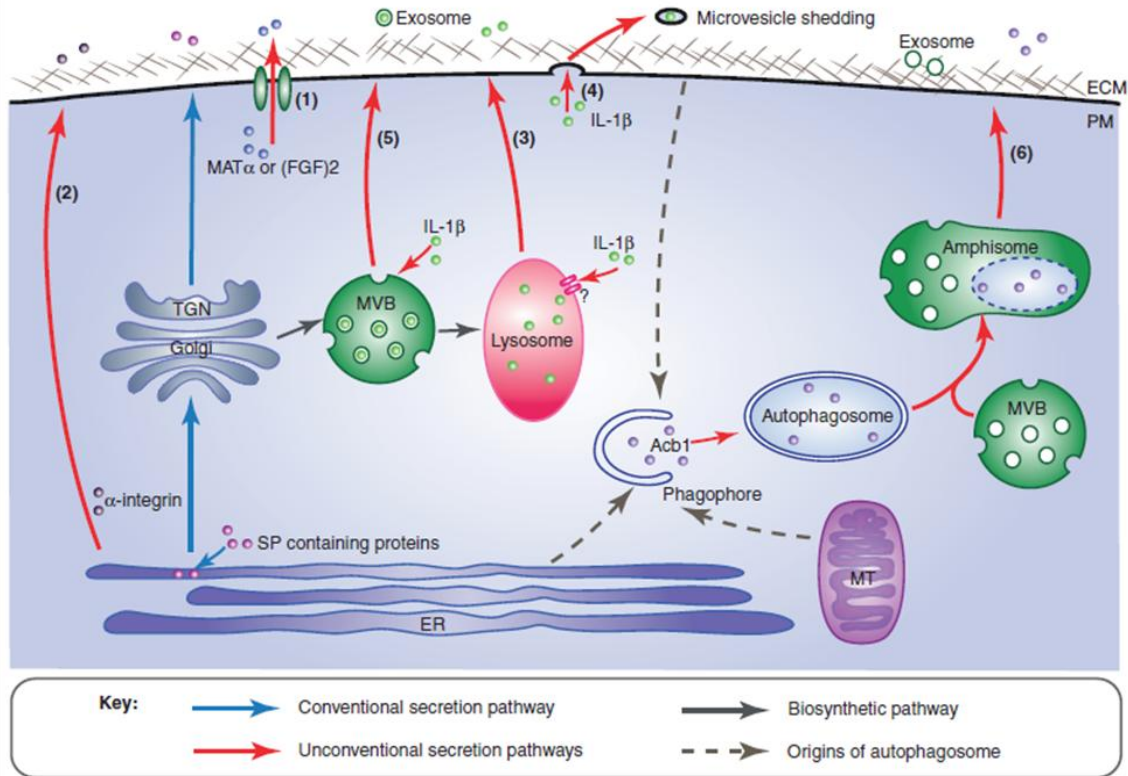


Εικόνα 18. Το συμβατικό/κλασσικό μονοπάτι πρωτεϊνικής έκκρισης (“The conventional secretion pathway”). Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) μέσω αναγνώρισης της σηματοδοτικής αλληλουχίας (signal peptide) και ακολούθως εξέρχονται από το ΕΔ σε εξειδικευμένες μεμβρανικές περιοχές με τη βοήθεια κυστιδίων καλυμμένων με το πρωτεϊνικό σύμπλεγμα COPII. Οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες εισέρχονται στη συνέχεια στο Golgi, από όπου εξέρχονται μέσα σε μεταφορικά κυστίδια. Το τελικό στάδιο στο εκκριτικό μονοπάτι περιλαμβάνει γεγονότα μεμβρανικής σύντηξης του κυστιδίου (που περιέχει την εσωτερικευμένη πρωτεΐνη) με την πλασματική μεμβράνη. Η διαδικασία αυτή επιτελείται με τη βοήθεια των πρωτεϊνών SNAREs – **SNAP** (soluble NSF Attachment Protein) **Receptors**. Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών SNAREs, που σχηματίζονται μεταξύ της μεμβράνης του κυστιδίου (v-SNARE) και της πλασματικής μεμβράνης (t-SNARE), αποσυναρμολογούνται μέσω της δράσης του NSF, που προσδένεται στο σύμπλεγμα των πρωτεϊνών SNAREs μέσω της πρωτεΐνης SNAP, γεγονός που επιτρέπει την ανακύκλωση των SNAREs για τη συμμετοχή τους σε επόμενους κύκλους μεμβρανικής σύντηξης. Η πρωτεΐνη Syntaxin-5 αποτελεί παράδειγμα μιας t-SNARE και εμπλέκεται στη μεμβρανική μεταφορά προς και μέσω του Golgi (Nickel & Rabouille, 2009).

Όπως αποτυπώνεται και στο όνομά της, η μη συμβατική έκκριση (unconventional secretion) δεν αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό που χρησιμοποιείται από την πλειονότητα των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, αλλά μάλλον αντιπροσωπεύει έναν ασυνήθιστο μηχανισμό έκκρισης. Η μη συμβατική έκκριση περιλαμβάνει μια συλλογή τουλάχιστον τεσσάρων διαφορετικών εκκριτικών οδών (Nickel, 2010). Αυτές μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο γενικές κατηγορίες: (1) μη κυστιδιακοί (nonvesicular) και (2) κυστιδιακοί (vesicular) οδοί έκκρισης. Κατά την μη κυστιδιακή μεταφορά, κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες εκκρίνονται μέσω πόρων που σχηματίζονται στην πλασματική μεμβράνη (Nickel & Rabouille, 2009; Nickel & Seedorf, 2008), οδηγώντας στην εναπόθεσή τους στην πλασματική μεμβράνη ή την απελευθέρωσή τους στο εξωκυττάριο χώρο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η έκκριση του FGF2 (Dimou et al., 2018; Nickel, 2010; Nickel & Rabouille, 2009) (Εικόνα 19, μηχανισμός 1). Ξεχωριστή περίπτωση μη συμβατικής έκκρισης, αφορά επίσης πρωτεΐνες που αν και διαθέτουν σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide) εκκρίνονται χωρίς να χρειαστεί να μεταβούν διαμέσου του Golgi (Εικόνα 19, μηχανισμός 2), όπως συμβαίνει για την α -υπομονάδα της ιντεγκρίνης (α -integrin) (Nickel & Rabouille, 2009).

Οι κυστιδιακοί μηχανισμοί της μη συμβατικής έκκρισης στηρίζονται στη δημιουργία ενδιάμεσων κυστιδίων, που αποτελούν τους φορείς μεταφοράς των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η μεμβρανική σύντηξη, είτε με την πλασματική μεμβράνη είτε με άλλα κυτταρικά οργανίδια- στόχους. Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται τα εκκριτικά λυσοσώματα (Εικόνα 19, μηχανισμός 3), όπως και τα εξοσώματα (exosomes) προερχόμενα, είτε από τα πολύ-κυστιδιακά σωματίδια (MVB, multivesicular bodies) είτε από σχηματισμούς της πλασματικής μεμβράνης μετά από αποκοπή (microvesicle shedding) (Εικόνα 19, μηχανισμοί 4, 5). Η ιντερλευκίνη (IL)-1 β προτείνεται ότι εκκρίνεται μέσω τουλάχιστον ενός από αυτά τα μονοπάτια (Andrei et al., 1999; MacKenzie et al., 2001). Πρόσφατες μελέτες εντάσσουν την αυτοφαγία, στην κατηγορία της κυστιδιακής μη συμβατικής έκκρισης, υποστηρίζοντας πως τα αυτοφαγοσώματα δεν αποικοδομούν το περιεχόμενό τους μετά από σύντηξη με τα λυσοσώματα αλλά αντιθέτως εκκρίνουν το περιεχόμενό τους στο εξωκυττάριο χώρο μέσω των MVB και των εξοσωμάτων (Manjithaya & Subramani, 2011). Χαρακτηριστικό παράδειγμα (στο ζυμομύκητα) αποτελεί η πρωτεΐνη Acb1 (acyl-CoA binding protein) στα αυτοφαγοσώματα, τα οποία συντήκονται με τα MVB

σχηματίζοντας “amphisomes”, πριν την τελική σύντηξη με την πλασματική μεμβράνη (Duran et al., 2010; Manjithaya & Subramani, 2011; Nickel, 2010) (Εικόνα 19, μηχανισμός 6).



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της συμβατικής (conventional secretion) και μη συμβατικής πρωτεϊνικής έκκρισης (unconventional secretion) σε ζυμομύκητες και θηλαστικά. Με μπλε βέλος απεικονίζεται η συμβατική έκκριση και με κόκκινα βέλη τα διαφορετικά μονοπάτια της μη συμβατικής έκκρισης. Με αρίθμηση, καταγράφονται οι επιμέρους οδοί μη συμβατικής έκκρισης για τις πρωτεΐνες FGF2, IL-1β και Acb1, που αποτελούν χαρακτηριστικά παραδείγματα των επιμέρους οδών. «Συντομογραφίες: ER, ενδοπλασματικό δίκτυο (endoplasmic reticulum). ECM, εξωκυττάρια μήτρα (extracellular matrix). MVB, πολυκυστιδιακό σωμάτιο (multivesicular body). MT, μιτοχόνδριο. PM, πλασματική μεμβράνη. TGN, Δίκτυο trans-Golgi. SP, σηματοδοτικό πεπτίδιο (signal peptide)». (Ding et al., 2012).

Protein	Proposed secretion mechanism
FGF1	Non-vesicular
FGF2	Non-vesicular
Interleukin 1 β	Vesicular
Galectins 1 and 3	Vesicular / Non-vesicular
HMGB1	Vesicular
AcbA	Vesicular
Thioredoxin	Non-vesicular
Engrailed Homeoproteins	Vesicular
HIV Tat	Non-vesicular
Tubby	Unclear
Yeast MATa	Non-vesicular

Πίνακας 4. Σύνοψη πρωτεϊνών που εκκρίνονται μέσω του μη συμβατικού/κλασσικού μονοπατιού (unconventional secretion). Οι πρωτεΐνες που αναφέρονται, κατατάσσονται ανάλογα με το προτεινόμενο μοντέλο μη συμβατικής έκκρισης, κυστιδιακό ή μη κυστιδιακό (Manjithaya & Subramani, 2011).

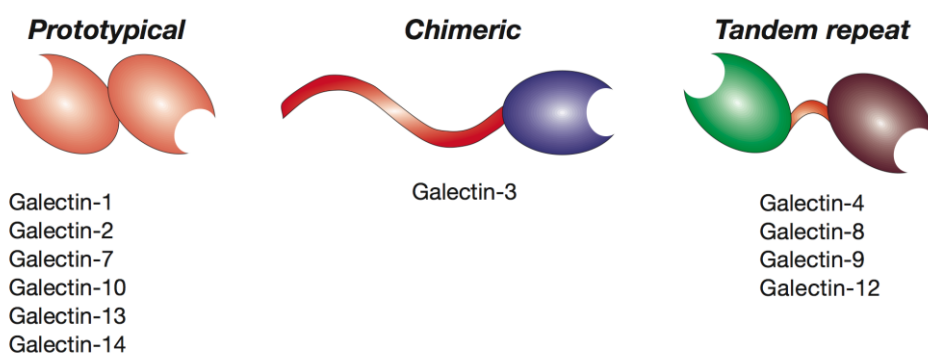
1.9. Οι πρωτεΐνες Galectins

Οι πρωτεΐνες galectins ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια πρωτεϊνών, γνωστών ως λεκτινών, που συνδέονται στους υδατάνθρακες των γλυκοπρωτεϊνών και γλυκολιπιδίων που περιέχουν β-γαλακτόζη (β -Gal) και N-ακετυλ-λακτοζαμίνη (LacNAc) (Ahmad et al., 2004; Barondes et al., 1994; Johannes et al., 2018; Leffler et al., 2004). Διαφορετικά μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών galectins δεσμεύονται κατά προτίμηση σε ένα μοναδικό υποσύνολο γλυκοπρωτεϊνών κυτταρικής επιφάνειας, γεγονός που εξηγεί την επιλεκτική τους δράση αλλά και την κυτταρική τους κατανομή σε διαφορετικά είδη ιστών (Brough et al., 2017; Johannes et al., 2018). Τουλάχιστον 14 μέλη αυτής της οικογένειας βρέθηκαν στα θηλαστικά και αναφέρονται ως galectin-1 έως galectin-14 (Cooper and Barondes, 1999; Hirabayashi et al., 1997; Visegrady et al., 2001; Yang et al., 2001).

Χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεϊνών galectins είναι η παρουσία ενός πολυπεπτιδίου, το οποίο περιλαμβάνει μία εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία 130 περίπου αμινοξέων, ομόλογη μεταξύ των διαφορετικών πρωτεϊνών galectins (Barondes et al., 1994), υπεύθυνη για την ειδική δέσμευση σε υδατάνθρακες (carbohydrate-recognition domain, CRD). Διαφορετικά μέλη των πρωτεϊνών galectins περιέχουν 1 ή 2 περιοχές CRD.

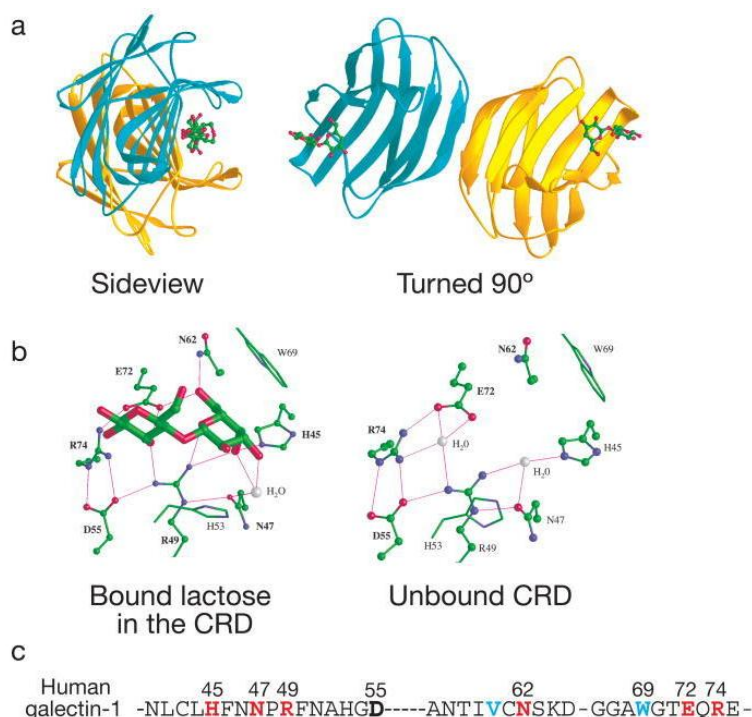
Αναφορικά με τη δομή τους, οι πρωτεΐνες galectins των θηλαστικών ταξινομούνται ως εξής:

- i. **Πρωτότυπες (“prototypes”)** galectins-1, -2, -5, -7, -10 και πιθανώς -11, -13 και -14, που υπάρχουν ως μονομερή (galectin-5, -7, -10) ή ομοδιμερή (galectin-1, -2, -11, -13, -14) με μία περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (CRD)
- ii. **Χιμαιρικού τύπου (“chimera”)** galectin-3, που περιέχουν μία αμινο-τελική περιοχή μη χαρακτηριστική των πρωτεϊνών λεκτινών, πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, γλυκίνης, τυροσίνης και μία περιοχή CRD και
- iii. **Επαναλαμβανόμενου τύπου (“tandem-repeat”)** galectins-4, -6, -8, -9 και -12, αποτελούμενες από δύο διαφορετικές περιοχές CRD σε μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα, συνδεδεμένες με ένα ενδιάμεσο πεπτίδιο (Cummings et al., 2015; Houzelstein et al., 2004; Johannes et al., 2018) (Εικόνα 20).



Εικόνα20. Ταξινόμηση των πρωτεϊνών galectins των θηλαστικών. Οι ανθρώπινες galectins ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες σύμφωνα με τη δομή τους: Πρωτότυπες “Prototypical”, χιμαιρικές “Chimeric” και επαναλαμβανόμενου τύπου “Tandem repeat”. Με οβάλ σχήμα απεικονίζεται η περιοχή CRD (carbohydrate-recognition domain). Απεικονίζονται ενδεικτικά μέλη των πρωτεϊνών galectins σε κάθε κατηγορία (Cummings et al., 2015).

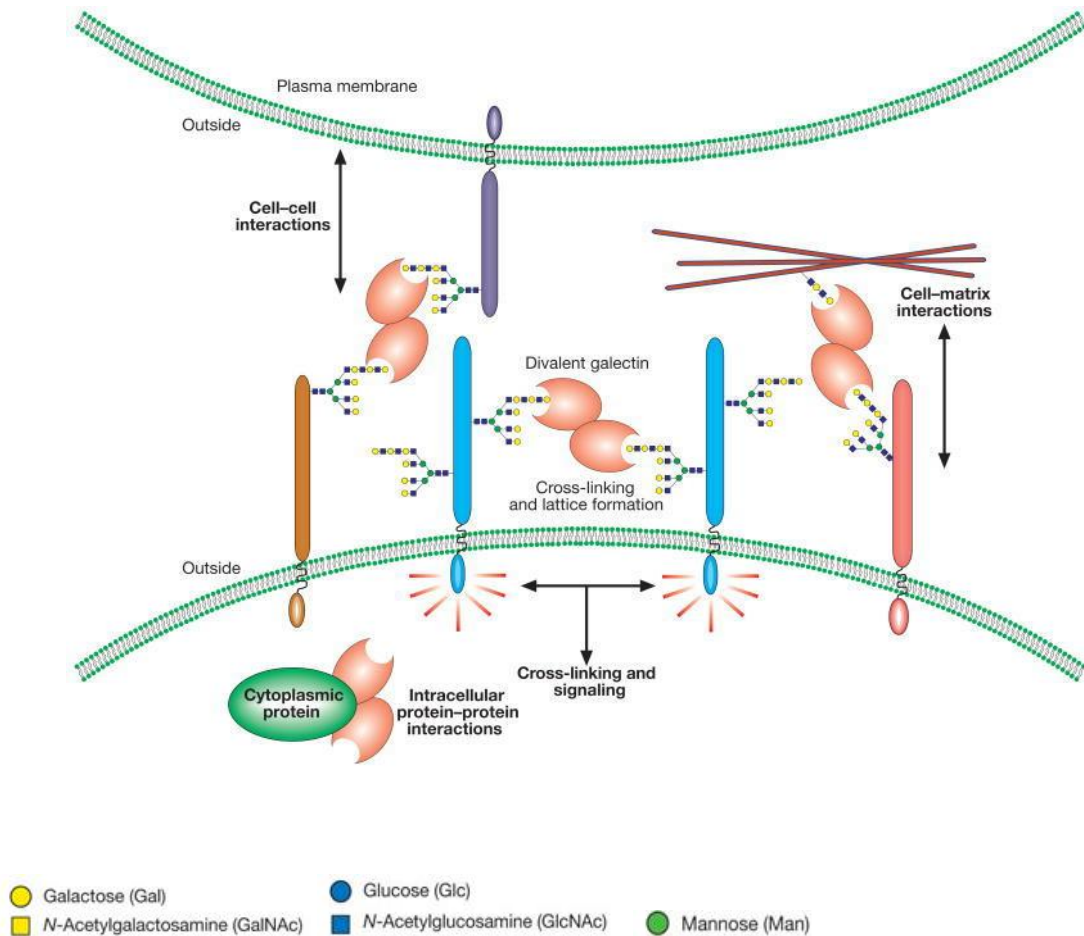
Η πρώτη ανακαλυφθείσα πρωτεΐνη στην οικογένεια των λεκτινών ήταν η galectin-1 (Gal-1), ένα μη ομοιοπολικό διμερές, που αποτελείται από δύο όμοιες υπομονάδες με μία περιοχή CRD για κάθε υπομονάδα (Rabinovich, 2005) (Εικόνα 20). Αν και αυτή η πρωτεΐνη συνδέεται κατά προτίμηση με γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια, που περιέχουν τον δισακχαρίτη N-ακετυλολακτοζαμίνη (Gal β 1-3/4 GlcNAc), έχει χαμηλή συγγένεια για μεμονωμένες μονάδες γαλακτοζαμίνης, ενώ η διάταξη δισακχαριτών λακτοζαμίνης σε επαναλαμβανόμενες αλυσίδες (πολυλακτοζαμίνη) αυξάνουν τη συγγένεια σύνδεσης (Ahmad et al., 2004).



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της πρωτεΐνης *galectin-1* από κρυσταλλογραφικές αναλύσεις ακτίνων X της αλληλεπίδρασής της με τη λακτόζη. (a) Το κάθε μονομερές απεικονίζεται με διαφορετικό χρώμα. Οι διεπαφές των υπομονάδων πραγματοποιούνται μέσω των καρβόξυ και αμινο-τελικών περιοχών τους. (b) Απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων της CRD περιοχής της *galectin-1* παρουσία (αριστερά) και απουσία (δεξιά) της λακτόζης. (c) Αλληλουχία της πρωτεΐνης *galectin-1*. Με αριθμηση, επισημαίνονται τα αμινοξέα που απεικονίζονται στην παραπάνω κρυσταλλική δομή (Cummings et al., 2015).

Ειδικότερα, η πρωτεΐνη *galectin-1* είναι ιδιαίτερα διατηρημένη μεταξύ διαφορετικών ειδών οργανισμών, έχοντας σημαντική βιολογική δράση, καθώς εμπλέκεται σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών που μεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων αλλά και κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM), ευνοώντας την κυτταρική προσκόλληση και την κυτταρική σηματοδότηση (Cummings et al., 2015) (Εικόνα 22). Ακόμη, έχει σημαντική εμπλοκή στον καρκίνο, στη μετάσταση αλλά και σε διαδικασίες με ανοσορρυθμιστικό ρόλο, προάγοντας προ-/αντι-φλεγμονώδεις αποκρίσεις (Camby, I. et al., 2006; Cummings et al., 2015; Rabinovich, 2005). Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν επίσης την εμπλοκή της *galectin-1*, αλλά και της *galectin-3* στην αγγειογένεση (D'Haene et al., 2013; Hsieh et al., 2008; Thijssen et al., 2006, 2010) μέσω της αλληλεπίδρασης της με σύμπλεγμα N-γλυκανών του υποδοχέα VEGFR2 αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων με τον συνυποδοχέα του VEGFR2, Neuropilin-1 (Crocì et al., 2014, Hsieh et al., 2008). Αναφορικά με την κυτταρική της κατανομή, πρόκειται για μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο

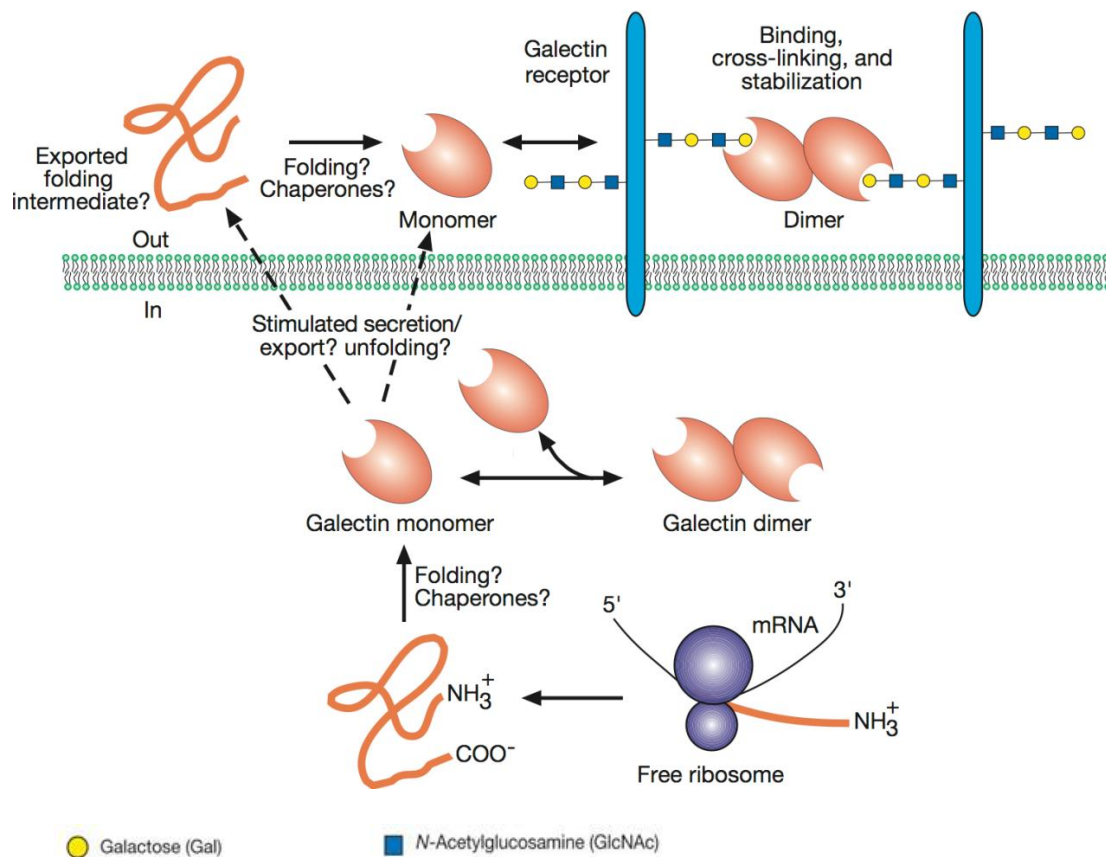
κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία (ECM) (Rabinovich, 2005; Vyakarnam et al., 1998). Παρά το ότι εκκρίνεται, δεν έχει - προς το παρόν - ανιχνευθεί σε εκκριτικά οργανίδια (Leffler et al., 2004). Εκτός των παραπάνω, η απουσία γλυκοζυλίωσης αλλά και η ακετυλίωση στο αμινο-τελικό της άκρο τη χαρακτηρίζουν ως μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη (Hughes, R.C., 1999; Leffler et al., 2004).



Εικόνα 22. Ο ρόλος της πρωτεΐνης galectin-1 στην κυτταρική προσκόλληση και στην κυτταρική σηματοδότηση. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης galectin-1 με κατάλληλα γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες της κυτταρικής επιφάνειας αλλά και του εξωκυττάριου χώρου εννοεί την κυτταρική προσκόλληση (cell adhesion) αλλά και τη σηματοδότηση. Η πρωτεΐνη galectin-1 αλληλεπιδρά επίσης, με ενδοκυττάρια πρωτεΐνες επιφέροντας διαφορετικές ενδοκυττάρια αποκρίσεις (Cumplings et al., 2015).

Είναι ενδιαφέρον το μονοπάτι έκκρισης της πρωτεΐνης galectin-1, το οποίο φαίνεται να εμπίπτει στην κατηγορία του μη συμβατικού/κλασσικού μονοπατιού εξωκυττάρωσης πρωτεϊνών (unconventional exocytosis) (Daniels & Brough, 2017; Ding Y et al., 2012; Nickel & Rabouille 2009; Nickel & Sedorf, 2008), δεδομένου ότι η Gal-1 δε

διαθέτει την τυπική σηματοδοτική αλληλουχία (signal sequence) για το διαμεσολαβούμενο, μέσω ER-Golgi, βιοσυνθετικό μονοπάτι έκκρισης (Leffler et al., 2004). Η galectin-1, προκειμένου να επιτελέσει την εξωκυτταρική της λειτουργία, εκκρίνεται παρά την έλλειψη τυπικής σηματοδοτικής αλληλουχίας. Έτσι, η έκκρισή της πραγματοποιείται μέσω μίας, ή περισσότερων, μη συμβατικής/κλασσικής εκκριτικής οδού (unconventional exocytosis), που ως τώρα παραμένει άγνωστη (Εικόνα 23). Έτσι, μέχρι σήμερα ο μηχανισμός έκκρισης της εν λόγω πρωτεΐνης παραμένει αινιγματικός (Cummings et al., 2015; Leffler et al., 2004; Vyakarnam et al., 1998; Rabinovich, 2005).



Εικόνα 23. Πιθανές οδοί έκκρισης της πρωτεΐνης galectin-1. Η μετάφραση του mRNA της πρωτεΐνης galectin-1 πραγματοποιείται στα ελεύθερα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξή της σε αυτό το διαμέρισμα του κυττάρου. Ακολούθως, η νεοσυντιθέμενη galectin-1 αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες του κυττάρου που περιέχουν N-ακετυλο/β-γαλακτοσίδια. Η έκκριση της πραγματοποιείται μέσω άγνωστων οδών που εμπίπτουν στην κατηγορία του μη συμβατικού μονοπατιού έκκρισης (unconventional secretion). Η νεοσυντιθέμενη galectin-1 είναι ασταθής αλλά η αλληλεπίδρασή της με άλλες πρωτεΐνες σταθεροποιεί τη δομή της. Η galectin-1 σχηματίζει ομοδιμερή που αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του ίδιου αλλά και διαφορετικών κυττάρων αλλά και με πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (Cummings et al., 2015).

1.10. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων και η επαγόμενη από υποδοχείς εξωκυττάρωση των αποθηκευτικών οργανιδίων έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα ως ανεξάρτητες κυτταρικές διαδικασίες. Έτσι, παραμένει ανοιχτό το ερώτημα εάν η ενδοκυττάρωση των υποδοχέων είναι απαραίτητη για την εξωκυττάρωση των αποθηκευτικών οργανιδίων καθώς και ποιες είναι οι μοριακές διασυνδέσεις που επιτρέπουν τη μεταφορά των ενεργοποιητικών σημάτων από τα ενδοκυττάρια διαμερίσματα στα αποθηκευτικά οργανίδια. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ειδικότερα, ενώ είναι γνωστό ότι η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 είναι απαραίτητη για την μεταγωγή του σήματος του VEGF, παραμένει εντελώς ανεξερεύνητο εάν τα διαφορετικά μονοπάτια της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 μεταβιβάζουν σήματα που ελέγχουν την VEGF-επαγόμενη εξωκυττάρωση των οργανιδίων αυτών.

Έτσι, οι κύριοι στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν:

- 1. να διερευνήσουμε τον ρόλο της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη από VEGF εξωκυττάρωση των WPBs, και**
- 2. να κατανοήσουμε την χωρο-χρονική συσχέτιση της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και της εξωκυττάρωσης των WPBs.**

Η απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα θα μας παρείχε σημαντικές πληροφορίες για τον συσχετισμό μεταξύ ενδοκυττάρωσης, μεταγωγής του σήματος και εξωκυττάρωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Επιπλέον, για την καλύτερη κατανόηση του ρόλου της μεταγωγής του σήματος του VEGF στην εξωκυττάρωση των WPBs, αλλά και για την εύρεση των μοριακών διασυνδέσεων αυτής της σχέσης, πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν η galectin-1, η οποία έχει γνωστό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος του VEGFR2.

Στηριζόμενοι στα παραπάνω, θέσαμε ως **επιπλέον στόχο της διατριβής:**

3. τη διερεύνηση της πιθανότητας η galectin-1 να εντοπίζεται στα WPBs.

Δεδομένου ότι μέχρι σήμερα ο μηχανισμός έκκρισης της πρωτεΐνης galectin-1 παραμένει άγνωστος, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, αναμένεται να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την κατανόηση του ρόλου της στην φυσιολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Αντιδραστήρια και αντισώματα

Ο ανθρώπινος ανασυνδυασμένος VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) (Cat.Number 11343663), καθώς και ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών bFGF (15 ng/ml) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Immunotools, ενώ το αντιδραστήριο ATP (100 μM) από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Τα αντιδραστήρια dynasore (100 μmol/L), 5-N-Ethyl-N-isopropyl amiloride (EIPA) (45 μmol/L) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich.

Για την ανίχνευση του υποδοχέα VEGFR2 σε μονιμοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVEC) χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα: πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι της εξωκυττάριας περιοχής 20-764 αμινοξέα (aa) του ανθρώπινου VEGFR2 (R&D Systems, AF357) και μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος (150 aa) του ανθρώπινου VEGFR2 (Cell Signaling Technology, 55B11). Για την ανίχνευση του ενδογενούς von Willebrand Factor (vWF), σε δοκιμασίες ανοσοφθορισμού αλλά και σε δοκιμασίες μέτρησης του εκκρινόμενου vWF με μεθοδολογία Elisa, χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα: μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος (M0616, κλώνος F8/86, Dako Cytomation) και πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου (A0082, Dako Cytomation) έναντι του ανθρώπινου vWF αντίστοιχα, καθώς και πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του ανθρώπινου vWF συζευγμένο με ραφανική υπεροξειδάση (P0026, Dako Cytomation).

Σε δοκιμασίες ανοσοφθορισμού χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα αντισώματα: πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι του προσδέματος mcherry (AB0040-200, SICGEN), πολυκλωνικό αντίσωμα προβάτου έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης P-Selectin (AF137, R&D Systems), μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι του προσδέματος flag (κλώνος M2, F3165, Sigma-Aldrich), μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι της GTPάσης Rab27A (ab55667, Abcam), καθαρισμένος πολυκλωνικός ορός κονίκλου έναντι της Rab27A (4th bleed) (Zografou et al., 2012) καθώς και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι της Rab27a (E12A-1sc-81914, Santa Cruz Biotechnology).

Για τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας πραγματικού χρόνου, η καταγραφή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε οπτικά διαυγές ρυθμιστικό διάλυμα με HEPES και pH=7,4 (Minimum Essential Medium Eagle, M3024-10X1L, Sigma-Aldrich).

Για την ανίχνευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Galectin-1 χρησιμοποιήθηκε αγορασμένο πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου (ab154351, Abcam), όπου και χρησιμοποιήθηκε σχεδόν σε όλα τα πειράματα. Για την ανίχνευση της εν λόγω πρωτεΐνης δοκιμάστηκαν επίσης τα αντισώματα: μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος (6C8.4-1, Thermo Fisher Scientific) καθώς και πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας (AF1152, R&D Systems). Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης ακτίνη χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα MAB1501 (κλώνος C4, Millipore).

Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα Alexa (Alexa 488, 594, 568, 633, 680) αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen. Το δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα CF 568 (20106) αγοράστηκε από την εταιρεία Biotium και χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:500. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) αγοράστηκαν από την εταιρεία Jackson Immunoresearch. Για τη μεθοδολογία STED χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα ATTO (ATTO 488, 425, Rockland).

2.2. Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)

Η απομόνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων HUVEC πραγματοποιήθηκε από φλέβα υγιών ομφάλιων λώρων (ευγενική δωρεά από μητέρες δότες, Γυναικολογική Κλινική, Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων) με εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο του εργαστηρίου μας.

Η διαδικασία της απομόνωσης περιλαμβάνει τα εξής: απομακρύνονται χειρουργικά οι θρομβωτικές περιοχές των λώρων με έντονη αιμάτωση και ξεπλένονται τοπικά με διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline). Ακολούθως, εντοπίζεται η φλέβα στα άκρα κάθε λώρου (είσοδος και έξοδος κατά μήκος του λώρου), τοποθετούνται στρόφιγγες τριπλής ροής (three way stop cocks) στα άκρα αυτής (οι στρόφιγγες δένονται με χειρουργικό νήμα εκατέρωθεν της φλέβας) και η φλέβα πλένεται εσωτερικά με PBS με τη χρήση σύριγγας. Στη συνέχεια, αποφράζεται το ένα άκρο της φλέβας και ακολουθεί διαποτισμός της φλέβας, από το ελεύθερο άκρο της, με 0.1% διάλυμα κολλαγενάσης (Collagenase type I, LS004196, Worthington) σε PBS και ο λώρος τοποθετείται σε δοχείο με περίσσεια PBS και επωάζεται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37⁰C για 12 λεπτά.

Για την απενεργοποίηση της κολλαγενάσης και τη συλλογή των κυττάρων, ο λώρος πλένεται με 10 ml πλήρως συμπληρωμένο θρεπτικό M199 (βλ. 2.3), ακολουθούν τρεις πλύσεις με 10 ml διάλυμα φωσφορικών PBS (3x10 ml) και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 1000 rpm. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος με 10 ml πλήρους θρεπτικού M199 και καλλιέργεια των κυττάρων σε τρυβλία. Το θρεπτικό ανανεώνεται την επόμενη μέρα και σε πάροδο 3 ημερών, έως ότου η πυκνότητα των κυττάρων στο πιάτο καλλιέργειας να φτάσει το 100%, ώστε τα κύτταρα να είναι έτοιμα για διασπορά (passaging).

2.3. Καλλιέργεια Ανθρώπινων Ενδοθηλιακών Κυττάρων HUVEC

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC, προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου, απομονώθηκαν (εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο απομόνωσης, βλ. 2.2) και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 100 mm, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I για 20 λεπτά στους 37⁰C. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό M199 (Sigma) εμπλουτισμένο με 20% εμβρυικό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS, Biosera), 0,035 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement) απομονωμένο από εγκέφαλο βοός (εγκαθιδρυμένο πρωτόκολλο απομόνωσης στο εργαστήριό μας), 0,05 IU ηπαρίνης/ml (H3149, Sigma), 1% L-γλουταμίνη (Gibco) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Antimycotic-Antibiotic, Invitrogen) σε ειδικούς επωαστές (incubators), σε θερμοκρασία 37⁰C και 5% CO₂. Σε όλες τις πειραματικές διατάξεις χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενεάς (passage) 1-3.

Ειδικότερα για τις μελέτες της πρωτεΐνης galectin-1, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HUVE πρώιμης γενεάς (passage 1). Τα κύτταρα άλλαζαν γενιά (passaged) κάθε 3^η μέρα με αναλογία διασποράς 1:4 (split ratio 1:4). Ανάλογα με τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος, τα κύτταρα αναπτύχθηκαν είτε σε πιάτα 24, 12 ή 6 θέσεων, είτε σε υάλινες καλυπτρίδες, είτε σε κατάλληλα πιάτα μικροσκοπίας (ibidi, 81156). Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ελεύθερα ενδοτοξίνης και ο χειρισμός των κυττάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής.

2.4. Διαμόλυνση και επιμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων

2.4.1. Διαμόλυνση με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24 φρεατίων επιστρωμένων ή μη με υάλινες καλυπτρίδες, ανάλογα με τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος, ώστε τη μέρα της διαμόλυνσης να βρίσκονται σε οπτική πυκνότητα 40-60% κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου. Η διαμόλυνση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με siRNAs συμπληρωματικά του μεταγραφήματος της πρωτεΐνης στόχου ή με ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (scrabbled siRNAs) ως δείγματα ελέγχου (control), καθώς και με το λιπίδιο RNAiMAX LIPOFECTAMINE (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, μείγμα του λιπιδίου και του siRNA επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό Optumem I (Gibco) και στη συνέχεια το μίγμα προστέθηκε στα κύτταρα. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για το δείγμα ελέγχου με scrabbled siRNA. Μετά από 4 ώρες πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του θρεπτικού καλλιέργειας των κυττάρων με πλήρες θρεπτικό M199. Ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας των siRNAs να αποσιωπούν την έκφραση της πρωτεΐνης στόχου πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά.

Οι αλληλουχίες των siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν και οι πρωτεΐνες-στόχοι είναι οι εξής: siRNAs εναντίον της Rabankyrin-5 με αλληλουχίες στόχευσης 5'-GCAAAUCGGUUUCAGCUAC-3' (siRNA RbnkA) και 5'- CAGAGUACCCGCUACAUA-3' (siRNA RbnkB) σε τελική συγκέντρωση 30 nM, siRNAs εναντίον της CDC42 με αλληλουχίες στόχευσης 5'-GGAGAACCAUAUACUCUUG-3' (siRNA CDC42A) και 5'-GAUUACGACCGCUGAGUUA-3' (siRNA CDC42B) σε τελική συγκέντρωση 20 nM από την εταιρεία Dharmacon και siRNA εναντίον της πρωτεΐνης galectin-1 (siRNA Gal-1) με αλληλουχία στόχευσης 5'-CUAAGAGCUUCGUGCUGAA-3' σε τελική συγκέντρωση 20 nM από την εταιρεία Eurofins. Η διαλυτοποίηση της σκόνης των siRNAs για τις πρωτεΐνες Rabankyrin-5 και CDC42 πραγματοποιήθηκε σε ddH₂O ενώ το siRNA της πρωτεΐνης galectin-1 σε universal buffer 1x siMAX (30 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH = 7,3, αποστειρωμένο).

2.4.2. Διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (cDNA)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24 φρεατίων καλυμμένων με υάλινες καλυπτρίδες ή σε κατάλληλα πιάτα μικροσκοπίας (ibidi), ώστε τη μέρα της διαμόλυνσης να βρίσκονται σε οπτική πυκνότητα 60-70% κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου ή του πιάτου.

Για τη διαμόλυνση των κυττάρων HUVE με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης πρωτεϊνών (cDNA) χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontex) σε αναλογία λιπιδίου προς DNA 3:1. Μίγμα του λιπιδίου και του DNA (ενδείκνυται 400 ng/μl) επώαστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε θρεπτικό M199 χωρίς πρόσθετα συστατικά και το μίγμα λιπιδίου/DNA προστέθηκε στα κύτταρα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με το μίγμα λιπιδίου/DNA σε θρεπτικό M199 συμπληρωμένο με 5 % FCS για 3 ώρες. Έπειτα, το θρεπτικό ανάπτυξης των κυττάρων αντικαταστάθηκε με πλήρες θρεπτικό M199 (βλέπε 2.3). Ο έλεγχος της έκφρασης των πλασμιδιακών κατασκευών πραγματοποιήθηκε 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, καθώς αυτός είναι ο βέλτιστος χρόνος έκφρασης.

2.5. Κατασκευές πλασμιδιακών φορέων έκφρασης cDNAs

Χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο ένα πλασμίδιο που εκφράζει τον VEGFR2 πλήρους μεγέθους (ευγενική προσφορά του J. Huot, Centre de recherche du CHU de Québec, Καναδάς) παρασκευάστηκε το πλασμίδιο VEGFR2 συζευγμένο με την αλληλουχία της φθορίζουσας χρωστικής mCherry στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pCMV.

Για την παραγωγή της πλασμιδιακής κατασκευής του vWF propeptide (763 αμινοξέα) με το πρόσδεμα EGFP αρχικά υπο-κλωνοποιήθηκε μέρος της γονιδιακής αλληλουχίας του vWF (2718 bp, τα πρώτα 906 αμινοξέα), προϊόν πέψης με SalI/BamHI του πλασμιδιακού φορέα pEGFPN1 που φέρει την αλληλουχία του πλήρους cDNA του «ώριμου» vWF (2813 αμινοξέα) με αντίστροφη κατεύθυνση, στον πλασμιδιακό φορέα pEGFPN2 (στις συμπληρωματικές θέσεις XhoI/BamHI), με στόχο την παραγωγή του πλασμιδίου pEGFPN2-vWF (906 aa, 2718 bp) με σωστή κατεύθυνση. Το πλασμίδιο vWF propeptide (763 aa)-EGFP προέκυψε μετά από κλωνοποίηση στις θέσεις XhoI/BamHI του πλασμιδίου pEGFPN2-vWF (906 aa, 2718).

Συγκεκριμένα στις θέσεις XhoI/BamHI κλωνοποιήθηκε η cDNA αλληλουχία, προϊόν αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) του cDNA του vWF, στο οποίο έχει μεταλλαχθεί η θέση αναγνώρισης (2289 bp στην αλληλουχία του vWF) της πρωτεΐνης φουρίνη (Arg-Ser-Lys-Arg σε Arg-Ser-Lys-Gly), ώστε να δημιουργηθεί η θέση αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου BamHI με χρήση των εκκινητών: forward: 5'-CAGCTCGAGACTGCAACACCTG-3' και reverse: 5'-CCTGGATCCCTTTGCTGCGATGAGACAGG-3' και έχοντας ως εκμαγείο τον αρχικό πλασμιδιακό φορέα pEGFPN1 που φέρει την αλληλουχία του πλήρους cDNA του vWF (2813 αμινοξέα) με αντίστροφη κατεύθυνση. Η περιοριστική πέψη με XhoI πραγματοποιήθηκε στη θέση 1092 bp της γονιδιακής αλληλουχίας του vWF ενώ με BamHI στη θέση 2718 bp.

Το πλασμίδιο vWF propeptide (763 αμινοξέα) συζευγμένο με το πρόσδεμα mcherry παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το προηγούμενο πλασμίδιο έκφρασης του vWF propeptide (763 αμινοξέα) στον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης pEGFPN2, στον οποίο πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση του προσδέματος EGFP, στις θέσεις BamHI/NotI του πλασμιδιακού φορέα pEGFPN2, από το πρόσδεμα mcherry, το οποίο παρασκευάστηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με χρήση των εκκινητών: forward: 5'-GCAGGATCCAAATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' και reverse: 5'-GATCAGCGGCCCGCCTACTTGTACAGCTCGTCC-3' και εκμαγείο τον πλασμιδιακό φορέα CMV-mcherry.

Ο έλεγχος της πρωτεϊνικής έκφρασης των πλασμιδιακών κατασκευών (vWF propeptide-EGFP, vWF propeptide-mCherry, VEGFR2-mCherry) πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού σε μονιμοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, μετά από διαμόλυνση κυττάρων HUVE και συνδυαστική χρήση κατάλληλων αντισωμάτων.

Οι RabGTPάσες Rab27a, 3a, 3d συνδεδεμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP (Zografou et al., 2012), χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες των WPBs σε πειράματα διαμόλυνσης (βλέπε 2.20). Ο καθαρισμός των παραγόμενων πλασμιδιακών κατασκευών πραγματοποιήθηκε με το kit Endotoxin-free plasmid midiprep (Macherey Nagel), σύμφωνα με τις παρεχόμενες οδηγίες και συνεπώς ενδείκνυται για την ασφαλή διαμόλυνση σε κύτταρα HUVE, λόγω απουσίας τοξικότητας από ενδοτοξίνες.

Για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης EGFP-Galectin-1 πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του αντίστοιχου cDNA στις θέσεις BamHI/XhoI

στον πλασμιδιακό φορέα pGEX6P1. Για την παραγωγή του cDNA της EGFP-Galectin-1 πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές: forward: 5' - C G C G G A T C C A T G G T G A G C A A G G G C G A G - 3' και reverse: 5'-CGGGCTCGAGTCAGTCAAAGGCCACAC-3' και εκμαγείο πλασμίδιο έκφρασης του προσδέματος EGFP ακολουθούμενο από την πρωτεΐνη Galectin-1 σε πλασμιδιακό φορέα για έκφραση σε θηλαστικά (CMV).

Το cDNA της flag-galectin-1 αποτέλεσε προϊόν PCR με εκκινητές forward: 5'-CAGGATCCGATTATAAAGATGATGATGATAAAAATGGCTTGTGGTCTGGTC-3' (για την δημιουργία του προσδέματος flag στο άμινο-τελικό άκρο) και reverse: 5'-CGGGCTCGAGTCAGTCAAAGGCCACAC-3' στις θέσεις κλωνοποίησης BamHI/XhoI στον πλασμιδιακό φορέα pGEX6P1.

Το cDNA της galectin-1-flag παρασκευάστηκε με PCR με εκκινητές forward: 5' - C G G G A T C C A T G G C T T G T G G T C T G G T C - 3' και reverse: 5'-CCGCTCGAGTCATTTATCATCATCATCTTTATAATCGTCAAAGGCCACACATTTG-3' (για τη δημιουργία του προσδέματος flag στο άμινο-τελικό άκρο) και ακολούθως κλωνοποιήθηκε στις θέσεις BamHI/XhoI του πλασμιδιακού φορέα pGEX6P1.

Στις περιπτώσεις αντιδράσεων PCR για την παραγωγή των πλασμιδίων pGEX6P1-galectin-1-flag και pGEX6P1-flag-galectin-1 ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε το πλασμίδιο που περιέχει το cDNA της EGFP-Galectin-1. Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού DnaStar και αγοράστηκαν από την εταιρεία Eurofins.

2.6. Μέθοδος Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε τόσο για τη δημιουργία κατάλληλων άκρων στα PCR προϊόντα, ώστε να είναι δυνατή η ένθεσή τους στις κατάλληλες θέσεις κλωνοποίησης, είτε σε πλασμιδιακό φορέα pGEX6P-1 που φέρει το γονίδιο της GST πρωτεΐνης για να δημιουργηθούν χημικά μόρια και να εκφραστεί η αντίστοιχη πρωτεΐνη (EGFP-galectin-1, flag-galectin-1, galectin-1-flag), είτε για την ένθεση των PCR προϊόντων στους πλασμιδιακούς φορείς pCMV, (flag-galectin-1, VEGFR2-mCherry) και pEGFPN2 (vWF propeptide-EGFP, vWF propeptide-mCherry).

Σύμφωνα με τις αρχές της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, η αντίδραση καταλύεται από μία σειρά επιμέρους σταδίων:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA
- υβριδισμός των εκκινητών στη συμπληρωματική αλληλουχία του DNA και
- ακόλουθη επιμήκυνση της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας του DNA με χρήση μιας DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Deoxynucleotide triphosphates, dNTPs).

Τα παραπάνω στάδια επαναλαμβάνονται από 25 έως 35 φορές σε θερμικό κυκλοποιητή.

Συγκεκριμένα, για την κατάλυση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν 10 ng πλασμιδίου που έφερε την αλληλουχία cDNA του γονιδίου ενδιαφέροντος, 0.3 μM από τον κάθε εκκινητή (οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στην ενότητα 2.5), DNA πολυμεράση (KAPA HiFi Fidelity, 1U/μl) μίγμα τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs σε τελική συγκέντρωση 0.3 mM) και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα της DNA πολυμεράσης (σε τελική συγκέντρωση 1x, περιέχει 2 mM ιόντα Mg^{2+}), όλα σε τελικό όγκο 25 μl. Ενδεικτικά, στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται για το κάθε επιμέρους στάδιο οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των παραπάνω προϊόντων PCR (ίδιες συνθήκες για όλες τις υπό μελέτη αντιδράσεις PCR).

Στάδια της PCR	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
1. Αρχική αποδιάταξη	95	2 λεπτά
2. Αποδιάταξη	98	20 δευτερόλεπτα
3. Υβριδισμός εκκινητών	60-75	30 δευτερόλεπτα
4. Επιμήκυνση	72	45 δευτερόλεπτα
Επανάληψη σταδίων 2-4 για 25 φορές		
5. Τελική επιμήκυνση	72	5 λεπτά

Πίνακας. Παράμετροι των επιμέρους σταδίων των αντιδράσεων PCR. Απεικονίζονται οι τιμές των θερμοκρασιών και των χρόνων για τα επιμέρους στάδια της συμβατικής PCR.

2.7. Ενεργοποίηση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προς επαγωγή της έκκρισης των WPBs

Για την επαγόμενη έκκριση των WPBs η ενεργοποίηση των κυττάρων HUVE πραγματοποιήθηκε μετά από 3 ημέρες καλλιέργειας, αφότου τα κύτταρα κάλυπταν το 100% της επιφάνειας του πιάτου, προκειμένου να επιτραπεί στα κύτταρα να φθάσουν σε μια πλήρως σφιχτή μονοστιβάδα. Ειδικότερα, για την επαγωγή της έκκρισης η ενεργοποίηση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με VEGF (50 ng/ml). Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Κύτταρα HUVE (που είχαν καλλιεργηθεί σε πιάτα 24-φρεατίων) πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα HBSS (Hank's Buffered Salt Solution, Gibco) και ακολούθησε προσθήκη του ενεργοποιητή σε διάλυμα HBSS + 20% HEPES + 0,1% BSA για χρονική διάρκεια ανάλογα με τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος (π.χ. 20, 30 ή 40 λεπτά). Μετά το πέρας των παραπάνω χρόνων επώασης, ποσότητα του υπερκειμένου συλλέχτηκε, φυγοκεντρήθηκε για 7 λεπτά στις 1000 rpm και ο εκκρινόμενος vWF μετρήθηκε με δοκιμασία Elisa (βλέπε 2.9). Για τη συλλογή δείγματος που αντιστοιχεί στην ιδιοσυστατική/βασική έκκριση του vWF, τα κύτταρα επώαστηκαν μόνο με διάλυμα HBSS

+ 20% HEPES + 0,1% BSA, απουσία του ενεργοποιητή, για τα ίδια χρονικά διαστήματα (control). Για τη μέτρηση των ενδοκυττάρων επιπέδων του vWF (αντιστοιχεί στον vWF που δεν εκκρίθηκε), πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων με διάλυμα 0,5% Triton X-100, 1 mM EDTA σε PBS, φυγοκέντρηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων για 15 λεπτά στις 12.000 rpm στους 4°C και μέτρηση του εκκρινόμενου vWF με δοκιμασία Elisa. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του εκκρινόμενου vWF, σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται από την Zografou, S. et al. (2012).

Στην πειραματική διάταξη όπου πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με siRNAs έναντι των πρωτεϊνών Rabankyrin-5 (siRNA RbnkA) και CDC42 (siRNA CDC42B) (βλέπε 2.4.1), τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 12 φρεατίων. 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό M199 απουσία ορού για 2 ώρες και ακολούθως ενεργοποιήθηκαν με VEGF (για 20 ή 40 λεπτά) και ο εκκρινόμενος vWF μετρήθηκε με δοκιμασία Elisa (βλέπε 2.9).

2.8. Δοκιμασίες χημικών αναστολέων

2.8.1 Αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 με χρήση χημικών αναστολέων και μελέτη της επίδρασης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs

Όλα τα πειράματα με τους χημικούς αναστολείς τα οποία περιελάμβαναν την ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF, πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE, τα οποία υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού από το θρεπτικό καλλιέργειας για δύο ώρες, πριν την επαγωγή με VEGF. Για την αναστολή των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, κύτταρα HUVE επώαστηκαν με τους αναστολείς 5-N-Ethyl-N-isopropyl amiloride (EIPA) (45 $\mu\text{mol/l}$) (για την αναστολή της μακροπινोकυττάρωσης) και με dyngo-4a (30 $\mu\text{mol/l}$) (για το εξαρτώμενο από την κλαθρίνη μονοπάτι) για 20 λεπτά. Ακολούθως ενεργοποιήθηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (20, 30 λεπτά) παρουσία των αναστολέων. Τα κύτταρα που επώαστηκαν με DMSO (Dimethyl sulfoxide, αποτελεί το διαλύτη των χημικών αναστολέων) αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα μάρτυρες (control) και χρησιμοποιήθηκαν παράλληλα.

Όλες οι επώσεις με VEGF πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) + 20 mM HEPES + 0.1% BSA και η συλλογή των υπό μελέτη δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας την πειραματική διαδικασία που

περιγράφεται παραπάνω (βλέπε 2.7). Η μέτρηση της απορρόφησης για τον εκκρινόμενο vWF πραγματοποιήθηκε στα 492 nm με δοκιμασία Elisa. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με Student's *t*-test.

2.9. Δοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) για την ποσοτική μέτρηση του εκκρινόμενου vWF

Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά σχεδιασμένα πιάτα 96-φρεατίων (μέγιστης χωρητικότητας 200 μl), η επιφάνεια των οποίων επώαστηκε με το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του ανθρώπινου vWF (A0082, Dako Cytomation) αραιωμένο (1:300) σε διάλυμα PBS, ολονυκτίως (O/N), υπό ανάδευση στους 4°C.

Τα πιάτα με το δεσμευμένο αντίσωμα πλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα PBS+0.1% Triton-X 100 (διάλυμα πλύσης) υπό ανάδευση για 2 λεπτά και έπειτα ακολούθησε επώαση (200 μl/φρεάτιο) με διάλυμα PBS+0.1% Triton-X 100 + 0.2% ζελατίνη (διάλυμα δέσμευσης), για τη δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων, υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε το «αντιγόνο» (150 μl από το υπερκείμενο της καλλιέργειας, ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες του πειράματος) στο οποίο προστέθηκαν 50 μl διαλύματος δέσμευσης, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200 μl.

Ακολούθησε επώαση του «αντιγόνου» για 1 ώρα, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 3 πλύσεις με διάλυμα πλύσης και 1 πλύση με διάλυμα δέσμευσης (200 μl/φρεάτιο). Έπειτα, τα δείγματα επώαστηκαν για 1 ώρα με το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του vWF, συζευγμένο με HRP (P0026 Dako Cytomation) (1:4000 σε διάλυμα δέσμευσης, 200 μl/φρεάτιο).

Μετά την 1 ώρα επώασης με το δευτερογενές αντίσωμα, τα δείγματα πλύθηκαν 5 φορές με διάλυμα δέσμευσης. Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των παραγόμενων προϊόντων (αποτέλεσμα σύζευξης αντιγόνου-αντισώματος) πραγματοποιήθηκε αντίδραση υπεροξειδάσης με προσθήκη του «υποστρώματος» (200 μl/φρεάτιο), το οποίο παρασκευάστηκε ως εξής: 50 ml ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού/φωσφορικών (pH 5) + 0,02 gr ο-φαινολενοδιαμίνη (o-Phenylenediamine, OPD, P-2903, Sigma) συμπληρωμένο με 20 μl H₂O₂ 30% (όπου το διάλυμα κιτρικού/φωσφορικών αποτελούνταν από 100 mM κιτρικό οξύ και 200 mM Na₂HPO₄, σε αναλογία 1:1,06).

Τα δείγματα επώαστηκαν με το εν λόγω διάλυμα («υπόστρωμα») στο σκοτάδι για χρόνο όχι μεγαλύτερο των 10-15 λεπτών, ώστε να αποφευχθεί ο κορεσμός του σήματος. Η επιτυχής έκβαση της αντίδρασης διαπιστώνεται από την αλλαγή του χρώματος του διαλύματος, ως αποτέλεσμα της δράσης της αντίδρασης της υπεροξειδάσης που προκαλεί την παραγωγή του χρωμογόνου προϊόντος (κίτρινου χρώματος). Ο τερματισμός της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη H_2SO_4 2N (50 μl/φρεάτιο). Ο τερματισμός της αντίδρασης διαπιστώνεται και πάλι με την αλλαγή του χρώματος του διαλύματος, λόγω αλλαγής του pH, που σηματοδοτεί την απενεργοποίηση της δράσης του ενζύμου υπεροξειδάσης.

Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 492 nm (αλλά και στα 630 nm για την απομάκρυνση του θορύβου), το οποίο αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης του χρωμογόνου προϊόντος. Η μετατροπή της οπτικής απορρόφησης σε A.U. (arbitrary units), πραγματοποιήθηκε με χρήση πρότυπης καμπύλης που συσχέτιζε τα δύο αυτά μεγέθη.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα («αντιγόνα») διαδοχικές αραιώσεις σε διάλυμα δέσμευσης (“blocking buffer”) από το υπερκείμενο κυττάρων HUVE, που βρίσκονταν σε καλλιέργεια 3 τουλάχιστον ημερών, ώστε να μελετηθεί η ιδιοσυστατική/βασική έκκριση του vWF.

2.10. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Για τον υπολογισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα κυτταρικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BCA (BCATM Protein Assay Kit της εταιρίας Pierce), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, σε 1 ml αντιδραστηρίου BCA προστέθηκαν 10 μl από το διάλυμα του κυτταρικού λύματος (κύτταρα HUVE λύθηκαν με διάλυμα PBS + 1% SDS). Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 30 λεπτά στους 60⁰C και φωτομετρήθηκε σε μήκος κύματος 562 nm. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα λύσης σε ίδιο όγκο δείγματος.

Για τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA). Για την μέτρηση της συγκέντρωσης των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που παράχθηκαν από κύτταρα Ecoli

χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Bradford (Bio-Rad), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, το δείγμα προστέθηκε σε διάλυμα 20% αντιδραστηρίου Bradford σε νερό και φωτομετρήθηκε στα 595 nm.

2.11. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Για τη συλλογή των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε λύση των κυττάρων HUVE με διάλυμα 1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate, Sigma) σε PBS. Στα κυτταρικά εκχυλίσματα προστέθηκε 1x διάλυμα Laemmli, προσδίδοντας τελική συγκέντρωση στα δείγματα 62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2,3% SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης, παρουσία 100 mM DTT. Ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά στους 100°C και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13.200 rpm, ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Millipore). Για τον έλεγχο της μεταφοράς των πρωτεϊνών, οι μεμβράνες βάφτηκαν με τη χρωστική Ponceau S (Serva) για 30 δευτερόλεπτα και πλύθηκαν με ddH₂O.

Οι μεμβράνες επώστηκαν για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου (RT), με διάλυμα δέσμευσης (5% γάλα σε διάλυμα 0.1% Tween 20 σε 1% PBS) για τη δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων. Ακολούθως, επώστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης στόχου.

Συγκεκριμένα, για την ανίχνευση της ανθρώπινης πρωτεΐνης Galectin-1 (14.5 kDa) πραγματοποιήθηκε επώαση της μεμβράνης με το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου ab154351 (Abcam, 1:5.000) για την ανίχνευση 20 µg ολικής πρωτεΐνης εκχυλίσματος κυττάρων και ακολούθησε επώαση O/N στους 4°C. Για την ανίχνευση του υποδοχέα VEGFR2 χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της κυτταροπλασματικής του περιοχής (55B11, Cell Signaling, 1:3000) (επώαση O/N στους 4°C). Για έλεγχο της ισοφόρτωσης χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι της πρωτεΐνης ακτίνη (MAB1501, κλώνος C4, Millipore, 1:10.000) με επώαση στους 4°C, O/N καθώς και το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ενδοσωματικής πρωτεΐνης EEA1 (Early Endosomal Antigen 1, 170 kDa) σε αραιώση 1:3.000, με επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Χρησιμοποιήθηκε ακόμη το αντίσωμα έναντι

της πρωτεΐνης anti-CDC42 (sc-87, Santa Cruz Biotechnology, 1:200) έναντι της πρωτεΐνης CDC42 (21 kDa) με επώαση στους 4°C, O/N. Οι αραιώσεις όλων των πρωτογενών αντισωμάτων πραγματοποιήθηκαν σε διάλυμα 2 % ζελατίνης + 0.1 % Tween 20 + 1 % PBS.

Ακολούθως, οι μεμβράνες πλύθηκαν 4 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα 0.1 % Tween 20 + 1 % PBS και επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP, Jackson Immunoresearch, 1:5000 σε διάλυμα δέσμησης) για 1 ώρα, υπό ανάδευση, RT. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών σε διάλυμα Tween 20 + 1 % PBS, επώαση για 5 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Roche Diagnostics GmbH, Germany) και εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο.

2.11.1. Μελέτη του βαθμού διαλυτοποίησης του VEGFR2 μετά από επαγωγή με VEGF

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 6 φρεατίων επιστρωμένα με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I σε πυκνότητα κυττάρων 70-80% κάλυψης της επιφάνειας, υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού από το θρεπτικό καλλιέργειας για 2 ώρες και ακολούθως επώαστηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για 30, 60 και 180 λεπτά. Έπειτα, πλύθηκαν 2 φορές με PBS και τα κύτταρα λύθηκαν μετά από επώαση για 10 λεπτά στους 4°C, υπό ανάδευση, με διάλυμα λύσης (25 mM Tris pH=7.5, 0.5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, protease inhibitors, 2 mM EGTA). Πραγματοποιήθηκε επώαση για 30 λεπτά στους 4°C με το παραπάνω διάλυμα λύσης και τα κυτταρικά εκχυλίσματα υπερφυγοκεντρήθηκαν σε ψυχόμενη υπερφυγόκεντρο στις 100.000xg για 30 λεπτά.

Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -20°C, ενώ τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν με 1x διάλυμα Laemml (62,5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2,3% SDS, 10% (v/v) γλυκερόλη, 0,05% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης) παρουσία ή μη 10% 1,4-Dithiothreitol (DTT) και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C υπό ανάδευση. Τα ιζήματα, που περιέχουν τις μη διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες επαναιωρήθηκαν με το παραπάνω διάλυμα, επεξεργάστηκαν δύο φορές με υπερήχους έντασης 13 % για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήθηκαν, όπως παραπάνω, για τη συλλογή του υπερκειμένου.

Η μέτρηση της πρωτεΐνης στα υπερκείμενα πραγματοποιήθηκε με το αντιδραστήριο BCA (Bikinchromic Acid, Pierce), σύμφωνα με τις οδηγίες του

κατασκευαστή (βλέπε 2.10). Ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για 5 λεπτά στους 100°C και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13200 rpm. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με χρήση SDS (SDS-PAGE) πραγματοποιήθηκε σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 6% και 15% σε συσκευή Hoefer και ηλεκτρομεταφορά για 16 ώρες στους 4°C (180 mA).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε η διαδικασία που περιγράφεται κατά την ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλέπε 2.11) και οι μεμβράνες επώαστηκαν με πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του VEGFR2 (55B11, Cell Signaling, 1:3000) σε διάλυμα 2 % ζελατίνης + 0.1 % Tween 20 + 1 % PBS, O/N στους 4°C και ακολούθως με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (HRP, Jackson Immunoresearch, 1:5000) σε διάλυμα δέσμησης (5% γάλα σε διάλυμα 0,1% Tween 20 σε 1% PBS) για 1 ώρα, RT. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση με ECL (Roche Diagnostics GmbH, Germany) και εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο.

2.12. Παρασκευή και καθαρισμός ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Η παρασκευή αφορά τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες GST-Galectin-1-EGFP, GST-flag-Galectin-1 καθώς και GST-Galectin-1-flag. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων BL21 με το cDNA των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Προκαλλιέργεια των υπό μελέτη πρωτεϊνών αναπτύχθηκε υπό ανάδευση (200 rpm) έως $O.D_{600nm} \sim 0.6$ στους 25°C (η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 4 lt θρεπτικού LB). Η επαγωγή της πρωτεϊνικής έκφρασης πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη IPTG (100 μM) και η καλλιέργεια παρέμεινε υπό ανάδευση (200 rpm) ολονυκτίως στους 25°C. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση στις 6.000 rpm για 15 λεπτά στους 4°C και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (50 mM Tris-HCl, pH=7.5, 150 mM NaCl, 5 μg/ml RNase, 5 μg/ml DNase, protease inhibitors, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) (χρησιμοποιήθηκαν 17 ml διαλύματος λύσης για την επαναδιάλυση του ιζήματος/ lt καλλιέργειας). Το εναιώρημα των βακτηριακών κυττάρων λύθηκε χρησιμοποιώντας French press (συσκευή η οποία επιτρέπει την λύση των βακτηριακών τοιχωμάτων με εφαρμογή υψηλής πίεσης και παράλληλη εξώθηση του κυτταρικού περιεχομένου από μία μικρή οπή) και το προϊόν της κυτταρικής λύσης φυγοκεντρήθηκε στις 18.000 rpm για 90 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και επώαστηκε για 2-3 ώρες υπό συνεχή

ανάδευση στους 4°C με 150 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης (sepharose 4B beads)/It καλλιέργειας (τα σφαιρίδια γλουταθειόνης επιτρέπουν την επιλεκτική δέσμευση των πρωτεϊνών που περιέχουν το πρόσδεμα GST).

Μετά την επώαση, το μίγμα τοποθετήθηκε σε στήλη χρωματογραφίας και οι μη δεσμευμένες πρωτεΐνες απομακρύνθηκαν μετά από πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) (5 φορές, με δεκαπλάσιο όγκο από αυτόν των σφαιριδίων). Η αποδέσμευση της υπό μελέτη πρωτεΐνης από το πρόσδεμα GST πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση των σφαιριδίων με την πρωτεάση PreScission, η οποία περιέχει το πρόσδεμα GST και επομένως παραμένει προσδεσμένη στα σφαιρίδια μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης διάσπασης. Πριν την προσθήκη της πρωτεάσης, η ποσότητα της GST-πρωτεΐνης που είναι συνδεδεμένη στα σφαιρίδια προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad), μετά την επώαση μίας μικρής ποσότητας (20 μl) από τα σφαιρίδια (είναι συνδεδεμένα με την GST-πρωτεΐνη) με ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 15 mM ανηγμένη γλουταθειόνη/reduced glutathione, pH 8.5).

Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια επώαστηκαν με την πρωτεάση PreScission (10 μg/mg της GST-πρωτεΐνης) σε διάλυμα έκλουσης, O/N στους 4°C, υπό ανάδευση. Η καθαρισμένη πρωτεΐνη (απαλλαγμένη από το πρόσδεμα GST) εκλούεται από τα σφαιρίδια, συλλέγεται και επωάζεται ξανά με 100 μl σφαιρίδια γλουταθειόνης (glutathione-Sepharose 4B beads) για 2 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν μόρια GST-PreScission ή GST πρωτεΐνης που πιθανώς να είχαν διαφύγει στο προηγούμενο στάδιο επώασης με την πρωτεάση. Η εκλουσμένη πρωτεΐνη απομακρύνθηκε από τη στήλη και ακολούθησε διαπίδυση (με χρήση κατάλληλης μεμβράνης) για αντικατάσταση των συστατικών του ρυθμιστικού διαλύματος. Η διαπίδυση πραγματοποιήθηκε ολονυκτίως στους 4°C σε διάλυμα TBS + 0,1 mM EDTA σε ddH₂O.

Την επόμενη μέρα ανανεώθηκε το διάλυμα διαπίδυσης και η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος επώαστηκε στο εν λόγω διάλυμα για άλλες 3-4 ώρες στους 4°C. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Bio-Rad). Το δείγμα της καθαρισμένης πρωτεΐνης καταψύχθηκε και αποθηκεύθηκε στους -80°C, αφού προηγουμένως πάγωσε σε δοχείο με υγρό άζωτο. Το πρωτεϊνικό προφίλ όλων των ενδιάμεσων σταδίων καθαρισμού ελέγχθηκε με SDS-PAGE και χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

2.13. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24-φρεατίων που περιείχαν υάλινες καλυπτρίδες επιστρωμένες με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I. Μετά το πέρας των εκάστοτε πειραματικών συνθηκών, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA) 3.7% σε PBS για 20 λεπτά. Το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε με 50 mM NH₄Cl σε διάλυμα PBS + 50 mM MgCl₂ + 100 mM CaCl₂, μετά από επώαση των κυττάρων για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα επώαστηκαν με 0.1% Triton σε διάλυμα PBS + 50 mM MgCl₂ + 100 mM CaCl₂ για 3-4 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης, ώστε να είναι δυνατή η διείσδυση των αντισωμάτων για την ανίχνευση του σήματος των ενδοκυττάρων πρωτεϊνών. Ακολούθησαν τρεις πλύσεις με διάλυμα PBS + 50 mM MgCl₂ + 100 mM CaCl₂ και οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις δεσμεύτηκαν με επώαση των κυττάρων με διάλυμα δέσμησης (10 % FCS σε PBS) για 45 λεπτά.

Η επώαση των κυττάρων με διάλυμα πρωτογενών αντισωμάτων, αραιωμένων σε διάλυμα δέσμησης, πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα σε RT. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα PBS + 50 mM MgCl₂ + 100 mM CaCl₂ και ακολούθως τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με φθοριοχρώματα Alexa (Alexa 488, 594, 680) (αραιωμένων 1:300 σε διάλυμα δέσμησης) για 35 λεπτά, RT, στο σκοτάδι. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με το αντιδραστήριο τοποθέτησης Prolong (ProLong™ Gold Antifade Mountant, P36930, Thermo Fisher Scientific) και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε RT για 24 ώρες. Τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ (confocal).

2.14. Μελέτη του ενδοκυττάρου εντοπισμού του VEGFR2 και των WPBs σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε υάλινες καλυπτρίδες (σε πιάτα 24 φρεατίων) σε πυκνότητα 70-80% της επιφάνειας του πιάτου και σε πλήρες θρεπτικό M199. Ακολούθως πλύθηκαν 3 φορές με PBS και υποβλήθηκαν σε στέρηση ορού για 2 ώρες. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για 5,15,30, 60 λεπτά, πλύθηκαν 3 φορές με PBS και μονομοιοποιήθηκαν με 3,7% PFA. Κύτταρα ελέγχου (control) υπέστησαν την ίδια διαδικασία απουσία όμως ενεργοποίησης. Ακολούθως τα κύτταρα σε όλες τις υπό μελέτη συνθήκες υποβλήθηκαν στην διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Ο έλεγχος του ενδοκυττάριου VEGFR2 πραγματοποιήθηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι της εξωκυττάριας περιοχής του (20-764 αμινοξέα) (AF357, 1:100) ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 (1:300). Για την ανίχνευση των WPBs πραγματοποιήθηκε χρώση έναντι του vWF με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμούς (M0616, 1:100) ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594 (1:300).

Σε ανεξάρτητα πειράματα, για τον έλεγχο του ενεργοποιημένου VEGFR2 σε μονιμοποιημένα κύτταρα HUVE, χρησιμοποιήθηκε επίσης το μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματός του (150 aa) (55B11, 1:400), ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 (1:300).

2.15. Συνεστιακή μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (time-lapse video microscopy)

Για τη μελέτη του χωρο-χρονικού συντονισμού της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 ταυτόχρονα με την εξωκυττάρωση των WPBs, κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα για μικροσκοπία πιάτα επιφάνειας 35-mm (Ibidi) επιστρωμένα με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πυκνότητα 60-70% κάλυψης της επιφάνειας του πιάτου, ώστε την επόμενη μέρα να πραγματοποιηθεί διαμόλυνση με τους πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης του προπετιδίου vWF-EGFP και του VEGFR2-mCherry.

Μετά την πάροδο 48 ωρών από την στιγμή της διαμόλυνσης, το θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων αντικαταστάθηκε με διάλυμα κατάλληλο για μικροσκοπία πραγματικού χρόνου (ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, pH=7,4, Minimum Essential Medium Eagle). Στο παραπάνω διάλυμα πραγματοποιήθηκε η προσθήκη του ενεργοποιητή VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για την επαγωγή της έκκρισης. Η παρακολούθηση της VEGF-επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs ταυτόχρονα με τον έλεγχο του υποκυτταρικού εντοπισμού του VEGFR2 πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα. Για τη καταγραφή του video λήφθηκαν εικόνες κάθε 30 δευτερόλεπτα.

2.16. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM)

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των υπό μελέτη πρωτεϊνών μελετήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 II (IMBB/ITE, Τμήμα Βιοϊατρικής Έρευνας, Ιωάννινα) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite. Για την παρακολούθηση χρησιμοποιήθηκε ο φακός Leica 63x 1.4 NA oil UV. Η συχνότητα σάρωσης πραγματοποιήθηκε στα 400 Hz, με διάφραγμα δέσμης (pinhole) 1 AU (Airy) και ανάλυση εικόνας 512x512 pixels.

2.17. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM) με χρήση υπερδιακριτικής ικανότητας (Stimulated Emission Depletion, STED)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλες για μικροσκοπία υάλινες καλυπτρίδες (18x18 mm) (Deckglaser, Assistent) επιστρωμένες με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I και επεξεργάστηκαν στις διάφορες συνθήκες, ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Μετά το πέρας της επεξεργασίας, τα κύτταρα πλύθηκαν 1 φορά με PBS, μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (PFA) 3.7% σε PBS για 15 λεπτά και ακολούθησε 1 πλύση με PBS για 5 λεπτά. Το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε με διάλυμα 50 mM NH₄Cl σε PBS για 15 λεπτά.

Για την ανίχνευση του ενδοκυτταρικού σήματος, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα 0,1% Triton σε PBS για 4 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης για τη διείσδυση των αντισωμάτων. Έπειτα τα κύτταρα επώαστηκαν με PBS για 5 λεπτά και ακολούθως με 5 % ορό αίγας (005-000-121, Jackson ImmunoResearch) σε PBS για 20 λεπτά, προκειμένου να δεσμευθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με διάλυμα πρωτογενών αντισωμάτων (σε 5% ορό αίγας σε PBS) για 1 ώρα, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (RT). Συγκεκριμένα για την ανίχνευση της galectin-1 χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου ab154351 (1:200) και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος 6C8.4-1(1:200) σε ανεξάρτητα πειράματα. Για την ανίχνευση του ενδογενούς vWF χρησιμοποιήθηκαν τόσο το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος M0616 (1:100) καθώς και το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου A0082 (1:400). Η ανίχνευση της υπερεκφρασμένης Rab27a πραγματοποιήθηκε με τον καθαρισμένο πολυκλωνικό ορό κονίκλου (4th bleed, 1:200) (Zografou et al., 2012).

Ακολούθως τα κύτταρα πλύθηκαν 1 φορά για 5 λεπτά με PBS υπό ανάδευση σε RT και στην συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα δευτερογενών πολυκλωνικών αντισωμάτων αίγας έναντι κονίκλου και έναντι επιμύος, συζευγμένων με τα φθοριοχρώματα ATTO 488 (Rockland, 1: 400 σε 5% ορό αίγας σε PBS) και ATTO 425 (Rockland, 1: 500 σε 5% ορό αίγας σε PBS) αντίστοιχα, για 1 ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου (RT), καλυμμένα με αλουμινόχαρτο.

Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 10 λεπτών με PBS υπό ανάδευση σε RT και οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες με το αντιδραστήριο τοποθέτησης Prolong και παρέμειναν να στεγνώσουν στον πάγκο για 24 ώρες. Η ανίχνευση του φθοριοχρώματος ATTO 488 πραγματοποιήθηκε μετά από διέγερση με λέιζερ που εκπέμπει σε μήκος κύματος 514 nm (φάσμα απορρόφησης 535-585 nm, κόκκινο χρώμα) ενώ η διέγερση του φθοριοχρώματος ATTO 425 πραγματοποιήθηκε με λέιζερ που εκπέμπει σε μήκος κύματος 458 nm (φάσμα απορρόφησης 470-500 nm, πράσινο χρώμα). Για την παρακολούθηση χρησιμοποιήθηκε ο φακός 100x oil και τα λέιζερ Argon (30% της μέγιστης έντασης) και 592 nm depletion (100% της μέγιστης έντασης).

2.18. Πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs) με χρήση nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry (nLC-MS/MS)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα καλλιέργειας μεγάλης κλίμακας και σε πλήρες θρεπτικό M199 ως ότου η πυκνότητα των κυττάρων να είναι 100%. Την επομένη μέρα τα κύτταρα πλύθηκαν με διάλυμα HANKS + 20mM Hepes (1M).

Για την επαγωγή της εξωκυττάρωσης των WPBs τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) / bFGF (15 ng/ml) / ATP (100 μM) σε θρεπτικό M199 (απουσία ορού) για 1 ώρα, ενώ τα κύτταρα ελέγχου επώαστηκαν με το ίδιο θρεπτικό M199 απουσία των ενεργοποιητών επίσης για 1 ώρα. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα υπερκείμενα (150 ml για κάθε δείγμα), προστέθηκαν αναστολείς των πρωτεασών (protease inhibitors) και ακολούθησε φυγοκέντρηση (για απομάκρυνση τυχόν κυττάρων από το υπερκείμενο). Τα υπερκείμενα συμπυκνώθηκαν για 48h στους 4⁰C σε φίλτρα Vivacell 70 και στη συνέχεια σε φίλτρα centricon, έως ότου ο όγκος να φτάσει τα 250μl

(συνολική συμπίκνωση κατά 600 φορές). Ποσότητα 150 μl από το κάθε δείγμα υποβλήθηκαν σε κατακρήμνιση με Τριχλωροοξικό οξύ (Trichloroacetic acid, TCA) (Λαζάνη, Β., μέλος του εργαστηρίου μας).

Το εκχύλισμα των εκκρινόμενων πρωτεϊνών διαχωρίστηκε σε πήκτωμα (gel-based) μετά την κατακρήμνιση με TCA και ακολούθως πραγματοποιήθηκε πέψη των εκκρινόμενων πρωτεϊνών με το ένζυμο πεπτιδο-N-γλυκοσιδάση F (Peptide:N-glycosidase F, PNGase F), με στόχο την παραγωγή πεπτιδίων για ανάλυση. Τα παραγόμενα πεπτίδια υποβλήθηκαν σε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας σε επίπεδο νανοκλίμακας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (nano LC-MS/MS) και η ταυτοποίηση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με εργαλεία βιοπληροφορικής (η ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία μάζας πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του κ. Αϊβαλιώτη, Μ., ΙΤΕ/ΙΜΒΒ, Ηράκλειο).

2.19. Δοκιμασία πρωτεϊνικού ανταγωνισμού “Competition assay” για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Galectin-1

Για τον έλεγχο της εξειδίκευσης του πολυκλωνικού αντισώματος κονίκλου έναντι της πρωτεΐνης Galectin-1 (ab154351, Abcam) που χρησιμοποιήθηκε σε όλα σχεδόν τα πειράματα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα προσθήκης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1 ή galectin-1-flag σε τελική συγκέντρωση 10 μg/ml σε διάλυμα 10% FBS σε PBS (διάλυμα δέσμησης), στο οποίο προστέθηκαν τα υπό μελέτη αντισώματα: πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης Galectin-1 (1:200) και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης vWF (M0616, κλώνος F8 186, 1:100).

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με το παραπάνω διάλυμα πρωτογενών αντισωμάτων παρουσία των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για 1 ώρα, RT. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS και τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα δευτερογενών αντισωμάτων κονίκλου και επιμύος συζευγμένων με τα φθοριοχρώματα Alexa 488 και Alexa 594 (1:300 σε διάλυμα δέσμησης) αντίστοιχα και μελέτη με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης.

2.20. Έλεγχος εντοπισμού της galectin-1 στα WPBs με γνωστούς πρωτεϊνικούς δείκτες αυτών (P-selectin, Rab27a, Rab3a, Rab3d)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε υάλινες καλυπτρίδες (επιστρωμένες με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I) σε πιάτα 24-φρεατίων. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε οπτική πυκνότητα 60-70% της επιφάνειας του πιάτου καλλιέργειας, ώστε να είναι δυνατή η διαμόλυνσή τους με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης. Για την διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές των Rab27a-EGFP, Rab3a-EGFP, Rab3d-EGFP (Zofraou et al., 2012) σε συγκέντρωση 400 ng/μl και η διαδικασία διαμόλυνσης πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στην υποενότητα 2.4.2. 48 ώρες μετά την διαμόλυνση τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με 3,7% PFA και ακολούθως υποβλήθηκαν στην διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Για τον ενδογενή εντοπισμό της galectin-1 στα WPBs χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου ab154351 (1:200) ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο είτε με φθοριόχρωμα Alexa 488 (1:300) είτε με φθοριόχρωμα Alexa 594 (1:300). Για την ανίχνευση του vWF χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος (M0616, 1:100) ακολουθούμενο είτε από δευτερογενές συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 568 (κόκκινο) είτε με φθοριόχρωμα Alexa 680 (μπλε). Για την ανίχνευση της ενδογενούς πρωτεΐνης P-Selectin χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα προβάτου AF137 (1:100) ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 633 (μπλε). Ο έλεγχος της υπερέκφρασης των Rab27a-EGFP, Rab3a-EGFP, Rab3d-EGFP πραγματοποιήθηκε μέσω αυτοφθορισμού του προσδέματος EGFP.

2.21. Μελέτη της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης των WPBs με πειράματα πρόσληψης αντισωμάτων έναντι του vWF (“anti-vWF antibody internalization assay”) για την διερεύνηση του μηχανισμού έκκρισης της galectin-1

Η πειραματική διαδικασία που περιγράφεται ακολούθως αποτελεί παραλλαγή της πειραματικής διάταξης που αναφέρουν στην μελέτη τους οι Knop & Gerke (2002). Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε υάλινες καλυπτρίδες (επιστρωμένες με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I) και ακολούθησε πλύση 2 φορές με PBS. Για την επαγωγή της εξωκυττάρωσης τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με το συνδυασμό των ενεργοποιητών VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) / bFGF (15 ng/ml) / ATP (100 μM) παρουσία πολυκλωνικών

αντισωμάτων κονίκλου έναντι του vWF (A0082, 0,1 mg/ml) σε διάλυμα πλήρους θρεπτικού M199 (προερχόμενο από καλλιέργεια κυττάρων 2 ημερών) και 0,1% BSA. Ως δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που καλλιεργήθηκαν στο ίδιο θρεπτικό παρουσία των πολυκλωνικών αντισωμάτων για τον vWF, αλλά απουσία των ενεργοποιητών της έκκρισης. Όλες οι επώσεις των κυττάρων πραγματοποιήθηκαν σε συνολικό όγκο 70 μl (σε μορφή σταγόνας/καλυπτρίδα) για 30 λεπτά, σε ειδικούς επωαστές (incubators) σε θερμοκρασία 37°C και 5% CO₂.

Μετά το πέρας της επώασης τα κύτταρα πλύθηκαν τρεις φορές με PBS. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις των 5 λεπτών με όξινο διάλυμα M199 (pH= 2,0), με ενδιάμεση πλύση με PBS πριν την προσθήκη του όξινου διαλύματος κάθε φορά, για την απομάκρυνση του εκκρινόμενου vWF που πιθανώς παρέμεινε προσδεμένος στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν για μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Ο έλεγχος του ενδοκυττάρου εντοπισμού των ενδογενών πρωτεϊνών galectin-1 και vWF πραγματοποιήθηκε με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος αίγας AF1152 (1:100) για την πρωτεΐνη galectin-1, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 (1:300) και με το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος M0616 (1:100), ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 680 (1:300) για τον ενδογενή vWF. Για την ανίχνευση των πολυκλωνικών αντισωμάτων έναντι του vWF (A0082) που προσέλαβαν τα WPBs που υπέστησαν “kiss-and-run” εξωκυττάρωση χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα κονίκλου συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594 (1:300).

2.22. Δοκιμασίες εισόδου (“internalization assays”) ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 στα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων

2.22.1. Μελέτη της πρόσληψης της ανασυνδυασμένης galectin-1-flag στα WPBs, απουσία επαγωγής της έκκρισης

Κύτταρα HUVE επιστρωμένα σε υάλινες καλυπτρίδες σε πιάτο 24-φρεατίων, πλύθηκαν 2 φορές με PBS. Ακολούθως επώαστηκαν με πλήρες M199 θρεπτικό στο οποίο προστέθηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη galectin-1-flag σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (70, 140, 420, 700 μg/ml σε ανεξάρτητα πειράματα). Η επώαση των κυττάρων με την

ανασυνδρασμένη πρωτεΐνη πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα (σε σταγόνα όγκου 70 µl). Τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με PBS, μονιμοποιήθηκαν με 3,7% PFA σε PBS για 20 λεπτά και ακολούθως υποβλήθηκαν στη διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλέπε 2.13).

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των ενδογενών πρωτεϊνών galectin-1 και vWF πραγματοποιήθηκε με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος κονίκλου (ab154351, Abcam, 1:200) και του μονοκλωνικού αντισώματος επιμύος (M0616, κλώνος F8186, 1:100) ακολουθούμενα από τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα Alexa 488 και Alexa 594 (1:300) αντιστοίχως. Για την ανίχνευση του προσδέματος flag της ανασυνδρασμένης πρωτεΐνης galectin-1-flag χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα επίμυος F3165 (κλώνος M2, 1:2000), ακολουθούμενο είτε από το δευτερογενές συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 (για την ανίχνευση της galectin-1-flag σε συγκέντρωση 140 και 700 µg/ml), είτε από δευτερογενές συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594 (για την ανίχνευση της ανασυνδρασμένης galectin-1-flag σε συγκέντρωση 70 µg/ml). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε φυσιολογικά κύτταρα HUVE αλλά και σε κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε η αποσιώπηση της ενδογενούς πρωτεΐνης galectin-1 με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια siRNAs με αλληλουχίες στόχευσης: νοσηματική/sense αλυσίδα: 5'-CUAAGAGCUUCGUGCUGAA-3' και αντινοσηματική/anti-sense αλυσίδα: 5'-UUCAGCACGAAGCUCUUAG-3'. Σε όλες τις περιπτώσεις η τελική συγκέντρωση των siRNAs ήταν 20 nM σε universal buffer 1x siMAX (30 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7.3) και η επεξεργασία των κυττάρων πραγματοποιήθηκε 72 ώρες μετά τη διαμόλυνση.

2.22.2. Μελέτη της πρόσληψης της ανασυνδρασμένης galectin-1 στα WPBs μετά από επαγωγή της έκκρισης με VEGF/bFGF/ATP

Κύτταρα HUVE επιστρωμένα σε υάλινες καλυπτρίδες σε πιάτο 24-φρεατίων, πλύθηκαν 2 φορές με PBS. Η προσθήκη της ανασυνδρασμένης galectin-1 (28 µg/ml) πραγματοποιήθηκε σε πλήρες θρεπτικό M199 απουσία ή παρουσία των ενεργοποιητών VEGF (50 ng/ml) / bFGF (15 ng/ml) / ATP (100 µM) (σε σταγόνα όγκου 70 µl/καλυπτρίδα). Η επώαση με τους ενεργοποιητές πραγματοποιήθηκε για 30 λεπτά. Η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα στα οποία δεν προστέθηκε η ανασυνδρασμένη πρωτεΐνη galectin-1 (κύτταρα ελέγχου, control). Μετά το τέλος της επώασης τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με PBS, μονιμοποιήθηκαν με 3,7% PFA

σε PBS για 20 λεπτά και ακολούθως υποβλήθηκαν στη διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού (βλέπε 2.13).

Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών galectin-1 και vWF πραγματοποιήθηκε με χρήση αντισωμάτων που περιγράφονται στην προηγούμενη παράγραφο (βλέπε 2.22.1).

2.23. Έμμεσος προσδιορισμός της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης των WPBs, ως πιθανός μηχανισμός εισόδου της galectin-1 στα WPBs - πειράματα απομάκρυνσης της εκκρινόμενης galectin-1

Κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν σε υάλινες καλυπτρίδες (επιστρωμένες με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I) σε πιάτο 24-φρεατίων. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό M199 για χρονική διάρκεια 3 ημερών (control) καθώς και σε πλήρες θρεπτικό που ανανεώνονταν κάθε 6-8 ώρες, για την απομάκρυνση της εξωκυττάριας galectin-1 (αυτή που εκκρίνεται μη συμβατικά). Μετά το πέρας των 3 ημερών, ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS, μονιμοποίηση με 3,7% PFA και έμμεσος ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση της galectin-1 στα WPBs με συνεστιακή μικροσκοπία.

Για τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου ab154351 (1:200) ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 488 (1:300). Ως δείκτης των WPBs χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι του vWF (M0616, 1:100) ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594 (1:300).

2.24. Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση

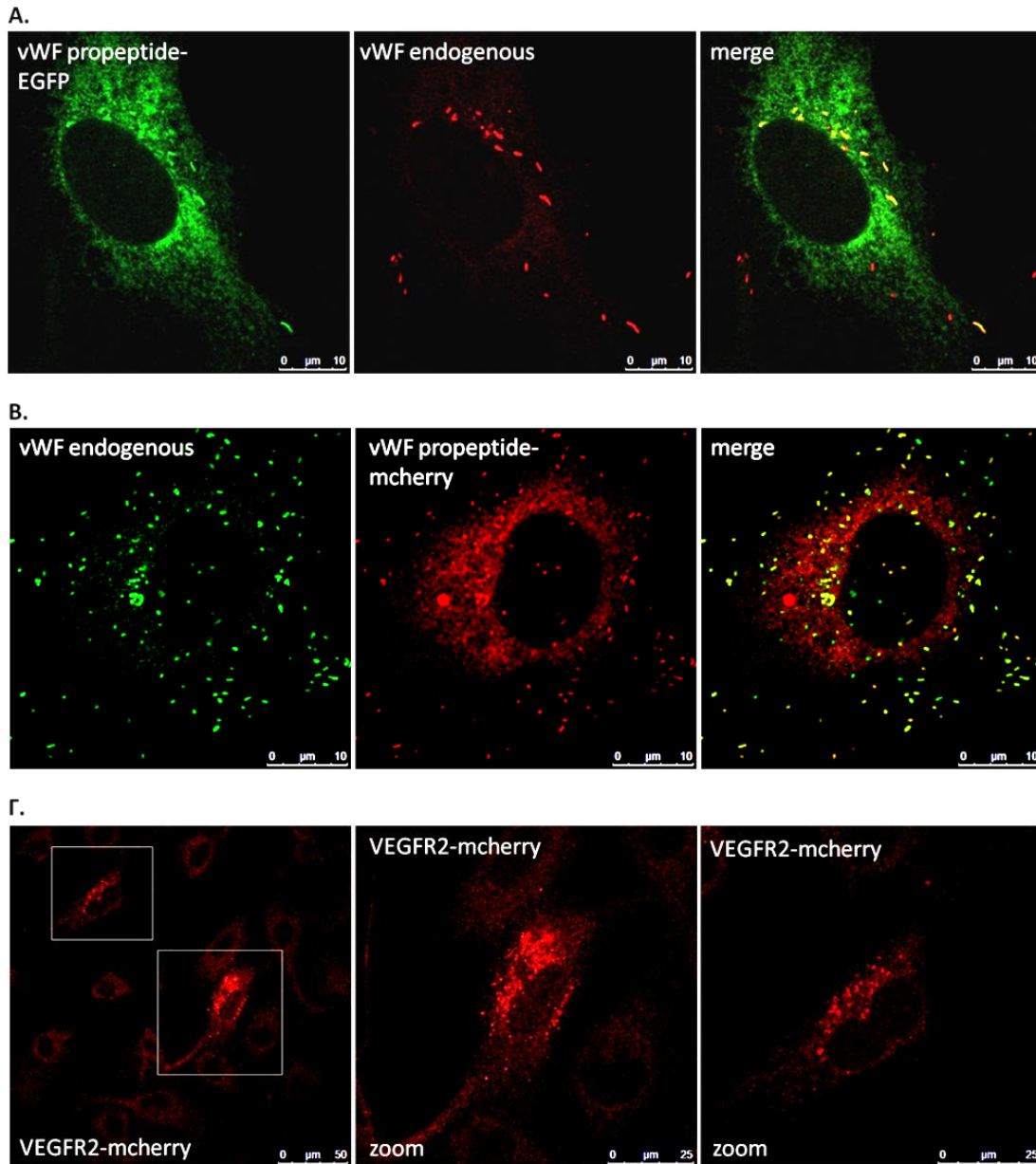
Τα γραφήματα σχεδιάστηκαν με το λογισμικό Graphpad Prism. Τα γραφήματα αντιπροσωπεύουν δεδομένα που προκύπτουν από τουλάχιστον 2 ή 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις του κάθε πειράματος, υπολογίζοντας τη μέση τυπική απόκλιση (S.E.M.) των τιμών. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το Student's *t*-test (για την ανάλυση δύο ομάδων) με χρήση της εφαρμογής GraphPad QuickCalcs: *t* test calculator.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Παραγωγή πλασμιδίων και έλεγχος αντισωμάτων

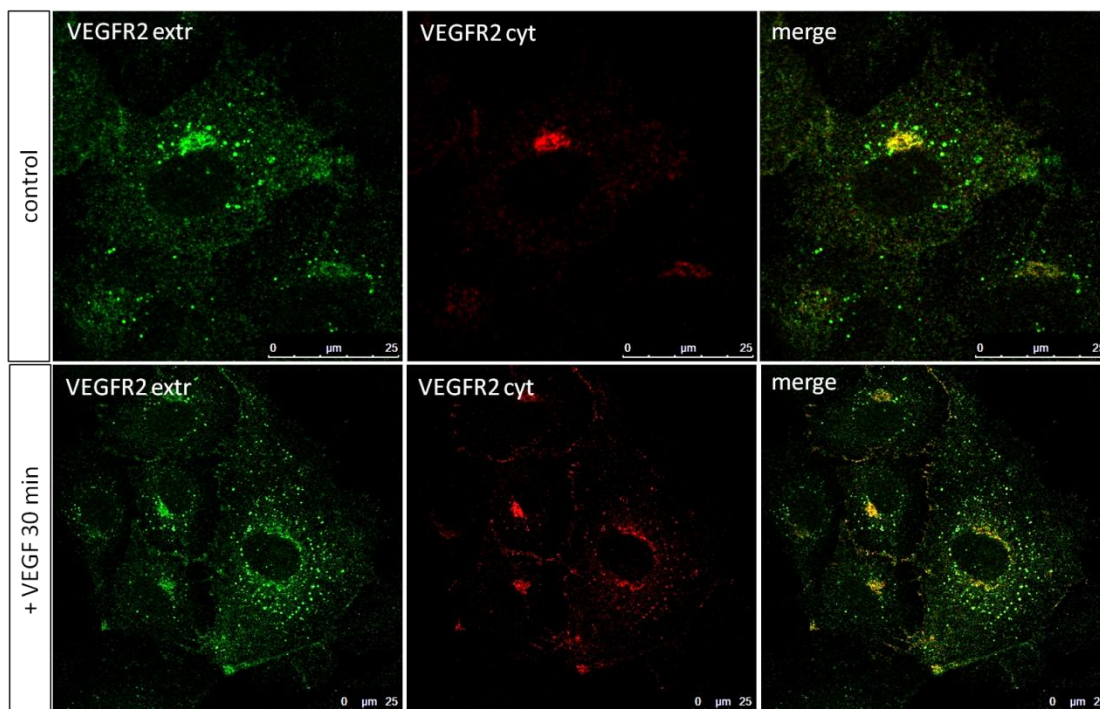
Προκειμένου να μελετηθεί η χωρο-χρονική συσχέτιση μεταξύ της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και της εξοκυττάρωσης των WPBs, έπρεπε αρχικά να παρασκευασθούν πλασμιδιακές κατασκευές έκφρασης των πρωτεϊνών VEGFR2 και vWF, που να επιτρέπουν την ταυτόχρονη παρακολούθηση των ενδοσωμάτων, στα οποία εισέρχεται ο VEGFR2 και των εκκρινόμενων WPBs.

Για τον σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν πλασμίδια έκφρασης του προπεπτιδίου του vWF με προσδέματα EGFP και mCherry καθώς και πλασμίδιο έκφρασης του VEGFR2 με το πρόσδεμα mCherry. Προκειμένου να ελεγχθεί η πρωτεϊνική έκφραση των πλασμιδιακών κατασκευών (προπεπτίδιο vWF-EGFP, προπεπτίδιο vWF-mCherry και VEGFR2-mCherry) και η πιθανή παρεμπόδιση του προσδέματος στην ειδική στόχευση των πρωτεϊνών αυτών στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό τους, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση κυττάρων HUVEC με τις παραπάνω πλασμιδιακές κατασκευές και ακολούθησε μικροσκοπία ανοσοφθορισμού. Ανάλυση των εικόνων μικροσκοπίας απέδειξε την επιτυχή πρωτεϊνική έκφραση των εν λόγω πλασμιδιακών κατασκευών (Εικόνα 1, Α-Γ). Επιπλέον, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1 Α, Β, οι χιμαιρικές πρωτεΐνες προπεπτίδιο vWF-EGFP και προπεπτίδιο vWF-mCherry συνεντοπίζονται με τον ενδογενή vWF. Άρα, τα προσδέματα EGFP και mcherry δεν επηρεάζουν την στόχευση του προπεπτιδίου του vWF στα WPBs. Ακόμη, η χιμαιρική πρωτεΐνη VEGFR2-mCherry εντοπίζεται σε ενδοκυτταρικά κυστίδια, όπως συμβαίνει με τον ενδογενή VEGFR2 (Basagiannis et al. 2016). Συνεπώς, τα προσδέματα EGFP και mcherry δεν επηρεάζουν την στόχευση των υπό μελέτη πρωτεϊνών στον ειδικό τους προορισμό.



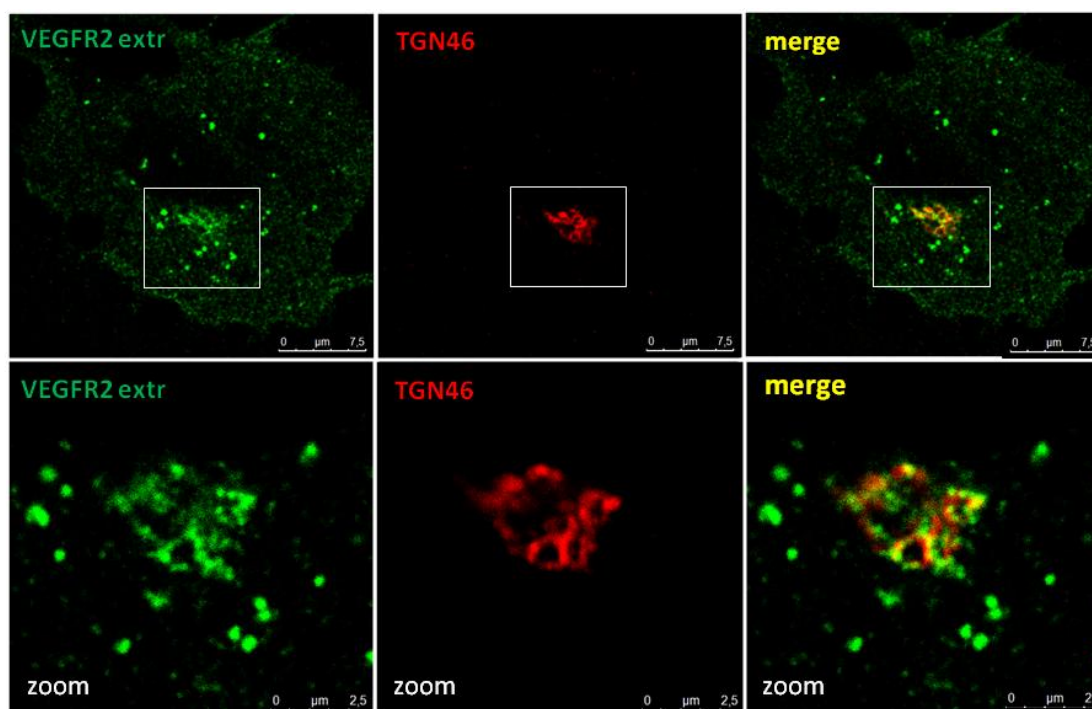
Εικόνα 1. Έλεγχος της έκφρασης και του υποκυτταρικού εντοπισμού των πρωτεϊνών *vWF-propeptide-EGFP*, *vWF-propeptide-mCherry* και *VEGFR2-mCherry* μετά από διαμόλυνση κυττάρων HUVEC. Κύτταρα HUVEC διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή *vWF-propeptide* (400 ng) συζευγμένο με τα προσδέματα GFP (A) και *mCherry* (B), ή με πλασμίδιο έκφρασης του *VEGFR2* συζευγμένο με το πρόσδεμα *mCherry* (400 ng) (Γ), για 48 ώρες. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία (*confocal*). Για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα: (A) μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόδος έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης *vWF*, ενώ η υπερέκφραση του προπεπτιδίου της πρωτεΐνης *vWF* ελέγχθηκε μέσω του αυτοφθορισμού της *EGFP*, (B) πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι του προσδέματος *mcherry* ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα CF 568 και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόδος έναντι της ανθρώπινης πρωτεΐνης *vWF* ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 488 και (Γ) πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι του προσδέματος *mcherry* ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα CF 568 για τον έλεγχο της υπερέκφρασης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *VEGFR2-mcherry*. Απεικονίζονται σε μεγέθυνση κύτταρα HUVE τα οποία υπερεκφράζουν το πλασμίδιο *VEGFR2-mcherry* (άσπρα πλαίσια).

Επιπλέον, δοκιμάστηκαν διαθέσιμα αντισώματα του εμπορίου για την ανίχνευση του ενδογενούς VEGFR2. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που αναγνωρίζουν είτε το εξωκυτταρικό είτε το κυτταροπλασματικό (καρβόξυ-τελικό) ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα, σε ενεργοποιημένα με VEGF κύτταρα HUVE και σε κύτταρα σε ηρεμία. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων ανοσοφθορισμού κατέδειξε ότι ο VEGFR2 εντοπίζεται είτε σε διάσπαρτα ενδοσώματα ή σε ένα περιπυρηνικό διαμέρισμα, ανάλογα με το αν τα κύτταρα έχουν ενεργοποιηθεί με VEGF ή αν βρίσκονται σε ηρεμία, αντίστοιχα (Εικόνα 2). Ο διαφορετικός εντοπισμός του υποδοχέα οφείλεται στην ενδοκυττάρωση που προκαλεί η επώαση με VEGF (Basagiannis et al., 2016) αλλά και πιθανά στον διαφορετικό επίτοπο που αναγνωρίζουν τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Τα παραπάνω αποτελέσματα, σε συνδυασμό με προηγούμενη βιβλιογραφία (Basagiannis et al., 2016; Gampel et al., 2006; Manickam et al., 2011), συνηγορούν στο ότι τα αντισώματα αναγνωρίζουν ειδικά τον VEGFR2.



Εικόνα 2. Έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού του VEGFR2 με χρήση δύο διαφορετικών αντισωμάτων. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 2 ώρες και ακολούθως ενεργοποιήθηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για 30 λεπτά. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία έμμεσου ανοσοφθορισμού και ανάλυση με συνεστιακή μικροσκοπία (confocal). Για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό του VEGFR2 χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντισώματα: αντισώματα που αναγνωρίζουν είτε το εξωκυτταρικό τμήμα (20-764 αμινοξέα) είτε το κυτταροπλασματικό (καρβόξυ-τελικό) ενδοκυτταρικό τμήμα (150 αμινοξέα) του VEGFR2, ακολουθούμενα από τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριόχρωμα Alexa 488 και Alexa 594, αντίστοιχα (VEGFR2 extr: VEGFR2 extracellular, VEGFR2 cyt: VEGFR2 cytoplasmic).

Το περιπυρηνικό πρότυπο του εντοπισμού του VEGFR2, το οποίο παρατηρήθηκε απουσία VEGF και με τα δύο αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν (Εικόνα 2), μεταβάλλονταν σε περισσότερο ενδοσωματικό/κυστιδιακό μετά από επαγωγή με VEGF (Εικόνα 2). Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με δημοσιευμένες παρατηρήσεις (Manickam et al., 2010), στις οποίες ο VEGFR2 συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη TGN64 (δείκτης του Golgi). Ανεξάρτητα πειράματα του εργαστηρίου επιβεβαίωσαν τον συνεντοπισμό του VEGFR2 με τον πρωτεϊνικό δείκτη TGN46 (Εικόνα 3/ευγενική προσφορά από Ζωγράφου Σοφία, αδημοσίευτη εργασία). Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι η επαγωγή με VEGF προκαλεί την μετακίνηση του υποδοχέα από το Golgi στην πλασματική μεμβράνη (Manickam et al., 2010), γεγονός που επιβεβαιώνεται από τις δικές μας παρατηρήσεις, καθώς παρουσία VEGF μειώνεται η περιπυρηνική χρώση και αυξάνεται η κυστιδιακή (Εικόνα 2).

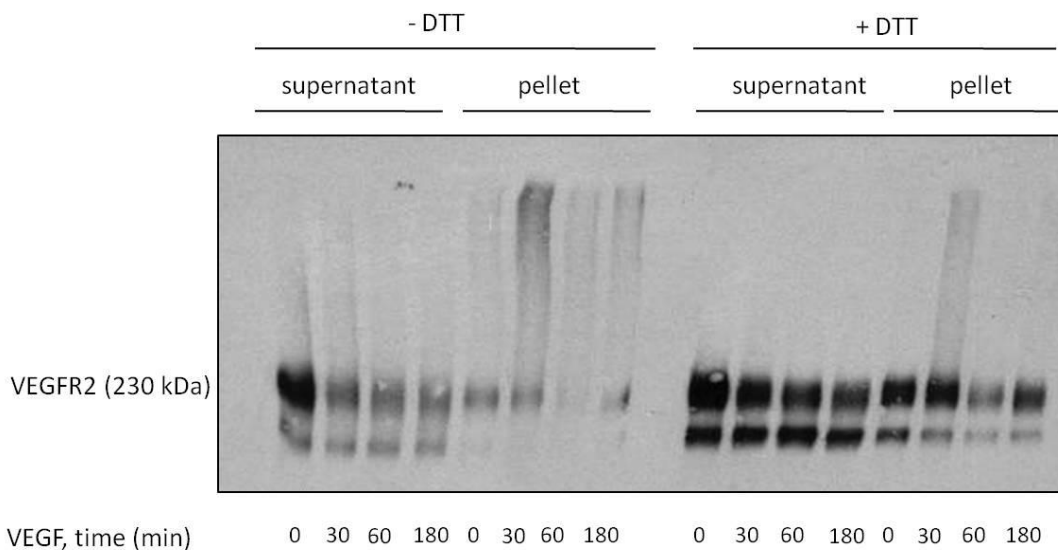


Εικόνα 3. Υποκυττάριος εντοπισμός του VEGFR2 στο Golgi. Κύτταρα HUVE (control) καλλιεργήθηκαν σε υάλινες καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε διαδικασία έμμεσου ανοσοφθορισμού και ακόλουθη χρώση με πολυκλωνικά αντισώματα αίγας έναντι του εξωκυτταρικού τμήματος του VEGFR2 (20-764 αμινοξέα) ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με φθοριόχρωμα Alexa 488 καθώς και έναντι του πρωτεϊνικού δείκτη TGN46 για το Golgi (άσπρο πλαίσιο, σε μεγέθυνση κάτω) ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συνδεδεμένο με φθοριόχρωμα Alexa 594 (ευγενική προσφορά από Ζωγράφου Σοφία, αδημοσίευτη εργασία).

Οι παραπάνω παρατηρήσεις, σύμφωνα με τις οποίες ο VEGFR2 συσσωρεύεται στο Golgi, οδηγούν στον εξής προβληματισμό. Είναι γνωστό ότι οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες που ακολουθούν το μονοπάτι από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) προς το Golgi, προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, μονοπάτι που ακολουθεί και ο νεοσυντιθέμενος VEGFR2, αναδιπλώνονται εντός του αυλού του ΕΔ. Οι σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες εξέρχονται από το ΕΔ και συνεχίζουν προς το Golgi, ενώ οι πρωτεΐνες που δεν αναδιπλώνονται ορθά παραμένουν στο ΕΔ έως ότου πάρουν την σωστή αναδίπλωση. Έτσι, είναι σύνηθες οι νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες να συσσωρεύονται στο ΕΔ. Η διαλογή μεταξύ των πρωτεϊνών που δεν έχουν αναδιπλωθεί σωστά και εκείνων που έχουν ορθή διαμόρφωση πραγματοποιείται από το σύστημα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών του ΕΔ (ER quality control system). Ωστόσο, αφότου αποχωρήσει μια πρωτεΐνη από το ΕΔ, δεν υπάρχει άλλο διαμέρισμα συγκράτησής της. Έτσι, όσες πρωτεΐνες εισέλθουν στο Golgi, εξέρχονται από αυτό χωρίς καθυστέρηση (αντίθετα με το ΕΔ, όπου, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, είναι σύνηθες να εμφανίζεται συσσώρευση πρωτεϊνών). Με βάση τα παραπάνω, είναι απρόσμενο το γεγονός ότι ο VEGFR2 συσσωρεύεται στο Golgi (Manickam et al., 2010 και Εικόνα 3). Είναι ωστόσο πιθανό η συσσώρευση του VEGFR2 στο Golgi να οφείλεται στην δημιουργία ολιγομεριακών συμπλόκων, είτε μεταξύ ιδίων μορίων του VEGFR2 (τα σύμπλοκα αυτά πιθανά σχηματίζονται στο ΕΔ λόγω ανεπαρκούς διαμόρφωσης και ξεφεύγουν από το σύστημα ελέγχου ποιότητας πρωτεϊνών και μεταναστεύουν στο Golgi) ή/και με άλλα μόρια του Golgi. Τα σύμπλοκα αυτά, πιθανά λόγω μεγέθους, ενδέχεται να μην χωρούν να εισέλθουν στα εκκριτικά κυστίδια που σχηματίζονται στο Golgi, γεγονός που μπορεί να οδηγεί στην συσσώρευσή τους στο διαμέρισμα αυτό. Οπότε, προκειμένου να ελέγξουμε αν η συσσώρευση του VEGFR2 στο Golgi (Εικόνες 2, 3) οφείλεται σε ανεπαρκή διαμόρφωση, ή/και σε σχηματισμό πρωτεϊνικών συμπλόκων μεγάλου μοριακού βάρους, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανάλυσης του μοριακού βάρους του VEGFR2 με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE απουσία ή παρουσία DTT, και ανίχνευση της πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση. Το DTT διασπά του δισουλφιδικούς δεσμούς ομο- και ετερο- μοριακών συμπλόκων που δημιουργούνται στο ΕΔ, οπότε χρησιμεύει στην ανίχνευση ολιγο- ή πολυμοριακών συμπλόκων που σχηματίζονται στο εκκριτικό μονοπάτι. Για το σκοπό αυτό, κύτταρα HUVE σε ηρεμία ή μετά από επώαση με VEGF, υπέστησαν λύση με επώαση με το απορρυπαντικό Triton X-100, υποβλήθηκαν σε υπερφυγοκέντρηση (τα σύμπλοκα μεγάλου μοριακού βάρους αναμένεται να κατανέμονται στο ίζημα) και αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4, στο δείγμα κυττάρων σε

ηρεμία, απουσία DTT, δεν ανιχνεύθηκαν σύμπλοκα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο του μονομερούς VEGFR2 (230 kDa) ούτε στο υπερκείμενο (supernatant) αλλά ούτε και στο ίζημα (pellet) των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Συνεπώς, η συσσώρευση του VEGFR2 στο Golgi (Εικόνα 2) δεν οφείλεται σε δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων μεγάλου μοριακού βάρους.

Η επαγωγή με VEGF για 30 λεπτά προκάλεσε την εκ νέου σύνθεση του VEGFR2 (Εικόνα 4 και Manickam et al., 2010), όπως φαίνεται από την δημιουργία συμπλόκων μεγάλου μοριακού βάρους (βλέπε -DTT, Pellet, 30 min VEGF). Ωστόσο, παρά τη σύνθεση νέων μορίων VEGFR2, η συνολική ποσότητα του VEGFR2 δεν αυξάνεται, γεγονός που πιθανότατα οφείλεται στο ότι, παράλληλα με τη σύνθεση νέων μορίων VEGFR2, επάγεται η ενδοκυττάρωση μορίων του VEGFR2 της κυτταροπλασματικής μεμβράνης τα οποία οδηγούνται προς αποικοδόμηση στο λυσόσωμα (Bruns et al., 2010; Duval et al., 2003; Ewan et al., 2006; Gaengel & Betsholtz, 2013). Με βάση όσα γνωρίζουμε για τη βιοσύνθεση και αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ΕΔ (Braakman I & Hebert, DN., 2013), η παρουσία των συμπλόκων του VEGFR2 στο ίζημα και η μείωση της ποσότητάς τους μετά από επώαση με DTT καταδεικνύει ότι τα νεοσυντιθέμενα μόρια του VEGFR2 (μετά την επαγωγή με VEGF) δεν έχουν ακόμη λάβει τη σωστή τριτοταγή διαμόρφωση, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σύμπλοκα με δισουλφιδικούς δεσμούς εντός του ΕΔ. Με την πάροδο του χρόνου, η πρωτεΐνη λαμβάνει την σωστή διαμόρφωση, διασπώνται τα ολιγομερή και εξέρχεται από το ΕΔ. Από όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι, πέρα από την δημιουργία των αναμενόμενων ολιγομοριακών συμπλόκων που σχηματίζουν τα νεοσυντιθέμενα μόρια του VEGFR2 στο ΕΔ, η συσσώρευση του VEGFR2 στο Golgi δεν οφείλεται στη δημιουργία αδιάλυτων συμπλόκων μεγάλου μοριακού βάρους.



Εικόνα 4. Έλεγχος σχηματισμού αδιάλυτων συμπλόκων του *VEGFR2*, πριν και μετά από την επαγωγή κυττάρων *HUVE* με *VEGF*. Κύτταρα *HUVE* σε ηρεμία ή μετά από επαγωγή με *VEGF* για 30, 60, 180 λεπτά, λύθηκαν με διάλυμα που περιείχε Triton X-100 και υπερφυγοκεντρήθηκαν στα 100.000g. Μέρος του δείγματος από το υπερκείμενο και το ίζημα αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (*SDS-PAGE*) και ανοσοαποτύπωση κατά *Western* με μονοκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του *VEGFR2*. Παρατηρείστε ότι σε συνθήκες ηρεμίας, δεν εμφανίζονται μεγαλομοριακά σύμπλοκα του υποδοχέα. Αντίθετα, μετά από επαγωγή με *VEGF* για 30 λεπτά, παράγονται μεγάλου μοριακού βάρους σύμπλοκα του *VEGFR2* (βλέπε pellet -*DTT*/*+DTT*), τα οποία είναι συμβατά με τη *VEGF*-επαγόμενη σύνθεση του *VEGFR2* (Manickam et al., 2010) και τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στο *ΕΔ*.

3.2. Ο ρόλος των διαφορετικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του *VEGFR2* στην επαγόμενη από *VEGF* εξωκυττάρωση των *WPBs*

Τα κύρια μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του *VEGFR2* είναι το μονοπάτι της κλαθρίνης και της μακροπινικοκυττάρωσης (Basagianis et al., 2016). Η εσωτερίκευση του *VEGFR2* είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων *ERK1/2* και *Akt* (Basagianis et al., 2016). Ωστόσο, παραμένει άγνωστο, αν απαιτείται η ενδοκυττάρωση του *VEGFR2* προκειμένου ο υποδοχέας να μεταβιβάσει σήματα ενεργοποίησης της έκκρισης των *WPBs*. Προκειμένου να διερευνηθεί η σημασία της ενδοκυττάρωσης του *VEGFR2* στην επαγόμενη από *VEGF* εξωκυττάρωση των *WPBs*, πραγματοποιήθηκε αναστολή των διαφορετικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του *VEGFR2* με χρήση χημικών αναστολέων και ειδικών *siRNAs* έναντι των πρωτεϊνών-ρυθμιστών των δύο βασικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα. Συγκεκριμένα για την αναστολή του καθενός μονοπατιού ξεχωριστά χρησιμοποιήθηκαν:

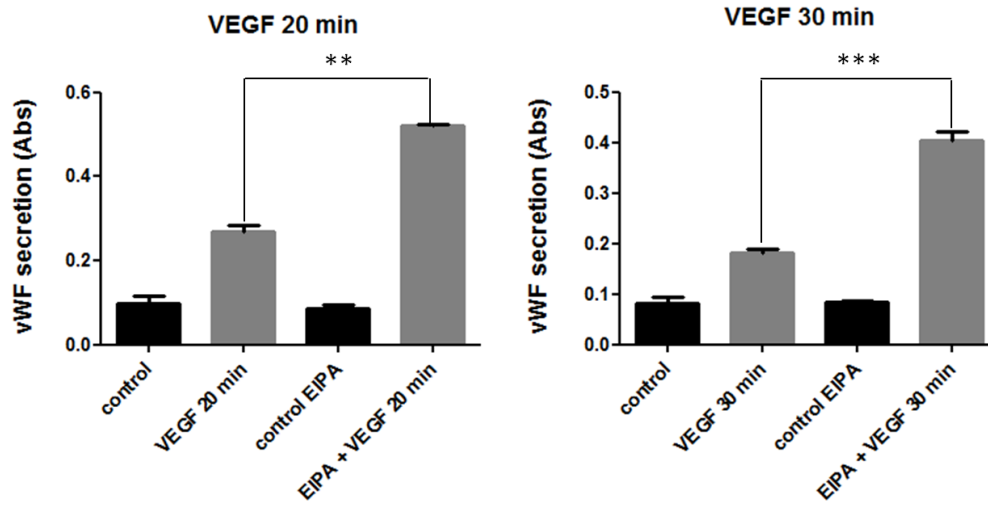
- αναστολέας EIPA και siRNAs εναντίον της Rabankyrin5, CDC42 (για την αναστολή της μακροπυκνωτικής),
- αναστολέας dyngo-4a (για την αναστολή της ενδοκυττάρωσης μέσω της κλαθρίνης).

Η επίπτωση του χειρισμού των μονοπατιών αυτών στην επαγόμενη από VEGF έκκριση των WPBs, προσδιορίστηκε με μεθοδολογία ELISA, μέσω μέτρησης του εκκρινόμενου vWF (βλέπε αποτελέσματα στις επόμενες παραγράφους).

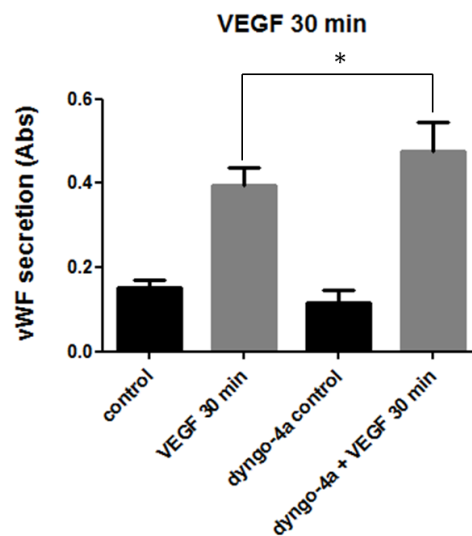
3.2.1. Αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 με χρήση χημικών αναστολέων και μελέτη της επίδρασης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs

Ο ρόλος των διαφορετικών οδών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 ελέγχθηκε αρχικά με χρήση χημικών αναστολέων. Συγκεκριμένα, η αναστολή της μακροπυκνωτικής του VEGFR2 πραγματοποιήθηκε με χρήση του χημικού αναστολέα EIPA, ενός κοινού αναστολέα της μακροπυκνωτικής (Commisso et al., 2014; Kerr and Teasdale, 2009; Koivusalo et al., 2010; Kuhling and Schelhaas, 2014) ενώ ο αναστολέας dyngo-4a (McCluskey et al., 2013; Robertson et al., 2014) χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της διαμεσολαβούμενης μέσω κλαθρίνης οδού ενδοκυττάρωσης. Τα αποτελέσματα της Εικόνας 5A αποδεικνύουν **σημαντική αύξηση του εκκρινόμενου vWF στα 20 και 30 λεπτά ενεργοποίησης με VEGF, παρουσία του αναστολέα EIPA. Ο χημικός αναστολέας dyngo-4a φαίνεται να αυξάνει επίσης, στατιστικά σημαντικά, την επαγόμενη έκκριση του vWF μετά από χρόνο 30 λεπτών ενεργοποίησης με VEGF (Εικόνα 5B), αλλά η αύξηση αυτή είναι πολύ μικρότερης έκτασης σε σχέση με τον αναστολέα EIPA.**

A.



B.



Εικόνα 5. Επίδραση της αναστολής της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην VEGF επαγόμενη έκκριση του vWF. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 2 ώρες, επώαστηκαν με τους αναστολείς EIPA (A) και dyngo-4a (B) για 20 λεπτά και ακολούθως ενεργοποιήθηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για 20 (A) και 30 (A, B) λεπτά, παρουσία των αναστολέων. Η μέτρηση του εκκρινόμενου vWF πραγματοποιήθηκε με δοκιμασία ELISA. Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από n=3 (A) και n=2 (B) ανεξάρτητα πειράματα και η στατιστική ανάλυση έγινε με t-test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Στην παρούσα μελέτη, για τη μελέτη του ρόλου του μονοπατιού της κλαθρίνης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs, δεν χρησιμοποιήθηκε ο χημικός αναστολέας dynasore, που αποτελεί τον πιο γνωστό αναστολέα της πρωτεΐνης δυναμίνη (Macia et al., 2006), η οποία συμμετέχει στο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης μέσω κλαθρίνης (McMahon and Boucrot, 2011; Schmid & Frolov, 2011). Ο αναστολέας αυτός, αν και είναι ο πιο γνωστός στο πεδίο, με περισσότερες από 3.000 αναφορές στη βάση Google Scholar, αποκλείστηκε από την παρούσα μελέτη διότι, πέρα από αναστολή στο μονοπάτι της κλαθρίνης, προκαλεί μη εξειδικευμένη αναστολή της VEGF-επαγόμενης έκκρισης του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} (off-target effect) (Basagiannis et al., 2017), το οποίο είναι απαραίτητος διαμεσολαβητής στην σηματοδότηση της εξωκυττάρωσης (Goligorsky et al., 2009; Lorenzi et al., 2008; McCormack et al., 2017; Rondaij et al., 2006).

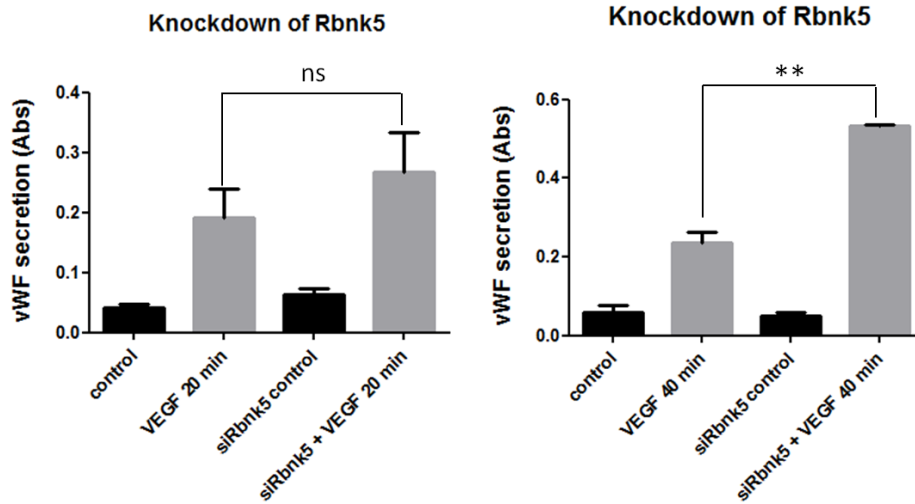
Από τα παραπάνω, με βάση τα αποτελέσματα με χρήση χημικών αναστολέων, συμπεραίνεται ότι η αναστολή του μονοπατιού της μακροπινוקυττάρωσης επιφέρει σημαντική αύξηση της εξωκυττάρωσης, ενώ η αναστολή του μονοπατιού της κλαθρίνης έχει πολύ μικρότερη επίπτωση.

3.2.2. Αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 με πειράματα αποσιώπησης (siRNAs) και μελέτη της επίδρασης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs

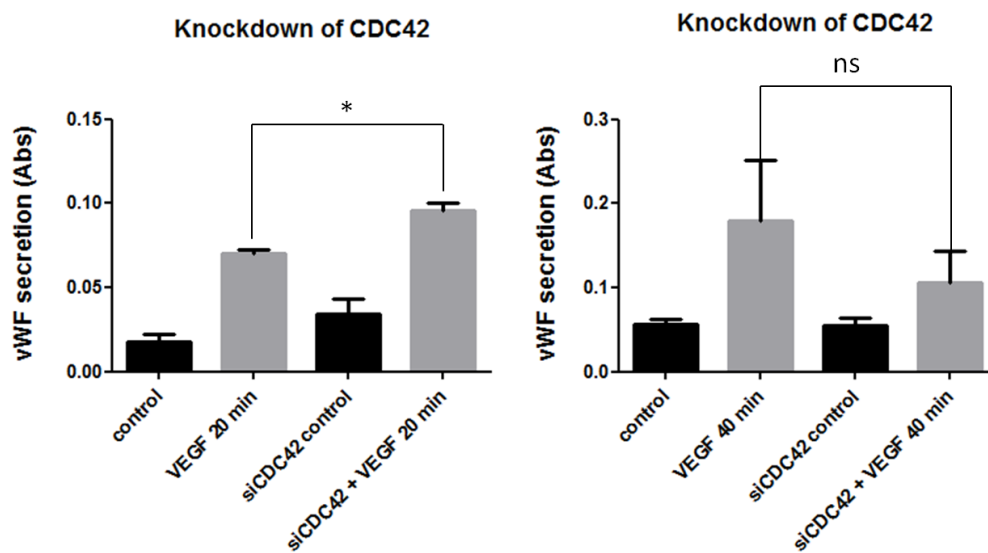
Με βάση τα πειράματα της προηγούμενης παραγράφου, η μακροπινוקυττάρωση φαίνεται να έχει τον πρώτο λόγο στον έλεγχο της επαγόμενης έκκρισης. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από τη χρήση χημικών αναστολέων, οι οποίοι είναι δυνατό να επηρεάζουν μη ειδικούς στόχους (off-target effect) (Ivanov, 2008; Ivanov, 2014). Έτσι, προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τον ρόλο της μακροπινוקυττάρωσης στην έκκριση των WPBs, χρησιμοποιήσαμε ειδικά siRNAs έναντι γνωστών ρυθμιστών του μονοπατιού αυτού. Ως μόρια στόχους επιλέξαμε την Rabankyrin-5 (Schnatwinkel et al., 2004) και την CDC42 (Chen et al., 1996; Fiorentini et al., 2001; Garrett et al., 2000; Koivusalo et al., 2010), που είναι γνωστοί ρυθμιστές του μονοπατιού της μακροπινוקυττάρωσης. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 6A, η αποσιώπηση της Rabankyrin-5 προκαλεί σημαντική αύξηση της έκκρισης του vWF, μετά από 40 λεπτά επαγωγής με VEGF. Ομοίως, η αποσιώπηση της CDC42 προκάλεσε αύξηση στο ποσοστό της έκκρισης του vWF (Εικόνα 6B). Ωστόσο, στην περίπτωση της αποσιώπησης της CDC42, η αύξηση της έκκρισης

παρατηρήθηκε μετά από επαγωγή με VEGF για μικρότερο χρόνο (20 λεπτά), ενώ η επαγωγή για 40 λεπτά δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό έκκρισης του vWF.

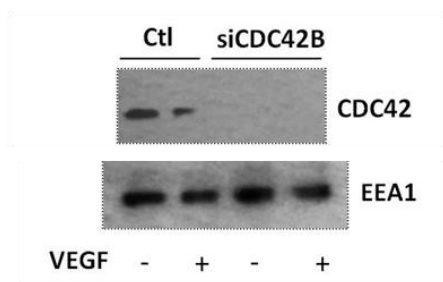
A.



B.

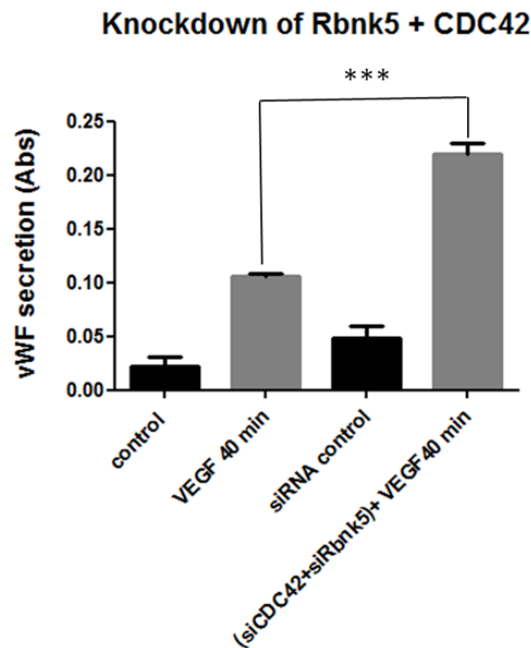


Γ.



Εικόνα 6. Επίδραση της αναστολής της μακροπinoκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs. A,B) Η μελέτη της αναστολής της μακροπinoκυττάρωσης μελετήθηκε με αποσιώπιση των πρωτεϊνών Rabankyrin-5 και CDC42 με χρήση siRNAs (με αλληλουχίες στόχευσης RbnkA και CDC42B) για 72 ώρες. Ακολούθως τα κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 2 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για 20 και 40 λεπτά. Η μέτρηση της απορρόφησης για τον εκκρινόμενο vWF πραγματοποιήθηκε στα 492 nm με δοκιμασία Elisa. Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από τον έλεγχο n=2 ανεξάρτητων πειραμάτων και η στατιστική ανάλυση έγινε με t-test (*P<0.05, **P<0.01, ns, not significant). Γ) Ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώνει την επιτυχή αποσιώπιση του γονιδίου της CDC42 (siRNA CDC42B) σε τελική συγκέντρωση 20 nM, για 72 ώρες επώασης. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα anti-CDC42 και anti-EEA1 ως μάρτυρας ισοφόρτωσης συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση. Τα δεδομένα αναφέρονται σε κύτταρα ελέγχου (control, ctl) αλλά και σε επαγόμενα με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml). Η αποσιώπιση των πρωτεϊνών Rabankyrin-5 και CDC42 με χρήση siRNAs πραγματοποιήθηκε σε παράλληλα πειράματα, αλλά λόγω κακής ποιότητας του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης Rabankyrin-5 σε δοκιμασία Western blot, τα δεδομένα παραλείπονται.

Επιπλέον, ελέγξαμε την επίπτωση στην εξωκυττάρωση από την συνδυαστική αποσιώπιση (με χρήση siRNAs) των Rabankyrin-5 και CDC42. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, η ταυτόχρονη αποσιώπιση των δύο παραπάνω ρυθμιστών της μακροπinoκυττάρωσης, προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση της VEGF-επαγόμενης έκκρισης των WPBs. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα παραπάνω δεδομένα (Εικόνα 6 A,B) και επιβεβαιώνουν τον **ανασταλτικό ρόλο της μακροπinoκυττάρωσης στην εξωκυττάρωση των WPBs.**



Εικόνα 7. Επίδραση της αναστολής της μακροπinoκυττάρωσης του VEGFR2, με διπλή αποσιώπηση των πρωτεϊνών Rabankyrin-5 και CDC42, στην επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs. Κύτταρα HUVE επώαστηκαν με siRNAs έναντι των πρωτεϊνών Rabankyrin-5 και CDC42 για 72 ώρες. Ακολούθως τα κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 2 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) για 40 λεπτά. Η μέτρηση της απορρόφησης για τον εκκρινόμενο vWF πραγματοποιήθηκε με δοκιμασία ELISA. Τα αποτελέσματα που απεικονίζονται προέρχονται από n=2 ανεξάρτητα πειράματα και η στατιστική ανάλυση έγινε με t-test (***)*P*<0.001).

Συνολικά, τα παραπάνω πειράματα καταδεικνύουν ότι, ενώ το μονοπάτι της κλαθρίνης έχει μόνο μια μικρή επίδραση στην εξωκυττάρωση, η μακροπinoκυττάρωση έχει σημαντικό ανασταλτικό ρόλο.

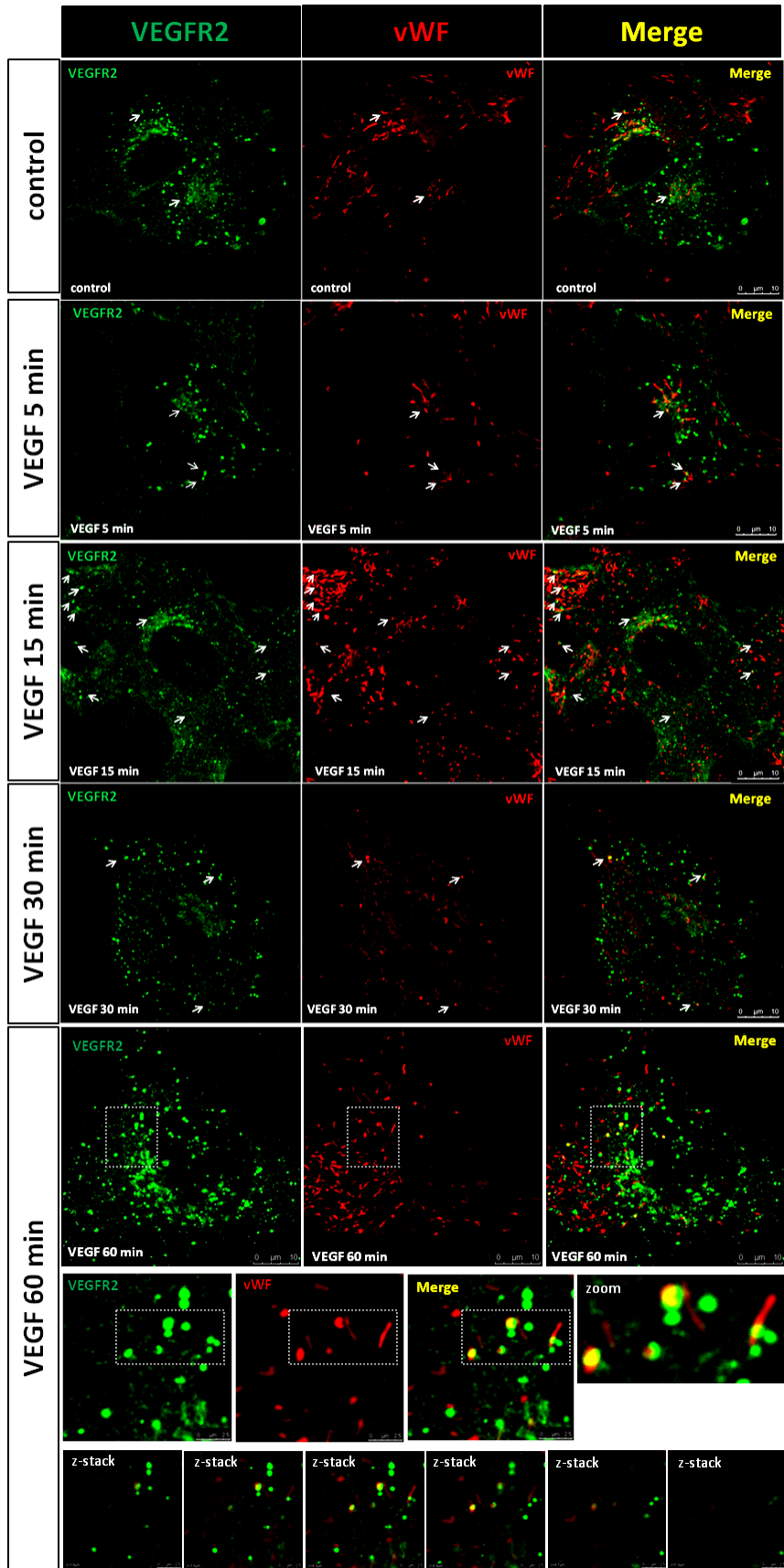
3.3. Ταυτόχρονη ιχνηλάτηση της διακίνησης του VEGFR2 και της εξωκυττάρωσης των WPBs

Προκειμένου να προσεγγίσουμε περισσότερο την σχέση μεταξύ της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και της VEGF-επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs, πραγματοποιήσαμε πειράματα μελέτης της υποκυτταρικής θέσης του VEGFR2 συγκριτικά με την τοποθεσία των WPBs, σε κύτταρα HUVEC, μετά από επώαση με VEGF για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (ενδεικτικά αναφέρονται 5, 15, 30, 60 λεπτά). Ο

υποκυτταρικός εντοπισμός του VEGFR2 καθώς και των WPBs, πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (Laser Scanning Confocal Microscopy, LSCM).

Η ανάλυση των εικόνων από μονιμοποιημένα κύτταρα κατέδειξε πως, μόνο ένας πολύ μικρός αριθμός ενδοσωμάτων του VEGFR2 βρίσκονται σε φυσική αλληλεπίδραση με τα WBPs, σε όλα τα υπό μελέτη χρονικά διαστήματα επαγωγής με VEGF (Εικόνα 8).

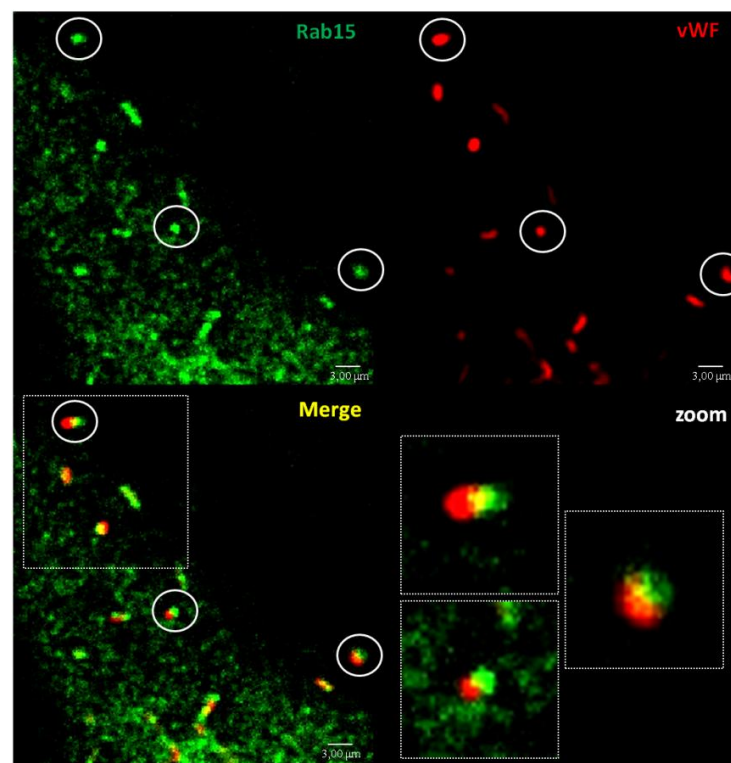
Αν και δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμη η στατιστική επεξεργασία των παρακάτω αποτελεσμάτων, επειδή τα παρακάτω αποτελέσματα αποτελούν αντιπροσωπευτικές εικόνες των δειγμάτων του πειράματος οδηγούμαστε στο πρωταρχικό συμπέρασμα ότι οι επαφές μεταξύ των ενδοσωμάτων και των WPBs είναι μια χρονο-εξαρτώμενη διαδικασία.



Εικόνα 8. Περιορισμένος αριθμός ενδοσωμάτων που περιλαμβάνουν τον VEGFR2 αλληλεπιδρά με τα WPBs. Κότταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό M199 απουσία ορού για 2 ώρες και

ακολούθως επωάστηκαν με VEGF για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (ενδεικτικά αναφέρονται 5, 15, 30, 60 λεπτά). Συνεστιακή μικροσκοπική ανάλυση σε μονιμοποιημένα κύτταρα αναδεικνύει τις επαφές μεταξύ των VEGFR2-θετικών ενδοσωμάτων (χρώση με πολυκλωνικό αντισώματα αίγας έναντι της εξωκυττάριας περιοχής του), ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 (πράσινο χρώμα) με τα WPBs (χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος έναντι του vWF), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594 (κόκκινο χρώμα). Με βέλη απεικονίζονται οι επαφές των εν λόγω οργανιδίων. Στο χρόνο επαγωγής των 60 λεπτών με VEGF, παρουσιάζονται σε μεγένθυση οι υποπεριοχές αλληλεπίδρασης των VEGFR2-θετικών ενδοσωμάτων με τα WPBs (άσπρο πλαίσιο,) καθώς και οι επαφές (contact sites) του ενδοκυτταρωμένου VEGFR2 με τα WPBs της υπό μεγένθυση περιοχής σε ένα σύνολο διαφορετικών εικόνων από κατακόρυφες εγκάρσιες τομές του κυττάρου σε επίπεδο z (z-stacks). Ο έλεγχος των επαφών πραγματοποιήθηκε σε $n > 3$ ανεξάρτητα πειράματα για τους χρόνους επαγωγής των 30 και 60 λεπτών με VEGF και σε ένα ανεξάρτητο πείραμα για τους μικρότερους χρόνους (5,15 λεπτά).

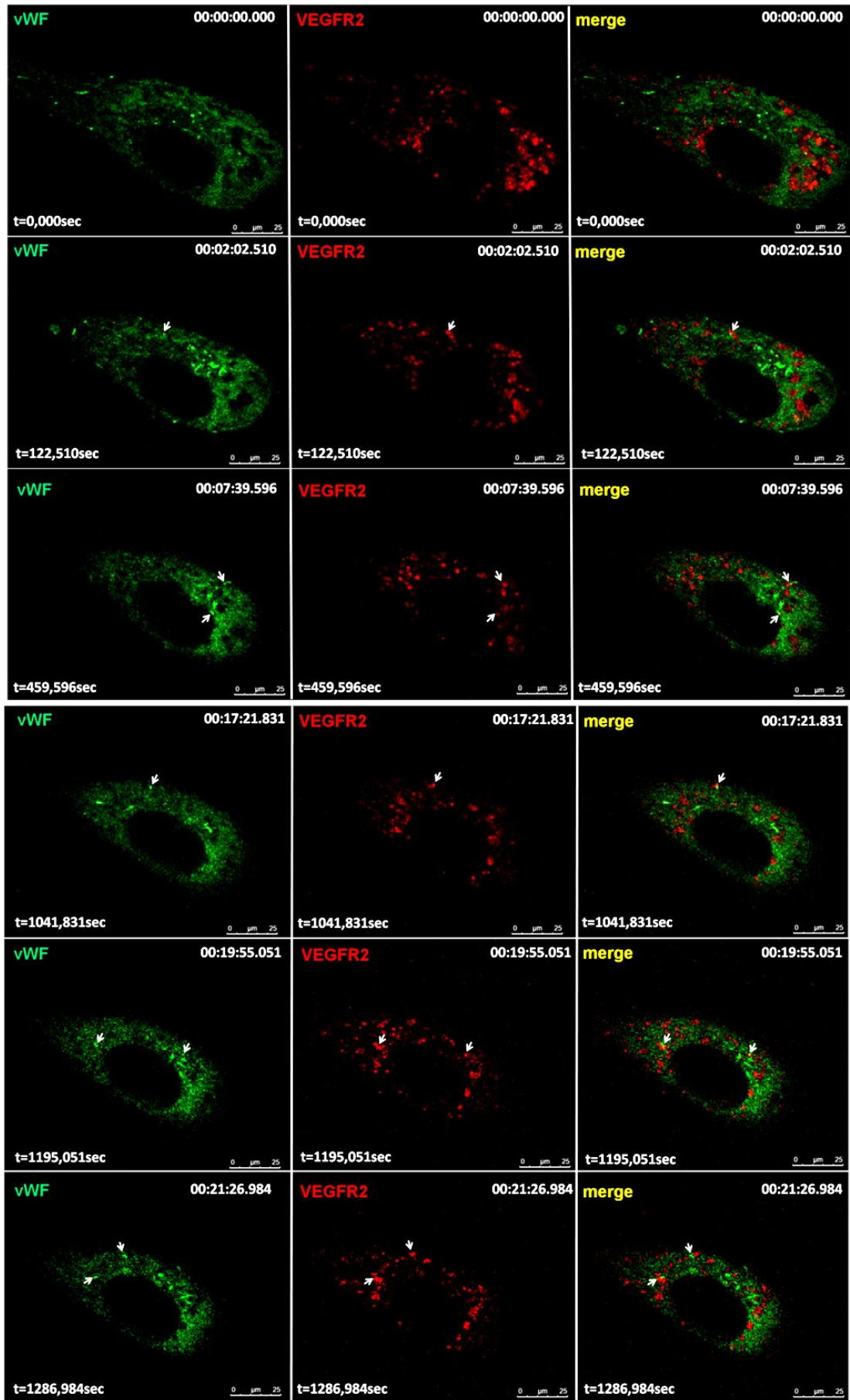
Τέλος, μια ακόμη παρατήρηση από μία πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας (Δέσποινα Γκέκα, Διδακτορική Διατριβή, 2019) επιβεβαιώνει την φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοσωμάτων με τα WPBs. Στη μελέτη αυτή, βρέθηκε ότι η αποσιώπηση της Rab27 έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση των επαφών μεταξύ της ενδοσωματικής Rab15 με τα WPBs (Εικόνα 9).

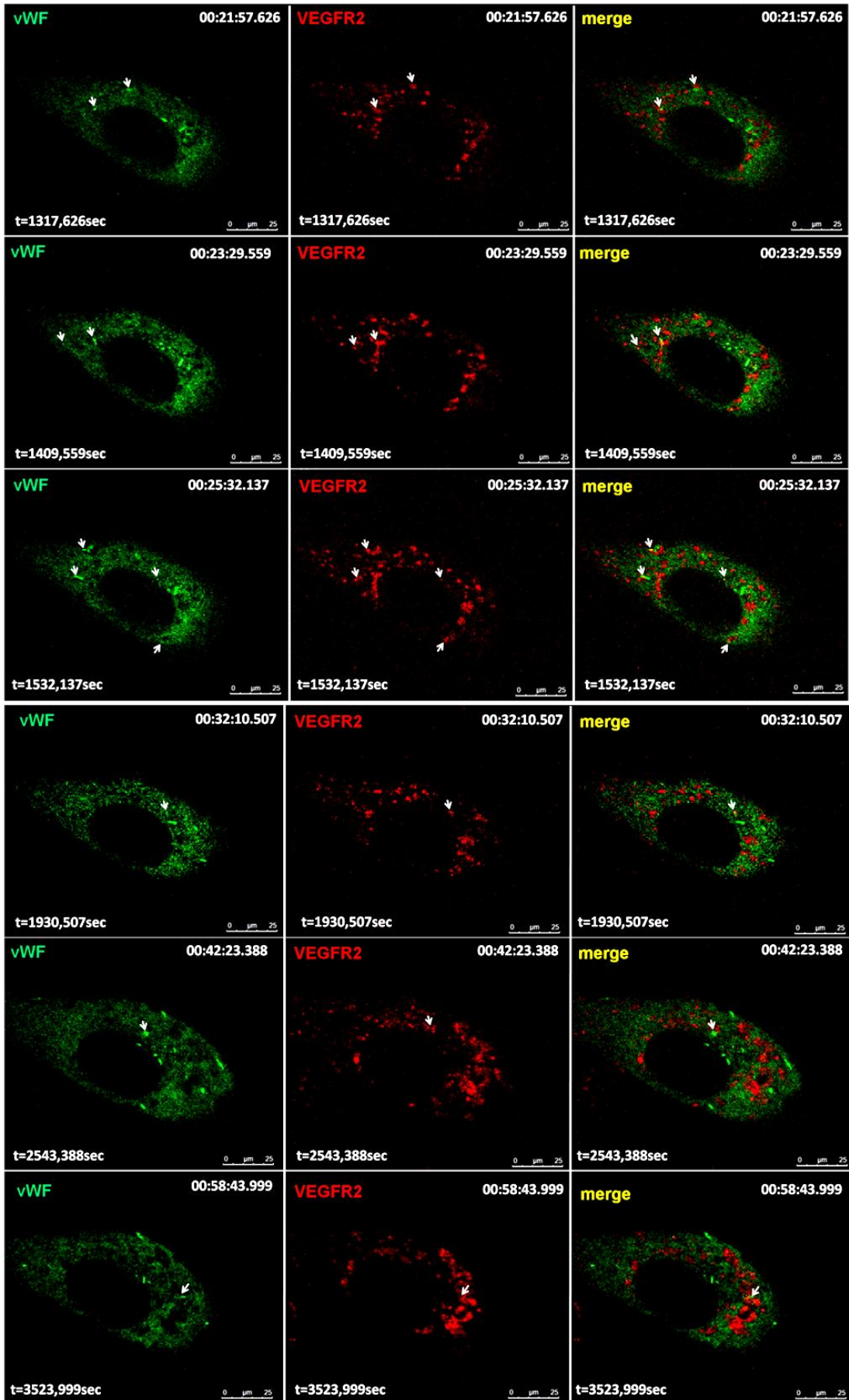


Εικόνα 9. Αλληλεπίδραση της ενδοσωματικής Rab15 με τα WPBs. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με siRNA ολιγονουκλεοτίδια έναντι της Rab27a (για 72 ώρες) και 24 ώρες μετά, με πλασμίδιο έκφρασης της Rab15-EGFP. Μετά την πάροδο 48 ωρών από την υπερέκφραση της Rab15-EGFP, τα κύτταρα επωάστηκαν με PMA (100 ng/ml) για 2 ώρες, πλύθηκαν 2 φορές με πλήρες θρεπτικό M199 συμπληρωμένο με 20% εμβρυικό ορό βοός (FSC) και επωάστηκαν με το ίδιο θρεπτικό για 5 ώρες και 30 λεπτά. Για την ενδοκυτταρικό εντοπισμό των πρωτεϊνών Rab15 και vWF χρησιμοποιήθηκαν

το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της EGFP, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 488 και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόδος, έναντι του vWF, ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 594. Τα σημεία επαφών της Rab15 με τα WPBs επισημαίνονται με κύκλους. Στα διακεκομμένα πλαίσια παρουσιάζονται υπό μεγέθυνση οι περιοχές αυτών (Δέσποινα Γκέκα, Διδακτορική Διατριβή, 2019).

Επειδή η φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοσωμάτων και των WPBs μπορεί να είναι μια δυναμική διαδικασία, που ίσως διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα, διερευνήσαμε περαιτέρω την έκταση των φυσικών επαφών μεταξύ ενδοσωμάτων που περιέχουν τον VEGFR2 και των WPBs, με μικροσκοπία πραγματικού χρόνου, σε ζωντανά κύτταρα, μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF. Για την ταυτόχρονη ιχνηλάτηση του VEGFR2 και των WPBs, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με πλασμίδιο έκφρασης του VEGFR2-mCherry και με το προπεπτίδιο vWF-EGFP. Από την ανάλυση των εικόνων της βίντεο μικροσκοπίας, παρατηρήθηκαν σημεία επαφών (contact sites) μεταξύ των κυστιδίων θετικών για τον VEGFR2 και των WPBs, σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση (Εικόνα 10). **Οι πρώτες επαφές παρατηρήθηκαν σε χρόνο $t=2$ λεπτά ($t=122,510$ sec) ενεργοποίησης με VEGF, ενώ ο αριθμός των επαφών αυξάνεται σε χρόνο $t=25$ λεπτών ($t=1532,137$ sec). Περιορισμένες επαφές παρατηρήθηκαν και σε πιο όψιμα στάδια ενεργοποίησης με VEGF (π.χ. σε χρόνους $t=42$ λεπτά/ $t=2543,388$ sec και $t=58$ λεπτά/ $t=3523,999$ sec) (Εικόνα 10).** Τα παραπάνω, συμφωνούν με τα αποτελέσματα που πραγματοποιήθηκαν σε μονιμοποιημένα κύτταρα, όπου παρατηρήθηκαν περιορισμένες επαφές μεταξύ των VEGFR2/ενδοσωμάτων και των WPBs. Μάλιστα, στα μονιμοποιημένα κύτταρα, ο αριθμός των επαφών μεταξύ των υπό μελέτη οργανιδίων, ήταν αυξημένος μετά από 15 λεπτά επώασης με VEGF, συγκριτικά με μικρότερους (2-5 λεπτά) ή με μεγαλύτερους (30-60 λεπτά) χρόνους επαγωγής (Εικόνα 8).





Εικόνα 10. Συνεστιακή μικροσκοπία πραγματικού χρόνου επιβεβαιώνει τις περιορισμένες επαφές του ενδοκυτταρωμένου VEGFR2 με τα WPBs, μετά από επαγωγή με VEGF. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με τους πλασμιδιακούς φορείς vWF proreptide-EGFP και VEGFR2-mCherry και 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, ακολούθησε ενεργοποίηση της εξωκυττάρωσης των WPBs με VEGF₁₆₅ (50 ng/ml). Ο συνεντοπισμός μεταξύ VEGFR2 και vWF αναλύθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία πραγματικού χρόνου. Οι εικόνες παρουσιάζουν στιγμιότυπα της ανάλυσης αυτής, όπου απεικονίζεται ένα ενδοθηλιακό κύτταρο σεσημασμένο με VEGFR2-mcherry (κόκκινο) και vWF (πράσινο) καθώς και τα σημεία επαφών (κίτρινο, βέλη). Η καταγραφή της εξωκυττάρωσης πραγματοποιήθηκε για 1 ώρα. Οι φυσικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυστιδίων στα οποία εντοπίζεται ο VEGFR2 με τα WPBs είναι περιορισμένες, με μεγαλύτερη ωστόσο συχνότητα στο χρονικό διάστημα 25 λεπτών ενεργοποίησης με VEGF.

Το σύνολο των παραπάνω δεδομένων, υποδεικνύει πως υπάρχει φυσική αλληλεπίδραση των ενδοσωμάτων (που φέρουν τον VEGFR2) με τα WPBs, η οποία ωστόσο είναι περιορισμένη.

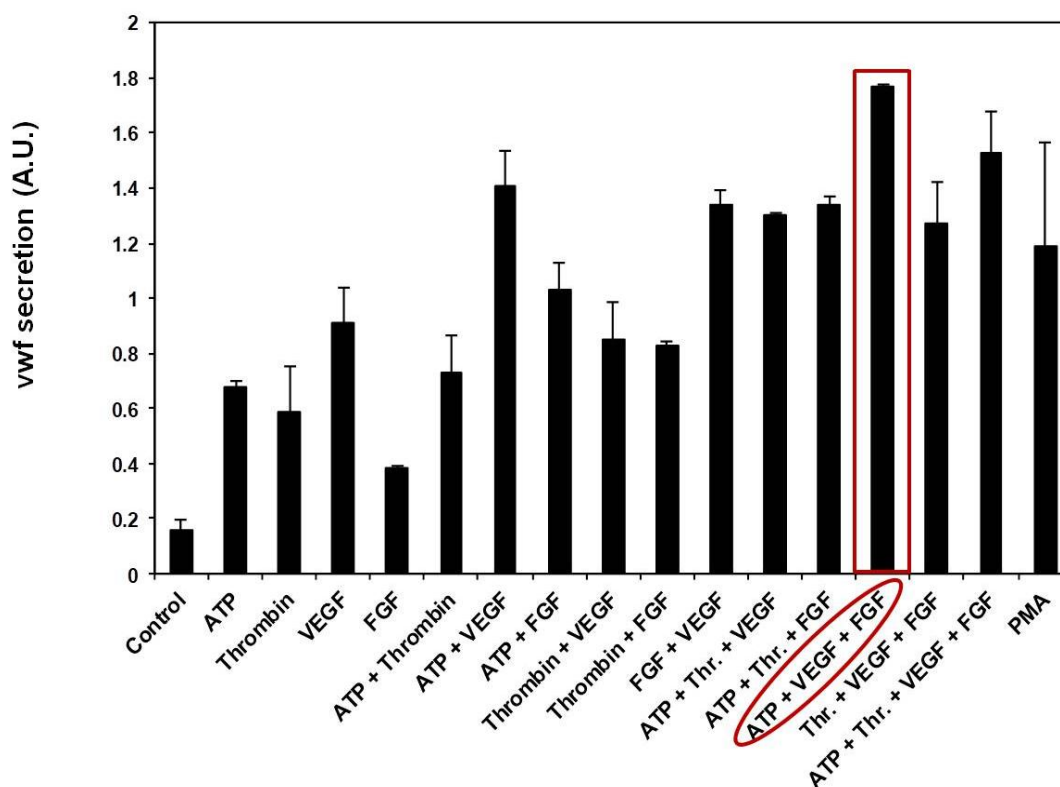
3.4. Πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων μορίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs)

Μέχρι σήμερα, έχει αναγνωριστεί μόνο ένα μέρος των εκκρινόμενων πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα WPBs. Για την καλύτερη κατανόηση της διασύνδεσης μεταξύ της μεταγωγής του σήματος του VEGF και της εξωκυττάρωσης των WPBs, αλλά και του ρόλου των WPBs στην φυσιολογία των αγγείων, παράλληλα πειράματα στο εργαστήριο είχαν ως στόχο την ταυτοποίηση του συνόλου των εκκρινόμενων πρωτεϊνών των WPBs. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών των WPBs, μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν, μέσω ταυτοποίησης των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, να προκύψουν μοριακές διασυνδέσεις μεταξύ της μεταγωγής τους σήματος του VEGF και της εξωκυττάρωσης των WPBs.

3.4.1. Εύρεση του ενεργοποιητή, ή συνδυασμού ενεργοποιητών, που παρουσιάζει την βέλτιστη απόδοση επαγωγής της έκκρισης των WPBs

Μεταξύ των διαφορετικών ενεργοποιητών της έκκρισης των WPBs (ATP, θρομβίνη, VEGF, bFGF) ο παράγοντας PMA (phorbol ester phorbol-12-myristate-13-acetate) αποτελεί έναν από τους πιο ισχυρούς (McCormack et al., 2017). Από πειράματα σύγκρισης διαφόρων ενεργοποιητών, ως προς την ικανότητά τους να επάγουν την έκκριση

των WPBs, προέκυψε ότι ο συνδυασμός VEGF/bFGF/ATP προκαλεί την μέγιστη δυνατή έκκριση, με απόδοση αντίστοιχη με αυτή του παράγοντα PMA (Zografou et al., 2012) (Εικόνα 11). Έτσι, για τα πειράματα πρωτεομικής ανάλυσης επιλέχθηκε η χρήση του συνδυασμού των παραγόντων VEGF/bFGF/ATP για την ενεργοποίηση της εξωκυττάρωσης των WPBs.

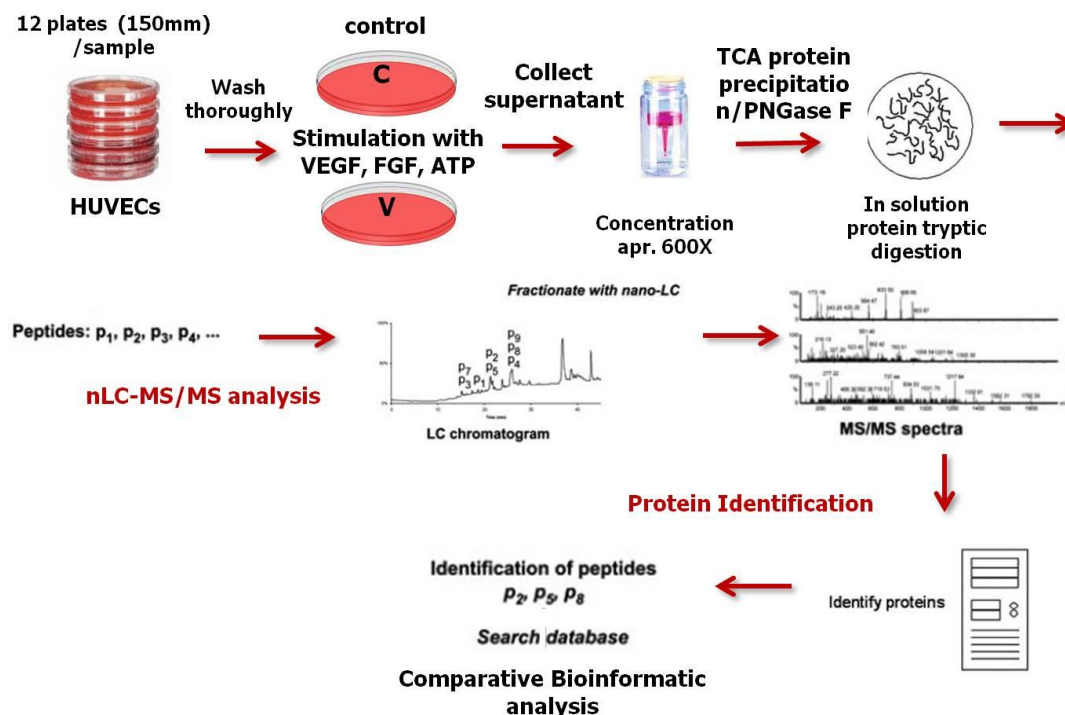


Εικόνα 11. Σύγκριση διαφόρων ενεργοποιητών, ή συνδυασμού αυτών, ως προς την ικανότητά τους να επάγουν την έκκριση των WPBs. «Κύτταρα HUVE, σε συρροή για 2 μέρες, ενεργοποιήθηκαν για 1 ώρα με τους παράγοντες ATP (100 μM), Thrombin (1 U/ml), VEGF (50 ng/ml), bFGF (15 ng/ml) και PMA (100 ng/ml), κατά μόνας, ή σε συνδυασμούς μεταξύ τους, και ο εκκρινόμενος vWF ποσοτικοποιήθηκε με ELISA και εκφράστηκε σε αυθαίρετες μονάδες. Με κόκκινο περίγραμμα έχει επισημανθεί ο συνδυασμός που επάγει τη βέλτιστη έκκριση» (Zografou et al., 2012).

3.4.2. Πρωτεομική ανάλυση σε ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs) μετά από ενεργοποίηση με VEGF/bFGF/ATP

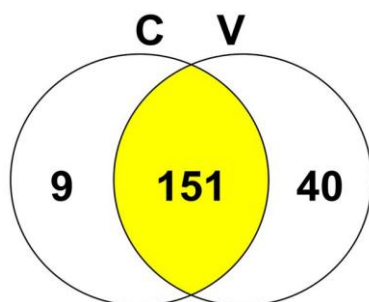
Για την ταυτοποίηση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών των WPBs, ακολουθήθηκε η πειραματική προσέγγιση που περιγράφεται σχηματικά στην Εικόνα 12. Η ανάλυση περιελάμβανε δύο μεγάλης κλίμακας ομάδες καλλιέργειας κυττάρων HUVE: κύτταρα

ελέγχου (control, C) και κύτταρα που επώστηκαν με VEGF/bFGF/ATP. Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα (gel-based) και ακολούθως ταυτοποιήθηκαν με φασματοσκοπία μάζας.



Εικόνα 12. Σχηματική αναπαράσταση του πειραματικού σχεδιασμού που πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών (πρωτεομική) σε διεγερμένα και μη ενδοθηλιακά κύτταρα (HUVECs). Μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες κυττάρων HUVE ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) / bFGF (15 ng/ml) / ATP (100 μM) για 1 ώρα ώστε να επαχθεί η εξοκυστική των WPBs (Zografou et al., 2012). Το υπερκείμενο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε και συμπυκνώθηκε με ειδικά φίλτρα έως 600 φορές και ακολούθως υποβλήθηκε σε κατακρήμνιση με Trichloroacetic acid (TCA). Η ίδια ποσότητα εκκρινόμενων πρωτεϊνών συλλέχθηκε και από δείγματα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή (control). Οι εκκρινόμενες πρωτεΐνες αναλύθηκαν σε πήκτωμα (gel-based) μετά την κατακρήμνιση με TCA και ακολούθως επώστηκαν με το ένζυμο Peptide N-glycosidase F (PNGase F), με στόχο την παραγωγή πεπτιδίων προς ανάλυση. Τα παραγόμενα πεπτίδια υποβλήθηκαν σε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας σε επίπεδο νανοκλίμακας, συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (nano LC-MS/MS) και η ταυτοποίηση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με εργαλεία Βιοπληροφορικής (συνεργασία μεταξύ της κ. Β. Λαζάνη, μέλος της ομάδα μας, και του κ. Μ. Αϊβαλιώτη, ΙΤΕ/IMBB, Ηράκλειο).

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι 40 πρωτεΐνες βρίσκονται ειδικά στο δείγμα των ενεργοποιημένων κυττάρων, σε σύγκριση με τα μη ενεργοποιημένα κύτταρα ελέγχου (βλέπε διάγραμμα Venn, Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Διάγραμμα Venn που απεικονίζει το σύνολο των κοινών εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε κύτταρα HUVE control (C) αλλά και επαγόμενων με VEGF/bFGF/ATP (V). Μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες κυττάρων HUVE χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: στην ομάδα C (control), τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα με θρεπτικό M199 και στην ομάδα V τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) / bFGF (15 ng/ml) / ATP (100 μM) επίσης για 1 ώρα, ώστε να προκληθεί η εξωκυττάρωση των WPBs. Τα αποτελέσματα του διαγράμματος Venn προέρχονται από την πειραματική προσέγγιση που περιγράφεται παραπάνω (Εικόνα 12). Από το σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, 151 πρωτεΐνες ήταν κοινές μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων (C, V). Από τις εν λόγω πρωτεΐνες 82 βρέθηκαν αυξημένες στην ομάδα V (η ανάλυση των δειγμάτων με φασματοσκοπία μάζας πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του κ. Αϊβαλιώτη, Μ., ΙΤΕ/ΙΜΒΒ, Ηράκλειο).

Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν και ο vWF, που όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, αποτελεί αντιπροσωπευτικό δείκτη των WPBs (McCormack et al., 2017; Rondaij et al., 2006; Valentijn et al., 2008, 2011; Wagner et al., 1982). Αυτό το εύρημα επιβεβαιώνει την ειδικότητα και την αξιοπιστία του πειραματικού πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε.

Για το σύνολο των πρωτεϊνών που βρέθηκαν εμπλουτισμένες στο δείγμα των ενεργοποιημένων κυττάρων, διερευνήθηκε με βιβλιογραφική ανάλυση αν σχετίζονται με εξωκυτταρική δράση. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1, για μεγάλο αριθμό των πρωτεϊνών αυτών, έχει ήδη αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι παρουσιάζουν σημαντική εξωκυτταρική δράση στο αγγειακό σύστημα, γεγονός που επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε.

Identified protein	General function	Extracellular Function	Reference
von Willebrand Factor (vWF)	<ul style="list-style-type: none"> Haemostasis/thrombosis, vascular tonicity, inflammation, angiogenesis 	<ul style="list-style-type: none"> Platelet adhesion and aggregation Stabilization of FVII Molecular carrier (ie, for FVIII, osteoprotegerin, galectins) Recruiter of platelets Interactions with receptors (ie, LRP1) 	<p>(Boulton et al., 1975) (Lenting et al., 2015) (McCormack et al., 2017) (Metcalf et al., 2008) (Michaux et al., 2006) (Rondaj et al., 2006)</p>
Galectin-1	<ul style="list-style-type: none"> Binding β-galactosides (particularly <i>N</i>-acetyllactosamine-containing glycans) Cell adhesion Inflammation Apoptosis Proliferation Differentiation 	<ul style="list-style-type: none"> Tumor Angiogenesis Cell-cell/ ECM interactions Intracellular signaling Interaction with cell surface receptors (ie VEGFR2, neuropilin) Tumor growth and transformation EC Migration 	<p>(Croci et al., 2014) (Cummings, R. D. et al., 2015) (D'Haene et al. 2013) (Hsieh et al. 2008) (Ito et al. 2011) (Rabinovich, G.A., 2005) (Thijssen et al. 2010)</p>
NRCAM, Neural-Cell Adhesion Molecule	<ul style="list-style-type: none"> Neural cell adhesion 	<ul style="list-style-type: none"> Angiogenesis, tumor progression Cell proliferation and motility Cell adhesion, ECM interactions 	<p>(Gower et al., 1988) (Bock et al., 1987) (Bussolati et al., 2006)</p>
Protein Disulfide-Isomerase (PDI)	<ul style="list-style-type: none"> Protein folding in the ER Molecular chaperone (preventing misfolding and aggregation of proteins) 	<ul style="list-style-type: none"> Integrin-dependent adhesion (ie platelet adhesion to collagen) Platelet aggregation and granule secretion Nitric oxide regulation Interactions with selectins (ie L-selectin, P-selectin in leukocytes) Virus-cell fusion Malignancy (B lymphocytes) 	<p>(DW Essex et al., 1995) (ESSEX, D. W., & LI, M., 1999) (Hotchkiss et al., 1998) (Jordan & Gibbins, 2006) (Lahav et al, 2000)(Ramachandran et al., 2001) (Ruoppolo et al., 1996) (Sullivan et al., 2003) (Täger et al., 1997)</p>
Peptidylprolyl isomerase A, Cyclophilin A	<ul style="list-style-type: none"> Protein folding in the ER Protein trafficking Protein interaction and activation 	<ul style="list-style-type: none"> Quality control system for stored proteins in exocytotic granules Secreted growth factor induced by oxidative stress (VSMC) Apoptosis Proinflammatory Proliferation and migration Chemotaxis (leukocytes) 	<p>(Colgan et al., 2005) (Jin et al., 2000) (Schonbrunner et al., 1992) (Song et al., 2011) (Takaki et al., 1997) (Walsh et al., 1992) (Xue et al., 2018)</p>
Endothelial protein C receptor	<ul style="list-style-type: none"> Anticoagulant, anti-inflammatory and anti-apoptotic/protein C-related 	<ul style="list-style-type: none"> Blood coagulation Cancer metastasis (lung adenocarcinoma) Arrests cell migration (neutrophil) 	<p>(Gandrille et al., 2008) (Mohan et al., 2014) (QU, D. et al., 2006) (Sturm et al., 2003)</p>
ANNEXIN A2 (ANXA2)	<ul style="list-style-type: none"> Phospholipids binding Membrane transport 	<ul style="list-style-type: none"> Annexin A2 and fibrinolysis (tPA and 	<p>(Gerke et al., 2005)</p>

	<ul style="list-style-type: none"> (recycling endosomes) Calcium sensors Membrane/actin dynamics Cell differentiation Migration 	<ul style="list-style-type: none"> plasminogen co-receptor, generation of plasmin and fibrin degradation) Possible UPS secretion Ca²⁺ regulated exocytosis of Weibel-balade bodies, chromaffin granules 	
ANNEXIN 5	<ul style="list-style-type: none"> Interaction with membrane lipids (Ca²⁺-dependent) 	<ul style="list-style-type: none"> Anti-coagulant by binding on cell -surface phospholipids that play role in blood coagulation 	(Gerke et al., 2005)
Calmodulin	<ul style="list-style-type: none"> Senses calcium levels Ca²⁺-dependent activation of eNOS Mitochondrial oxidative metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> Has been reported extracellularly, released from endothelial cells (role in inflammation) Stimulate the proliferation of cultured hepatocytes, keratinocytes, melanoma cells, K562 leukemia cells, HUVECs and fibroblasts 	(Busse et al., 1990) (Chin et al., 2000) (Houston et al., 1997) (Myre et al., 2004)
Fascin 1	<ul style="list-style-type: none"> Actin-bundling protein Key regulator of cytoskeletal dynamics (cell adhesion, motility and invasion) Neuronal growth cone morphogenesis and reorganization 	<ul style="list-style-type: none"> Be released as a result of interaction between annexins and actin with the secretory vesicle at the site of fusion 	(Adams et al., 2004) (Jayo & Parsons, 2010)
beta actin	<ul style="list-style-type: none"> Cell growth, migration Embryogenesis Vesicle trafficking Cell compartmentalization 	<ul style="list-style-type: none"> Pro-inflammatory (TREM-1-interacting protein on platelets) Binding site for plasminogen (control the plasmin production and the fibrinolysis) Constrains neoplastic progression in endotheliocytes Promote neurotransmitter release (catecholaminergic cells) 	(Bunnell et al., 2011) (Eitzen et al., 2003) (Fu et al., 2017) (Lee et al., 1993) (Sudakov et al., 2017)
Enolase 1	<ul style="list-style-type: none"> Glycolysis (glycolytic enzyme) Plasminogen receptor 	<ul style="list-style-type: none"> Binds plasminogen at the cell surface (plasmin generation) Migration/inflammatory cell invasion (monocytes) Matrix degradation UPS secretion 	(Edward F. Plow and Riku Das., 2009) (Wygrecka et al., 2009)
PGK1 (phosphoglycerate kinase)	<ul style="list-style-type: none"> ATP-generating glycolytic enzyme DNA replication and repair 	<ul style="list-style-type: none"> Plasmin reductase-angiogenesis Cleavage of disulfide bonds in plasmin Proteolytic release of the angiogenesis inhibitor angiostatin 	(Daly et al., 2004) (Lay et al., 2000) (Myre et al., 2004)
Glyceraldehyde-	<ul style="list-style-type: none"> Glycolytic enzyme 	<ul style="list-style-type: none"> Inhibits cell spreading 	(Egea et al., 2007)

3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	<ul style="list-style-type: none"> • Apoptosis (under oxidative stress) • Mitochondrial dysfunction • Endocytosis • Microtubule bundling • Phosphotransferase/kinase reactions • Translational regulation of gene expression • Nuclear RNA export • DNA replication and DNA repair • Cancer • Viral pathogenesis 	<ul style="list-style-type: none"> • Interaction with plasminogen and fibrinogen • Adhesion and virulence 	<p>(Nakajima et al., 2017)</p> <p>(Sirover et al., 1999)</p> <p>(Yamaji et al., 2005)</p>
Triosephosphate isomerase 1	<ul style="list-style-type: none"> • Glycolysis • Lipid metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> • Binding to laminin • Adherence and invasion 	<p>(Orosz et al., 2009)</p>
Purine nucleoside phosphorylase	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleotide metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> • T-cell malignancies 	<p>(Bantia et al., 2004)</p> <p>(Cohen et al., 1976)</p>
Nucleoside-diphosphate kinase 2	<ul style="list-style-type: none"> • Nucleotide metabolism • Cell proliferation, development • Differentiation 	<ul style="list-style-type: none"> • Hematopoietic differentiation (inhibit macrophage formation) 	<p>(Kamath et al., 2000)</p> <p>(Willems et al., 2002)</p>

Πίνακας 1. Παρουσίαση μέρους των εκκρινόμενων πρωτεϊνών, με δράση στο αγγειακό σύστημα, από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματα προήλθαν από ανάλυση υγρής χρωματογραφίας σε επίπεδο νανοκλίμακας (nano LC-MS/MS). Ενδεικτικά αναφέρεται ο ρόλος και η εξωκυττάρια λειτουργία καθώς και σχετική βιβλιογραφία, για ορισμένες από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που βρέθηκαν εμπλουτισμένες στο δείγμα των ενεργοποιημένων με VEGF/bFGF/ATP ενδοθηλιακών κυττάρων.

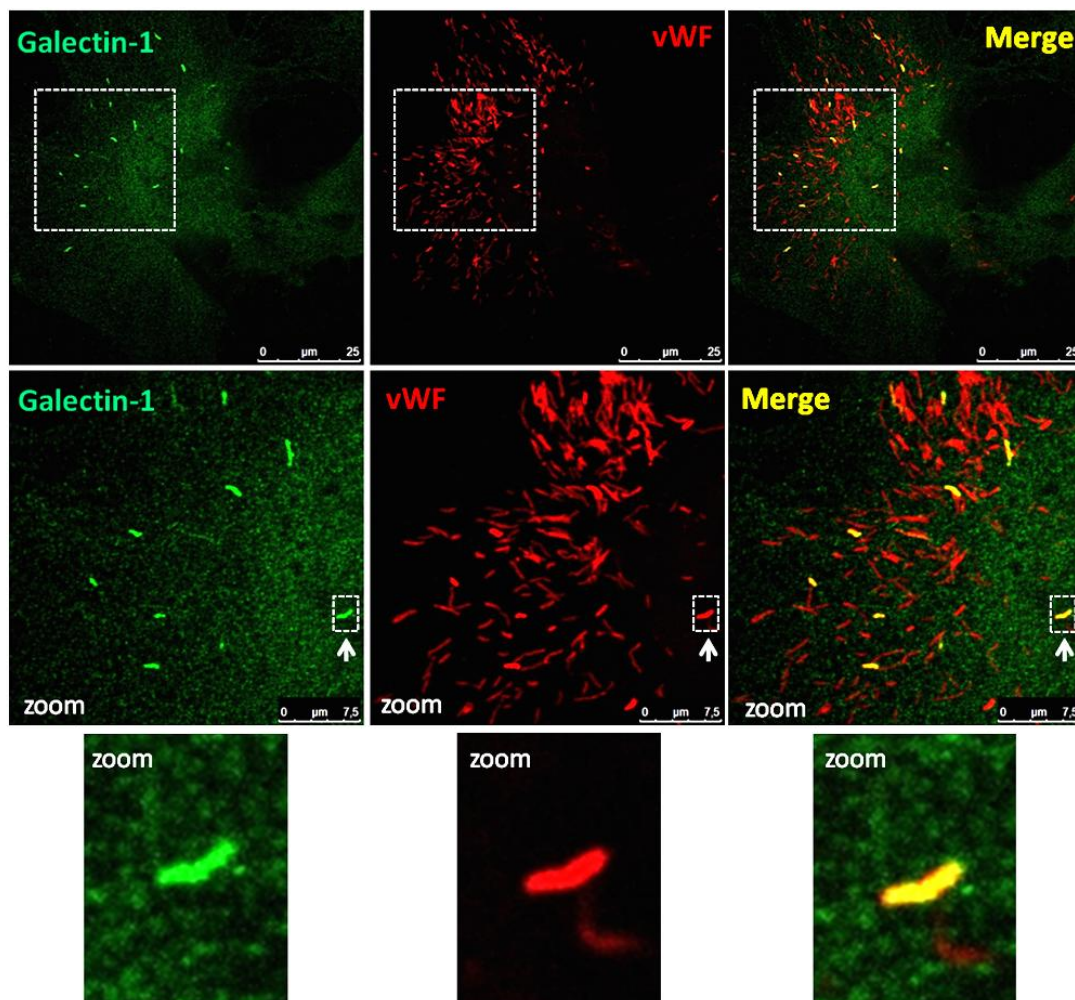
Ανάμεσα στις εκκρινόμενες πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν, συμπεριλαμβάνονται πρωτεΐνες με δράση στην θρόμβωση, τη φλεγμονή αλλά και την αγγειογένεση, διεργασίες στις οποίες η έκκριση των WPBs διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο (Goligorsky et al., 2009; Lowenstein et al., 2005; McCormack et al., 2017; Metcalf et al., 2008; Rondaij et al., 2006; Valentijn et al., 2011). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγεται η πρωτεΐνη galectin-1 (Πίνακας 1), γεγονός που εγείρει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, δεδομένου του ρόλου της πρωτεΐνης αυτής σε ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της διαφοροποίησης, της κυτταρικής προσκόλλησης, αλλά και λόγω της εμπλοκής της στον καρκίνο, τη μετάσταση αλλά και σε διαδικασίες με ανοσορυθμιστικό ρόλο (Rabinovich, 2005; Thijssen et al., 2010). Οι galectins δεσμεύονται επιλεκτικά σε συγκεκριμένες ομάδες πολυσακχαριτών σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια, επηρεάζοντας έτσι τη δράση τους. Μάλιστα, η galectin- 1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επίσης

αναγνωρίζει πολυσακχαρίτες στο μόριο της πρωτεΐνης vWF (Oortwijn et al., 2012; Saint-Lu et al., 2012). Επιπλέον, συνδέεται με τον υποδοχέα VEGFR2 και ελέγχει την μεταγωγή του σήματος του VEGF (Crocì et al., 2014; D'Haene et al., 2013; Hsieh et al., 2008; Stanley, P., 2014). Παρά τις παραπάνω ξεκάθαρες εξωκυτταρικές λειτουργίες της galectin-1, ο μηχανισμός της έκκρισής της παραμένει αδιευκρίνιστος. Η galectin-1, λόγω του ότι δεν διαθέτει σηματοδοτική αλληλουχία έκκρισης, εκκρίνεται μέσω μιας μη συμβατικής οδού (Dimou et al., 2018; Nickel, W., 2003; Nickel, 2010; Nickel & Rabouille, 2009; Nickel, & Seedorf 2008; Rabouille, 2017), που παραμένει άγνωστη μέχρι σήμερα. Έτσι, η ταυτοποίηση της galectin-1 στην πρωτεομική ανάλυση που παρουσιάστηκε πιο πάνω γεννά το ενδιαφέρον ερώτημα, εάν η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί ένα νέο μόριο-φορτίο των WPBs. Αν η υπόθεση αυτή επιβεβαιωθεί, θα προκύπτει το συμπέρασμα ότι η galectin-1, παρά το ότι στερείται μιας ξεκάθαρης σηματοδοτικής αλληλουχίας, είναι δυνατό να εισέρχεται στο εκκριτικό μονοπάτι μέσω του κυτταρικού διαμερίσματος των WPBs. Επειδή μια τέτοια υπόθεση έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και δεν έχει προηγουμένο, αλλά και επειδή η galectin-1 ελέγχει τη δράση του υποδοχέα VEGFR2 (Crocì et al., 2014; D'Haene et al., 2013; Hsieh et al., 2008; Stanley, P., 2014), άρα είναι πιθανό να αποτελεί ένα σύνδεσμο μεταξύ εξωκυττάρωσης και μεταγωγής του σήματος του VEGF, στην συνέχεια της παρούσας διατριβής αποφασίσαμε να ελέγξουμε αν όντως η galectin-1 εντοπίζεται στα WPBs.

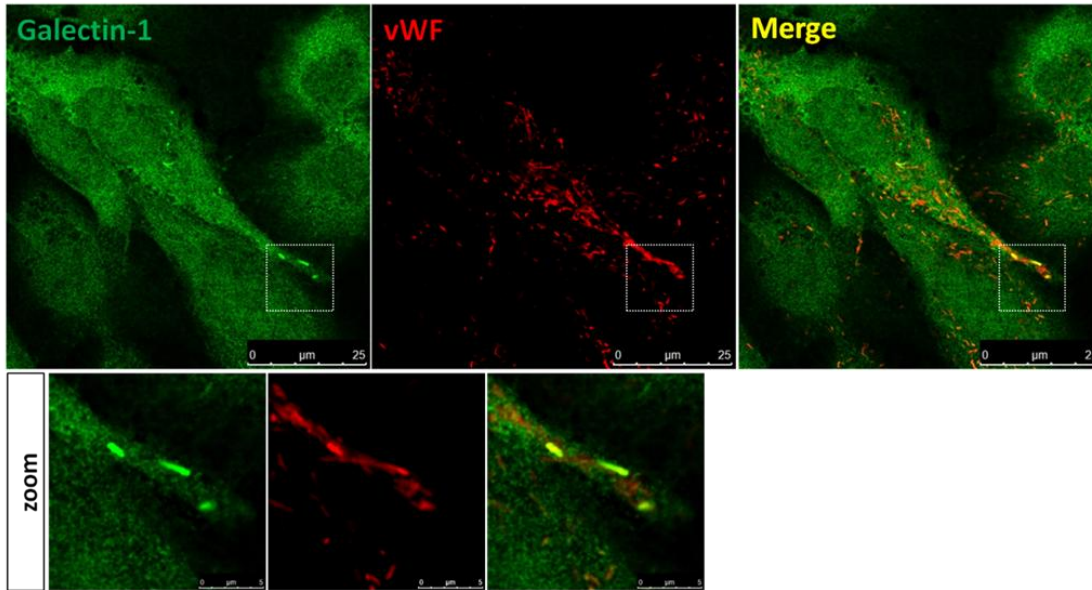
3.5. Η Galectin-1 συνεντοπίζεται με το κύριο μόριο των WPBs, την πρωτεΐνη vWF, σε ένα μικρό υποσύνολο των WPBs στα HUVECs

Προκειμένου να ελέγξουμε τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της galectin-1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα, χρησιμοποιήσαμε συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού με τη χρήση συνδυασμού κατάλληλων αντισωμάτων. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14, η galectin-1 δεν εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων (όπως ήταν γνωστό μέχρι σήμερα), αλλά επιπλέον, συνεντοπίζεται με την πρωτεΐνη vWF σε ενδοκυτταρικά οργανίδια επιμηκυσμένου σχήματος, δομές που είναι χαρακτηριστικές των WPBs, γεγονός που είναι σε συμφωνία με την ανίχνευση της galectin-1 στο πείραμα της πρωτεομικής. Ωστόσο, είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η galectin-1 δεν συνεντοπίζεται με τον vWF στο σύνολο των WPBs, αλλά σε ένα μέρος αυτών (Εικόνα 14). Επίσης, η galectin-1

συνεντοπίζεται με τον vWF, μόνο σε ένα υποπληθυσμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ στην πλειοψηφία των κυττάρων η galectin-1 εντοπίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα (Εικόνα 15).



Εικόνα 14. Η *Galectin-1* εντοπίζεται σε ένα υποσύνολο των WPBs στα HUVECs. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (*confocal*) αναδεικνύει τον ενδογενή εντοπισμό της πρωτεΐνης *galectin-1* (πράσινη χρώση) και του vWF (κόκκινη χρώση). Για την ανίχνευση των εν λόγω πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου, έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1* (*ab1543*), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα *Alexa 488* καθώς και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος, έναντι του vWF, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα *Alexa 594*. Σε μεγένθυση απεικονίζονται τα WPBs στα οποία η πρωτεΐνη *galectin-1* συνεντοπίζεται με τον vWF (κίτρινο) καθώς και ο διπλός συνεντοπισμός των πρωτεϊνών *galectin-1* και vWF σε ένα WPB (βέλος, άσπρο πλαίσιο)(συνεργασία με Λαζάνη Βασιλική).

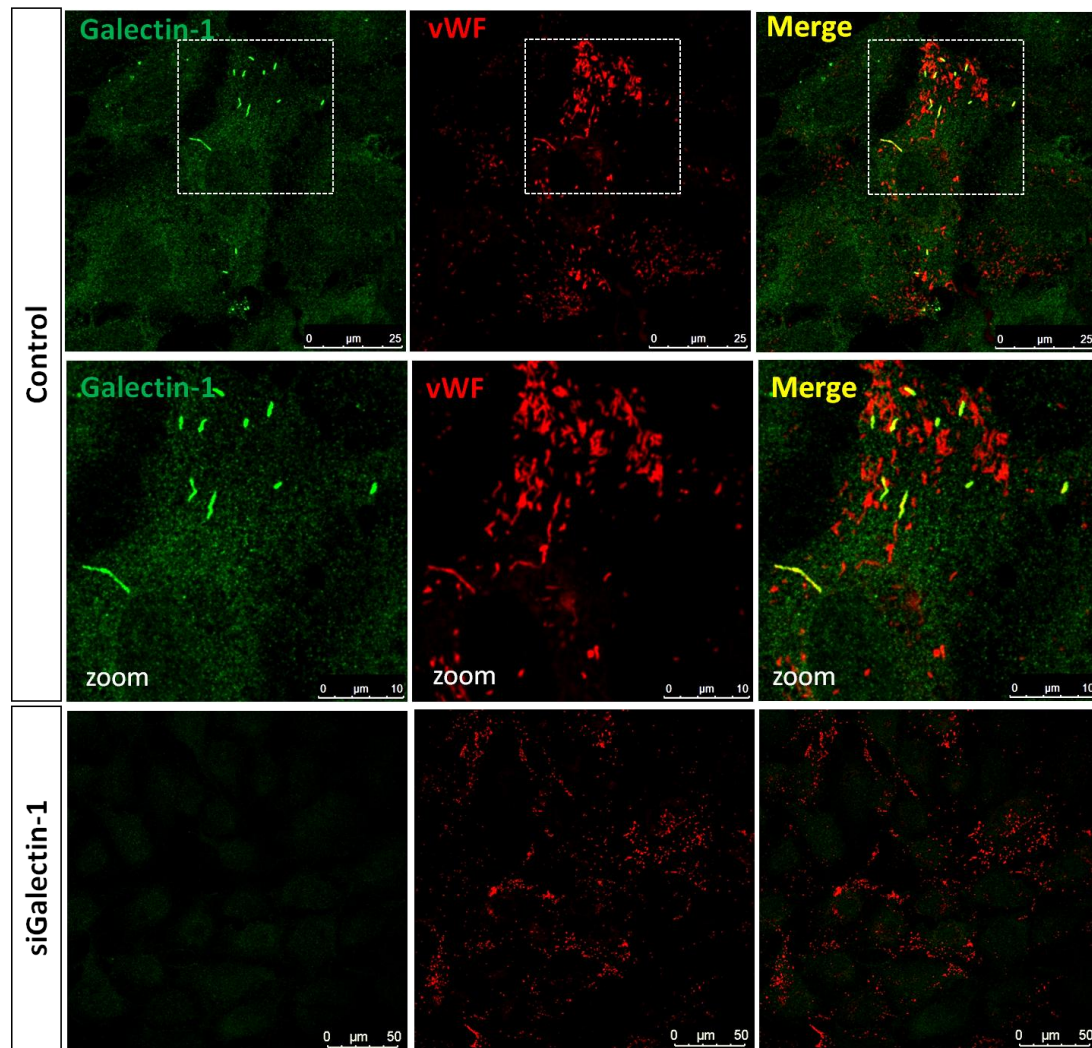


Εικόνα 15. Η πρωτεΐνη *galectin-1* (πράσινο) συν-εντοπίζεται με τον *vWF* (κόκκινο) στα WPBs, σε περιορισμένο αριθμό κυττάρων HUVE. Ο ενδοκυττάριος εντοπισμός των πρωτεϊνών *galectin-1* και *vWF* πραγματοποιήθηκε με χρήση των αντισωμάτων που αναφέρονται στη λεζάντα της Εικόνας 14. Η πρωτεΐνη *galectin-1* κατανέμεται τόσο στο κυτταρόπλασμα (διάχυτη χρώση, πράσινο) αλλά και σε ορισμένα WPBs (κίτρινο) (σε μεγένθυση η περιοχή που απεικονίζεται στο άσπρο πλαίσιο), σε ένα υποσύνολο κυττάρων HUVE.

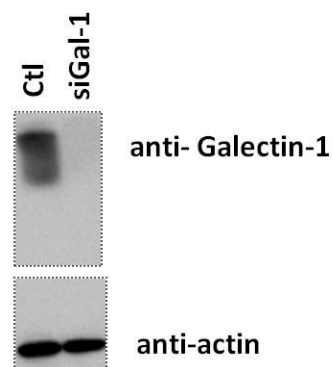
3.6. Έλεγχος της εξειδίκευσης του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1* με ανοσοφθορισμό

Επειδή ο συνεντοπισμός της *galectin-1* (μιας κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης) με τον *vWF* στα WPBs ήταν απρόσμενο αποτέλεσμα, προχωρήσαμε στον έλεγχο της εξειδίκευσης του αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1*. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήσαμε δύο ανεξάρτητες πειραματικές προσεγγίσεις. Πρώτον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αποσιώπησης (knock down) με siRNAs έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* στα HUVECs και ελέγξαμε αν η αποσιώπηση της *galectin-1* εξαλείφει την αντίχρυσή της στα πειράματα ανοσοφθορισμού. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 16 Α, η αποσιώπηση της *galectin-1* προκάλεσε σχεδόν πλήρη απώλεια τόσο του κυτταροπλασματικού σήματος της *galectin-1* όσο και του συνεντοπισμού της με τον *vWF*, γεγονός που καταδεικνύει ότι το αντίσωμα αναγνωρίζει την ενδογενή πρωτεΐνη που αποσιωπήθηκε από τα ειδικά siRNAs (*galectin-1*).

A.



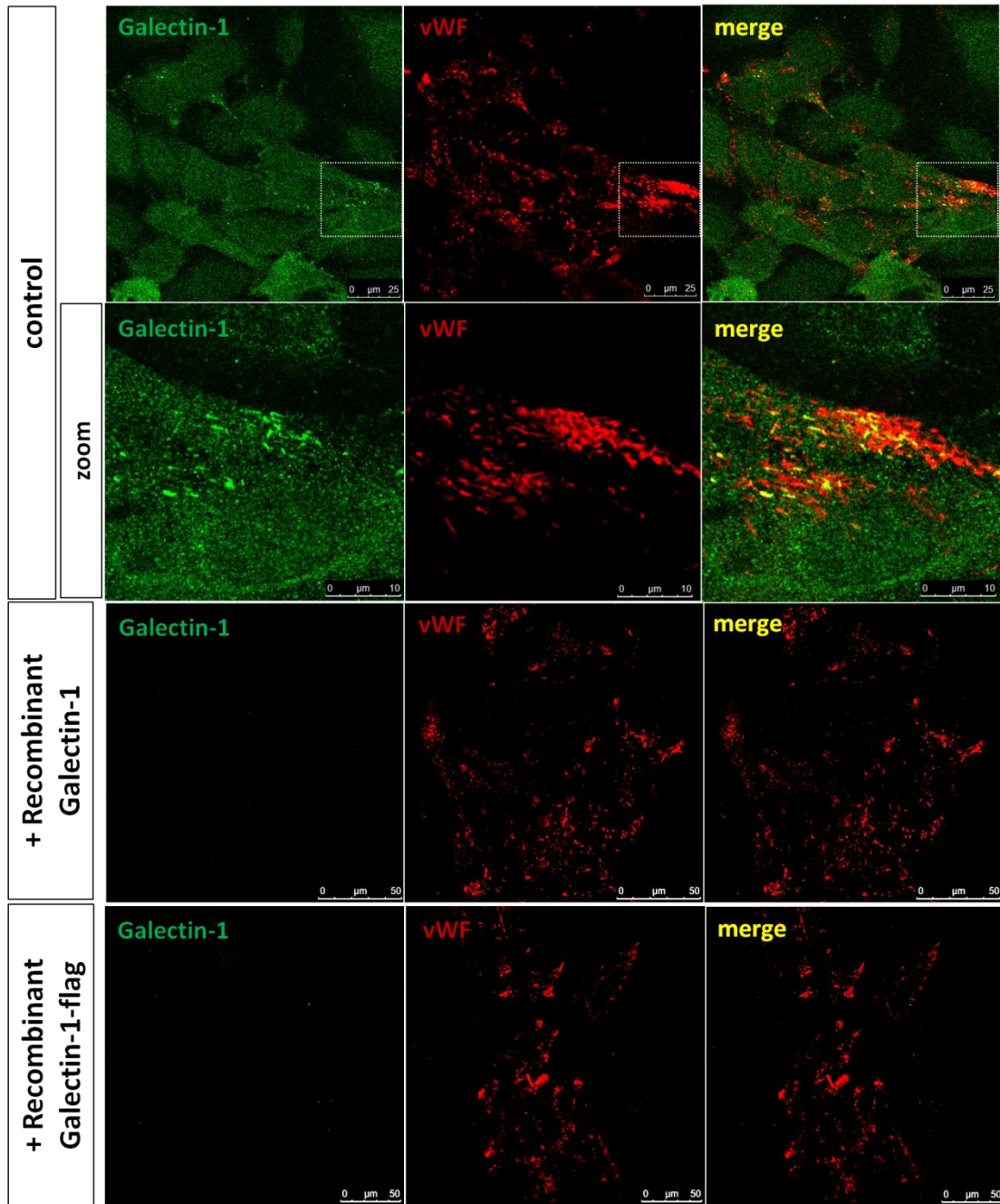
B.



Εικόνα 16. Η αποσιώπηση της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* απαλείφει την παρουσία της στα WPBs. Α) Η αποσιώπηση της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* πραγματοποιήθηκε με χρήση *siRNA* για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και για χρονική διάρκεια 72 ωρών. Ακολούθησε χρώση με πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1* (*ab154351*), ακολουθούμενο από

δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 488 (πράσινη χρώση) και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος, έναντι της πρωτεΐνης vWF, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 594 (κόκκινη χρώση). Παρουσιάζεται η υπό μεγέθυνση περιοχή του κυττάρου που απεικονίζεται με άσπρο πλαίσιο. Η αποσιώπηση της ενδογενούς πρωτεΐνης galectin-1 απαλείφει τόσο το σήμα του κυτταροπλασματικού της εντοπισμού όσο και την παρουσία της στα WPBs. Β) Ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώνει την επιτυχή αποσιώπηση της πρωτεΐνης galectin-1 με χρήση siRNA. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης galectin-1 και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος, έναντι της πρωτεΐνης ακτίνη, ως μάρτυρας ισοφόρτωσης, συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση.

Στη δεύτερη πειραματική προσέγγιση ελέγχου της εξειδίκευσης του αντισώματος, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του ανταγωνισμού (“competition assay”), με χρήση εξωγενούς ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1, ή galectin-1 συζευγμένης με το πρόσδεμα flag. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη επώαστηκε με το αντίσωμα πριν αυτό χρησιμοποιηθεί στο πείραμα του ανοσοφθορισμού. Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 17, η επώαση του αντισώματος με την καθαρή ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη οδηγεί σε πλήρη απώλεια του σήματος (κυτταροπλασματικού και WPBs) στο πείραμα του ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με το πείραμα ανοσοφθορισμού μετά από αποσιώπηση της galectin-1 (Εικόνα 16), οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το αντίσωμα έναντι της galectin-1 είναι εξειδικευμένο. Συνεπώς, ο συνεντοπισμός της ενδογενούς galectin-1 με τον vWF είναι ειδικός.



Εικόνα 17. Πειράματα πρωτεϊνικού ανταγωνισμού (“competition assay”), με ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες galectin-1 και galectin-1-flag, επιβεβαιώνουν την εξειδίκευση του αντισώματος έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης galectin-1. Κύτταρα HUVE μονιμοποιήθηκαν και ακολούθως επωάστηκαν με διάλυμα πρωτογενών αντισωμάτων, στο οποίο προστέθηκε, είτε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη galectin-1 (10 μg/ml) είτε η galectin-1-flag (10 μg/ml). Χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτογενή αντισώματα: πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης galectin-1 (πράσινο) και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος, έναντι του vWF (κόκκινο), σε διάλυμα 10 % FBS σε PBS απουσία (κύτταρα ελέγχου, control) ή παρουσία των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 και galectin-1-flag. Τα κύτταρα ακολούθως επωάστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα Alexa 488 (για την galectin-1) και Alexa 594 (για τον vWF) και παρατηρήθηκαν με συνεστιακή μικροσκοπία. Η προσθήκη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 και galectin-1-flag εξαλείφει το σήμα του κυτταροπλασματικού της εντοπισμού καθώς και την παρουσία της ενδογενούς galectin-1 στα WPBs, επιβεβαιώνοντας την εξειδίκευση του πολυκλωνικού αντισώματος

έναντι της *galectin-1(ab154351)* που χρησιμοποιήθηκε. Παρουσιάζεται σε μεγέθυνση, η περιοχή του κυττάρου που απεικονίζεται στο άσπρο πλαίσιο, όπου και αναδεικνύεται ο συνεντοπισμός των ενδογενών πρωτεϊνών *galectin-1* και *vWF* (κίτρινο).

3.7. Η *Galectin-1* εντοπίζεται σε ένα υποσύνολο των WPBs, σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων HUVEC

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η *galectin-1* ανιχνεύεται μόνο σε ένα υποσύνολο των WPBs. Επίσης, μόνο ένας μικρός αριθμός ενδοθηλιακών κυττάρων έχει WPBs τα οποία είναι θετικά στην *galectin-1* (Πίνακας 2). Έτσι, στα επόμενα πειράματα θελήσαμε να κατανοήσουμε περισσότερο το φαινόμενο αυτό. Διαπιστώσαμε ότι, όσο αυξάνεται η ανακαλλιέργεια (“passaging”) των κυττάρων, μειώνεται το ποσοστό των κύτταρων στα οποία η *galectin-1* εντοπίζεται στα WPBs (Πίνακας 2). Δεδομένου ότι οι κυτταρικές διαιρέσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων σε καλλιέργεια προκαλούν μείωση του ενδοθηλιακού τους χαρακτήρα, είναι πιθανό η *galectin-1* να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενδοθηλιακή φυσιολογία.

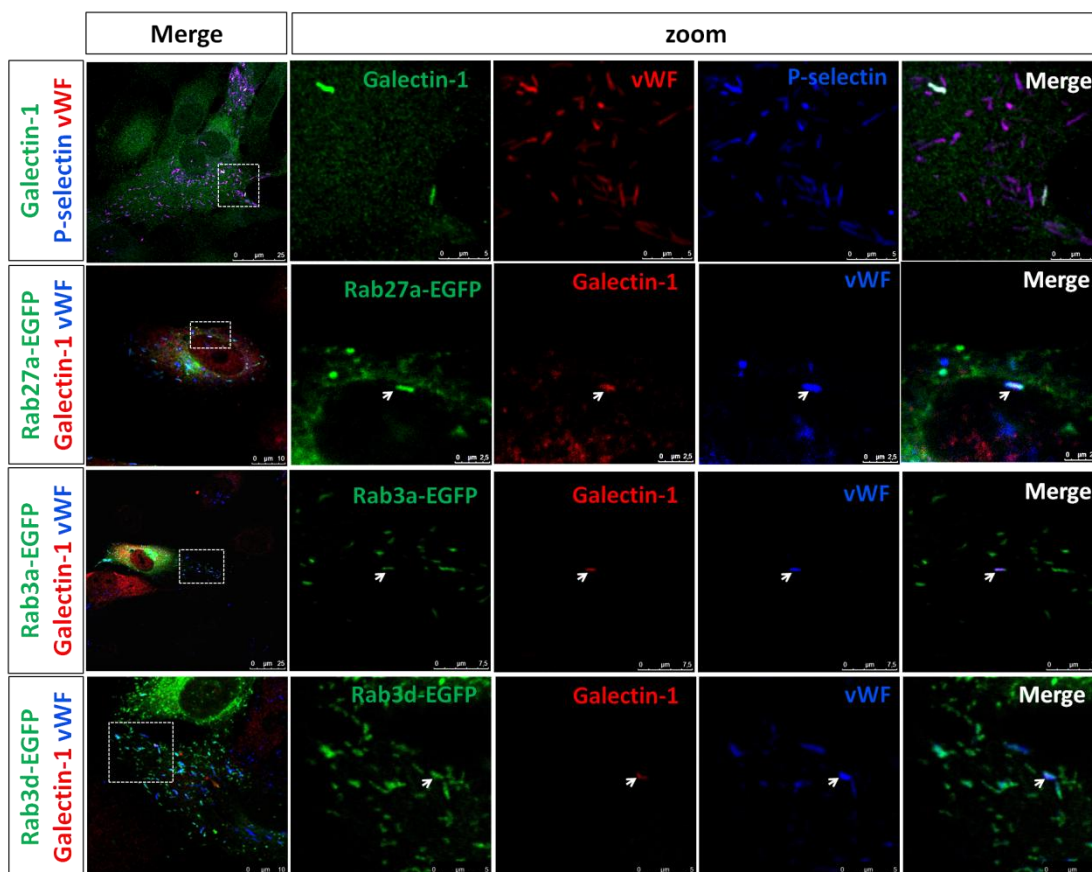
Ποσοστό κυττάρων HUVE στα οποία η πρωτεΐνη <i>Galectin-1</i> εντοπίζεται στα WPBs			
Primary	Passage 1	Passage 2	Passage 3
15-18%	6-15%	2-5%	Σπάνια ανιχνεύσιμη

Πίνακας 2. Ποσοτικοποίηση κυττάρων HUVE στα οποία η *galectin-1* εντοπίζεται στα WPBs. Η μέτρηση των κυττάρων στα οποία η *galectin-1* εντοπίζεται στα WPBs πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά “passages” (γενεαλογία) καλλιέργειας των κυττάρων HUVE.

3.8. Η πρωτεΐνη *galectin-1* συνεντοπίζεται με γνωστούς πρωτεϊνικούς δείκτες των WPBs

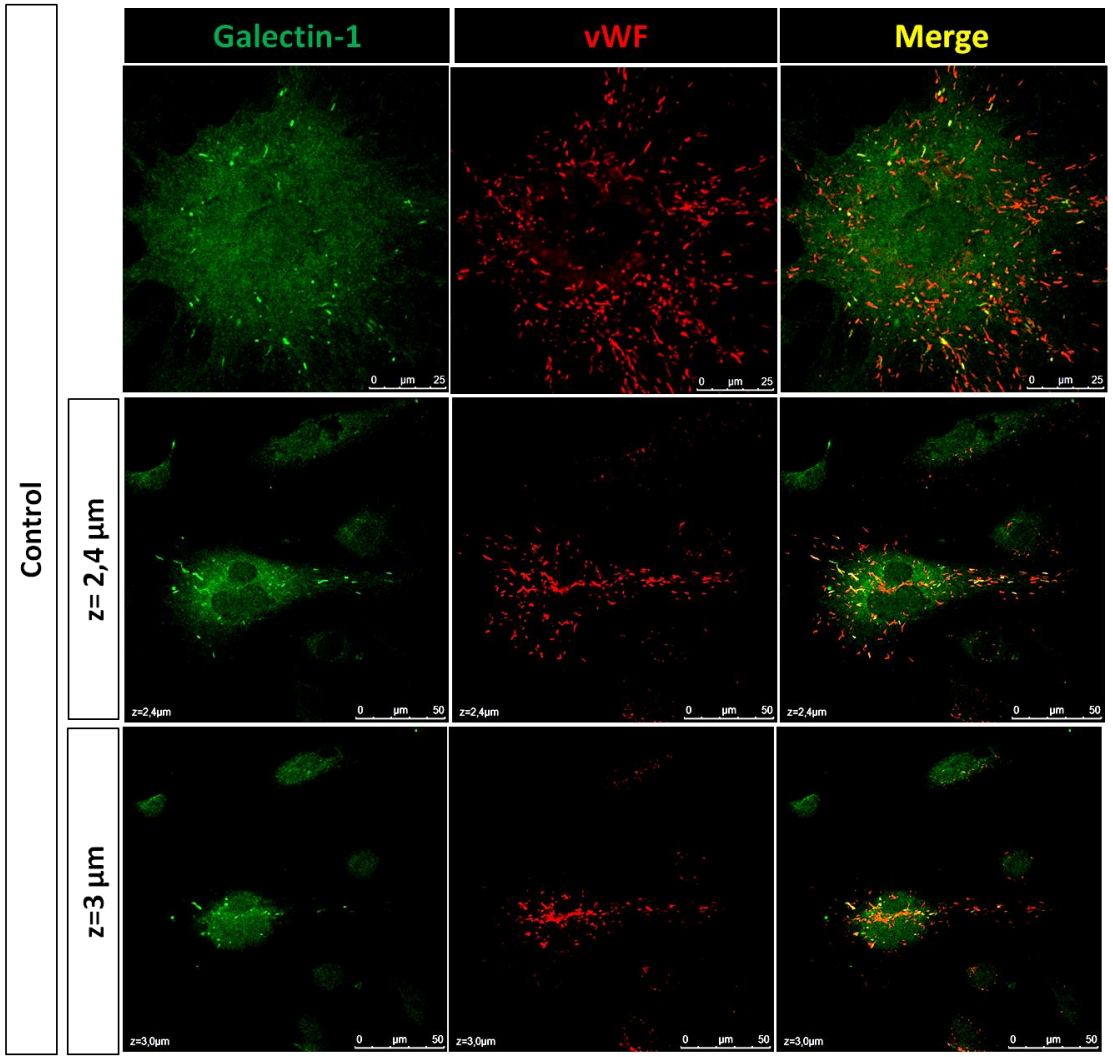
Σε μια πρόσφατη μελέτη (Zografou et al., 2012), όπου σαρώθηκε το ανθρώπινο γονιδίωμα των Rab GTPασών πρωτεϊνών, βρέθηκαν πέντε Rabs να εντοπίζονται στα WPBs. Πρόκειται για τις Rab27a, 3a, 15, 33a και 37. Προηγούμενες μελέτες αποδεικνύουν επίσης την παρουσία των Rab27a και Rab3a GTPασών στα WPBs (Hannah et al., 2002;

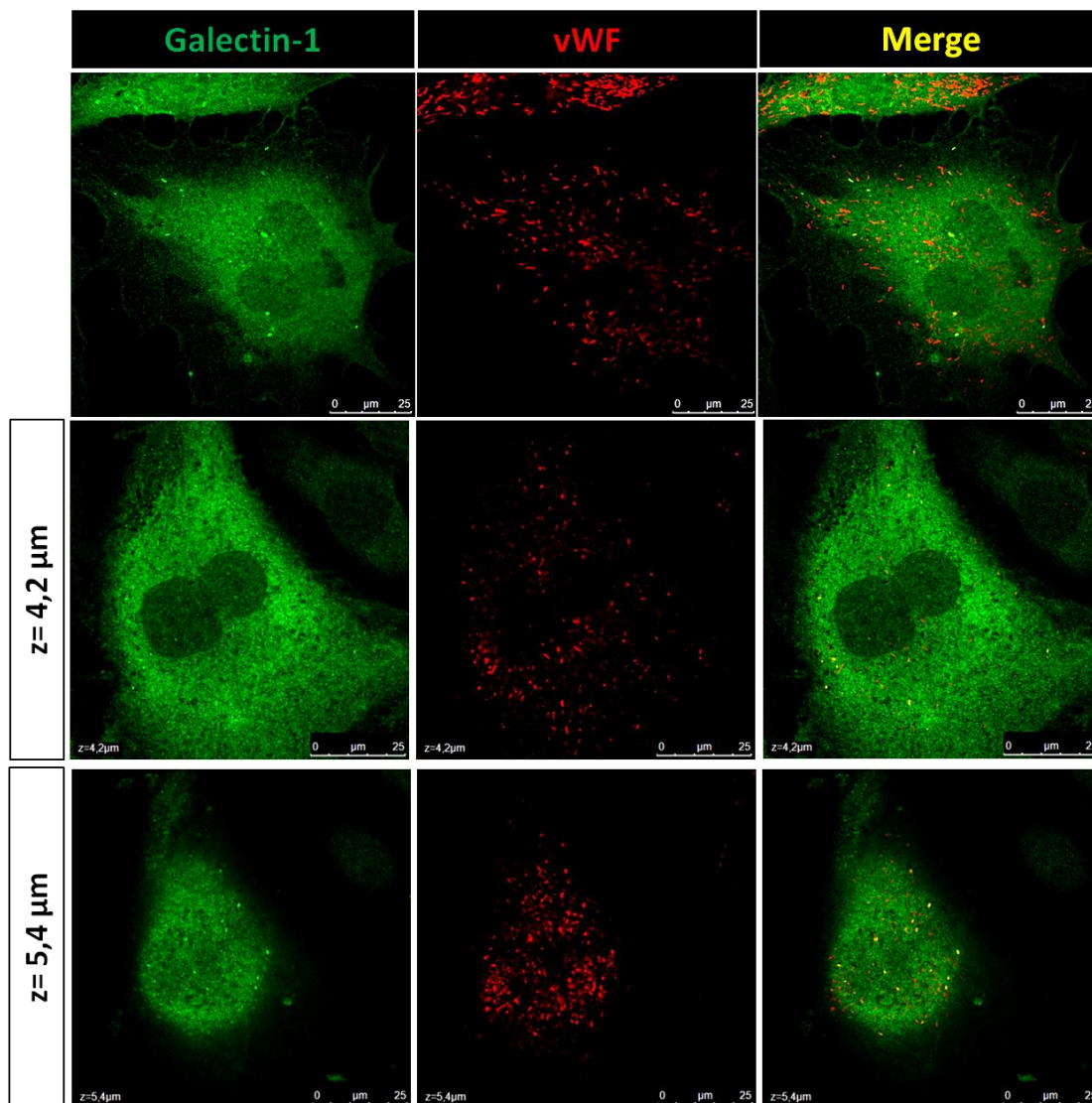
Knop et al., 2004) καθώς και αυτή της Rab3d κατά την ωρίμανση αυτών (Metcalf, D. J. et al., 2008). Προκειμένου να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η παρουσία της πρωτεΐνης galectin-1 στα WPBs, ελέγχθηκε ο συνεντοπισμός των Rab27a, 3a, 3d, συνδεδεμένων με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη EGFP (Zografou et al., 2002), με την galectin-1 στα οργανίδια αυτά, καθώς και με την πρωτεΐνη P-selectin, η οποία εντοπίζεται επίσης στα WPBs. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 18) (συνεργασία με Λαζάνη, Β.).



Εικόνα 18. Η πρωτεΐνη galectin-1 συνεντοπίζεται με γνωστούς πρωτεϊνικούς δείκτες των WPBs: P-Selectin, Rab27a, Rab3a, Rab3d. Για τον έλεγχο του συνεντοπισμού των Rab GTPασών με την πρωτεΐνη galectin-1 στα WPBs, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση των πλασμιδιακών κατασκευών Rab27a, Rab3a και Rab3d συζευγμένων με την πράσινη φθορίζουσα χρωστική EGFP για 48 ώρες. Για τον έλεγχο του ενδοκυτταρικού συνεντοπισμού τους με συνεστιακή μικροσκοπία πραγματοποιήθηκε χρώση με πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου έναντι της πρωτεΐνης galectin-1 ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 594 (κόκκινο), χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος έναντι του vWF ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 680 (μπλέ) ενώ ο έλεγχος των υπερεκφρασμένων Rab GTPασών πραγματοποιήθηκε λόγω αυτοφθορισμού της EGFP. Ο έλεγχος της galectin-1 στα WPBs με τους πρωτεϊνικούς δείκτες P-selectin και vWF πραγματοποιήθηκε με πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου έναντι της πρωτεΐνης galectin-1, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 488 (πράσινο), χρώση με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος έναντι του vWF ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 568 (κόκκινο) καθώς και με πολυκλωνικό αντίσωμα προβάτου έναντι της πρωτεΐνης P-Selectin, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με φθοριόχρωμα Alexa 633 (μπλε).

Αξίζει να σημειωθεί πως παρατηρήθηκε αυξημένος εντοπισμός της galectin-1 στα WPBs σε κύτταρα τα οποία βρίσκονταν σε φάση διαίρεσης. Ένα τέτοιο αντιπροσωπευτικό παράδειγμα παρουσιάζεται στην Εικόνα 19, όπου απεικονίζονται διαφορετικά κύτταρα σε φάση διαίρεσης (παρατηρήστε διπύρρηνα κύτταρα) καθώς και διαφορετικές εγκάρσιες z-τομές, για ορισμένα από τα εν λόγω κύτταρα, ώστε να αναδειχθούν τα WPBs στα οποία εντοπίζεται η galectin-1. Ωστόσο, η παραπάνω παρατήρηση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με πειράματα ποσοτικοποίησης του συνεντοπισμού της galectin-1 με τον vWF, σε συγχρονισμένες καλλιέργειες κυττάρων HUVEC. Αν τα πειράματα αυτά επιβεβαιώσουν την παραπάνω αρχική παρατήρηση, θα υποδηλώνουν μια συσχέτιση του εντοπισμού της galectin-1 στα WPBs και του γνωστού της ρόλου στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Rabinovich, 2005), μια υπόθεση που αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω.





Εικόνα 19. Ο αριθμός των WPBs, θετικών για την πρωτεΐνη *galectin-1*, φαίνεται αυξημένος σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση διαίρεσης. Κύτταρα HUVE μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση έναντι των πρωτεϊνών *galectin-1* (πράσινη χρώση) και του vWF (κόκκινη χρώση). Χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1*, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος, έναντι του vWF, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594. Απεικονίζονται διαφορετικά κύτταρα HUVE σε φάση διαίρεσης, σε κάποια από τα οποία απεικονίζονται διαφορετικές εγκάρσιες τομές του κυττάρου σε επίπεδο z (z-stacks), όπου και αποκαλύπτουν WPBs θετικά για την *galectin-1* (κίτρινη χρώση).

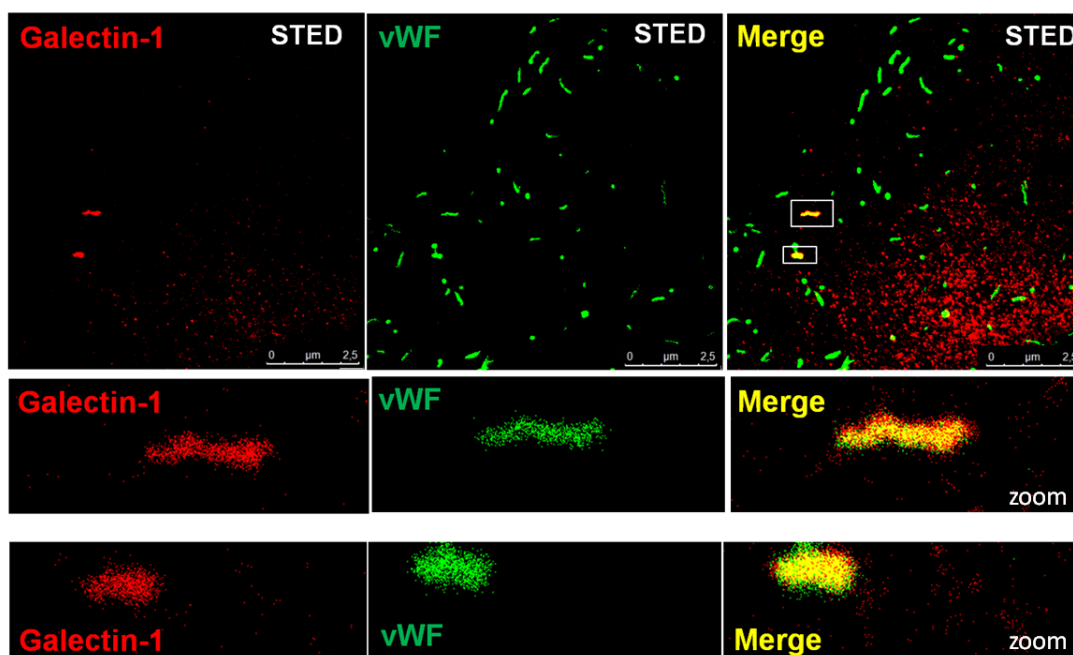
3.9. Συνεστιακή μικροσκοπία STED υψηλής ανάλυσης επιβεβαιώνει την παρουσία της *Galectin-1* στα WPBs

Η παρατήρηση του εντοπισμού της *galectin-1*, που είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, στα WPBs εγείρει ένα βασικό ερώτημα σχετικά με την ακριβή της τοπολογία: βρίσκεται στον αυλό των WPBs (αποτελεί δηλαδή μεταφερόμενο μόριο/cargo) ή βρίσκεται

συνδεδεμένη στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των WPBs, δηλαδή στην κυτταροπλασματική πλευρά του οργανιδίου αυτού; Το ερώτημα αυτό είναι σημαντικό καθώς η τοπολογία της galectin-1 στα WPBs, επηρεάζει τον πιθανό της ρόλο στα οργανίδια αυτά αλλά και την τύχη της μετά την σύντηξή τους με την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Στην προσπάθειά μας να αποσαφηνίσουμε την τοπολογία της πρωτεΐνης galectin-1 στα WPBs, εάν δηλαδή εντοπίζεται στον αυλό ή στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης των οργανιδίων αυτών, πραγματοποιήθηκε συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ με χρήση υπερδιακριτικής ικανότητας (STED), για να ελεγχθεί ο συνεντοπισμός της τόσο με ένα δείκτη του αυλού (vWF), όσο και με δείκτη της εξωτερικής πλευράς της μεμβράνης (Rab27a) των WPBs.

Ο συνεντοπισμός της galectin-1 με τον vWF, δείκτης του αυλού και κύριο πρωτεϊνικό φορτίο των WPBs, σε υψηλή διακριτική ανάλυση (STED) απεικονίζεται στην Εικόνα 20. Ο πλήρης συνεντοπισμός της galectin-1 με τον vWF στο πείραμα αυτό, υποδεικνύει ότι πιθανόν η galectin-1 να εντοπίζεται στον αυλό των WPBs.

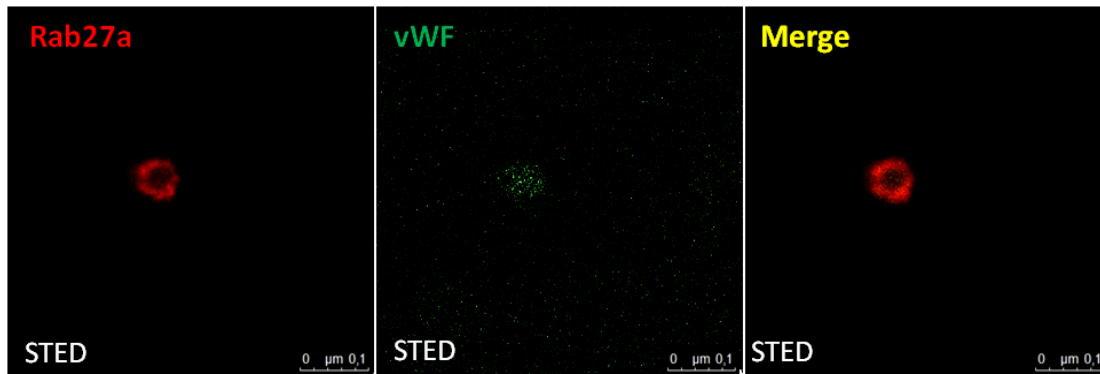


Εικόνα 20. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser με χρήση υπερδιακριτικής ικανότητας (STED), υποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη Galectin-1 συν-εντοπίζεται με τον vWF, το κύριο φορτίο των WPBs. Για τον έλεγχο των πρωτεϊνών galectin-1 και vWF χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης galectin-1 (ab154351), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα ATTO 488 (διέγερση με λέιζερ στα 514 nm, κόκκινο χρώμα) και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος, έναντι του vWF, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα ATTO 425 (διέγερση με λέιζερ στα 458 nm, πράσινο χρώμα). Παρουσιάζονται σε μεγέθυνση τα θετικά για την πρωτεΐνη WPBs, που απεικονίζονται στα άσπρα πλαίσια.

Στην συνέχεια συγκρίναμε την τοπολογία της galectin-1 με την θέση της πρωτεΐνης Rab27a, η οποία αποτελεί αντιπροσωπευτικό δείκτη της εξωτερικής πλευράς της μεμβράνης των WPBs.

Αρχικά, για την έλεγχο του ενδοκυττάρου εντοπισμού της Rab27a, χρησιμοποιήθηκε καθαρισμένος πολυκλωνικός ορός κονίκλου (Zografou et al., 2012), σε συνδυασμό με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος, για τον ενδογενή εντοπισμό του vWF, στα WPBs. Λόγω αδυναμίας ανίχνευσης της ενδογενούς Rab27a από τον ορό, αλλά και από άλλα καθαρά αντισώματα του εμπορίου που χρησιμοποιήθηκαν έναντι της πρωτεΐνης αυτής, ο έλεγχος συνεχίστηκε με πειράματα υπερέκφρασης της Rab27a. Ωστόσο, το μικρό ποσοστό υπερέκφρασης της στα HUVECs (30-40%) δεν επέτρεψε τον εντοπισμό κυττάρων που ταυτόχρονα να υπερεκφράζουν την Rab27a-EGFP και να έχουν WPBs που να είναι θετικά στην galectin-1.

Ο προσανατολισμός επίσης των WPBs, εάν δηλαδή εμφανίζονται παράλληλα με το επίπεδο xy ή κάθετα σ' αυτό, είναι εξίσου μεγάλης σημασίας, για τον διακριτό εντοπισμό της Rab27a στην μεμβράνη των WPBs και στην μικροσκοπία STED. Αυτό εξηγείται από τη διαφορετική διακριτική ικανότητα στους άξονες xy και z που προσφέρει η συνεστιακή μικροσκοπία με ή χωρίς STED, καθώς επιτρέπει ένα σαφή διαχωρισμό μεταξύ της μεμβράνης και του αυλού των WPBs μόνο όταν η διάμετρος των WPBs (συνήθως μέγεθος 100-300 nm) είναι μεγαλύτερη των ορίων της διακριτικής ικανότητας των αξόνων xyz. Για να συμβεί αυτό, θα πρέπει το υπό μελέτη WPB να είναι τοποθετημένο κάθετα στον άξονα xyz, ώστε εγκάρσια τομή αυτού στον άξονα z, να αναδειξεί τον εντοπισμό της Rab27a στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης του WPB, ενώ του vWF στο εσωτερικό του κοίλου σωλήνα. Κάτι αντίστοιχο παρουσιάζεται στην Εικόνα 21, όπου και η Rab27a βρέθηκε να εμφανίζει μία δομή δακτυλίου που περιβάλλει περιφερικά το WPB, ενώ ο vWF βρέθηκε να καλύπτει το εσωτερικό του κοίλου σωλήνα. Αντιθέτως, σε μία εγκάρσια τομή σε ένα WPB τοποθετημένο παράλληλα με τον άξονα xy, η διάκριση της Rab27a στην μεμβράνη θα ήταν εφικτή, μόνο εφόσον η διάμετρος του WPB θα ήταν μεγαλύτερη της διακριτικής ικανότητας στον z άξονα (> 450 nm για STED).



Εικόνα 21. Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με laser με χρήση υπερδιακριτικής ικανότητας (STED) δείχνει τον εντοπισμό της Rab27a σε ένα WPB (τοποθετημένο κάθετα στον άξονα xyz) (ενδογενή χρώση για τον vWF). Για τον έλεγχο των πρωτεϊνών Rab27a και vWF χρησιμοποιήθηκε παρασκευασμένος ορός κονίκλου (4th bleed) έναντι της υπερεκφρασμένης Rab27a, ακολουθούμενος από δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα ATTO 488 (κόκκινο χρώμα) καθώς και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος, έναντι του vWF, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα ATTO 425 (πράσινο χρώμα). Απεικονίζεται ένα κάθετα στον xyz άξονα τοποθετημένο WPB, μετά από εγκάρσια τομή σε επίπεδο z, όπου και στην παραπάνω τομή καθίσταται εμφανής η τοπολογία της Rab27a με δομή δακτυλίου, περιφερικά του WPB.

Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου επιβεβαιώνεται ο εντοπισμός των Rab GTPασών με την χαρακτηριστική δομή δακτυλίου περιφερικά της μεμβράνης των ενδοσωμάτων (Rink et al., 2005). Ακολούθως πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της τοπολογίας της galectin-1 συγκριτικά με αυτή της Rab27a στα “κυκλικά” WPBs, όπου το σήμα φθορισμού με μικροσκοπία STED απεικονίζεται στην Εικόνα 22.



Εικόνα 22. Συνεστιακή μικροσκοπία STED για τον έλεγχο της τοπολογίας των πρωτεϊνών Rab27a και galectin-1 σε ένα “κυκλικό” WPB (κάθετα στον xyz άξονα). Για τον έλεγχο των πρωτεϊνών Rab27a και vWF χρησιμοποιήθηκε παρασκευασμένος ορός κονίκλου (4th bleed), έναντι της υπερεκφρασμένης Rab27a, ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα ATTO 488 (κόκκινο χρώμα) καθώς και μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος, έναντι της galectin-1 (6C84-1), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα αίγας συζευγμένο με φθοριόχρωμα ATTO 425 (πράσινο χρώμα). Απεικονίζεται ένα “κυκλικό” WPB, μετά από εγκάρσια τομή σε επίπεδο z.

Σύμφωνα με το παραπάνω πρότυπο ανοσοφθορισμού, η Rab27a φαίνεται να περιβάλλει περιφερικά την μεμβράνη του WPB. Παρόμοια παρουσιάζεται και η χρώση της galectin-1, αλλά διάχυτο σήμα παρατηρείται και στο εσωτερικό του WPB, σε αντίθεση με την Rab27a. Ο εντοπισμός της galectin-1 κοντά σε μεμβρανικές περιοχές, έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά, όπου και αναφέρεται η συσσώρευση της galectin-1 στην κυτταροπλασματική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης, πριν εκκριθεί (Cooper and Barondes, 1990; Nickel, W., 2003; Popa et al., 2018). Παρόλα αυτά, λόγω δυσκολίας ανεύρεσης πολλών “κυκλικών” WPBs, που να υπερεκφράζουν Rab27a και να είναι θετικά για την galectin-1, η αδυναμία αυτή αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο για την ταυτοποίηση της galectin-1 ως ένα νέο μόριο-φορτίο (cargo) των WPBs, στηριζόμενοι στο προηγούμενο πρότυπο συνεντοπισμού της με τον vWF (Εικόνα 20).

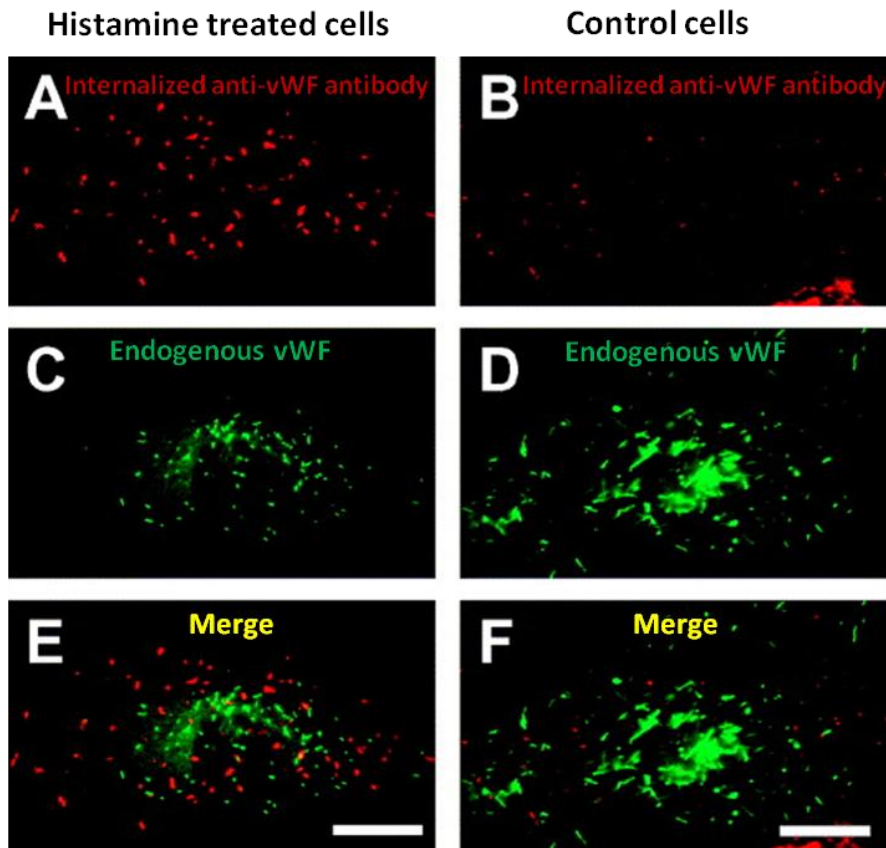
Για όλους τους παραπάνω λόγους και δυσκολίες, πειράματα σε εξέλιξη στοχεύουν να αποσαφηνίσουν πλήρως την τοπολογία της galectin-1 στα WPBs, με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, συζευγμένης με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (Correlative Light Electron Microscopy, CLEM).

3.10. Η πρωτεΐνη galectin-1 εντοπίζεται στα WPBs που υπέστησαν “kiss-and-run” εξωκυττάρωση μετά από επαγωγή με VEGF/bFGF/ATP

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η galectin-1 δεν διαθέτει την τυπική σηματοδοτική αλληλουχία (signal peptide) που να της επιτρέπει να εκκρίνεται μέσω του κλασσικού βιοσυνθετικού εκκριτικού μονοπατιού. Έτσι, τα μέχρι σήμερα δεδομένα της βιβλιογραφίας υποστηρίζουν ότι η galectin-1 εκκρίνεται μέσω μίας άγνωστης έως τώρα οδού που εμπίπτει στην κατηγορία του μη συμβατικού/κλασσικού μονοπατιού εξωκυττάρωσης (unconventional exocytosis).

Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας της παρούσας μελέτης, αποδεικνύουν τον εντοπισμό της galectin-1 στα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με βάση τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας STED, είναι πολύ πιθανό η galectin-1 να εντοπίζεται στον αυλό των WPBs (Εικόνες 20, 22). Στην περίπτωση αυτή γεννάται το εξής ερώτημα: πώς είναι δυνατό μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη να εισέρχεται στον αυλό των WPBs, τα οποία περιβάλλονται από μεμβρανική διπλοστοιβάδα; Επειδή η galectin-

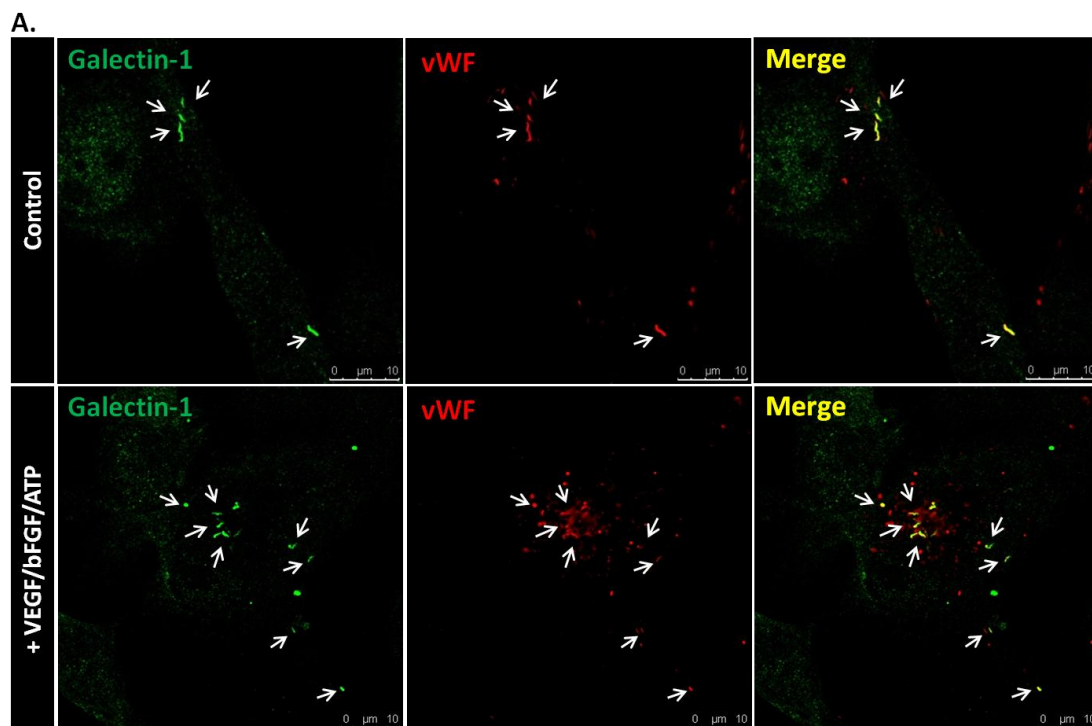
1 εκκρίνεται με ένα μη συμβατικό τρόπο, διαπερνώντας με κάποιο τρόπο την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Nickel, W., & Rabouille, C., 2018; Popa et al., 2018), είναι πιθανό η είσοδός της στα WPBs να πραγματοποιείται από τον εξωκυτταρικό χώρο, κατά τη στιγμή της παροδικής σύντηξης των WPBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Κατά την παροδική σύντηξη, ο αυλός των WPBs μένει ανοιχτός προς την έξω πλευρά του κυττάρου για αρκετό χρονικό διάστημα, ώστε να εισχωρήσει μια εξωκυτταρική πρωτεΐνη που εμφανίζει συγγένεια σύνδεσης με κάποιο από τα συστατικά του αυλού (Knop & Gerke, 2002). Προκειμένου να διερευνήσουμε την παραπάνω υπόθεση και κατά συνέπεια τον μηχανισμό που οδηγεί την galectin-1 στα WPBs, στηριζόμενοι στην μελέτη των Knop και Gerke (2002), εστίασαμε στην μελέτη της παροδικής εξωκυττάρωσης των οργανιδίων αυτών μέσω του μηχανισμού “kiss-and-run”. Σύμφωνα με την παραπάνω μελέτη, η έκκριση του vWF μπορεί να ελεγχθεί έμμεσα με πειράματα επαναπρόσληψης του εκκρινόμενου vWF από τα μερικώς συντηγμένα με την πλασματική μεμβράνη WPBs (“*anti-vWF antibody internalization assay*”), όπως υποστηρίζεται μετά από επαγωγή της έκκρισης με ισταμίνη (Εικόνα 23, από δημοσίευση των Knop & Gerke, 2002).



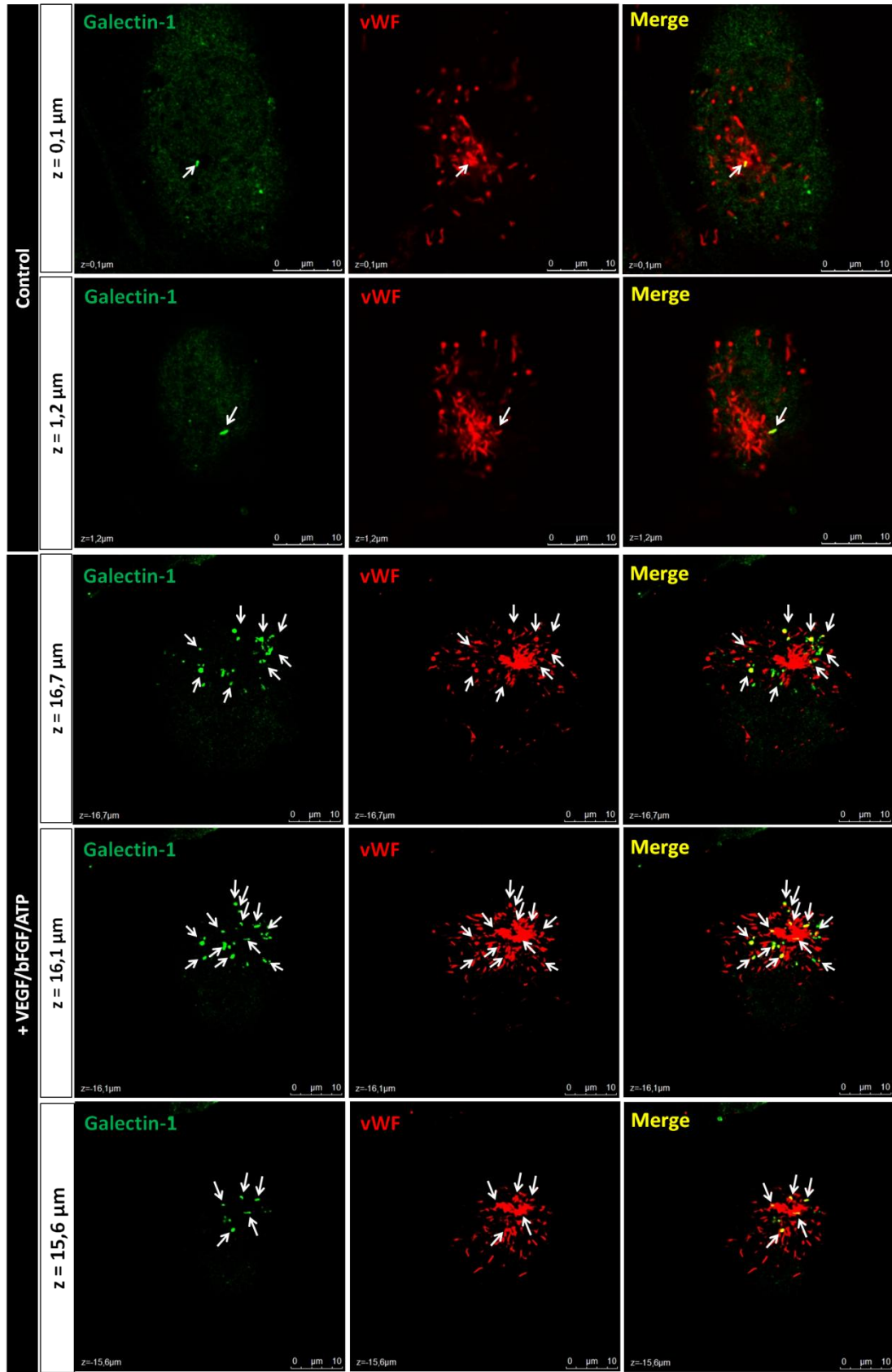
Εικόνα 23 (από δημοσίευση των Knorr & Gerke, 2002). «Παρακολούθηση της εξωκυττάρωσης του vWF. Κύτταρα HUVE αναπτύχθηκαν σε υάλινες καλυπτρίδες και υποβλήθηκαν σε διέγερση με ισταμίνη σε θρεπτικό που περιείχε πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου (anti-rabbit) έναντι του vWF (A, C, E). Κύτταρα ελέγχου (control) που απεικονίζονται στα πλαίσια B, D και F διατηρήθηκαν για τον ίδιο χρόνο σε θρεπτικό που περιείχε το αντίσωμα χωρίς ισταμίνη. Τόσο τα επαγόμενα με ισταμίνη όσο και τα κύτταρα ελέγχου (control) στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν, διαπερατοποιήθηκαν και υποβλήθηκαν σε χρώση με δευτερογενές συζευγμένο με TRITC (anti-goat) για την σήμανση του εσωτερικευμένου αντισώματος έναντι του vWF (A, B) και με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμούσ (anti-mouse) ακολουθούμενο από δευτερογενές συζευγμένο με Cy2k (anti-goat) για την επισήμανση του ενδογενούς vWF στα WPBs (C, D). Η συγχώνευση (merge) εμφανίζεται στις εικόνες E και F. Να σημειωθεί ότι ο αριθμός των WPBs μειώνεται σημαντικά μετά από διέγερση με ισταμίνη (σύγκριση C με D). Η διέγερση έχει ως αποτέλεσμα την πρόσληψη του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του vWF (A) που εμφανίζεται σε δομές μορφολογικά διαφορετικές από τα WPBs που δεν εξωκυττάρωθηκαν (ιδιαίτερα εμφανείς στην επικάλυψη που παρουσιάζεται στο E). Είναι ενδιαφέρον ότι ο vWF σε αυτά τα επανενσωματωμένα οργανίδια δεν είναι προσβάσιμος στο μονοκλωνικό αντίσωμα του vWF που χρησιμοποιείται στα μονιμοποιημένα και διαπερατά κύτταρα, πιθανόν λόγω της κάλυψης του επιτόπου από το εσωτερικευμένο πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του vWF. Οι κλίμακες αντιπροσωπεύουν 10 μm» (Knorr & Gerke, 2002).

Στηριζόμενοι στην παραπάνω λοιπόν μελέτη, διερευνήσαμε την υπόθεση ότι η παρουσία της galectin-1 στα WPBs θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της πρόσληψής της από τον εξωκυτταρικό χώρο, όταν τα WPBs υφίστανται παροδική εξωκυττάρωση (“kiss-and-run”). Για την διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης, κύτταρα HUVE επώαστηκαν με

ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη galectin-1 (28 $\mu\text{g/ml}$) με στόχο την αύξηση της παρουσίας της στον εξωκυτταρικό χώρο. Ακολούθησε μελέτη του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε επαγόμενα με VEGF/bFGF/ATP (Zografou et al., 2012) κύτταρα, δεδομένου ότι ο συνδυασμός των παραπάνω παραγόντων ευνοεί την έκκριση των WPBs και έτσι αυξάνεται ο αριθμός των WPBs που έχουν την πιθανότητα να πραγματοποιήσουν παροδική σύντηξη με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Πράγματι, η επώαση των κυττάρων με τους ενεργοποιητές προκαλεί αύξηση του αριθμού των WPBs που είναι θετικά στην galectin-1 (Εικόνα 24 A). Μάλιστα, η προσθήκη της εξωγενούς galectin-1 προκάλεσε περαιτέρω αύξηση των θετικών σε galectin-1 WPBs (Εικόνα 24 B).



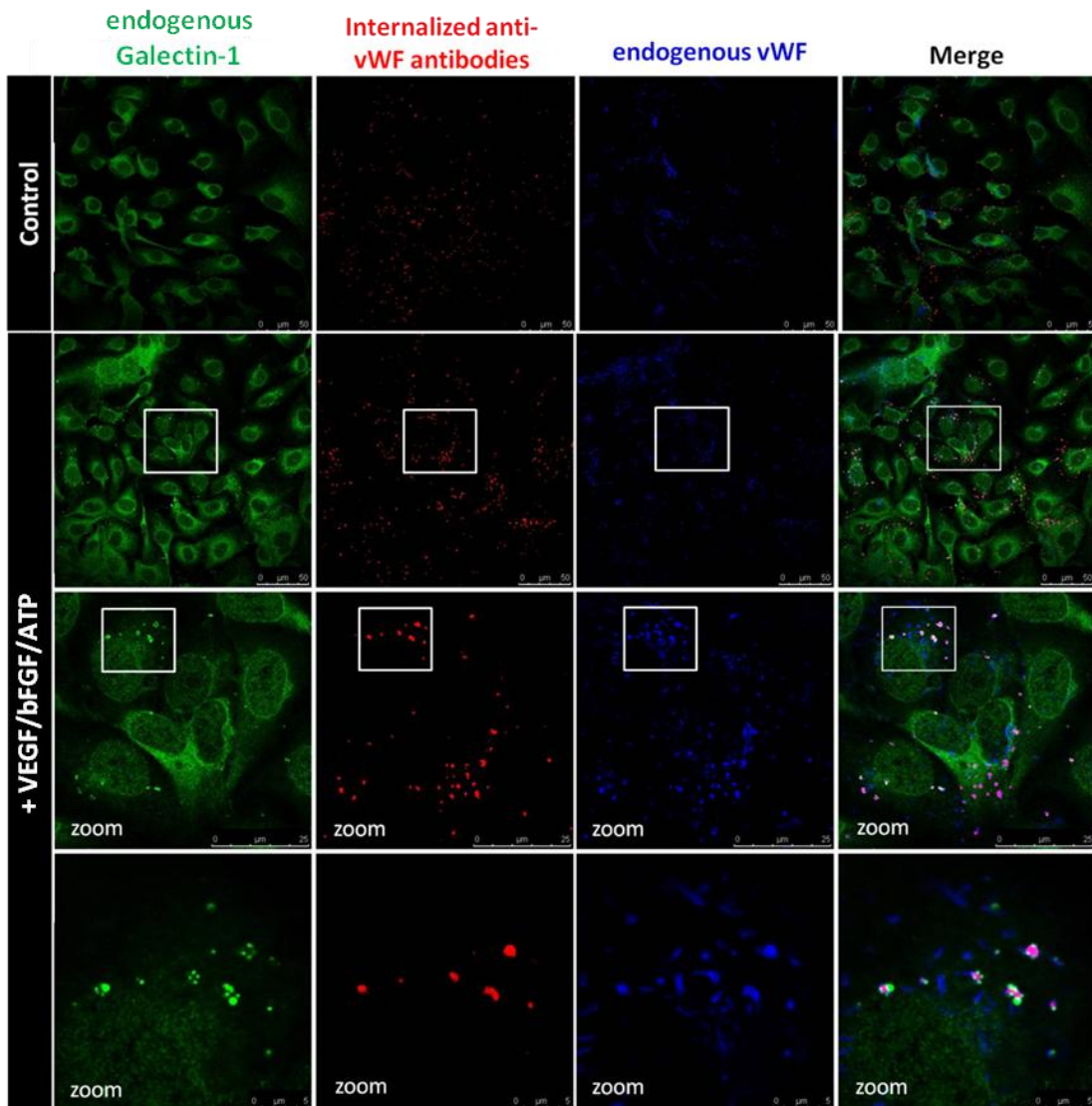
B. + 28 $\mu\text{g/ml}$ Recombinant Galectin-1



Εικόνα 24. Η επαγωγή της εξωκοντάρωσης με VEGF/bFGF/ATP αυξάνει τον αριθμό των WPBs στα οποία η πρωτεΐνη galectin-1 συνεντοπίζεται με τον vWF. (A) Φυσιολογικά κύτταρα

HUVE καθώς και (B) κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε η προσθήκη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1* (28 µg/ml) ενεργοποιήθηκαν με *VEGF* (50 ng/ml) / *bFGF* (15 ng/ml) / *ATP* (100 µM) για 30 λεπτά και ακολούθως τα κύτταρα υπέστησαν επεξεργασία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Για τον ενδοκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης *galectin-1*, χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου (*ab154351*), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα *Alexa 488* (πράσινη χρώση), ενώ για τον εντοπισμό του *vWF*, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος (*M0616*), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα *Alexa 594* (κόκκινη χρώση). Συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης αποδεικνύει τον εντοπισμό της πρωτεΐνης *galectin-1* (πράσινο) με τον *vWF* (κόκκινο) στα *WPBs* (κίτρινο) ενός κυττάρου. Απεικονίζονται οι διαφορετικές εγκάρσιες τομές του κυττάρου σε επίπεδο *z* (*z-stacks*), για την ανάδειξη των θετικών για την πρωτεΐνη *galectin-1* *WPBs* (άσπρα βέλη).

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η *galectin-1* εισέρχεται στα *WPBs* από τον εξωκυττάριο χώρο, μέσω της παροδικής σύντηξης των *WPBs* με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, χρησιμοποιήσαμε την πειραματική προσέγγιση των Knop και Gerke (2002). Στην μελέτη αυτή, οι ερευνητές πρόσθεσαν στον εξωκυτταρικό χώρο αντίσωμα έναντι του εκκρινόμενου *vWF*. Κατά την παροδική εξωκυττάρωση, μετά από επαγωγή της έκκρισης, το αντίσωμα αυτό έχει πρόσβαση στα μερικώς συντηγμένα με την πλασματική μεμβράνη *WPBs*. Έτσι, το αντίσωμα προσδένεται στα μόρια του *vWF* στον αυλό των *WPBs* (στα *WPBs* που υφίστανται παροδική εξωκυττάρωση “kiss-and-run”). Στη συνέχεια, τα *WPBs* αποκόπτονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και παραμένουν στον ενδοκυττάριο χώρο. Τα *WPBs* που υπέστησαν “kiss-and-run” εξωκυττάρωση διαφέρουν μορφολογικά από τα ενδογενή *WPBs*, που δεν εξωκυτταρώθηκαν· τα πρώτα έχουν σφαιρικό σχήμα ενώ τα δεύτερα είναι επιμήκη (Εικόνα 23). Προκειμένου να συγκρίνουμε τα *WPBs* στα οποία εισέρχεται (από τον εξωκυττάριο χώρο, μέσω παροδικής εξωκυττάρωσης) το αντίσωμα έναντι του *vWF*, με τα *WPBs* στα οποία εντοπίζεται η ενδογενής *galectin-1*, για την επαγωγή της έκκρισης χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των ενεργοποιητών *VEGF/bFGF/ATP*, παρουσία αντισώματος έναντι του *vWF* στο θρεπτικό καλλιέργειας. Ο έλεγχος του συνεντοπισμού πραγματοποιήθηκε με συνεστιακή μικροσκοπία. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 25, τα *WPBs* που υπέστησαν παροδική εξωκυττάρωση (θετικά στο εξωτερικό αντίσωμα του *vWF*), είναι επίσης θετικά στην ενδογενή *galectin-1*. Ωστόσο, ο συνεντοπισμός αυτός δεν είναι πλήρης, καθώς η *galectin-1* φαίνεται να βρίσκεται στις παρυφές των *WPBs*. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της *galectin-1* και του αντισώματος για τον *vWF*.



Εικόνα 25. Προφίλ εντοπισμού της ενδογενούς πρωτεΐνης galectin-1 στα WPBs που υπέστησαν “kiss-and-run” εξωκυττάρωση μετά από ενεργοποίηση της έκκρισης με VEGF/bFGF/ATP. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν χωρίς (control) ή με τον συνδυασμό των ενεργοποιητών VEGF (50 ng/ml)/ bFGF (15 ng/ml)/ ATP (100 μM) παρουσία του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι του vWF (0,1 mg/ml) σε διάλυμα πλήρους M199 θρεπτικού καλλιέργειας 2 ημερών και 0,1% BSA για 30 λεπτά. Η επαγωγή με VEGF/bFGF/ATP προκάλεσε αύξηση του αριθμού των WPBs στα οποία εντοπίζεται η πρωτεΐνη galectin-1 (άσπρο) συγκριτικά με την συνθήκη ελέγχου. Η χρώση έναντι των ενδογενών πρωτεϊνών galectin-1 και vWF στα WPBs, πραγματοποιήθηκε με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος αίγας (AF115), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 488 (πράσινο) και με το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύδος (M0616), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 680 (μπλε χρώση) αντίστοιχα, ενώ για την ενδοκυττάρωση του εκκρινόμενου vWF χρησιμοποιήθηκε το πολυκλωνικό αντίσωμα κόνικλου έναντι της πρωτεΐνης αυτής (A0082), ακολουθούμενο από δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με το φθοριόχρωμα Alexa 594 (κόκκινη χρώση). Παρουσιάζονται σε μεγέθυνση οι περιοχές που επισημαίνονται με άσπρα πλαίσια. Τα πειράματα αυτά πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με την Β. Λαζάνη, μέλος του εργαστηρίου μας.

3.11. Διερεύνηση της εισόδου ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 στα WPBs, μέσω του μηχανισμού "kiss-and-run", κατά την ιδιοσυστατική έκκριση

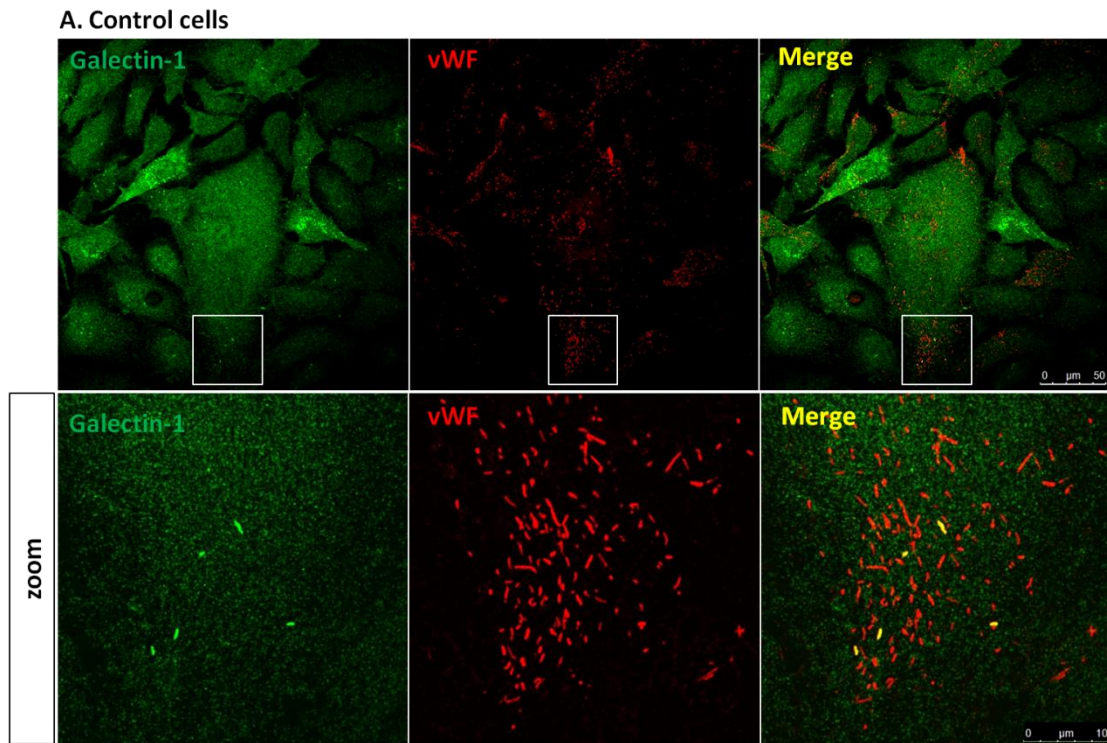
Στηριζόμενοι στα έως τώρα δεδομένα μικροσκοπίας, σχετικά με τον εντοπισμό της πρωτεΐνης galectin-1 στα WPBs, η διερεύνηση της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης πραγματοποιήθηκε παράλληλα με πειράματα πρόσληψης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1, που προστίθεται εξωγενώς στα κύτταρα, με στόχο τον έλεγχο του εντοπισμού της στα WPBs σε συνθήκες ιδιοσυστατικής έκκρισης, απουσία κάποιου ενεργοποιητή, κάτι που θα εξηγούσε την παρουσία της στα WPBs κυττάρων σε συνθήκες ηρεμίας.

Για τον σκοπό αυτό, ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε αρχικά με πειράματα πρόσληψης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1-EGFP (ευγενική προσφορά από την Λαζάνη, Β.), που προστίθεται εξωγενώς σε κύτταρα ελέγχου (σε συνθήκες ηρεμίας) αλλά και σε επαγόμενα με VEGF/bFGF/ATP κύτταρα. Τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά, καθώς δεν παρατηρήθηκε πρόσληψη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1-EGFP από τα WPBs, πιθανόν λόγω μεγάλου μεγέθους του προσδέματος της EGFP. Για την αποφυγή του παραπάνω προβλήματος παρασκευάστηκε η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη flag-galectin-1, καθώς και galectin-1-flag, όπου το μέγεθος του προσδέματος flag είναι πολύ μικρότερο από την EGFP.

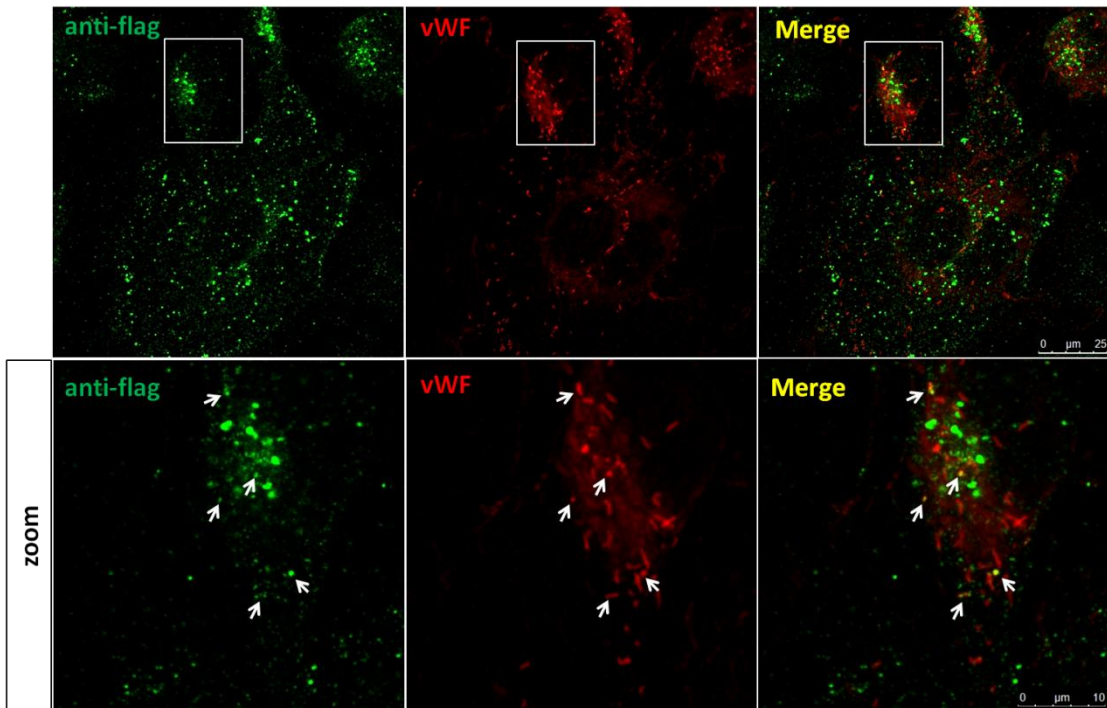
Ο έλεγχος της πρόσληψης της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1-flag (πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφορετικών συγκεντρώσεων: 70, 140, 420, 700 $\mu\text{g/ml}$) πραγματοποιήθηκε αρχικά σε ενδοθηλιακά κύτταρα σε συνθήκες ηρεμίας. Ενδεικτικά, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της πρόσληψης της ανασυνδυασμένης galectin-flag στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (700 $\mu\text{g/ml}$) (Εικόνα 26).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την είσοδο της εξωγενούς ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1-flag στα WPBs, ωστόσο σε πολύ περιορισμένο αριθμό αυτών, όπως διαπιστώθηκε μετά από έλεγχο της εισόδου της με αντίσωμα έναντι του προσδέματος flag (Εικόνα 26 Β). Ο έλεγχος της εισόδου πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα και με χρήση του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης galectin-1. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση στον αριθμό των WPBs, με την χαρακτηριστική επιμηκυσμένη δομή, θετικών για την πρωτεΐνη galectin-1, σε κύτταρα στα οποία η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προστέθηκε εξωγενώς, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (Εικόνα 26 Γ). Παρατηρήθηκε

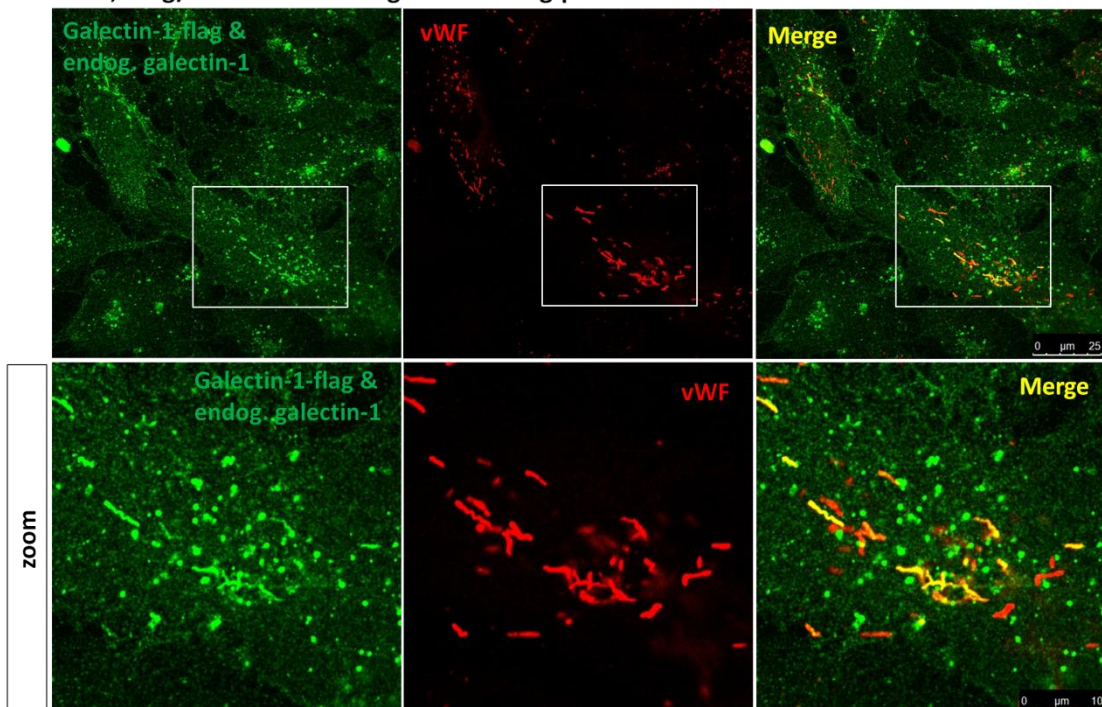
επίσης αύξηση του κυτταροπλασματικού σήματος της πρωτεΐνης galectin-1 (με χαρακτηριστική εμφάνιση κυστιδίων), γεγονός που θα μπορούσε να οφείλεται σε γεγονότα “fluid phase” ενδοκυττάρωσης, δεδομένης της υψηλής συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα 26 Β, Γ).



B. + 0,7 mg/ml Recombinant galectin-1-flag protein



Γ. + 0,7 mg/ml Recombinant galectin-1-flag protein

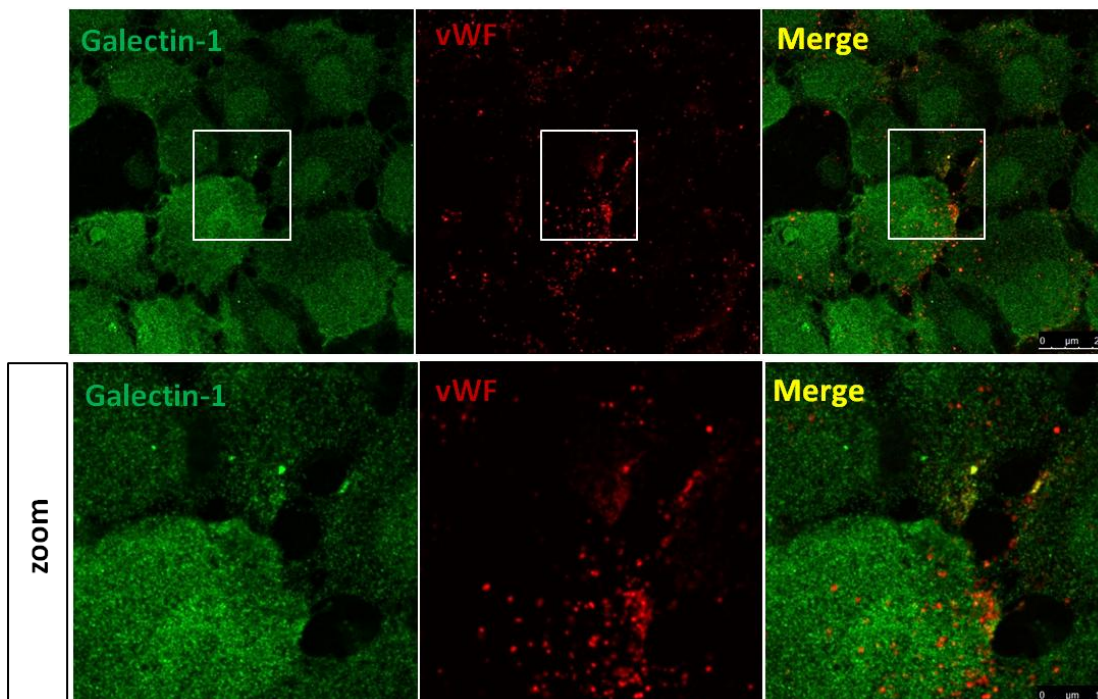


Εικόνα 26. Έλεγχος της εισόδου της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag*, που προστέθηκε εξωγενώς στα WPBs, σε αναπτυσσόμενα κύτταρα HUVE στην καλλιέργεια. Η πρόσληψη της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* (σε συγκέντρωση 0,7 mg/ml) πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HUVE για 1 ώρα (B,Γ). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση έναντι A) των ενδογενών πρωτεϊνών *galectin-1* (πράσινη χρώση) και *vWF* (κόκκινη χρώση) σε φυσιολογικά κύτταρα, στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε προσθήκη της ανασυνδασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* (control), ενώ σε κύτταρα στα οποία προστέθηκε

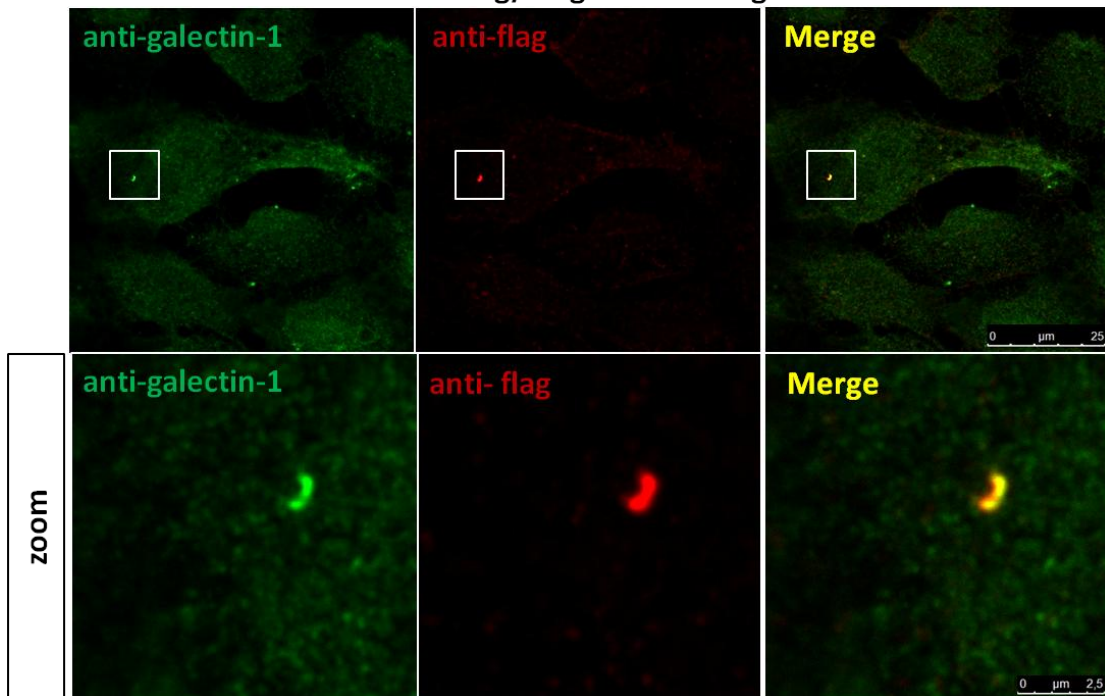
εξωγενώς η πρωτεΐνη *galectin-1-flag* (B,Γ) πραγματοποιήθηκε χρώση έναντι B) της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* (*anti-flag antibody*, πράσινη χρώση) και του ενδογενούς *vWF* (κόκκινη χρώση) καθώς και Γ) έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1* (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, πράσινη χρώση) για την ανίχνευση τόσο της ενδογενούς *galectin-1* όσο και της *galectin-1-flag*, καθώς και έναντι του *vWF* (κόκκινη χρώση). Παρουσιάζονται οι μεγεθύνσεις των υπο-περιοχών των κυττάρων που επιλέγονται με άσπρο πλαίσιο και στις οποίες αναδεικνύεται με μεγαλύτερη σαφήνεια, ο συνεντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* (A,Γ) καθώς και της ανασυνδυασμένης *galectin-1-flag* (B, Γ) με τον *vWF*, στα WPBs (κίτρινο χρώμα). Τα βελη στο B δείχνουν τον συνεντοπισμό της *galectin-1-flag* με τον *vWF* στα WPBs.

Ο έλεγχος της εσωτερικευμένης *galectin-1-flag* στα «ραβδωτού» σχήματος WPBs, πραγματοποιήθηκε επίσης με παρόμοια πειράματα πρόσληψης της ανασυνδυασμένης *galectin-1-flag*, σε μικρότερη ωστόσο συγκέντρωση (0,07 mg/ml). Ακολούθησε συνδυαστική χρώση, με αντισώματα έναντι τόσο της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1*, όσο και του προσδέματος *flag*, αναμένοντας τον συνεντοπισμό τους στις χαρακτηριστικές επιμηκυσμένες δομές των WPBs και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 27 B (να σημειωθεί ότι απουσιάζει χρώση έναντι των WPBs λόγω αδυναμίας συνδυασμού των διαθέσιμων αντισωμάτων). Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν τον συνεντοπισμό της ανασυνδυασμένης *galectin-1-flag* σε χαρακτηριστικές επιμηκυσμένες δομές που θυμίζουν τα WPBs, φαινόμενο ωστόσο που παρατηρήθηκε σε πολύ μικρή έκταση (Εικόνα 27 B).

A. Control cells, without external *galectin-1*



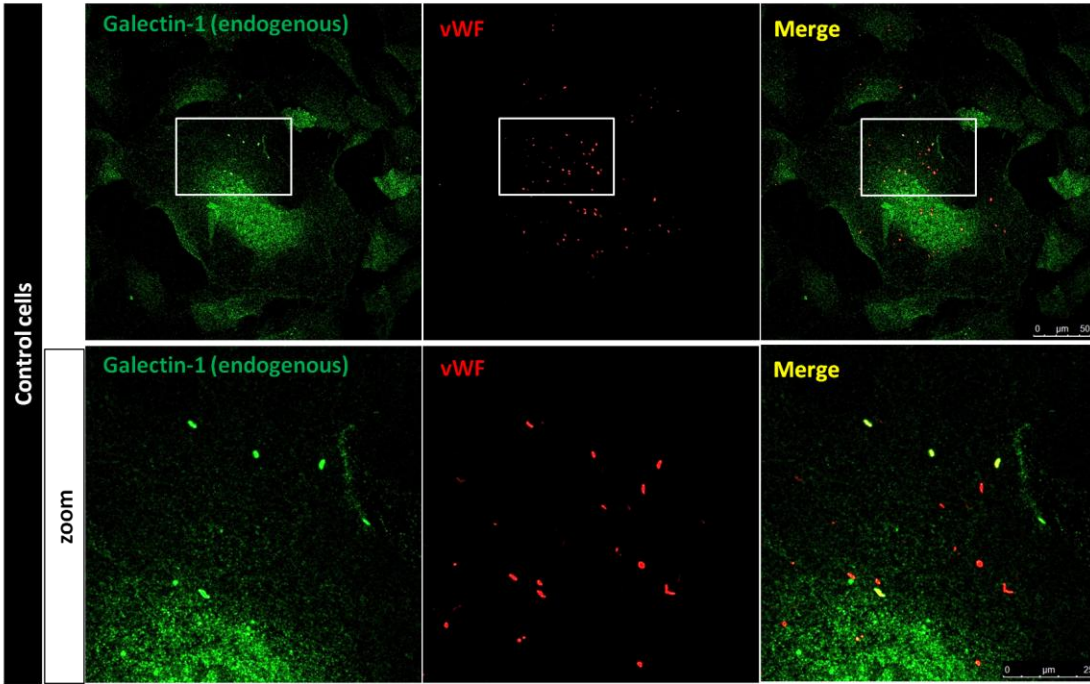
B. Cells incubated with 0.07 mg/ml galectin-1-flag



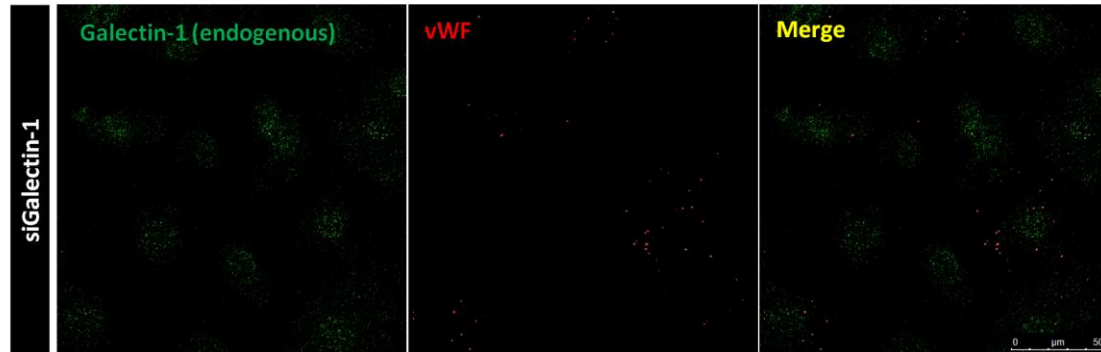
Εικόνα 27. Πρόσληψη της ανασυνδυασμένης galectin-1-flag, στις χαρακτηριστικές επιμηκυσμένες, «ραβδωτού» σχήματος, δομές των οργανιδίων WPBs. Κύτταρα HUVE επωάστηκαν με την ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη galectin-1-flag (0,07 mg/ml) για 1 ώρα (B). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση, έναντι A) των ενδογενών πρωτεϊνών galectin-1, με χρήση ποικλωνικού αντισώματος κονίκλου (πράσινη χρώση) και vWF (κόκκινη χρώση) σε φυσιολογικά κύτταρα, ενώ σε κύτταρα στα οποία προστέθηκε εξωγενώς η πρωτεΐνη galectin-1-flag (B) πραγματοποιήθηκε χρώση έναντι της πρωτεΐνης galectin-1, με πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου (πράσινη χρώση) και έναντι του προσδέματος flag, με μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος (κόκκινη χρώση). Παρουσιάζεται σε μεγέθυνση, μία δομή (άσπρο πλαίσιο) που θυμίζει ένα WPB, όπου και παρουσιάζεται ο συνετοπισμός της ενδογενούς galectin-1 με την ανασυνδυασμένη galectin-1-flag.

Ο έλεγχος της πρόσληψης της ανασυνδυασμένης galectin-1-flag (0,14 mg/ml) πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα HUVE, στα οποία αποσιωπήθηκε η ενδογενής πρωτεΐνη galectin-1, με χρήση siRNA (Εικόνα 28). Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν για ακόμη μία φορά, τον εντοπισμό της εξωγενούς galectin-1 στα WPBs, αλλά παρόλα αυτά η παρουσία της στα εν λόγω οργανίδια είναι αισθητά περιορισμένη. Η επιτυχής αποσιώπηση της πρωτεΐνης galectin-1 με χρήση siRNA αποδεικνύεται και με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 28 H).

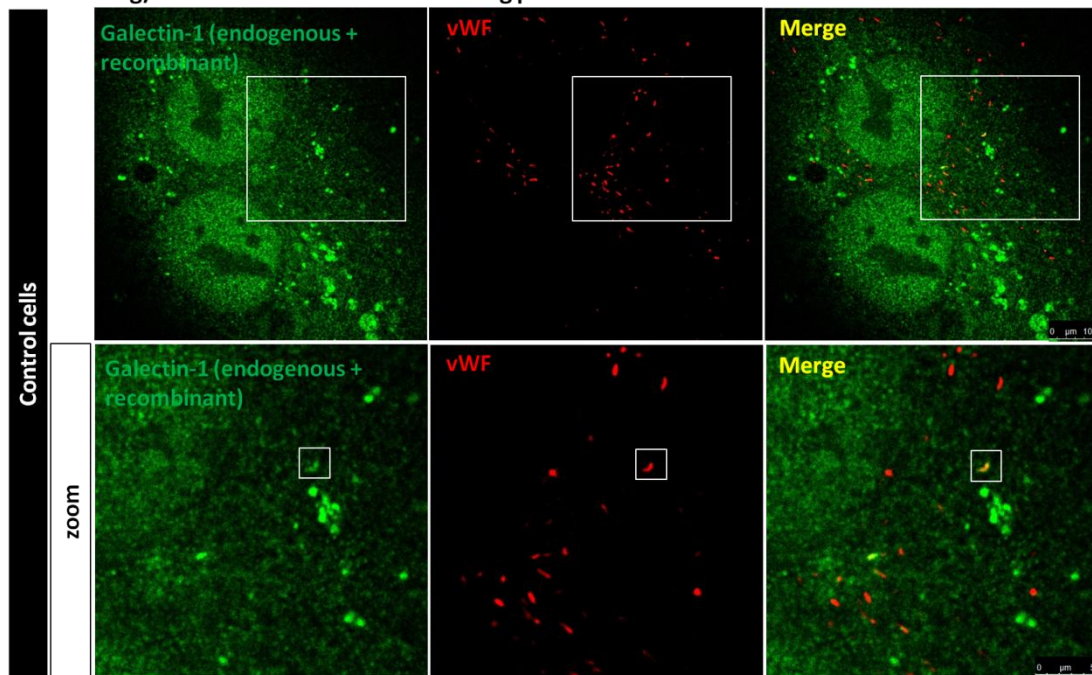
A.



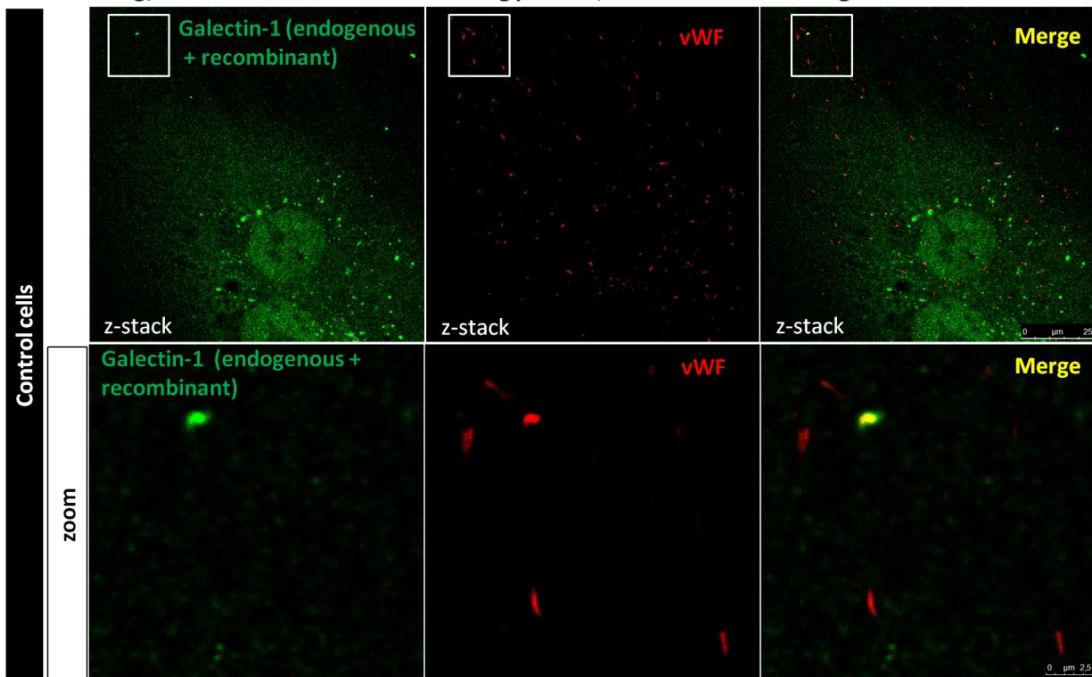
B.



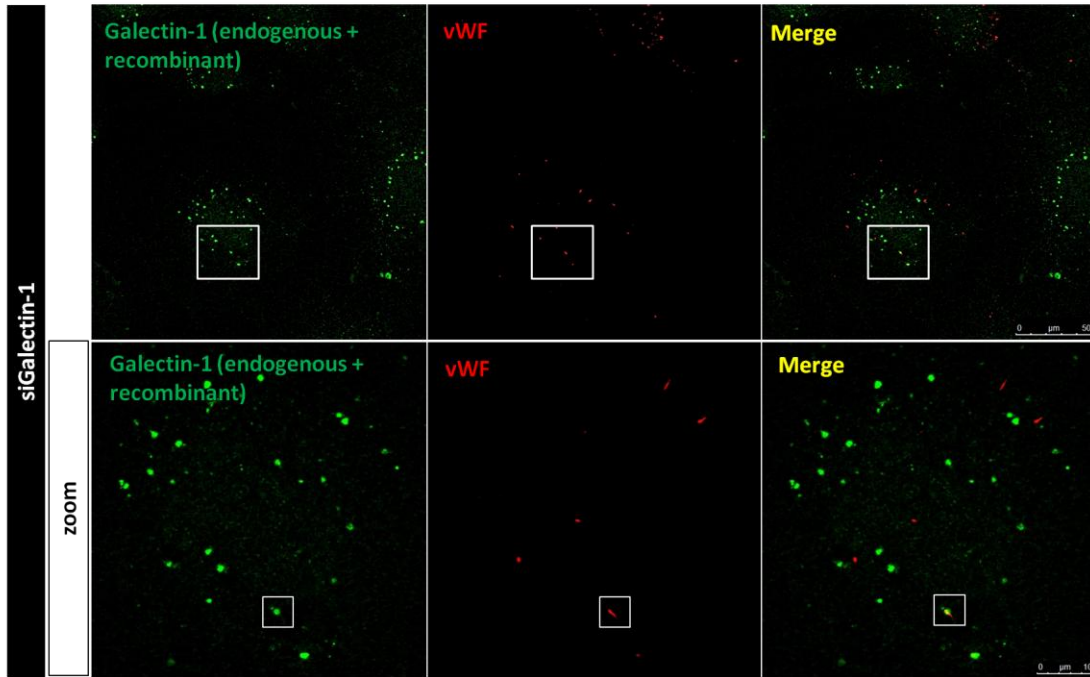
Γ. + 0.14 mg/ml Recombinant Galectin-1-flag protein



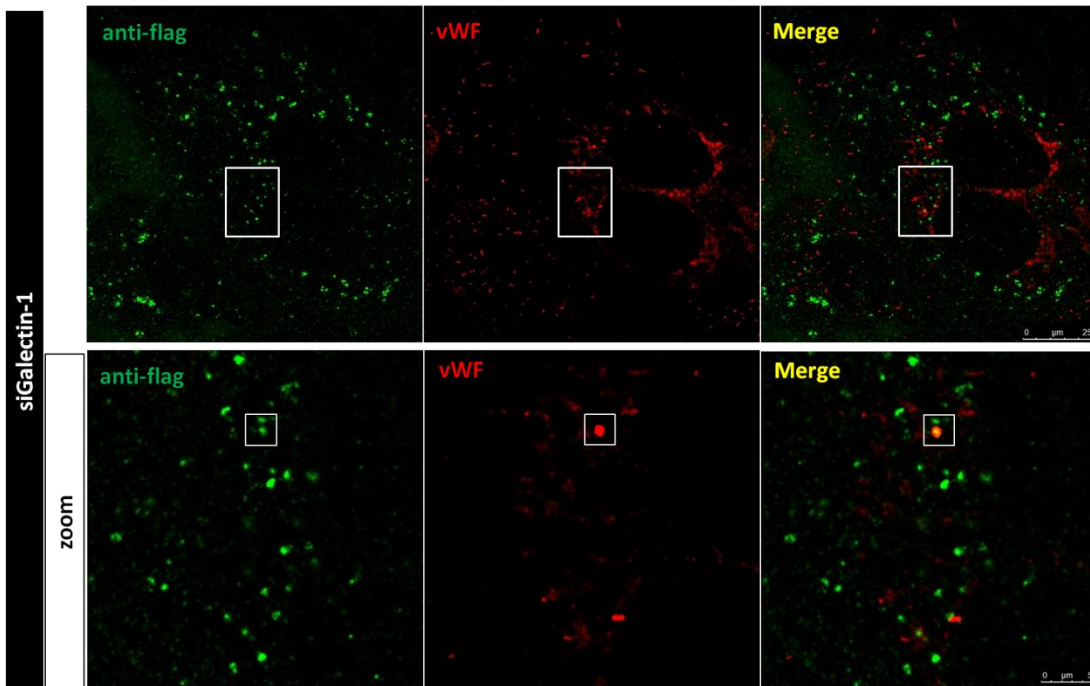
Δ. + 0.14 mg/ml Recombinant Galectin-1-flag protein, different z-stack of figure Γ.

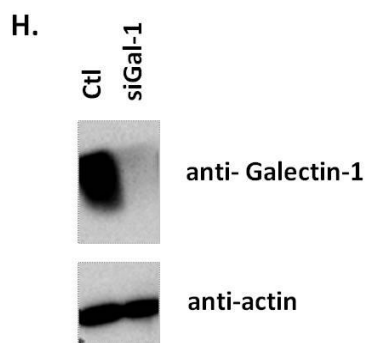


E. + 0.14 mg/ml Recombinant Galectin-1-flag protein



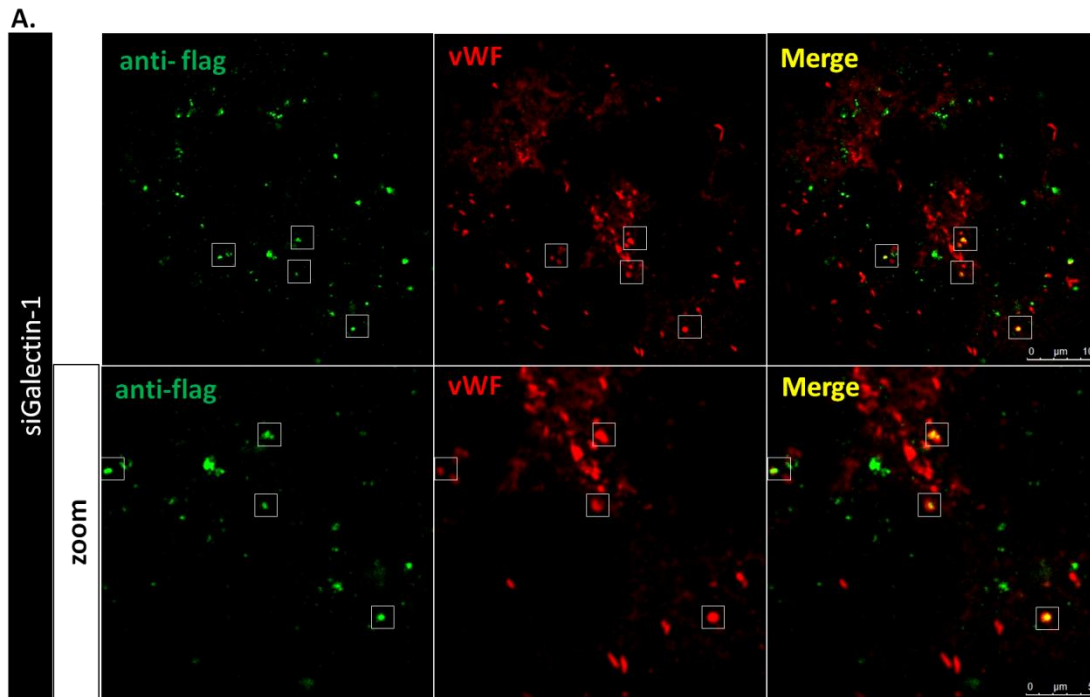
Z. + 0.14 mg/ml Recombinant Galectin-1-flag protein



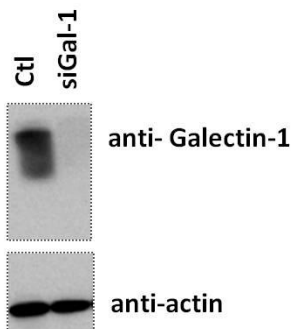


Εικόνα 28. Η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη *galectin-1-flag* εισέρχεται σε περιορισμένο αριθμό WPBs, μετά από έλεγχο της εξωκυττάριας πρόσληψής της. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της εισόδου, της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* στα WPBs σε αναπτυσσόμενα φυσιολογικά (Γ,Δ) καθώς και σε κύτταρα HUVE στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* (E,Z). Η πρόσληψη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* (0,14 mg/ml) πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HUVE για 1 ώρα (Γ-Z). Η αποσιώπηση της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες με χρήση siRNA (B,E,Z) και ακολούθησε η προσθήκη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* (E,Z). Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση με πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1* (πράσινη χρώση) και vWF (κόκκινη χρώση) (A,B,Γ,Δ,E) και Z της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* (anti-flag antibody, πράσινη χρώση) και του ενδογενούς vWF (κόκκινη χρώση). Παρουσιάζονται σε μεγέθυνση, οι περιοχές των κυττάρων που επισημαίνονται με άσπρο πλαίσιο και στις οποίες αναδεικνύεται με μεγαλύτερη σαφήνεια, ο εντοπισμός της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* (A,Γ,Δ,E) καθώς και της ανασυνδυασμένης *galectin-1-flag* (Γ,Δ,E) με τον vWF στα WPBs. Να σημειωθεί ότι στις εικόνες Γ,Δ δεν είναι σαφής ο διαχωρισμός μεταξύ της ενδογενούς και της ανασυνδυασμένης *galectin-1-flag*, καθώς πραγματοποιήθηκε χρώση με αντίσωμα για την *galectin-1*, που αναμένεται να αναγνωρίσει και τις δύο πρωτεΐνες. Η χρώση όμως έναντι του προσδέματος flag καθιστά αναγνωρίσιμη μόνο την ανασυνδυασμένη *galectin-1-flag* (Z). Δεδομένου της επιτυχούς αποσιώπησης της ενδογενούς πρωτεΐνης *galectin-1* μέσω siRNA, όπως αποδεικνύεται από την μείωση του σήματος (B) (δεν βρέθηκαν WPBs στα οποία να εντοπίζεται η *galectin-1* μετά από την αποσιώπηση αυτής), διαπιστώνεται ο συνεντοπισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης (E, Z, άσπρα πλαίσια, μεγέθυνση) με τον vWF στα WPBs. Η εικόνα Δ απεικονίζει μία διαφορετική εγκάρσια τομή σε επίπεδο z, του κυττάρου που απεικονίζεται στην εικόνα Γ, ώστε να τονιστεί ο συνεντοπισμός της *galectin-1* τόσο στα επιμηκυσμένα όσο και στα κυκλικά WPBs. Η) Ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώνει την επιτυχή αποσιώπηση της πρωτεΐνης *galectin-1* με χρήση siRNA. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, έναντι της πρωτεΐνης *galectin-1* και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμύος, έναντι της πρωτεΐνης ακτίνη, ως μάρτυρας ισοφόρτωσης, συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση.

Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν μετά από την πρόσληψη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης *galectin-1-flag* σε υψηλότερη συγκέντρωση (0,42 mg/ml) (Εικόνα 29 A) σε κύτταρα HUVE στα οποία αποσιωπήθηκε επιτυχώς η ενδογενής *galectin-1* (Εικόνα 29 B).



B.



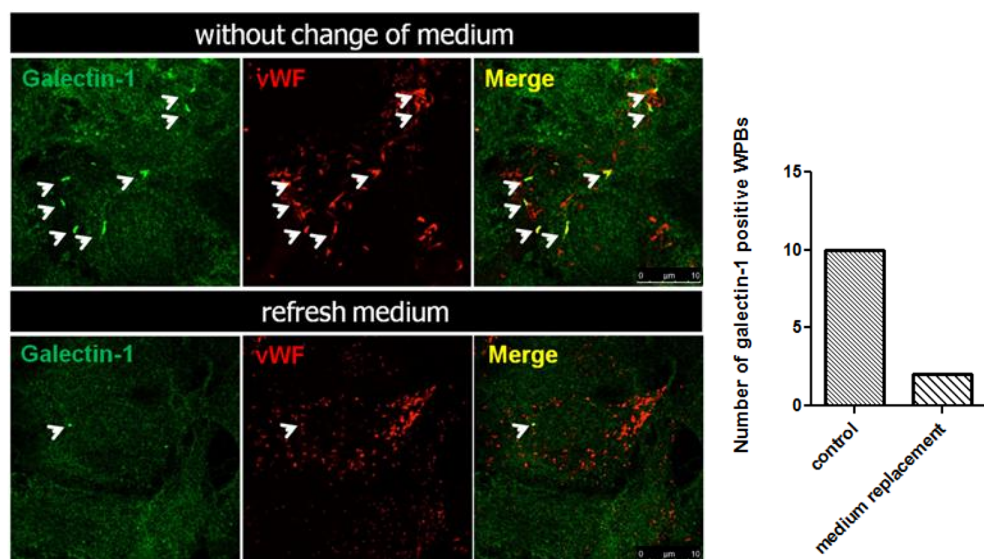
Εικόνα 29. Επιβεβαίωση της εισόδου της ανασυνδυασμένης galectin-1 στα WPBs. Α) Στα άσπρα πλαίσια απεικονίζονται υπό μεγέθυνση τα WPBs τα οποία προσέλαβαν την εξωκυττάρια ανασυνδυασμένη galectin-1-flag. Να σημειωθεί ότι η αυξημένη συγκέντρωση της εξωγενούς galectin-1-flag στο θρεπτικό (0,42 mg/ml) προκαλεί την ενδοκυττάρωσή της, πιθανόν μέσω “fluid phase” ενδοκυττάρωσης. Η αποσιώπηση της ενδογενούς galectin-1 πραγματοποιήθηκε με χρήση siRNA για 72 ώρες. Η χρώση των υπό μελέτη πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με αντισώματα έναντι του προσδέματος flag (πράσινη χρώση) και του ενδογενούς vWF (κόκκινη χρώση). Β) Ανοσοαποτύπωση κατά Western επιβεβαιώνει την επιτυχή αποσιώπηση της πρωτεΐνης galectin-1 με χρήση siRNA. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκαν το πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι της πρωτεΐνης galectin-1 και το μονοκλωνικό αντίσωμα επιμόος έναντι της πρωτεΐνης ακτίνη, συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση.

Να σημειωθεί ότι σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη galectin-1-flag προστέθηκε σε φυσιολογικά κύτταρα HUVE (κύτταρα ελέγχου) και σχετικά σε κύτταρα πρώιμης γενεολογίας (passage 1) απουσία ενεργοποιητών της

εξωκυττάρωσης. Μελλοντικά πειράματα πρόσληψης ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1-flag κατά την ρυθμιζόμενη εξωκυττάρωση των WPBs μετά από επαγωγή με VEGF/bFGF/ATP αναμένεται να διαλευκάνουν τον μηχανισμό “kiss-and-run” ως υπεύθυνο για την είσοδο της galectin-1 στα WPBs.

3.12. Η απομάκρυνση της εκκρινόμενης galectin-1 μειώνει την παρουσία της στα WPBs που υφίστανται ιδιοσυστατική έκκριση

Προκειμένου να διερευνήσουμε περαιτέρω την υπόθεση ότι η εξωκυττάρια galectin-1, η οποία προηγουμένως έχει εκκριθεί μη συμβατικά, είναι αυτή που πιθανόν εισέρχεται στα WPBs μέσω του μηχανισμού “kiss-and-run”, κατά την ιδιοσυστατική έκκριση, πραγματοποιήθηκαν τακτικές αλλαγές του θρεπτικού καλλιέργειας των κυττάρων HUVE, ώστε να μειώσουμε την παρουσία της στο εκκρινόμενο υλικό αυτών των κυττάρων. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, η απομάκρυνση της εξωκυττάριας galectin-1 από το θρεπτικό καλλιέργειας, μειώνει τον αριθμό των θετικών για την πρωτεΐνη galectin-1 WPBs (Εικόνα 30), παρατήρηση που ενισχύει το ενδεχόμενο της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης, ως μηχανισμού εισόδου της galectin-1 στα WPBs.



Εικόνα 30. Η απομάκρυνση της εξωκυττάριας galectin-1 από το θρεπτικό καλλιέργειας μειώνει την παρουσία της στα WPBs. Κύτταρα HUVE καλλιιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό M199 για 3 ημέρες καθώς και σε πλήρες θρεπτικό M199, που ανανεώνονταν κάθε 6-8 ώρες για χρονική διάρκεια 3 ημερών. Στην συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθως υποβλήθηκαν στην διαδικασία του έμμεσου ανοσοφθορισμού, για τον υποκυτταρικό εντοπισμό της πρωτεΐνης galectin-1 (πράσινο) και του vWF (κόκκινο). Η απομάκρυνση της εξωκυττάριας galectin-1 από το θρεπτικό καλλιέργειας, μείωσε τον αριθμό των θετικών για την galectin-1 WPBs (άσπρα βέλη). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων αποδίδεται στο διάγραμμα (δεξιά).

Μελλοντικά πειράματα σε επαγόμενα με VEGF/bFGF/ATP κύτταρα αναμένεται να διαλευκάνουν την παραπάνω υπόθεση, αλλά και να αναδείξουν τον ρόλο της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης, τόσο κατά την ιδιοσυστατική όσο και κατά την ρυθμιζόμενη έκκριση των WPBs, τονίζοντας τον ρόλο της πρωτεΐνης galectin-1 στην ενδοθηλιακή φυσιολογία.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Συσχέτιση μεταξύ της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και της επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα

4.1.1. Ο ρόλος της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Αν και υπάρχει σημαντική γνώση σχετικά με τον ρόλο της ενδοκυττάρωσης υποδοχέων αυξητικών παραγόντων στην ακόλουθη μεταγωγή του σήματός τους και σ'ένα εύρος κυτταρικών λειτουργιών, παραμένει άγνωστο εάν απαιτείται ενδοκυττάρωση των υποδοχέων (στα ενδοσώματα) προκειμένου να ενεργοποιηθεί η εξωκυττάρωση “κλασικών” εκκριτικών οργανιδίων (“professional secretory organelles”). Η ρύθμιση της εξωκυττάρωσης μέσω ελέγχου της ενδοκυττάρωσης θα μπορούσε να αποτελεί έναν ισχυρό μηχανισμό που να σχετίζεται με τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα και τα εγκεφαλικά, αλλά και με την αγγειογένεση στον καρκίνο (Edgington, 1995; Sumpio et al., 2002). Σημαντικά βιολογικά μόρια που εμπλέκονται στις παραπάνω παθολογικές διεργασίες αποθηκεύονται σε εξειδικευμένα οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα Weibel-Palade Bodies (WPBs). Η επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs προκαλεί την απελευθέρωση των μορίων αυτών στην κυκλοφορία του αίματος (Goligorsky et al., 2009; Rondaij et al., 2006). Αν και είναι σημαντικός ο ρόλος του VEGF στην εξωκυττάρωση των WPBs, ελάχιστα είναι γνωστά έως σήμερα, για το πώς τα διαφορετικά μονοπάτια της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα του VEGF (VEGFR2) μεταβιβάζουν σήματα που ελέγχουν την εξωκυττάρωση των οργανιδίων αυτών καθώς και οι μοριακές διασυνδέσεις που επιτρέπουν την μεταφορά των ενεργοποιητικών σημάτων μέσω της σηματοδότησης του VEGFR2 στα εν λόγω οργανίδια (LORENZI et al., 2008; Matsushita et al., 2005b; Xiong et al., 2009). Μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι ο VEGF εισάγει μια νέα οδό ενδοκυττάρωσης για τον VEGFR2, το μονοπάτι της μακροπινοκυττάρωσης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σηματοδότηση του VEGFR2 και την αγγειογένεση (Basagiannis et al., 2016). Αντιθέτως το εξαρτώμενο από κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης έχει μικρότερη επίδραση στην ενδοκυττάρωση του VEGFR2, λειτουργώντας ως ένας προστατευτικός μηχανισμός ιδιοσυστατικής ενδοκυττάρωσης για τον VEGFR2, προστατεύοντάς τον από πρωτεολυτική σχάση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Basagiannis et al., 2016). Αυτά τα δεδομένα ήταν απρόσμενα, δεδομένου ότι μέχρι σήμερα η μόνη γνωστή οδός ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 ήταν η ενδοκυττάρωση

μέσω του μονοπατιού της κλαθρίνης. Τα δεδομένα αυτά μας οδήγησαν στο να μελετήσουμε τη σημασία των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην εξωκυττάρωση των WPBs. Τόσο μέσω ειδικών χημικών αναστολέων όσο και με ειδικά siRNAs προέκυψε το συμπέρασμα ότι η αναστολή της μακροπυκνωτικής επιφέρει σημαντική αύξηση της εξωκυττάρωσης των WPBs, ενώ η αναστολή της κλαθρίνης έχει πολύ μικρότερη επίπτωση. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται να συσχετίζονται με μια ανασταλτική δράση του ενδοκυττάρωμένου VEGFR2 στα ενδοσώματα/μακροπυκνωτικά έναντι της έκκρισης των WPBs. Θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί, σε μελλοντικές μελέτες, ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο προκαλείται η αναστολή αυτή μέσω των μακροπυκνωμάτων.

Όπως θα παρατηρήσει κανείς, στην παρούσα μελέτη δεν χρησιμοποιήσαμε αναστολείς της κλαθρίνης (ως εργαλεία μελέτης του αντίστοιχου μονοπατιού ενδοκυττάρωσης του VEGFR2), καθώς η αναστολή της δράσης της κλαθρίνης αναμένεται να επηρεάσει και την ιδιοσυστατική έκκριση των WPBs, αφού η εν λόγω πρωτεΐνη αποτελεί βασικό συστατικό του καλύμματος των WPBs, κατά το στάδιο ωρίμανσης τους στο δίκτυο *trans*-Golgi. Σχετικά με το εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη δυναμίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, πρωταρχικά πειράματα αναστολής της δράσης της με siRNAs δεν επέφεραν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο ποσοστό του εκκρινόμενου vWF, τουλάχιστον στα 20 και 40 λεπτά επαγωγής και για τον λόγο αυτό τα δεδομένα παραλείπονται.

4.2. Ο VEGFR2 αλληλεπιδρά με τα WPBs

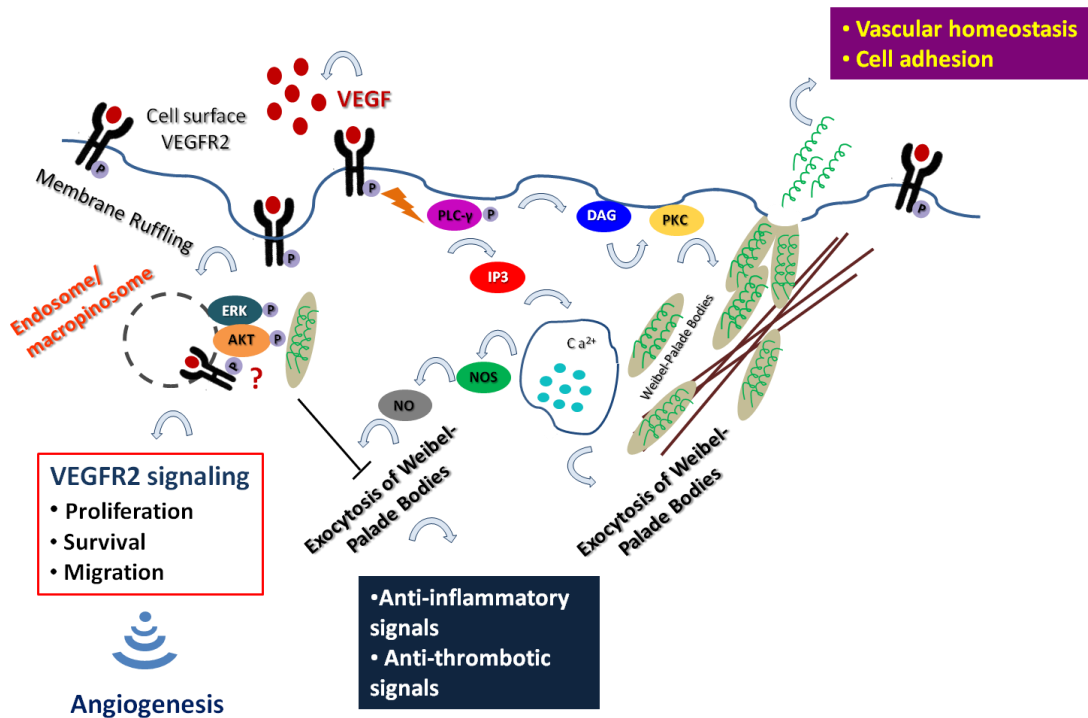
Τα προηγούμενα αποτελέσματα της ανασταλτικής δράσης των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στην εξωκυττάρωση των WPBs προέκυψαν από μελέτη της εξωκυττάρωσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (π.χ. 20 και 40 λεπτά ενεργοποίησης της έκκρισης), καθώς τα εν λόγω χρονικά διαστήματα ενδείκνυται για την μέτρηση της έκκρισης του vWF (Romani de Wit, T., 2003). Παράλληλα πειράματα σε ενεργοποιημένα με VEGF κύτταρα HUVE ανέδειξαν την παρουσία επαφών μεταξύ κυστιδίων στα οποία εντοπίζεται ο VEGFR2 με τα WPBs και σε μικρότερους χρόνους, όπου και παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των επαφών στα 15 λεπτά επώασης με VEGF. Η ανάλυση των στατικών εικόνων έδειξε την παρουσία επαφών μεταξύ κυστιδίων του VEGFR2 με τα WPBs με τις πρώτες επαφές να παρατηρούνται στα πρώτα 2 λεπτά της

επαγόμενης από VEGF εξωκυττάρωσης, η παρουσία των οποίων είναι εμφανέστερη σε χρόνο 25 λεπτών ενεργοποίησης με VEGF. Περιορισμένες επαφές παρατηρήθηκαν επίσης σε πιο όψιμα στάδια ενεργοποίησης (40-60 λεπτά). Η παρατήρηση αυτή υποδεικνύει μία **φυσική αλληλεπίδραση πιθανόν μεταξύ των οργανιδίων-ενδοσωμάτων του ενδοκυτταρωμένου VEGFR2 και των WPBs, μία διαπίστωση που έως τώρα ήταν εντελώς ανεξερεύνητη.** Επειδή η στιγμή της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενδοσωμάτων/μακροπινοσωμάτων του VEGFR2 και των WPBs φαίνεται να είναι μία χρονο-εξαρτώμενη διαδικασία, η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι οι εν λόγω μεμβρανικές επαφές (MCSs, membrane contact sites) θα μπορούσαν να αποτελούν κέντρα σηματοδότησης και διακίνησης ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων (Prinz, 2014), υπεύθυνων για την μεταγωγή του σήματος του VEGFR2 προς τα WPBs. Η ενεργοποίηση των εν λόγω μορίων θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε διάφορα χρονικά διαστήματα, επηρεάζοντας την έκκριση με διαφορετικό τρόπο (είτε θετικά, είτε ανασταλτικά). Στηριζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματα, του ανασταλτικού ρόλου της μακροπινοκυττάρωσης του VEGFR2 στην εξωκυττάρωση των WPBs, υποθέτουμε ότι ο εντοπισμένος στην πλασματική μεμβράνη VEGFR2 πιθανόν να μεταφέρει ενεργοποιητικά σήματα της έκκρισης διαμέσου της διακίνησης μορίων που εντοπίζονται σε αυτή, υπόθεση η οποία απαιτεί μελλοντική διερεύνηση. Η παραπάνω υπόθεση θα μπορούσε να συμβαδίζει με το ενδεχόμενο μεταφοράς ενεργοποιητικών σημάτων έκκρισης μέσω της PLC- γ , το πρώτο μόριο στον καταρράκτη κυτταρικής σηματοδότησης του VEGFR2, ως απόκριση στην φλεγμονή αλλά και στην θρόμβωση, καταστάσεις όπου η έκκριση του vWF εμφανίζεται σε υψηλά επίπεδα.

4.3. Προτεινόμενο μοντέλο της χωρο-χρονικής οργάνωσης του ενδοκυτταρωμένου VEGFR2, της σηματοδότησης και της εξωκυττάρωσης των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Αφού η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 προκαλεί αναστολή της επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs, ο VEGFR2 επάγει την εξωκυττάρωση μέσω ενδιάμεσων μορίων μεταγωγής του σήματος που εκκινούν από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τέτοια υποψήφια μόρια είναι η PLC- γ (μόριο που εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη) και η ακόλουθη αύξηση του ενδοκυττάρου ασβεστίου (Ca^{2+}), υπόθεση η οποία απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Ο VEGF αποτελεί έναν από τους πολυάριθμους ενεργοποιητές της έκκρισης των WPBs ωστόσο με μικρότερη ισχύ, συγκριτικά με αυτή άλλων ρυθμιστών (PMA, VEGF/bFGF/ATP) (Zofragou et al., 2012). Η επαγόμενη έκκριση των WPBs από τον VEGF, μικρή αλλά σημαντική, θα μπορούσε να σχετίζεται με τον ρόλο της έκκρισης των WPBs για την διατήρηση της ενδοθηλιακής ομοιόστασης σε φυσιολογικές ωστόσο συνθήκες, απουσία τραύματος ή φλεγμονής, όπου και η ποσότητα του εκκρινόμενου vWF διατηρείται σε φυσιολογικά/θεραπευτικά επίπεδα. Αντιθέτως, ο ενδοκυτταρωμένος VEGFR2 στα ενδοσώματα/μακροπινোসώματα φαίνεται να μεταφέρει ανασταλτικά σήματα έκκρισης, όπως παρατηρήθηκε μετά από αποσιώπηση τόσο των πρωτεϊνών Rabankyrin-5 και CDC42 με χρήση siRNAs όσο και με χρήση των χημικών αναστολέων EIPA και dylngo-4a, επιφέροντας αντι-φλεγμονώδεις και αντι-θρομβωτικές δράσεις. Λαμβάνοντας υπόψη ότι, 1ον, η μακροπινοκυττάρωση του VEGFR2 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των καθοδικών μορίων Erk και Akt (Basagiannis et al., 2016), 2^{ον}, το γεγονός ότι στο σηματοδοτικό καταρράκτη του μονοπατιού της ERK1/2 το πρώτο μόριο το οποίο ενεργοποιείται από τον VEGFR2 είναι η PLCγ (Olsson et al., 2006; Takahashi et al., 2001), και 3^{ον}, τα αποτελέσματα και τις υποθέσεις της παρούσας μελέτης, προτείνουμε το παρακάτω μοντέλο μεταγωγής σήματος και επαγωγής της έκκρισης από τον VEGF σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα.



Εικόνα 1. Προτεινόμενο μοντέλο της χωρο-οργάνωσης του ενδοκυτταρωμένου VEGFR2, της σηματοδότησης και της εξωκυττάρωσης των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σύμφωνα με το παραπάνω μοντέλο, σε 1^η φάση, ο εντοπισμένος στην πλασματική μεμβράνη VEGFR2 (δεξιά), θα μπορούσε να μεταβιβάζει ενεργοποιητικά σήματα έκκρισης των WPBs, μέσω της ενεργοποίησης της φωσφολιπάσης Cγ (PLC-γ) και της ακόλουθης ενεργοποίησης της 1,2 διάκυλο-γλυκερόλης (DAG), έχοντας ως αποτέλεσμα την αύξηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺ αλλά και την ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC). Η εν λόγω επαγόμενη από τον VEGF, μικρή αλλά σημαντική, εξωκυττάρωση των WPBs, θα μπορούσε να σχετίζεται με τον ρόλο της έκκρισης του vWF σε δοσολογία κατάλληλη (θεραπευτική) για την διατήρηση τόσο της αγγειακής ομοιόστασης όσο και των αλληλεπιδράσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους. Η αύξηση του ενδοκυττάρου Ca²⁺ ενεργοποιεί και την συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS), έχοντας ως αποτέλεσμα την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO), το οποίο δρά ανασταλτικά στην εξωκυττάρωση των WPBs, προλαμβάνοντας τοξικές φλεγμονώδεις και θρομβωτικές αποκρίσεις. Μετά την 1^η φάση ενεργοποίησης της έκκρισης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, το σύμπλοκο VEGF/VEGFR2 ενδοκυτταρώνεται στα ενδοσώματα/μακροπινωσώματα, μέσω εσωτερίκευσης σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης όπου λαμβάνει μέρος η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού (“membrane ruffling”). Ο ενδοκυτταρωμένος VEGFR2 στα ενδοσώματα/μακροπινωσώματα (αριστερά) θα μπορούσε να μεταφέρει ανασταλτικά σήματα της έκκρισης των WPBs, μέσω της διακίνησης ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων, πιθανόν μέσω του καταρράκτη κυτταρικής σηματοδότησης διαμέσου της πρωτεϊνικής κινάσης B (Akt/PKB), παρέχοντας αντιφλεγμονώδεις και αντιθρομβωτικές δράσεις. Τα ανασταλτικά αυτά σήματα είναι σημαντικά για τον προστατευτικό ρόλο του VEGF στην ομοιόσταση του ενδοθηλίου. Ο ενδοκυτταρωμένος VEGFR2, μεταφέρει επίσης σήματα που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την επιβίωση αλλά και την αγγειογένεση.

Μελλοντικά πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (confocal) αλλά και ανάκλασης πραγματικού χρόνου (Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF) του ενεργοποιημένου VEGFR2 με τα καθοδικά σηματοδοτικά μόρια PLCγ, ERK1/2, PI3K, Akt και των WPBs, αναμένεται να αποκαλύψουν τον μηχανισμό καθώς και τα ενδιάμεσα καθοδικά σηματοδοτικά μόρια μέσω των οποίων ο VEGFR2 ελέγχει την εξωκυττάρωση των εκκριτικών οργανιδίων WPBs, στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

4.4. Εύρεση του ρόλου της Rab15 στην επικοινωνία μεταξύ VEGFR2-θετικών ενδοσωμάτων και των WPBs

Πρόσφατη μελέτη αναδεικνύει την GTPάση Rab15 ως μία νέα πρωτεΐνη Rab των WPBs (Zografou et al, 2012), η οποία είναι επίσης γνωστή ότι εντοπίζεται στα ενδοσώματα (Zuk et al., 2000). Ενδιαφέρον αποτελεί η αύξηση επαφών μεταξύ υποπεριοχών της ενδοσωμικής Rab15 με τα WPBs σε κύτταρα HUVE μετά από αποσιώπηση της Rab27a, από μία πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας (Δέσποινα Γκέκα, Διδακτορική Διατριβή, 2019). Παρόμοια αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αναδεικνύουν μία ενδοκυττάρια επικοινωνία μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης των ενδοσωμάτων στα οποία εντοπίζεται ο VEGFR2 με τα WPBs. Δεδομένου ότι το σύμπλοκο των πρωτεϊνών Rab15, Rab27a και Munc13-4 ρυθμίζει την έκκριση των WPBs (Zografou et al, 2012), η ενδοσωματική Rab15 μέσω της αλληλεπίδρασής της με σύμπλοκο άγνωστων μέχρι σήμερα πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου της Munc13-4, θα μπορούσε να συντονίζει τη γεινίαση μεταξύ των VEGFR2-θετικών ενδοσωμάτων και των WPBs.

4.5. Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης Galectin-1 στα WPBs

Μια παράλληλη μελέτη του εργαστηρίου με πρωτεομική ανάλυση οδήγησε στην ταυτοποίηση μιας σειράς πρωτεϊνών που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Από το σύνολο των εκκρινόμενων πρωτεϊνών οι περισσότερες βρέθηκε να εμφανίζουν σημαντική εξωκυττάρια δράση στην φυσιολογία του ενδοθηλίου (Μέρος αποτελεσμάτων: Πίνακας 1). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν ήταν η galectin-1.

Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης galectin-1 σε αυτή τη μελέτη είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα δεδομένου των πολλαπλών της δράσεων, καθώς εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση, στον καρκίνο, στην κυτταρική προσκόλληση, στη μετάσταση αλλά και σε διαδικασίες με ανοσορυθμιστικό ρόλο (Rabinovich, 2005, Μέρος αποτελεσμάτων: Πίνακας 1). Μελέτες δείχνουν ότι η εξωκυττάρια galectin-1 αυξάνει τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση καθώς και την αγγειόγνευση *in vivo* σε κύτταρα HUVE (D'Haene et al. 2013; Hsieh et al. 2008; Ito et al. 2011; Thijssen et al. 2010). Είναι ενδιαφέρον η εμπλοκή της galectin-1 στην αγγειογένεση και στο καρκίνο μέσω της σηματοδότησης του VEGFR2 (Hsieh et al. 2008) ακόμη και απουσία του VEGF (Crocì et al., 2014). Αίνιγμα ωστόσο αποτελεί ο μηχανισμός έκκρισης της εν λόγω πρωτεΐνης, ο οποίος φαίνεται να εμπίπτει στην κατηγορία της μη συμβατικής/κλασσικής οδού έκκρισης κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών (Nickel, W., & Rabouille, C., 2018; Popa et al., 2018). Δεδομένου ότι η galectin-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος του VEGFR2, είναι πιθανό η πρωτεΐνη αυτή να αποτελεί μέρος της διασύνδεσης μεταξύ της μεταγωγής του σήματος του VEGF και των WPBs. Ωστόσο, παραμένει άγνωστο αν η galectin-1 εισέρχεται στα WPBs. Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε τον μηχανισμό έκκρισης αυτής της πρωτεΐνης και να εξηγήσουμε την παρουσία της στο εκκρινόμενο υλικό των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε έλεγχος του υποκυτταρικού εντοπισμού της σε φυσιολογικά κύτταρα HUVE, απουσία επαγωγής της έκκρισης. Προς έκπληξή μας, συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού ανέδειξε τον εντοπισμό της galectin-1 τόσο στο κυτταρόπλασμα (διάχυτη κυτταροπλασματική χρώση) αλλά και στα WPBs, καθώς βρέθηκε να συνετοπίζεται πλήρως με την πρωτεΐνη vWF, γνωστός δείκτης των WPBs (Rondaij et al., 2006). Η παραπάνω παρατήρηση συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου υποστηρίζεται ότι οι πρωτεΐνες galectin-1 και galectin-3 εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επίσης αναγνωρίζουν πολυσακχαρίτες στο μόριο της πρωτεΐνης vWF (Oortwijn et al., 2012; Saint-Lu et al., 2012), χωρίς ωστόσο να αναφέρεται η εμπλοκή των WPBs. Η παρουσία της galectin-1 στα WPBs επιβεβαιώθηκε, για πρώτη φορά, στην παρούσα μελέτη και με πειράματα συνεντοπισμού της με τις πρωτεΐνες P-selectin, Rab27a, Rab3a, Rab3d, πρωτεΐνες-δείκτες των οργανιδίων αυτών (Bierings et al., 2012; Hannah et al., 2002; Knop et al., 2004; McCormack et al., 2017; Metcalf, D. J. et al., 2008; Michaux et al.,

2006b; Zografou et al., 2002). Περαιτέρω ανάλυση με μικροσκοπία STED επιβεβαίωσε τον πλήρη συνεντοπισμό της με τον vWF, αφήνοντας ανοιχτό το ενδεχόμενο για την ταυτοποίηση της galectin-1 ως ένα νέο μόριο-φορτίο των WPBs. Ο παραπάνω ωστόσο ισχυρισμός απαιτεί περαιτέρω έλεγχο της τοπολογίας της (εάν εντοπίζεται στον αυλό ή στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των WPBs) για την κατανόηση του ρόλου της στην ενδοθηλιακή φυσιολογία. Δεδομένου των ασαφειών της τοπολογίας της galectin-1 στα WPBs, ακόμη και με την μικροσκοπία STED, μία πιο σαφής και ακριβής εικόνα της τοπολογίας της στα WPBs αναμένεται να αναδειχθεί με ηλεκτρονική μικροσκοπία, συζευγμένη ή μη με μικροσκοπία ανοσοφθορισμού (CLEM), πειράματα που βρίσκονται σε εξέλιξη.

Ενδιαφέρον αποτελεί επίσης η ταυτοποίηση της galectin-1 σε ένα υποσύνολο των WPBs και μάλιστα σε ένα περιορισμένο αριθμό κυττάρων HUVE στην καλλιέργεια, όπως και παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Ο περιορισμένος ωστόσο αριθμός των WPBs στα οποία η πρωτεΐνη galectin-1 βρέθηκε να συνεντοπίζεται πλήρως με τον vWF, φαίνεται να επηρεάζεται από την ανακαλλιέργεια (“passaging”) των κυττάρων HUVE, όπου και παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση αυτής στα WPBs κυττάρων πρώιμης γενεαλογίας (primary), συγκριτικά με αυτά των επόμενων γενεαλογιών. Μάλιστα, η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και σε κύτταρα που βρίσκονται σε φάση διαίρεσης, παρατήρηση που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση με πειράματα συγχρονισμού της καλλιέργειας, επιβεβαιώνοντας την εμπλοκή της galectin-1 στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Rabinovich, 2005). Η συνδυαστική ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF/bFGF/ATP αύξησε επίσης τον αριθμό των θετικών για την galectin-1 WPBs, σε περιορισμένο ωστόσο αριθμό ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα παραπάνω διεγείρουν ένα νέο σημείο έρευνας, στην μελέτη του μηχανισμού που επιτρέπει σε κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες να εισέλθουν σε κλασικά εκκριτικά οργανίδια (“professional secretory organelles”), ερώτημα που διερευνήθηκε και στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

4.6. “Kiss-and-run” εξωκυττάρωση: Προτεινόμενος μηχανισμός εισόδου της πρωτεΐνης Galectin-1 στα WPBs

Είναι ενδιαφέρον το μονοπάτι έκκρισης της πρωτεΐνης galectin-1, το οποίο όπως αναφέρθηκε εμπίπτει στην κατηγορία της μη συμβατικής/κλασσικής πρωτεϊνικής έκκρισης (Daniels et al., 2017; Ding et al., 2012; Nickel, W., 2003; Nickel et al., 2008, 2009, Nickel, W., & Rabouille, C., 2018; Pora et al., 2018). Ακόμη πιο ενδιαφέρον αποτελεί η παρουσία της στα WPBs και στο εκκρινόμενο υλικό των ενεργοποιημένων κυττάρων HUVE, όπως υποστηρίζεται από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Οι παρατηρήσεις αυτές γεννούν το ερώτημα για τον μηχανισμό που εξηγεί την παρουσία της στα οργανίδια αυτά. Στην προσπάθεια εύρεσης του υπεύθυνου μηχανισμού, διερευνήθηκε η πιθανότητα η είσοδος της στα WPBs να πραγματοποιείται από τον εξωκυτταρικό χώρο, κατά τη στιγμή της παροδικής σύντηξης των WPBs με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (“kiss-and-run” εξωκυττάρωση) (Knop & Gerke, 2002). Σύμφωνα με το μοντέλο εξωκυττάρωσης “kiss-and-run”, τα WPBs συντίκονται με την πλασματική μεμβράνη μέσω του σχηματισμού ενός πόρου (10-12 nm), μέσω του οποίου επιτρέπεται η επιλεκτική απελευθέρωση πρωτεϊνών, κυρίως αυτών με μικρό μοριακό βάρος (Babich et al., 2008; Valentijn et al., 2011, 2013). Στη συνέχεια τα WPBs αποκόπτονται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και παραμένουν στον ενδοκυττάριο χώρο. Επειδή η galectin-1 εκκρίνεται με ένα μη συμβατικό τρόπο, διαπερνώντας με κάποιο τρόπο την κυτταροπλασματική μεμβράνη (Nickel, W., & Rabouille, C., 2018; Pora et al., 2018), είναι πιθανό η είσοδος της στα WPBs να πραγματοποιείται από τον εξωκυτταρικό χώρο, κατά τη στιγμή της “kiss-and-run” εξωκυττάρωσης αυτών, όπου υπάρχει επικοινωνία του αυλού των WPBs με τον εξωκυττάριο χώρο. Για την διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα πρόσληψης εξωγενούς ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης galectin-1 (“internalization assays”) που προστέθηκε στο θρεπτικό καλλιέργειας φυσιολογικών αλλά και ενεργοποιημένων με VEGF/bFGF/ATP κυττάρων HUVE, με στόχο την αύξηση της παρουσίας της στον εξωκυττάριο χώρο. Η επώαση των κυττάρων με τους ενεργοποιητές προκάλεσε αύξηση του αριθμού των WPBs που είναι θετικά στην galectin-1. Περαιτέρω αύξηση των θετικών σε galectin-1 WPBs παρατηρήθηκε σε κύτταρα στα οποία η galectin-1 προστέθηκε εξωγενώς. Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται σε γεγονότα εξωκυττάρωσης των WPBs, μετά από ενεργοποίηση της έκκρισης. Για την περαιτέρω διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης, στηριζόμενοι στην πειραματική προσέγγιση που

περιγράφουν στην μελέτη τους οι Knorr & Gerke (2002), πραγματοποιήθηκαν παρόμοια πειράματα πρόσληψης αντισωμάτων έναντι του vWF («*anti-vWF antibody internalization assay*») από τα μερικώς συντηγμένα με την πλασματική μεμβράνη WPBs, κατά την “kiss-and-run” εξωκυττάρωση αυτών. Η επαγωγή της έκκρισης πραγματοποιήθηκε μετά από διέγερση με VEGF/bFGF/ATP και ακολούθησε χρώση για την ανίχνευση της πρωτεΐνης galectin-1 στα WPBs. Τα αποτελέσματα έδειξαν την παρουσία της galectin-1 στις παρυφές των WPBs που επαναπροσέλαβαν το αντίσωμα του vWF, παρατήρηση που πιθανώς οφείλεται στον ανταγωνισμό μεταξύ της galectin-1 και του αντισώματος για τον vWF. Μία τέτοια ωστόσο παρατήρηση, γεννά επίσης πολλά ερωτήματα, σχετικά με τον μηχανισμό εισόδου της στα WPBs και αφήνει ανοιχτό το ενδεχόμενο για μία εναλλακτική οδό εισόδου της galectin-1 στα WPBs. Η εναλλακτική αυτή οδός θα μπορούσε να εξηγεί την ενδοκυττάρια πρόσληψη της κυτταροπλασματικής galectin-1 από τα WPBs, σε συνθήκες όπου ευνοείται η διάνυξη της μεμβράνης των WPBs, όπως σε περιπτώσεις τραύματος λόγω κυτταρικού στρες ή και ακόμη λόγω φαινομένων διάνυξης τους από τον συνεχώς αναπτυσσόμενο (λόγω πολυμερισμού) vWF. Σε μία τέτοια πιθανή περίπτωση, το σημείο διάνυξης της μεμβράνης των WPBs θα μπορούσε να αποτελεί σημείο εισόδου της galectin-1, η οποία εμφανίζει συγγένεια σύνδεσης με κάποιο από τα συστατικά του αυλού. Επιπλέον, η προσέλκυση των αυτοφαγοσωμάτων για την αποκατάσταση της βλάβης θα μπορούσε να ήταν πιθανή. Η παρουσία των πρωτεϊνών galectins, όπως για παράδειγμα της galectin-1 και galectin-3 σε κατεστραμμένες μεμβράνες λυσοσωμάτων που οδηγούν στην αυτοφαγία, υποστηρίζεται και βιβλιογραφικά (Aits et al., 2015; Anding et al., 2017; Popa et al., 2018; Maejima et al., 2013). Τα παραπάνω συνηγορούν στην πιθανότητα τα αυτοφαγοσώματα να λειτουργούν ως ενδιάμεσοι φορείς έκκρισης της πρωτεΐνης galectin-1, καθώς όλο και περισσότερες μελέτες εντάσσουν την αυτοφαγία, ως πιθανή οδό μη συμβατικής έκκρισης (Ding et al., 2012; Nickel et al., 2008, 2009, Nickel, W., & Rabouille, C., 2018; Popa et al., 2018). Οι παραπάνω ωστόσο παρατηρήσεις αποτελούν απλά υποθέσεις και απαιτούν μελλοντική διερεύνηση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή μελέτησε τον χωρο-χρονικό συντονισμό μεταξύ ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και επαγόμενης από τον VEGF εξωκυττάρωσης των Weibel-Palade bodies (WPBs), στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μέχρι στιγμής, η επαγόμενη από την ενδοκυττάρωση σηματοδότηση καθώς και η σηματοδοτούμενη εξωκυττάρωση έχουν μελετηθεί ξεχωριστά. Έτσι, δεν γνωρίζουμε αν η ενδοκυττάρωση και η εξωκυττάρωση είναι αλληλοεξαρτώμενες διαδικασίες, ποιες είναι οι φυσικές διασυνδέσεις μεταξύ των ενδοσωματικών διαμερισμάτων και των εκκριτικών κυστιδίων, και ποιοι είναι οι βασικοί μοριακοί μηχανισμοί αυτής της σχέσης. Μια πολύ πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι ο VEGF εισάγει μια νέα οδό ενδοκυττάρωσης για τον VEGFR2, το μονοπάτι της μακροπινोकυττάρωσης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σηματοδότηση του VEGFR2 και την αγγειογένεση. Αυτά τα δεδομένα ήταν απρόσμενα, δεδομένου ότι μέχρι σήμερα η μόνη γνωστή οδός ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 ήταν το μονοπάτι που εξαρτάται από την κλαθρίνη.

Στην παρούσα μελέτη, οι χημικοί αναστολείς dyno-4a (για το εξαρτώμενο από την κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης) και EIPA (για την μακροπινोकυττάρωση) χρησιμοποιήθηκαν για την αναστολή των διαφορετικών ενδοκυτταρικών οδών του VEGFR2 και μελετήθηκε η επίδραση αυτής της αναστολής στην εξωκυττάρωση των WPBs. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι το εξαρτώμενο από κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 έχει μικρή ανασταλτική δράση στο ποσοστό του εκκρινόμενου vWF, σε αντίθεση με την μακροπινोकυττάρωση, η οποία φαίνεται να έχει σημαντικό ανασταλτικό ρόλο. Ο ανασταλτικός ρόλος της μακροπινोकυττάρωσης στην VEGF επαγόμενη εξωκυττάρωση των WPBs ελέγχθηκε και με πειράματα αποσιώπησης πρωτεϊνών-τελεστών της μακροπινोकυττάρωσης (Rabankyrin-5, CDC42), με χρήση siRNAs και ακόλουθη μέτρηση του εκκρινόμενου vWF με δοκιμασία ELISA. Πράγματι, η αποσιώπηση των δύο αυτών πρωτεϊνών, ξεχωριστά ή συνδυαστικά, οδήγησε σε αύξηση της επαγόμενης εξωκυττάρωσης των WPBs. Από τα παραπάνω διαπιστώνεται, για πρώτη φορά, ότι τα μακροπινοςώματα μεταδίδουν σήματα αναστολής της έκκρισης των WPBs στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Παραμένουν ωστόσο, άγνωστα τα υπεύθυνα ενδιάμεσα σηματοδοτικά μόρια.

Επιπλέον, συνεστιακή μικροσκοπία πραγματικού χρόνου σε ζωντανά κύτταρα HUVE υποδεικνύει ότι μετά από ενεργοποίηση με VEGF, ο εντοπισμένος σε ενδοσωματικά κυστίδια VEGFR2 βρίσκεται σε περιορισμένες επαφές με τα WPBs. Συγκεκριμένα, παρατηρήσαμε τις πρώτες επαφές στα πρώτα 2 λεπτά της επαγόμενης από VEGF εξωκυττάρωσης των WPBs, η παρουσία των οποίων είναι εμφανέστερη σε χρόνο 25 λεπτών ενεργοποίησης με VEGF. Τα παραπάνω υποστηρίζουν μία αλληλεπίδραση μεταξύ των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης και εξωκυττάρωσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μια παρατήρηση που έως σήμερα παραμένει εντελώς ανεξερεύνητη.

Εώς τώρα, μόνο ένα μέρος των πρωτεϊνών που απελευθερώνονται από τα WPBs έχει αναγνωριστεί. Για να κατανοήσουμε καλύτερα τους μοριακούς μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την μεταγωγή του σήματος του VEGF και σχετίζονται με την εξωκυττάρωση των WPBs, πραγματοποιήθηκε πρωτεομική ανάλυση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό, κύτταρα HUVE ενεργοποιήθηκαν με VEGF/bFGF/ATP και το εκκρινόμενο υλικό αναλύθηκε με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (nLC-MS/MS). Τα αποτελέσματα οδήγησαν στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών που δεν έχουν συνδεθεί μέχρι σήμερα με την έκκριση των WPBs, μεταξύ αυτών και η πρωτεΐνη galectin-1 (Gal-1). Η ταυτοποίηση της galectin-1 σε αυτήν την μελέτη ήταν η πιο ενδιαφέρουσα λόγω του ρόλου της σε πλήθος κυτταρικών διεργασιών, όπως στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην διαφοροποίηση, στην μετάσταση αλλά και στην αγγειογένεση. Δεδομένου ότι η πρωτεΐνη galectin-1 είναι μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που εκκρίνεται μη συμβατικά, η παρουσία της στο εκκρινόμενο υλικό των ενεργοποιημένων κυττάρων γεννά ενδιαφέροντα ερωτήματα σχετικά με τον ενδοκυττάριο εντοπισμό της αλλά και του υπεύθυνου μηχανισμού της έκκρισής της, τα οποία και διερευνήσαμε. Αναφορικά με τον υπο-κυτταρικό εντοπισμό της, βρήκαμε ότι η galectin-1 εντοπίζεται στα WPBs των ενδοθηλιακών κυττάρων, αφού συνεστιακή μικροσκοπία (LSCM/CLSM) με ή χωρίς την χρήση υπερδιακριτικής ικανότητας (STED) απέδειξε τον πλήρη συνεντοπισμό της galectin-1 με τον vWF, το κύριο πρωτεϊνικό φορτίο των WPBs. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε από τον συνεντοπισμό της και με άλλες γνωστές πρωτεΐνες-δείκτες των WPBs (P-selectin, Rab27a, Rab3a, Rab3d). Προς έκπληξή μας, η galectin-1 βρέθηκε να εντοπίζεται σε ένα υποσύνολο των WPBs και σε ένα περιορισμένο αριθμό κυττάρων HUVE. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο αριθμός των θετικών για την galectin-1 WPBs σχετίζεται με την

ανακαλλιέργεια (“passaging”) των κυττάρων, καθώς παρατηρούμε περισσότερα WPBs θετικά για την galectin-1 σε πρώιμες καλλιέργειες κυττάρων HUVE. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει έναν πιθανό ρόλο της galectin-1 στον πολλαπλασιασμό ή/και τον ενδοθηλιακό φαινότυπο των κυττάρων.

Η επαγωγή με VEGF/bFGF/ATP αύξησε τον αριθμό των θετικών για την galectin-1 WPBs. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι η galectin-1 είναι πιθανό να εισέρχεται στα WPBs όταν αυτά συντίκονται μερικώς με την κυτταροπλασματική μεμβράνη (“kiss-and-run” εξωκυττάρωση). Για την διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα πρόσληψης αντισωμάτων έναντι του *vWF* («*antibody internalization assay*») σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, μετά από ενεργοποίηση της έκκρισης με VEGF/bFGF/ATP η galectin-1 εντοπίζεται στα WPBs που προσέλαβαν τα αντισώματα έναντι του *vWF*, και επομένως υπέστησαν “kiss-and-run” εξωκυττάρωση. Παράλληλα, πειράματα πρόσληψης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών galectin-1 που προστέθηκαν εξωγενώς στο θρεπτικό καλλιέργειας, σε φυσιολογικά αλλά και σε κύτταρα όπου η ενδογενής galectin-1 αποσιωποήθηκε με siRNAs, έδειξαν την παρουσία της ανασυνδυασμένης galectin-1 σε περιορισμένο αριθμό WPBs. Επιπλέον, η απομάκρυνση της εξωκυττάριας galectin-1 από το θρεπτικό καλλιέργειας των κυττάρων μείωσε αισθητά τον αριθμό των θετικών για την galectin-1 WPBs. Το σύνολο των παραπάνω πειραμάτων συνηγορεί στην είσοδο της galectin-1 στα WPBs μέσω του εξωκυττάρου χώρου.

Τα παραπάνω δεδομένα παρέχουν νέες πληροφορίες για τον μηχανισμό της μη συμβατικής έκκρισης της galectin-1, υποδηλώνοντας ότι η έκκρισή της, εν μέρει, οφείλεται στην “kiss-and-run” εξωκυττάρωση των WPBs. Επιπλέον, τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν μία απροσδόκητη σύνδεση μεταξύ της μη συμβατικής έκκρισης κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών και της εξωκυττάρωσης των “κλασικών” (“professional”) εκκριτικών οργανιδίων, υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεΐνες που εκκρίνονται μη συμβατικά μπορούν να εισέλθουν στη συμβατική οδό πρωτεϊνικής έκκρισης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)

This doctoral dissertation studied the spatio-temporal coordination between VEGFR2 endocytosis and VEGF-induced Weibel-Palade bodies (WPBs) exocytosis, in endothelial cells. So far, endocytosis induced signaling as well as signaling induced exocytosis have been studied separately. Thus, it remains unknown whether endocytosis and exocytosis are interdependent processes, what are the inter-connections between endosomal compartments and secretory vesicles, and which are the basic molecular mechanisms of this relationship? A recent study argues that VEGF introduces a new internalization itinerary for VEGFR2, the pathway of macropinocytosis, which is essential for VEGF signaling and angiogenesis. These data were unexpected, as the only known path of endocytosis of VEGFR2 was the clathrin pathway.

In the present study, the inhibitors dyngo-4a (for clathrin-dependent endocytosis) and EIPA (for macropinocytosis) were used to block the different internalization routes of VEGFR2 and the consequences of this inhibition on WPBs exocytosis were tested. The results demonstrate that clathrin-dependent endocytosis of VEGFR2 causes a minor inhibition on the percentage of secreted vWF, as compared to macropinocytosis, which has the predominant inhibitory role. The inhibitory role of macropinocytosis on VEGF-induced WPBs exocytosis was also tested by siRNAs treatments of common regulatory proteins of the macropinocytosis route (Rabankyrin-5, CDC42), followed by assessment of the secreted vWF by an ELISA-based method. Indeed, siRNAs treatment of the above proteins, individually or in combination, increased the VEGF-induced WPBs exocytosis. These data, for the first time, are strongly suggestive that macropinosomes convey signals that inhibit WPBs exocytosis. However, the signaling intermediate molecules remain unknown.

In addition, time-lapse confocal video microscopy in HUVECs suggests that upon VEGF stimulation, VEGFR2 positive endosomes are in limited contact with WPBs. In particular, we observed the first contact sites upon 2 minutes of VEGF-induced exocytosis of WPBs, the number of which is increased after 25 minutes. All the above data support an interaction between endocytic pathways and exocytosis in endothelial cells, an observation that to date is completely unexplored.

So far, only a part of WPBs-released proteins have been identified. In order to better understanding of the molecular mechanisms responsible for VEGF-induced exocytosis of WPBs, we employed a proteomic analysis of the secreted proteins in activated endothelial cells. For this purpose, HUVECs were stimulated with VEGF/bFGF/ATP and the secreted material was analyzed by high resolution mass spectrometry (nLC-MS/MS). The data led to the identification of proteins that have not been linked as yet with the secretion of WPBs, among them the galectin-1 protein (Gal-1). The identification of galectin-1 in this study was the most intriguing due to its role in a number of cellular processes, such as cell proliferation, differentiation, metastasis and angiogenesis. Given that galectin-1 is a cytoplasmic protein secreted unconventionally, its presence in the secreted material of activated cells generates interesting questions about its intracellular localization in endothelial cells and the responsible mechanism of its secretion. Regarding its intracellular localization, we found that galectin-1 is targeted to the WPBs of endothelial cells, since confocal microscopy (LSCM/CLSM) with/or STED demonstrates that galectin-1 co-localizes with vWF, the main cargo molecule of WPBs. This observation was also confirmed by its co-localization with other bona fide markers of WPBs (P-selectin, Rab27a, Rab3a, Rab3d). Surprisingly, galectin-1 was found only in a subset of WPBs and in a “rare” subpopulation of HUVECs. Of interest is that the number of galectin-1 positive WPBs is related to the “passaging” of HUVECs, since we observe more galectin-1 positive WPBs at early passages. This observation indicates a possible role of galectin-1 in cell proliferation and/or in endothelial phenotype.

Induction with VEGF/bFGF/ATP increased the number of galectin-1 positive WPBs. This observation has led to the hypothesis that galectin-1 is likely to enter WPBs when they are partially fused with the plasma membrane (“kiss-and-run” exocytosis). In order to test this hypothesis, anti-vWF antibodies internalization assays in activated endothelial cells were performed. The results show that, upon VEGF/bFGF/ATP induction galectin-1 is localized in WPBs that recapture the extracellular anti-vWF antibodies, thus undergo "kiss-and-run" exocytosis. In parallel, internalization assays of recombinant galectin-1 proteins added extracellularly in culture medium, in control and siRNA treated for galectin-1 HUVECs, show that recombinant galectin-1 is localized in a limited number of WPBs. In addition, removal

of extracellular galectin-1 from the culture medium reduces the number of galectin-1 positive WPBs significantly. All the above data suggest that galectin-1 enters WPBs through the extracellular space.

The above data provide novel insights into the mechanism of unconventional secretion of galectin-1, implying that its secretion is partly, due to "kiss-and-run" exocytosis of WPBs. Furthermore, these data provide unexpected links between unconventional protein secretion of cytoplasmic proteins and exocytosis of professional secretory organelles, suggesting that unconventionally secreted proteins are able to enter the conventional pathway.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, J. C. (2004). Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Current Opinion in Cell Biology*, **16(5)**, 590–596.
- Ahmad N, Gabius HJ, Sabesan S, Oscarson S, Brewer CF. (2004). Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3 and the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Glycobiology* **14**: 817–825.
- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.-M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Jäätelä, M. (2015). Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy*, **11(8)**, 1408–1424.
- Aird, W. C. (2006). Mechanisms of Endothelial Cell Heterogeneity in Health and Disease. *Circulation Research*, **98(2)**, 159-162.
- Amyere, M., Mettlen, M., Van Der Smissen, P., Platek, A., Payrastra, B., Veithen, A., & Courtoy, P. J. (2001). Origin, originality, functions, subversions and molecular signaling of macropinocytosis. *International Journal of Medical Microbiology*, **291(6-7)**, 487-494.
- Anding, A. L., & Baehrecke, E. H. (2017). Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Developmental Cell*, **41(1)**, 10–22.
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M. R., Chimini, G., & Rubartelli, A. (1999). The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1 β Involves Exocytosis of Endolysosome-related Vesicles. *Molecular Biology of the Cell*, **10(5)**, 1463-1475.
- Arya, M. Anvari B, Romo GM, Cruz MA, Dong JF, McIntire LV, Moake JL, Lopez JA. (2002). Ultra large multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*, **99(11)**, 3971-3977.
- Babich, V., Meli, A., Knipe, L., Dempster, J. E., Skehel, P., Hannah, M. J., & Carter, T. (2008). Selective release of molecules from Weibel-Palade bodies during a lingering kiss. *Blood*, **111(11)**, 5282–5290.
- Bantia, S. Klipatrick, JM. (2004). Purine nucleoside phosphorylase inhibitors in T-cell malignancies. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **7(2)**:243-7.

- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N.W., Cummings, R. D., Drickamer, K., Felzi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K. et al. (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597-598.
- Basagiannis D., and S. Christoforidis. (2016). Constitutive Endocytosis of VEGFR2 Protect the Receptor against Shedding. *J Biol Chem.* **291**:16892-16903.
- Basagiannis, D., Zografou, S., Murphy, C., Fotsis, T., Morbidelli, L., Ziche, M., Bleck, C., Mercer, J. and Christoforidis, S. (2016). VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. *J Cell Sci.* **129**:4091-4104.
- Basagiannis, D., Zografou, S., Galanopoulou, K., & Christoforidis, S. (2017). Dynasore impairs VEGFR2 signaling in an endocytosis-independent manner. *Scientific Reports*, **7(1)**.
- Bhattacharya, R., N. Kang-Decker, D.A. Hughes, P. Mukherjee, V. Shah, M.A.McNiven, and D. Mukhopadhyay (2005). Regulatory role of dynamin-2 in VEGFR-2/KDR-mediated endothelial signaling. *FASEB J.* **19**:1692-1694.
- Bierings, R., Hellen, N., Kiskin, N., Knipe, L., Fonseca, A.-V., Patel, B., Meli, A., Rose, M., Hannah, M. J. and Carter, T. (2012). The interplay between the Rab27A effectors Slp4-a and MyRIP controls hormone-evoked Weibel–Palade body exocytosis. *Blood*, **120**, 2757-2767.
- Birch, K. A., Pober J.S., Zavoico G.B., Means A.R., Ewenstein B.M. (1992). Calcium/calmodulin transduces thrombin-stimulated secretion: studies in intact and minimally permeabilized human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*, **118(6)**, 1501–1510.
- Blagoveshchenskaya, A.D., Hannah, M.J., Allen, S. and Cutler, D.F. (2002). Selective and signal-dependent recruitment of membrane proteins to secretory granules formed by heterologously expressed von Willebrand factor. *Mol Biol Cell*, **13**, 1582-1593.
- Bock, E., Edvardsen, K., Gibson, A., Linnemann, D., Lyles, J. M., & Nybroe, O. (1987). Characterization of soluble forms of NCAM. *FEBS Letters*, **225(1-2)**, 33–36.
- Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B. and Wagner, D. D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**, 1109-1112.

- Boulton, F. E., & Lloyd, M. J. (1975). Willebrand factor in von Willebrand's disease. *BMJ*, **4(5993)**, 384–384.
- Braakman I, Hebert, DN. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.***5(5)**:a013201.
- Brough, D., Pelegrin, P., & Nickel, W. (2017). An emerging case for membrane pore formation as a common mechanism for the unconventional secretion of FGF2 and IL-1 β . *Journal of Cell Science*, **130(19)**, 3197–3202.
- Bruns, A.F., S.P. Herbert, A.F. Odell, H.M. Jopling, N.M. Hooper, I.C. Zachary, J.H. Walker, and S. Ponnambalam. (2010). Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by co-ordinated trafficking and proteolysis. *Traffic*. **11**:161-174.
- Bruns, A.F., N. Yuldasheva, A.M. Latham, L. Bao, C. Pellet-Many, P. Frankel, S.L. Stephen, G.J. Howell, S.B. Wheatcroft, M.T. Kearney, I.C. Zachary, and S. Ponnambalam. (2012). A heat-shock protein axis regulates VEGFR2 proteolysis, Blood vessel development and repair. *PLoS ONE*. **7**:e48539.
- Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., & Ervasti, J. M. (2011). β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, **22(21)**, 4047–4058.
- Busse, R., & Mülsch, A. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Letters*, **265(1-2)**, 133–136.
- Bussolati, B., Grange, C., Bruno, S., Buttiglieri, S., Deregibus, M. C., Tei, L., Camussi, G. (2006). Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Experimental Cell Research*, **312(6)**, 913–924.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., & Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, **16(11)**, 137R-157R.
- Cines, D.B., E.S. Pollak, C.A. Buck, J. Loscalzo, G.A. Zimmerman, R.P. McEver, J.S. Pober, T.M. Wick, B.A. Konkle, B.S. Schwartz, E.S. Barnathan, K.R. McCrae, B.A. Hug, A.M. Schmidt, and D.M. Stern.(1998). Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. **91**:3527- 3561.

- Chauhan AK, Goerge T, Schneider SW, Wagner DD. (2007). Formation of platelet strings and microthrombi in the presence of ADAMTS-13 inhibitor does not require P-selectin or beta3 integrin. *J Thromb Haemost.* **5(3)**, 583–589.
- Chen, L.-M., Hobbie, S. and Galan, J. E. (1996). Requirement of CDC42 for Salmonella-induced cytoskeletal and nuclear responses. *Science* **274**, 2115-2118.
- Chin, D., & Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology*, **10(8)**, 322–328.
- Cohen, A., Doyle, D., Martin, D. W., & Ammann, A. J. (1976). Abnormal Purine Metabolism and Purine Overproduction in a Patient Deficient in Purine Nucleoside Phosphorylase. *New England Journal of Medicine*, **295(26)**, 1449–1454.
- Colgan, J., Asmal, M., Yu, B., & Luban, J. (2005). Cyclophilin A-Deficient Mice Are Resistant to Immunosuppression by Cyclosporine. *The Journal of Immunology*, **174(10)**, 6030–6038.
- Commisso, C., Flinn, R. J. and Bar-Sagi, D. (2014). Determining the macropinocytic index of cells through a quantitative image-based assay. *Nat. Protoc.* **9**, 182-192.
- Cooper, D.N., and Barondes, S.H. (1990). Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* **110**, 1681–1691.
- Cooper, D.N.W. and Barondes, S.H. (1999) God must love galectins: he made so many of them. *Glycobiology*, **9**, 979-984.
- Croci, D.O., Cerliani, J.P., Dalotto-Moreno, T., Méndez-Huergo, S. P., Mascanfroni, I.D., Dergan-Dylon, S., Rabinovich, G. A. (2014). Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell*, **156(4)**, 744–758.
- Cummings, R.D., Liu, F.T. and Vasta, G.R. (2015). Galectins. Essentials of Glycobiology (ed. A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Eski, P. Stanley, G.W. Hart, M. Aebi, A.G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer et al.), pp. **469-480**. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- Daly, E. B., Wind, T., Jiang, X.-M., Sun, L., & Hogg, P. J. (2004). Secretion of phosphoglycerate kinase from tumour cells is controlled by oxygen-sensing hydroxylases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1691**(1), 17–22.
- Daniels, M., & Brough, D. (2017). Unconventional Pathways of Secretion Contribute to Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**(1), 102.
- Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink. (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*. **115**:1285-1295.
- de Laurentiis, A., Donovan, L. & Arcaro, A. (2007). Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *The open biochemistry journal* **1**, 12-32.
- D’Haene, N., Sauvage, S., Maris, C., Adanja, I., Le Mercier, M., Decaestecker, C., Baum, L., and Salmon, I. (2013). VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1 and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS ONE* **8**, e67029
- Dimou, E., & Nickel, W. (2018). Unconventional mechanisms of eukaryotic protein secretion. *Current Biology*, **28**(8), R406-R410.
- Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y.D., Robinson, D.G., Jiang, L. (2012). Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci.*, **17**(10):606-15.
- Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. (2002). ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100**:4033-9.
- Dudley, A.C. (2012). Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006536
- Duran, J. M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W. F., & Malhotra, V. (2010). Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *The Journal of Cell Biology*, **188**(4), 527-536.
- Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, Gratton JP. (2003). Vascular endothelial growth factor dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells. *J Biol Chem* **278**:20091–20097.

- DW Essex, K Chen and M Swiatkowska (1995). Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*, **86**:2168-2173.
- Edgington, T.S. (1995). Vascular biology: integrative molecular cell biology. *FASEB J.* **9**:841-842.
- Edward F. Plow and Riku Das. (2009). Enolase-1 as a plasminogen receptor. *Blood*, **113**:5371-5372.
- Egea, L., Aguilera, L., Giménez, R., Sorolla, M. A., Aguilar, J., Badía, J., & Baldoma, L. (2007). Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **39**(6), 1190–1203.
- Eijnden-Schrauwen Y, Atsma DE, Lupu F, de Vries RE, Kooistra T, Emeis JJ. (1997). Involvement of calcium and G proteins in the acute release of tissue-type plasminogen activator and von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**:2177–2187.
- Eitzen, G. (2003). Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1641**(2-3), 175–181.
- Engling, A. (2002). Biosynthetic FGF-2 is targeted to non-lipid raft microdomains following translocation to the extracellular surface of CHO cells. *Journal of Cell Science*, **115**(18), 3619–3631.
- ESSEX, D. W., & LI, M. (1999). Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *British Journal of Haematology*, **104**(3), 448–454.
- Ewan, L.C., H.M. Jopling, H. Jia, S. Mittar, A. Bagherzadeh, G.J. Howell, J.H. Walker, I.C. Zachary, and S. Ponnambalam. (2006). Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic*. **7**:1270- 1282.
- Fabrowski, P., Necakov, A. S., Mumbauer, S., Loeser, E., Reversi, A., Streichan, S., ... De Renzis, S. (2013). Tubular endocytosis drives remodelling of the apical surface during epithelial morphogenesis in *Drosophila*. *Nature Communications*, **4**(1).

- Ferraro, F., Kriston-Vizi, J., Metcalf, D. J., Martin-Martin, B., Freeman, J., Burden, J. J., Westmoreland, D., Dyer, C. E., Knight, A. E., Ketteler, R. et al. (2014). A two-tier Golgi-based control of organelle size underpins the functional plasticity of endothelial cells. *Dev. Cell* **29**, 292-304.
- Ferraro, F., Mafalda Lopes da, S., Grimes, W., Lee, H. K., Ketteler, R., Kriston-Vizi, J. and Cutler, D. F. (2016). Weibel-Palade body size modulates the adhesive activity of its von Willebrand Factor cargo in cultured endothelial cells. *Sci. Rep.* **6**, 32473.
- Fiorentini, C., Falzano, L., Fabbri, A., Stringaro, A., Logozzi, M., Travaglione, S., Contamin, S., Arancia, G., Malorni, W. and Fais, S. (2001). Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2061-2073.
- Fu, J., Naren, A. P., Gao, X., Ahmmed, G. U. and Malik, A. B. (2005). Protease activated receptor-1 activation of endothelial cells induces protein kinase C alpha dependent phosphorylation of syntaxin 4 and Munc18c: role in signaling pselectin expression. *J. Biol. Chem.* **280**, 3178-3184.
- Fu, L., Han, L., Xie, C., Li, W., Lin, L., Pan, S., ... Zhang, A. (2017). Identification of Extracellular Actin As a Ligand for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 Signaling. *Frontiers in Immunology*, **8**.
- Gaengel, K., & Betsholtz, C. (2013). Endocytosis regulates VEGF signalling during angiogenesis. *Nature Cell Biology*, **15(3)**, 233–235.
- Gampel, A., Moss, L., Jones, M. C., Brunton, V., Norman, J. C. and Mellor, H. (2006). VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* **108**, 2624-2631.
- Gandrille, S. (2008). Endothelial cell protein C receptor and the risk of venous thrombosis. *Haematologica*, **93(6)**, 812–816.
- Garrett, W. S., Chen, L.-M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galán, J. E. and Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* **102**, 325-334.
- Gerke, V., Creutz, C. E., & Moss, S. E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6(6)**, 449–461.

- Giblin, J. P., Hewlett, L. J., & Hannah, M. J. (2008). Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood*, **112**(4), 957–964.
- Goligorsky, M. S., Patschan, D., & Kuo, M.C. (2009). Weibel-Palade bodies-sentinels of acute stress. *Nature Reviews Nephrology*, **5**(7), 423–426.
- Gourlaouen, M., J.C. Welte, N.S. Vasudev, and A.R. Reynolds. (2013). Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J Biol Chem*. **288**:7467-7480.
- Gower, H. J., Barton, C. H., Elsom, V. L., Thompson, J., Moore, S. E., Dickson, G., & Walsh, F. S. (1988). Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain. *Cell*, **55**(6), 955–964.
- Han, X., Li, P., Yang, Z., Huang, X., Wei, G., Sun, Y., Kang, X., Hu, X., Deng, Q., Chen, L. et al. (2017). Zyxin regulates endothelial von Willebrand factor secretion by reorganizing actin filaments around exocytic granules. *Nature Communications*, **8**, 14639.
- Hannah, M.J., Williams, R., Kaur, J., Hewlett, L.J. and Cutler, D.F. (2002) Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin Cell Dev Biol*, **13**, 313-324.
- Hirabayashi J., Arata, Y., and Kasai, K. (1997) Galectins from the nematode *Caenorhabditis elegans* and the genome project. *Trends Glycosci.*, **9**, 113-122.
- Hotchkiss, K. A., Matthias, L. J., & Hogg, P. J. (1998). Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1388**(2), 478–488.
- Houston, D. S., Carson, C. W., & Esmon, C. T. (1997). Endothelial Cells and Extracellular Calmodulin Inhibit Monocyte Tumor Necrosis Factor Release and Augment Neutrophil Elastase Release. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(18), 11778–11785.
- Houzelstein, D., Gonçalves, I. R., Fadden, A. J., Sidhu, S. S., Cooper, D. N. W., Drickamer, K., Leffler, H. and Poirier, F. (2004). Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1177-1187.

- Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M., and Chen, Y.L. (2008). Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* **27**, 3746–3753.
- Hughes, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. (1999). *Biochim. Biophys.* **1473**, 172-185.
- Ito, K., Stannard, K., Gabutero, E., Clark, A. M., Neo, S.-Y., Onturk, S., ... Ralph, S. J. (2012). Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer and Metastasis Reviews*, **31(3-4)**, 763–778.
- Ivanov, A.I. (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol.* **440**:15-33.
- Ivanov, AI. (2014). Pharmacological inhibitors of exocytosis and endocytosis: novel bullets for old targets. *Methods Mol Biol.* **1174**:3-18.
- Jayo, A., & Parsons, M. (2010). Fascin: A key regulator of cytoskeletal dynamics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **42(10)**, 1614–1617.
- Jin, Z.-G., Melaragno, M. G., Liao, D.-F., Yan, C., Haendeler, J., Suh, Y.-A., ... Berk, B. C. (2000). Cyclophilin A Is a Secreted Growth Factor Induced by Oxidative Stress. *Circulation Research*, **87(9)**, 789–796.
- Johannes, L., Jacob, R., Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *J Cell Sci.*, **131(9)**.
- Jordan, P. A., & Gibbins, J. M. (2006). Extracellular Disulfide Exchange and the Regulation of Cellular Function. *Antioxidants & Redox Signaling*, **8(3-4)**, 312–324.
- Kamath, S., Chen, M. L., & Chakrabarty, A. M. (2000). Secretion of Nucleoside Diphosphate Kinase by Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* 8821: Involvement of a Carboxy-Terminal Motif in Secretion. *Journal of Bacteriology*, **182(13)**, 3826–3831.
- Kaufmann JE, Oksche A, Wollheim CB, Gunther G, Rosenthal W, Vischer UM. (2000). Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *J Clin Invest.* **106**:107–116.
- Kerr, M.C. & Teasdale, R.D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364-371.

- Kiskin, N. I., Babich, V., Knipe, L., Hannah, M. J., & Carter, T. (2014). Differential Cargo Mobilisation within Weibel-Palade Bodies after Transient Fusion with the Plasma Membrane. *PLoS ONE*, **9**(9), e108093.
- Kliche, S., & Waltenberger, J. (2001). VEGF Receptor Signaling and Endothelial Function. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, **52**(1), 61–66.
- Knop, M., Aareskjold, E., Bode, G. and Gerke, V. (2004). Rab3D and annexin A2 play a role in regulated secretion of vWF, but not tPA, from endothelial cells. *EMBO J.* **23**, 2982-2992.
- Knop, M. & Gerke, V. (2002). Ca²⁺ -regulated secretion of tissue-type plasminogen activator and von Willebrand factor in human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. **1600**(1-2):162-7.
- Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K. M. and Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**, 547-563.
- Kühling, L. and Schelhaas, M. (2014). Systematic analysis of endocytosis by cellular perturbations. *Methods Mol. Biol.* **1174**, 19-46.
- Lahav, J., Gofer-Dadosh, N., Luboshitz, J., Hess, O., & Shaklai, M. (2000). Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Letters*, **475**(2), 89–92.
- Lampugnani, M.G., F. Orsenigo, M.C. Gagliani, C. Tacchetti, and E. Dejana. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol.* **174**:593-604.
- Laurentiis, A. de, Donovan, L., & Arcaro, A. (2007). Lipid Rafts and Caveolae in Signaling by Growth Factor Receptors. *The Open Biochemistry Journal*, **1**, 12-32.
- Lay, A. J., Jiang, X.-M., Kisker, O., Flynn, E., Underwood, A., Condrón, R., & Hogg, P. J. (2000). Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase. *Nature*, **408**(6814), 869–873.

- Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **20**(1), 87–123.
- Lee, M.Y., A. Skoura, E.J. Park, S. Landskroner-Eiger, L. Jozsef, A.K. Luciano, T. Murata, S. Pasula, Y. Dong, M. Bouaouina, D.A. Calderwood, S.M. Ferguson, P. De Camilli, and W.C. Sessa. (2014). Dynamin 2 regulation of integrin endocytosis, but not VEGF signaling, is crucial for developmental angiogenesis. *Development*. **141**:1465-1472.
- Lee, T. L., Lin, Y. C., Mochitate, K., and Grinnell, F. (1993) Stress relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin, annexins II and VI, and beta1 integrin receptors, *J. Cell Sci.*, **105**, 167177.
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F (2004). Introduction to galectins. *Glycoconj J* **19**: 433- 440
- Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. (2012). *J Thromb Haemost.* **10**(12):2428-2437.
- Lenting, P. J., Christophe, O. D., & Denis, C. V. (2015). von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*, **125**(13), 2019–2028.
- Lerman, A., and A.M. Zeiher. (2005). Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. **111**:363-368.
- Lingwood, D., & Simons, K. (2009). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science*, **327**(5961), 46–50.
- Lopes da Silva, M., & Cutler, D. F. (2016). von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells. *Blood*, **128**(2), 277–285.
- LORENZI, O., FRIEDEN, M., VILLEMIN, P., FOURNIER, M., FOTI, M., & VISCHER, U. M. (2008). Protein kinase C- δ mediates von Willebrand factor secretion from endothelial cells in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) but not histamine. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **6**(11), 1962–1969.

- Lowenstein, C. J., Morrell, C. N., & Yamakuchi, M. (2005). Regulation of Weibel-Palade Body Exocytosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **15**(8), 302-308.
- Lui-Roberts, W. W. Y., Collinson, L. M., Hewlett, L. J., Michaux, G. and Cutler, D. F. (2005). An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells. *J. Cell Biol.* **170**, 627-636.
- Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., & Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin. *Developmental Cell*, **10**(6), 839–850.
- MacKenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-Toth, E., Dower, S. K., North, R. A., & Surprenant, A. (2001). Rapid Secretion of Interleukin-1 β by Microvesicle Shedding. *Immunity*, **15**(5), 825–835.
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., ... Yoshimori, T. (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *The EMBO Journal*, **32**(17), 2336–2347.
- Manickam, V., Tiwari, A., Jung, J.-J., Bhattacharya, R., Goel, A., Mukhopadhyay, D. and Choudhury, A. (2011). Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 trafficking and angiogenesis by Golgi localized t-SNARE syntaxin 6. *Blood* **117**, 1425-1435.
- Manjithaya, R. and Subramani, S. (2011) Autophagy: a broad role in unconventional Protein secretion? *Trends Cell Biol.* **21**, 67–73
- Matsushita, K., Morrell, C. N., Cambien, B., Yang, S. X., Yamakuchi, M., Bao, C., Hara, M. R., Quick, R. A., Cao, W., O'Rourke, B. et al. (2003). Nitric oxide regulates exocytosis by S-nitrosylation of N-ethylmaleimide-sensitive factor. *Cell* **115**, 139-150.
- Matsushita, K., Yamakuchi, M., Morrell, C. N., Ozaki, M., O'Rourke, B., Irani, K. and Lowenstein, C. J. (2005b). Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis. *Blood* **105**, 207-214.
- Mayor, S., and R.E. Pagano. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**:603-612.

- McCluskey, A., Daniel, J. A., Hadzic, G., Chau, N., Clayton, E. L., Mariana, A., ... Robinson, P. J. (2013). Building a Better Dynasore: The Dyngo Compounds Potently Inhibit Dynamin and Endocytosis. *Traffic*, **14**(12), 1272–1289.
- McCormack, J., Mafalda Lopes da Silva, Francesco Ferraro, Francesca Patella, Daniel F. Cutler. (2017). Weibel–Palade bodies at a glance. *J Cell Sci.* **130**: 3611-3617.
- McEver, R. P., Beckstead, J. H., Moore, K. L., Marshall-Carlson, L. and Bainton, D. F. (1989). GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J. Clin. Invest.* **84**, 92-99.
- McMahon, H.T., and E. Boucrot. (2011). Molecular mechanism and Physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12**:517-533.
- Metcalf, D. J., Nightingale, T. D., Zenner, H. L., Lui-Roberts, W. W., & Cutler, D. F. (2008). Formation and function of Weibel-Palade bodies. *Journal of Cell Science*, **121**(1), 19–27.
- Miaczynska, M., S. Christoforidis, A. Giner, A. Shevchenko, S. Uttenweiler Joseph, B. Habermann, M. Wilm, R.G. Parton, and M. Zerial. (2004). APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell.* **116**:445-456.
- Miaczynska, M., L. Pelkmans, and M. Zerial. (2004). Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* **16**:400-406.
- Michael J. Cross, Johan Dixelius, Taro Matsumoto, Lena Claesson-Welsh. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochemical Sciences*. Volume **28**, Issue 9, Pages 488-494
- Michaux, G. (2003). Analysis of intracellular storage and regulated secretion of 3 von Willebrand disease-causing variants of von Willebrand factor. *Blood*, **102**(7), 2452–2458.
- Michaux, G., Abbitt, K. B., Collinson, L. M., Haberichter, S. L., Norman, K. E., & Cutler, D. F. (2006). The Physiological Function of von Willebrand’s Factor Depends on Its Tubular Storage in Endothelial Weibel-Palade Bodies. *Developmental Cell*, **10**(2), 223–232.

- Michaux, G., & Cutler, D. F. (2004). How to Roll an Endothelial Cigar: The Biogenesis of Weibel-Palade Bodies. *Traffic*, **5**(2), 69–78.
- Michaux, G., Pullen, T.J., Haberichter, S.L. and Cutler, D.F. (2006b) P-selectin binds to the D¹-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies. *Blood*, **107**, 3922-3924.
- Mignatti, P., Morimoto, T., & Rifkin, D. B. (1992). Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Journal of Cellular Physiology*, **151**(1), 81–93.
- Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco LH, Hellums JD. Involvement of Large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation. (1986). *J Clin Invest* **78**:1456-61.
- Mohan Rao, L. V., Esmon, C. T., & Pendurthi, U. R. (2014). Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. *Blood*, **124**(10), 1553–1562.
- Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, Zhang W, Tsai HM, Wagner DD, Ginsburg D. (2005). Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. *J Clin Invest* **115**:2752-61.
- Mousavi, S. A., Malerod, L., Berg, T. & Kjekens, R. (2004). Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 1-16.
- Myre, M. A., & O’Day, D. H. (2004). Calmodulin binds to and inhibits the activity of phosphoglycerate kinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1693**(3), 177–183.
- Nakajima, H., Itakura, M., Kubo, T., Kaneshige, A., Harada, N., Izawa, T., Takeuchi, T. (2017). Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Aggregation Causes Mitochondrial Dysfunction during Oxidative Stress-induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, **292**(11), 4727–4742.

- Nakayama, M., A. Nakayama, M. van Lessen, H. Yamamoto, S. Hoffmann, H.C. Drexler, N. Itoh, T. Hirose, G. Breier, D. Vestweber, J.A. Cooper, S. Ohno, K. Kaibuchi, and R.H. Adams. (2013). Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature cell biology*, **15**:249–260.
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2109–2119.
- Nickel, W. (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology*, **21(5)**, 621–626.
- Nickel, W., Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **10(2)**, 148–155.
- Nickel, W., & Rabouille, C. (2018). Unconventional protein secretion: Diversity and consensus. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Nickel, W., & Seedorf, M. (2008). Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **24(1)**, 287–308.
- Nightingale, T. D., Pattni, K., Hume, A. N., Seabra, M. C., & Cutler, D. F. (2009). Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of VWF released from endothelial cells. *Blood*, **113(20)**, 5010–5018.
- Nightingale, T. D., White, I. J., Doyle, E. L., Turmaine, M., Harrison-Lavoie, K. J., Webb, K. F., Cramer, L.P., Cutler, D. F. (2011). Actomyosin II contractility expels von Willebrand factor from Weibel–Palade bodies during exocytosis. *The Journal of Cell Biology*, **194(4)**, 613–629.
- Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling? in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7(5)**, 359–371.
- Orosz, F., Oláh, J., & Ovádi, J. (2009). Triosephosphate isomerase deficiency: New insights into an enigmatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **1792(12)**, 1168–1174.
- Pálfy, M., Reményi, A., & Korcsmáros, T. (2012). Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends in Cell Biology*, **22(9)**, 447–456.

- Pannekoek H, Voorberg J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. (1989). *Baillieres Clin Haematol.* **2(4)**:879-896.
- Perret, E., Lakkaraju, A., Deborde, S., Schreiner, R., & Rodriguez-Boulan, E. (2005). Evolving endosomes: how many varieties and why? *Current Opinion in Cell Biology*, **17(4)**, 423–434.
- Pike, L. J. (2003). Lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, **44(4)**, 655–667.
- Polverini, P.J. (2002). Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of dental education* **66**,962-975.
- Popa, S. J., Stewart, S. E., & Moreau, K. (2018). Unconventional secretion of annexins and galectins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.
- Pries, A.R., Secomb, T.W. & Gaetgens, P. (2000).The endothelial surface layer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **440**, 653-666.
- Prinz, W. A. (2014). Bridging the gap: Membrane contact sites in signaling, metabolism, and organelle dynamics. *The Journal of Cell Biology*, **205(6)**, 759–769.
- Pulido, I. R., Jahn, R., & Gerke, V. (2011). VAMP3 is associated with endothelial Weibel–Palade bodies and participates in their Ca²⁺-dependent exocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1813(5)**, 1038-1044.
- QU, D., WANG, Y., SONG, Y., ESMON, N. L., & ESMON, C. T. (2006). The Ser219->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **4(1)**, 229–235.
- Rabinovich, G.A. (2005). Galectin-1 as a potential cancer target. *British Journal of Cancer*, **92(7)**, 1188-1192
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, **27(3)**, 230–240.
- Ramachandran, N., Root, P., Jiang, X.-M., Hogg, P. J., & Mutus, B. (2001). Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98(17)**, 9539–9544.

- Rauch A, Wohner N, Christophe OD, Denis CV, Susen S, Lenting PJ. On the versatility of von Willebrand factor. (2013). *Mediterr J Hematol Infect Dis*. **5(1)**:e2013046.
- Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., & Zerial, M. (2005). Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell*, **122(5)**, 735-749.
- Robertson, M. J., Deane, F. M., Robinson, P. J., & McCluskey, A. (2014). Synthesis of Dynole 34-2, Dynole 2-24 and Dyngo 4a for investigating dynamin GTPase. *Nature Protocols*, **9(4)**, 851–870.
- Romani de Wit, T. (2003). Real-Time Imaging of the Dynamics and Secretory Behavior of Weibel-Palade Bodies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **23(5)**, 755–761.
- Romani de Wit, T., & van Mourik, J. A. (2001). Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **14(2)**, 241–255.
- Rondaij, M. G. (2006). Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **26(5)**, 1002-1007.
- Roth, M. G. (2005). Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7(1)**, 63–68.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., & Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO Journal*, **9(5)**, 1503–1510.
- Ruoppolo, M., Freedman, R. B., Pucci, P., & Marino, G. (1996). Glutathione-Dependent Pathways of Refolding of RNase T1 by Oxidation and Disulfide Isomerization: Catalysis by Protein Disulfide Isomerase. *Biochemistry*, **35(42)**, 13636–13646.
- Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor (1998). *Annu Rev Biochem*. **67**:395-424.
- Saint-Lu N. et al. (2012). Identification of galectin-1 and galectin-3 as novel partners for von Willebrand factor. (2012). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **32**:894-901. 465:487-491.

- Sawamiphak, S., S. Seidel, C.L. Essmann, G.A. Wilkinson, M.E. Pitulescu, T.Acker, and A. Acker-Palmer. (2010). Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*, **465(7297)**, 487-491.
- Schmid, S. L., & Frolov, V. A. (2011). Dynamin: Functional Design of a Membrane Fission Catalyst. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **27(1)**, 79-105.
- Schnatwinkel, C., S. Christoforidis, M.R. Lindsay, S. Uttenweiler Joseph, M. Wilm, R.G. Parton, and M. Zerial. 2004. The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS Biol.* **2**:E261.
- Schneider, S. W., Nuschele, S., Wixforth, A., Gorzelanny, C., Alexander-Katz, A., Netz, R. R., & Schneider, M. F. (2007). Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104(19)**, 7899–7903.
- Schonbrunner, E. R., & Schmid, F. X. (1992). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89(10)**, 4510–4513.
- Shapiro SE, Nowak AA, Wooding C, Birdsey G, Laffan MA, McKinnon TA. The von Willebrand factor predicted unpaired cysteines are essential for secretion. (2014). *J Thromb Haemost.* **12(2)**:246-254.
- Siders WM, Klimovitz JC, Mizel SB. (1993). Characterization of the structural requirements and cell type specificity of IL-1 α and IL-1 β secretion. *J. Biol. Chem.* **268**:22170–74.
- Sirover, M. A. (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1432(2)**, 159–184.
- Song, F., Zhang, X., Ren, X.-B., Zhu, P., Xu, J., Wang, L., ... Chen, Z.-N. (2011). Cyclophilin A (CyPA) Induces Chemotaxis Independent of Its Peptidylprolyl Cis-Trans Isomerase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, **286(10)**, 8197–8203.
- Sorkin, A., and M. von Zastrow. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**:609-622.
- Stanley, P. (2014). Galectin-1 Pulls the Strings on VEGFR2. *Cell*, **156(4)**, 625–626.

- Steringer, J. P., Müller, H.-M., & Nickel, W. (2015). Unconventional Secretion of Fibroblast Growth Factor 2-A Novel Type of Protein Translocation across Membranes? *Journal of Molecular Biology*, **427**(6), 1202–1210.
- Stevenson, N. L., White, I. J., McCormack, J. J., Robinson, C., Cutler, D. F., & Nightingale, T. D. (2017). Clathrin-mediated post-fusion membrane retrieval influences the exocytic mode of endothelial Weibel-Palade bodies. *Journal of Cell Science*, **130**(15), 2591–2605.
- Strick, D. J. (2002). Mammalian Suppressor of Sec4 Modulates the Inhibitory Effect of Rab15 during Early Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, **277**(36), 32722–32729.
- Sturn, D. H. (2003). Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood*, **102**(4), 1499–1505.
- Sudakov, N. P., Klimenkov, I. V., Byvaltsev, V. A., Nikiforov, S. B., & Konstantinov, Y. M. (2017). Extracellular actin in health and disease. *Biochemistry (Moscow)*, **82**(1), 1–12.
- Sullivan, D. C., Huminiecki, L., Moore, J. W., Boyle, J. J., Poulsom, R., Creamer, D., ... Bicknell, R. (2003). EndoPDI, a Novel Protein-disulfide Isomerase-like Protein That Is Preferentially Expressed in Endothelial Cells Acts as a Stress Survival Factor. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(47), 47079–47088.
- Sumpio, B. E., Timothy Riley, J., & Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **34**(12), 1508–1512.
- Swanson, J.A. & Watts, C (1995). Macropinocytosis. *Trends Cell Biol* **5**, 424-428.
- Täger M, Kröning H, Thiel U, Ansorge S. (1997). Membrane-bound protein-disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp Hematol*. **25**(7):601-7.
- Takahashi, T. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO Journal*, **20**(11), 2768–2778.

- Takaki, Y., Muta, T., & Iwanaga, S. (1997). A Peptidyl-prolylcis/trans-Isomerase (Cyclophilin G) in Regulated Secretory Granules. *Journal of Biological Chemistry*, **272(45)**, 28615–28621.
- Tarantini, F., Micucci, I., Bellum, S., Landriscina, M., Garfinkel, S., Prudovsky, I., & Maciag, T. (2000). The Precursor but Not the Mature Form of IL1 α Blocks the Release of FGF1 in Response to Heat Shock. *Journal of Biological Chemistry*, **276(7)**, 5147-5151.
- Tessneer, K.L., S. Pasula, X. Cai, Y. Dong, J. McManus, X. Liu, L. Yu, S. Hahn, B. Chang, Y. Chen, C. Griffin, L. Xia, R.H. Adams, and H. Chen. (2014). Genetic reduction of vascular endothelial growth factor receptor 2 rescues aberrant angiogenesis caused by epsin deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **34**:331-337.
- Thijssen, V.L., Barkan, B., Shoji, H., Aries, I.M., Mathieu, V., Deltour, L., Hackeng, T.M., Kiss, R., Kloog, Y., Poirier, F., and Griffioen, A.W. (2010). Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res.* **70**, 6216-6224.
- Thijssen, V.L., Postel, R., Brandwijk, R.J., Dings, R.P., Nesselova, I., Satijn, S., Verhofstad, N., Nakabeppu, Y., Baum, L.G., Bakkers, J., et al. (2006). Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 15975–15980.
- Traub, L. M. (2005). Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, **1744(3)**, 415–437.
- Valentijn, K.M., & Eikenboom, J. (2013). Weibel-Palade bodies: a window to von Willebrand disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **11(4)**, 581–592.
- Valentijn, K. M., van Driel, L. F., Mourik, M. J., Hendriks, G.-J., Arends, T. J., Koster, A. J., & Valentijn, J. A. (2010). Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood*, **116(10)**, 1807–1816.
- Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. (2011). *Blood* **117**:5033-43.

- Valentijn, K. M., Valentijn, J. A., Jansen, K. A., & Koster, A. J. (2008). A new look at Weibel–Palade body structure in endothelial cells using electron tomography. *Journal of Structural Biology*, **161**(3), 447–458.
- Van Breevoort, D., Snijders, A. P., Hellen, N., Weckhuysen, S., van Hooren, K. W. E. M., Eikenboom, J., Valentijn, K., Fernandez-Borja, M., Ceulemans, B., De Jonghe, P., Voorerg, J., Hannah, M., Carter, T., Bierings, R. (2014). STXBP1 promotes Weibel-Palade body exocytosis through its interaction with the Rab27A effector Slp4-a. *Blood*, **123**(20), 3185–3194.
- Van der Wouden, J. M., Maier, O., van IJzendoorn, S. C., & Hoekstra, D. (2003). Membrane Dynamics and the Regulation of Epithelial Cell Polarity. *International Review of Cytology*, **127–164**.
- Van Mourik, J. A., Romani de Wit, T., & Voorberg, J. (2002). Biogenesis and exocytosis of Weibel-Palade bodies. *Histochemistry and Cell Biology*, **117**(2), 113–122.
- Verweij, C. L., Hart, M., & Pannekoek, H. (1987). Expression of variant von Willebrand factor (vWF) cDNA in heterologous cells: requirement of the pro-polypeptide in vWF multimer formation. *The EMBO Journal*, **6**(10), 2885–2890.
- Visegrady, B., Than, N.G., Kilar, F., Sumegi, B., Than, G.N., and Bohn, H. (2001). Homology modelling and molecular dynamics studies of human placental tissue protein 13 (galectin-13). *Protein Eng.*, **14**, 875–880.
- Vyakarnam, A., Lenneman, A. J., Lakkides, K. M., Patterson, R. J., & Wang, J. L. (1998). A Comparative Nuclear Localization Study of Galectin-1 with Other Splicing Components. *Experimental Cell Research*, **242**(2), 419–428.
- Wagner, D. D. (1990). Cell Biology of von Willebrand Factor. *Annual Review of Cell Biology*, **6**(1), 217–242.
- Wagner DD, Marder VJ. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. (1983). *J Biol Chem*. **258**(4):2065–2067.
- Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. (1982). Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel–Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol* **95**:355–360.

- Wagner, D.D., Saffaripour, S., Bonfanti, R., Sadler, J. E., Cramer, E. M., Chapman, B., & Mayadas, T. N. (1991). Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor polypeptide. *Cell*, **64**(2), 403–413.
- Walsh CT, Zydowsky LD, McKeon FD. (1992). Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction. *J Bio Chem*. **267**(19):13115-8.
- WEIBEL, E. R. (2012). Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells¹. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **10**(6), 979–984.
- Weibel, E.R., and G.E. Palade. (1964). New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol*. **23**:101-112.
- Willems, R., Slegers, H., Rodrigus, I., Moulijn, A. C., Lenjou, M., Nijs, G., ... Van Bockstaele, D. R. (2002). Extracellular nucleoside diphosphate kinase NM23/NDPK modulates normal hematopoietic differentiation. *Experimental Hematology*, **30**(7), 640–648.
- Wygrecka, M., Marsh, L. M., Morty, R. E., Henneke, I., Guenther, A., Lohmeyer, J., ... Preissner, K. T. (2009). Enolase-1 promotes plasminogen-mediated recruitment of monocytes to the acutely inflamed lung. *Blood*, **113**(22), 5588–5598.
- Xiong, Y., Huo, Y., Chen, C., Zeng, H., Lu, X., Wei, C., ... Luo, J. (2009). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-2 Tyrosine 1175 Signaling Controls VEGF-induced von Willebrand Factor Release from Endothelial Cells via Phospholipase C- γ 1- and Protein Kinase A-dependent Pathways. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(35), 23217–23224.
- Xue, C., Sowden, M. P., & Berk, B. C. (2018). Extracellular and Intracellular Cyclophilin A, Native and Post-Translationally Modified, Show Diverse and Specific Pathological Roles in Diseases Highlights. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **38**(5), 986–993.
- Yamaji, R., Chatani, E., Harada, N., Sugimoto, K., Inui, H., & Nakano, Y. (2005). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the extracellular space inhibits cell spreading. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1726**(3), 261–271.

- Yang, R.-Y., Hsu, D. K., Yu, L., Ni, J., & Liu, F.-T. (2001). Cell Cycle Regulation by Galectin-12, a New Member of the Galectin Superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(23), 20252-20260.
- Zenner, H. L., Collinson, L. M., Michaux, G., & Cutler, D. F. (2007). High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. *Journal of Cell Science*, **120**(12), 2117–2125.
- Zhou YF, Eng ET, Zhu J, Lu C, Walz T, Springer TA. (2012). Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* **120**(2):449-458.
- Zhu, Q., Yamakuchi, M., Ture, S., de la Luz Garcia-Hernandez, M., Ko, K. A., Modjeski, K. L., LoMonaco, M. B., Johnson, A. D., O'Donnell, C. J., Takai, Y. et al. (2014). Syntaxin-binding protein STXBP5 inhibits endothelial exocytosis and promotes platelet secretion. *J. Clin. Invest.* **124**, 4503-4516.
- Zografou, S., D. Basagiannis, A. Papafotika, R. Shirakawa, H. Horiuchi, D. Auerbach, M. Fukuda, and S. Christoforidis. (2012). A complete Rab screening reveals novel insights in Weibel-Palade body exocytosis. *J Cell Sci.* **125**:4780- 4790.
- Zuk, P. A. and Elferink, L. A. (2000). Rab15 Differentially Regulates Early Endocytic Trafficking. *JBC*, **275**, 26754-26764.