







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΡΟΛΟΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΙΑΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ  
ΣΥΝΔΕΣΕΩΝ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ  
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΦΡΑΓΜΟΥ**

**ΝΤΟΥΧΑΝΙΑΡΗ Δ. ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010**



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



**Ημερομηνία αίτησης της κ. Ντουχανιάρη Αλεξάνδρας: 15-11-2005**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 567<sup>α</sup>/29-11-2005**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας

Μέλη

Γεωργάτος Σπυρίδωνας, Καθηγητής Βιολογίας

Χριστοφορίδης Σάββας, Λέκτορας Βιολογικής Χημείας

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 12-12-2005**

«Ρόλος και μηχανισμοί διακυτταρικών συνδέσεων στην λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού»

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 666<sup>α</sup>/22-9-2009**

1. Γαλάρης Δημήτριος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Γεωργάτος Σπυρίδωνας, Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Λαζαρίδης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Κούκλης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Χριστοφορίδης Σάββας, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 16-12-2010

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Γουδέβενος Ιωάννης**

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας

Η Γραμματέας της Σχολής

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΒΕΝΤΖΟΥΡΗ-ΖΩΗ







Στην αγαπημένη μου οικογένεια



και στη μνήμη της Γιαννούλας μου



# Περιεχόμενα

<b>1.</b>	<b>Εισαγωγή</b>	<b>5</b>
1.1	Τύποι διακυτταρικών συνδέσμων	7
1.2	Η οικογένεια των καδερινών	8
1.2.1	Ιδιότητες της εξωκυττάριας περιοχής των καδερινών	11
1.2.2	Ιδιότητες της κυτταροπλασματικής περιοχής των καδερινών	12
1.3	Το ενδοθήλιο-Ιδιότητες	14
1.3.1	Ενδοθηλιακή διαπερατότητα	16
1.3.2	VE-cadherin: η ιστοειδική καδερίνη του ενδοθηλίου	17
1.3.2.1	Γονιδιακή έκφραση της VE-cadherin	18
1.3.2.2	Δομή της VE-cadherin και αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες	18
1.3.3	Παράγοντες που εμπλέκονται στην ενδοθηλιακή διαπερατότητα μέσω του συμπλόκου VE-cadherin/κατενινών	20
1.3.4	Η δράση της θρομβίνης στο ενδοθήλιο	23
1.4	Ρύθμιση των συνδέσμων προσκόλλησης μέσω πρωτεϊνών Rho	24
1.4.1	Πρωτεΐνες Rho και Rac	27
1.4.2	Πρωτεΐνη Cdc42	28
1.4.3	Η επίδραση των Rho GTPασων στη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης	30
1.5	Ρόλος των μεμβρανικών λιπιδιακών περιοχών-PIP2	33
1.5.1	Μεταβολισμός και κατανομή των φωσφοϊνοσιτών	34
1.5.2	Λειτουργίες του PIP2	35
1.5.3	Μέθοδοι για τον εντοπισμό των φωσφοϊνοσιτών σε κυτταρικό επίπεδο	37
1.5.4	Μικροπεριοχές της μεμβράνης με δομή λιπιδιακής σχεδίας	38
1.5.5	Λιπιδιακές μικροπεριοχές και PIP2	41
1.5.6	Μέθοδοι για τον εντοπισμό των λιπιδιακών μικροπεριοχών	42
1.6	Σκοπός της παρούσας εργασίας	44
<b>2.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>45</b>
2.1	Πλασμιδιακοί φορείς	47
2.2	Αντισώματα	48
2.3	Καλλιέργεια κυττάρων	49

2.4	Παρασκευαστικές μέθοδοι	50
2.4.1	Παρασκευή ασκιδών σε BALB/c ποντίκια	50
2.4.2	Παρασκευή σφαιριδίων συγγένειας	51
2.4.3	Επίπλευση σε βαθμίδωση σακχαρόζης μετά από διαλυτοποίηση με απορρυπαντικό	52
2.4.4	Επίπλευση σε βαθμίδωση σακχαρόζης μετά από αλκαλική υπερήχηση	52
2.5	Βιοχημικές μέθοδοι	53
2.5.1	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	53
2.5.2	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου	53
2.5.3	Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου	54
2.5.4	Ανοσοαποτύπωση κατά Western	54
2.5.5	Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση σφαιριδίων συγγένειας	54
2.5.6	Έμμεση ανοσοκατακρήμνιση	55
2.5.7	Χημική σταυροσύνδεση (crosslinking) in vivo	55
2.6	Μέθοδοι γενετικής μηχανικής	57
2.6.1	Ανάπτυξη βακτηρίων	57
2.6.2	Μετασηματισμός βακτηρίων	57
2.6.3	Παρασκευή πλασμιδιακού DNA	58
2.6.4	Δημιουργία πλασμιδιακών VE-C wt mcherry-pcDNA3 και VE-C wt mcherry-pPYCAGIP	58
2.6.5	Πλασμιδιακή διαμόλυνση κυττάρων	60
2.7	Μορφολογικές μέθοδοι	61
2.7.1	Ανοσοφθορισμός	61
2.7.2	Συνεστιακή μικροσκοπία	61
2.8	Άλλες μέθοδοι	61
<b>3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>63</b>
3.1	Εντοπισμός της VE-cadherin σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης	65
3.1.1	Η VE-cadherin εντοπίζεται μερικώς σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης	65
3.1.2	Κατανομή της VE-cadherin στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μετά από επίδραση με θρομβίνη	74

3.1.3	Συνεντοπισμός του διαμεμβρανικού τμήματος/κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin με το PIP2	76
3.1.4	Ο ρόλος του φωσφολιπιδίου PIP2 κατά την επανασύσταση των συνδέσμων προσκόλλησης μετά από επίδραση θρομβίνης	81
3.1.5	Στοχευμένη μειορύθμιση των επιπέδων του PIP2 δε διασπά τους συνδέσμους προσκόλλησης , αλλά αποτρέπει το σχηματισμό τους	82
3.1.6	Σύνδεση της VE-cadherin με την περιοχή PH μετά από χημική σταυροσύνδεση in vivo	85
3.2	Αλληλεπιδράσεις της Cdc42 με πρωτεΐνες-μέλη των διακυτταρικών συνδέσμων	87
3.2.1	Συσχέτιση της έκφρασης του κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin και των β- και p120 κατενινών με τον εντοπισμό της Cdc42	87
3.2.2	Πιθανός εντοπισμός της Cdc42 σε λιπιδιακές μικροπεριοχές	89
3.2.3	Η VE-cadherin δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τη Cdc42	91
<b>4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>97</b>
<b>5.</b>	<b>Περίληψεις</b>	<b>113</b>
5.1	Περίληψη	115
5.2	Summary	117
<b>6.</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>	<b>119</b>





# **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**



## 1. 1 Τύποι διακυτταρικών συνδέσμων

Η σύνδεση των κυττάρων μεταξύ τους επιτυγχάνεται με μόρια προσκόλλησης που λειτουργούν αυτόνομα καθώς και με το σχηματισμό πολυ-πρωτεϊνικών δομών προσκόλλησης. Με βάση λειτουργικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά έχουν περιγραφεί τέσσερις τύποι διακυτταρικών συνδέσμων:

Στεγανοί σύνδεσμοι (tight junctions): Οι στεγανοί σύνδεσμοι είναι δομές που εμποδίζουν την ανάμιξη των πρωτεϊνών του κυττάρου μεταξύ κορυφαιάς και βασεοπλευρικής μεμβράνης και ελέγχουν την διέλευση διαλυτών μορίων και ιόντων μεταξύ των κυττάρων. Θεωρείται πως αποτελούν βασικό παράγοντα εγκαθίδρυσης της πολικότητας σε κυτταρικές στοιβάδες. Αποτελούνται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που είναι μέλη της οικογένειας κλωδίνης (claudins) καθώς και την οκλουδίνη (occludin). Το κυτταροπλασματικό τους τμήμα συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των πρωτεϊνών ZO-1, ZO-2 και ZO-3 (Hartsock and Nelson, 2008).

Χασμοσύνδεσμοι (gap junctions): Οι χασμοσύνδεσμοι αποτελούνται δομικά από μια περιοχή στην οποία οι μεμβράνες δύο κυττάρων βρίσκονται πολύ κοντά και ακριβώς παράλληλα, με ένα πολύ μικρό μεσοδιάστημα (χάσμα) 2-4 nm. Το διακυτταρικό χάσμα διαπερνάται από τα προεξέχοντα άκρα των κοννεξονίων που βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη δύο γειτονικών κυττάρων. Το κοννεξόνιο είναι σύμπλοκο αποτελούμενο από έξι μόρια των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών της οικογένειας κοννεξίνης. Δύο κοννεξόνια (ένα από κάθε κύτταρο) παρατάσσονται άκρο με άκρο σχηματίζουν στενούς διαύλους διαμέσου των δύο μεμβρανών που επιτρέπουν σε ανόργανα ιόντα και μικρά υδατοδιαλυτά μόρια να μετακινούνται ελεύθερα από το κυτταρόπλασμα του ενός κυττάρου στο κυτταρόπλασμα του άλλου. Έχει υπολογισθεί ότι οι χασμοσύνδεσμοι επιτρέπουν τη χωρίς περιορισμό διέλευση μορίων μοριακού βάρους έως 1000 Dalton. Έτσι δημιουργείται μια ηλεκτρική και μεταβολική σύζευξη ανάμεσα στα κύτταρα που επιτρέπει τη γρήγορη διάχυση μικρών υδατοδιαλυτών μορίων.

Δεσμοσώματα (desmosomes): Τα δεσμοσώματα αποτελούν διακυτταρικούς συνδέσμους που έχουν τη μοναδική ικανότητα να προσφέρουν πολύ ισχυρή σύνδεση. Αυτό είναι πολύ σημαντικό για ιστούς που υφίστανται ισχυρή μηχανική πίεση όπως το δέρμα και ο καρδιακός μυς. Οι σύνδεσμοι αυτοί δομούνται γύρω από

διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των καδερινών, τις δεσμοσωμικές καδερίνες, τη δεσμοκολλίνη και τη δεσμογλεΐνη. Αυτές συνδέονται μέσω της πλακοφιλίνης και της πλακογλοβίνης με τη δεσμοπλακίνη και αυτή με τη σειρά της με τα ινίδια κερατίνης.

Σύνδεσμοι προσκόλλησης (adherens junctions): Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης (Adherens Junctions - AJs) εντοπίζονται στην βασοπλευρική μεμβράνη και διασυνδέουν γειτονικά κύτταρα. Παρόλο που οι σύνδεσμοι προσκόλλησης και οι στεγανοί σύνδεσμοι διαφέρουν σε επίπεδο μορίων, έχουν ωστόσο κοινά χαρακτηριστικά. Η σύνδεση διαμεσολαβείται από διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που προάγουν τις ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις και σχηματίζουν δομές που μοιάζουν με φερμουάρ (zipper-like) κατά μήκος των ορίων των κυττάρων μέσω της πλευρικής τους συσσωμάτωσης in trans and cis [(Bazzoni and Dejana, 2004); (Gonzalez-Mariscal et al., 2008; Wallez and Huber, 2008)]. Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης δομούνται γύρω από τις καδερίνες.

## **1.2 Η οικογένεια των καδερινών**

Οι καδερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούν μια μεγάλη υπερ-οικογένεια που στα σπονδυλωτά περιλαμβάνει περισσότερα από 100 μέλη και διαιρείται σε υπο-οικογένειες με βάση τη σύγκριση της πρωτοταγούς τους δομής και τα δομικά τους χαρακτηριστικά. Χαρακτηριστικό όλων είναι η παρουσία στο εξωκυττάριο τμήμα τους μοτίβων που ονομάζονται «επαναλήψεις καδερίνης» (cadherin repeats). Κάθε μια από τις επαναλήψεις αποτελείται από 110 αμινοξέα περίπου και παρουσιάζουν σημαντική ομολογία.

Οι υπο-οικογένειες είναι οι εξής:

- Καδερίνες τύπου I,
- Καδερίνες τύπου II,
- Δεσμοσωμικές καδερίνες,
- Πρωτοκαδερίνες και
- Καδερίνες Flamingo

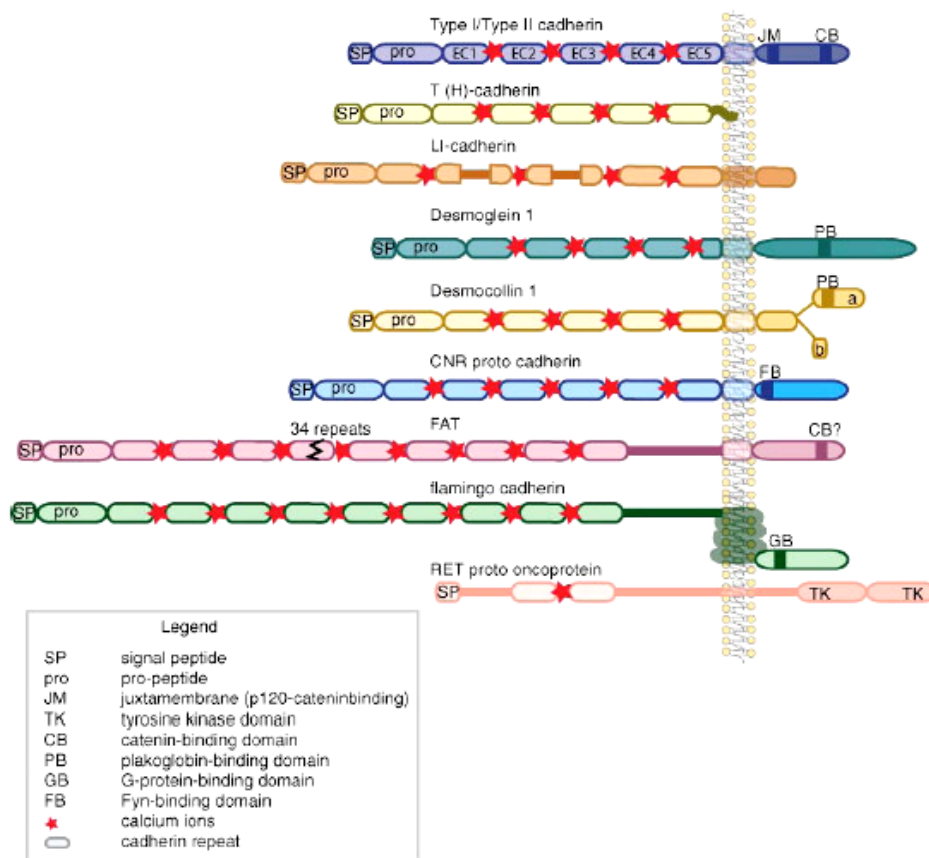
Επίσης έχουν ταυτοποιηθεί και άλλα μέλη της οικογένειας των καδερινών τα οποία όμως δεν παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά με τις υπόλοιπες ώστε να περιληφθούν σε μια κατηγορία. Μερικές από αυτές είναι οι FAT, Daschsous, η T-καδερίνη, η Ksp-καδερίνη, η LI-καδερίνη και η RET πρωτο-ογκοπρωτεΐνη (Εικ. 1).

Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται τα βασικά τους χαρακτηριστικά [(Angst et al., 2001), (Gallin, 1998), (Nollet et al., 2000),(Yagi and Takeichi, 2000)].

<b>Υπο-οικογένειες</b>	<b>Αντιπρόσωποι</b>	<b>Βασικά χαρακτηριστικά</b>
<b>Κλασικές καδερίνες</b>	<p>Τύπου I : E-καδερίνη, N-καδερίνη</p> <p>Τύπου II Αγγειακή ενδοθηλιακή καδερίνη</p>	<p>Ομοφιλικές συνδέσεις για τις οποίες είναι απαραίτητη η παρουσία ιόντων <math>Ca^{2+}</math></p> <p>Το κυτταροπλασματικό τμήμα αλληλεπιδρά με την β-κατενίνη, p120 και την α-κατενίνη</p> <p>Συνδέονται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης</p>
<b>Δεσμοσωμικές καδερίνες</b>	<p>Δεσμοκολλίνες</p> <p>Δεσμογλεΐνες</p>	<p>Απαντώνται αποκλειστικά στα δεσμοσώματα</p> <p>Παρόμοιες δομικά με τις κλασικές καδερίνες</p> <p>Το κυτταροπλασματικό τμήμα αλληλεπιδρά με την πλακογλοβίνη και τη δεσμοπλακίνη</p> <p>Συνδέονται με ενδιάμεσα ινίδια</p>
<b>Μη τυπικές καδερίνες</b>	<p>T-cadherin, LI-cadherin</p> <p>FAT, Daschous, Flamingo</p>	<p>Δημιουργούν συνδέσεις με ομοφιλικό τρόπο χωρίς να συνδέονται με κατενίνες ούτε με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης</p> <p>Μεταβλητός αριθμός επαναλήψεων στο εξωκυτταρικό τμήμα</p> <p>Παίζουν ρόλο στην καταστολή όγκων και στην εδραίωση της κυτταρικής πολικότητας</p> <p>Δεν είναι γνωστό αν συμμετέχουν σε ομοφιλικές</p>

		συνδέσεις
<b>Πρωτο-καδερίνες</b>	α-πρωτοκαδερίνες,β-πρωτοκαδερίνες,γ-πρωτοκαδερίνες, P APC, AXPC	Μεταβλητός αριθμός επαναλήψεων στο εξωκυτταρικό τμήμα  Εκφράζονται κυρίως στο νευρικό σύστημα  Το κυτταροπλασματικό τμήμα δεν αλληλεπιδρά με κατενίνες

**Πίνακας 1 :** Κοινό χαρακτηριστικό όλων των καδερινών αποτελεί η παρουσία επαναλαμβανόμενων περιοχών στο εξωκυτταρικό τμήμα (AXPC: axial proto-cadherin, LI cadherin: liver-intestine cadherin, P APC: paraxial proto-cadherin, T-cadherin: truncated cadherin).

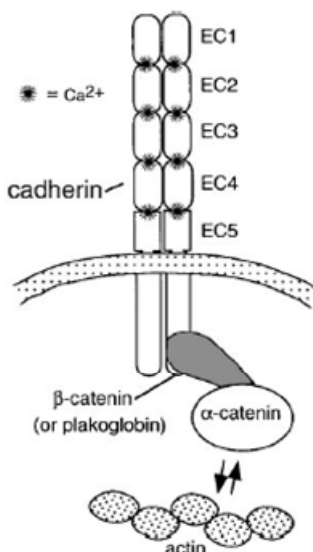


**Εικόνα 1 :** Σύγκριση της δομής των μελών της οικογένειας των καδερινών. Η εξωκυττάρια περιοχή αποτελείται από επαναλήψεις καδερίνης EC, η αρίθμηση των οποίων ξεκινά από το αμινοτελικό άκρο (SP: αλληλουχία σήματος, pro: προπεπτίδιο, JM: παραμεμβρανική περιοχή σύνδεσης με την p120, CB: περιοχή σύνδεσης με τη β-κατενίνη, PB: περιοχή σύνδεσης με την πλακογλοβίνη, FB: περιοχή σύνδεσης με την πρωτεΐνη Fyn, GB: περιοχή σύνδεσης με G-πρωτεΐνες, \*: ιόντα  $Ca^{2+}$ ) (Whelock and Johnson, 2003).

### 1.2.1 Ιδιότητες της εξωκυττάριας περιοχής των καδερινών

Με λίγες εξαιρέσεις οι κλασικές καδερίνες έχουν ένα κυτταροπλασματικό τμήμα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια εξελικτικά συντηρημένη εξωκυττάρια περιοχή. Η εξωκυττάρια περιοχή των περισσότερων καδερινών αποτελείται από πέντε επαναλήψεις καδερίνης (EC domain) (Εικ. 2).

Με βάση τη σύγκριση των αλληλουχιών τους μπορούν να διακριθούν σε δύο υποοικογένειες: τις κλασικού τύπου I όπως οι E-, N-, P- και C- καδερίνες και οι τύπου II από όπου απουσιάζει το μοτίβο Ιστιδίνης-Αλανίνης-Βαλίνης (HAV), ένα κλασικό μοτίβο σύνδεσης που εμφανίζεται στην EC1 περιοχή στο αμινοτελικό άκρο των καδερινών κλασικού τύπου I [(Johnson, 1999), (Knudsen et al., 1998), (Takeichi, 1990)]. Οι καδερίνες αποτελούν μόρια διασύνδεσης τα οποία για να εκδηλώσουν την διαμορφωτική και συνδετική τους λειτουργικότητα απαιτούν την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι αυτό οφείλεται στο ότι τα ιόντα ασβεστίου προσδένονται σε συγκεκριμένα αμινοξέα μεταξύ των περιοχών EC έτσι ώστε να διασφαλίσουν τη σωστή αναδίπλωση (Koch et al., 1999). Οι τύπου I και οι τύπου II έχουν μια συντηρημένη τρυπτοφάνη (W2) στο αμινοτελικό άκρο της EC1 περιοχής ενώ οι τύπου II έχουν μια επιπλέον τρυπτοφάνη (W2) στην ίδια περιοχή. Οι καδερίνες τύπου I και II προάγουν τις ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις και η EC1 περιοχή είναι απαραίτητη για αυτές.



**Εικόνα 2 :** Δομή καδερίνης κλασικού τύπου. Διακρίνονται το κυτταροπλασματικό τμήμα όπου εντοπίζονται οι θέσεις σύνδεσης με τις β-κατενίνη, πλακογλοβίνη και p120 στο κυτταροπλασματικό τμήμα, το διαμεμβρανικό τμήμα, το εξωκυττάρια τμήμα με τις πέντε επαναλαμβανόμενες περιοχές EC (Yap et al., 1997).

Έχει δείχθει ότι για την ομοφιλική αλληλεπίδραση μεταξύ των καδερινών τύπου I υπεύθυνη είναι η πρόσδεση της τρυπτοφάνης σε έναν υδρόφοβο θύλακα της in trans

EC1 περιοχής [(Blaschuk et al., 1990),(Nose et al., 1990)]. Επιπλέον, ο πλευρικός διμερισμός (cis) μεταξύ των περιοχών EC1 και EC2 πιστεύεται ότι ενισχύει τις αλληλεπιδράσεις [(Pertz et al., 1999), (Boggon et al., 2002),(Ahrens et al., 2002)]. Έτσι προκύπτουν διμερή που δημιουργούν δομές που μοιάζουν με φερμουάρ.

Οι καδερίνες εκφράζονται με ιστοειδικό τρόπο: η E-καδερίνη εκφράζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα, η N-καδερίνη στο νευρικό σύστημα, στα λεία μυϊκά κύτταρα, στους ινοβλάστες και στα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ η αγγειακή καδερίνη είναι ειδική για το ενδοθήλιο [(Lampugnani et al., 1992), (Gumbiner, 2005)].

### **1.2.2 Ιδιότητες της κυτταροπλασματικής περιοχής καδερινών**

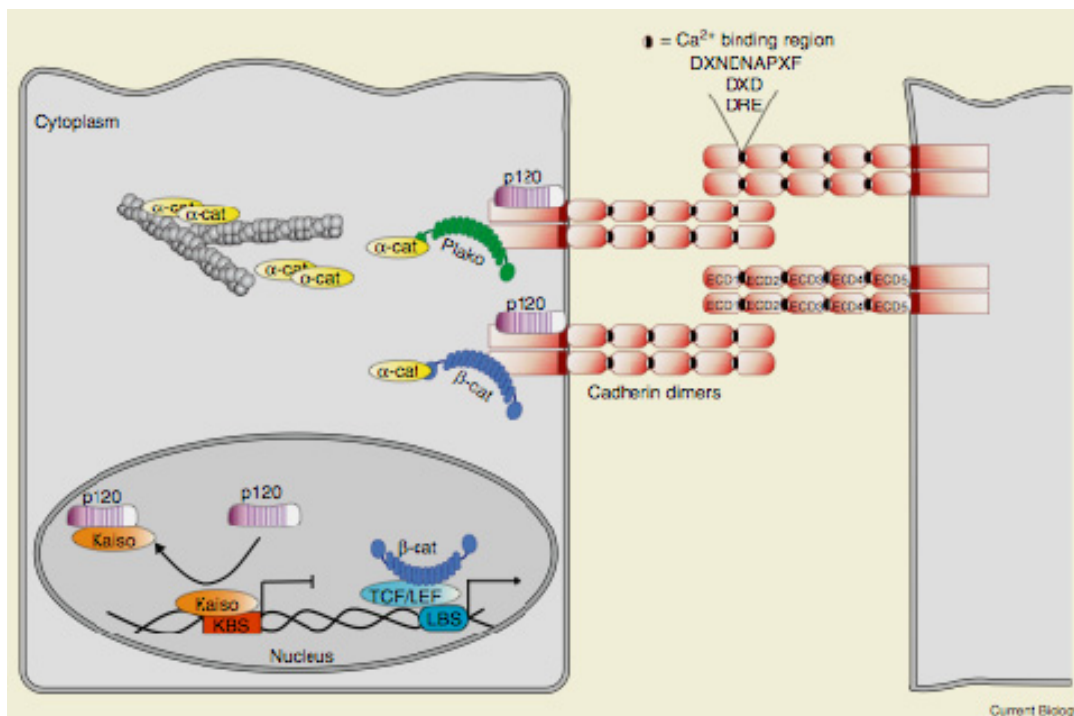
Οι κλασικού τύπου καδερίνες αλληλεπιδρούν μέσω του κυτταροπλασματικού τους τμήματος με την β-κατενίνη και την πλακογλοβίνη (ή γ-κατενίνη). Οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν ομολογία επειδή περιέχουν 10-13 επαναλαμβανόμενες περιοχές armadillo, οι οποίες εντοπίζονται σε πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε σηματοδοτικές οδούς. Τόσο η β-κατενίνη όσο και η πλακογλοβίνη συνδέονται με την α-κατενίνη η οποία συνδέεται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης είτε άμεσα είτε έμμεσα. Η α-κατενίνη είναι μια συνδετική πρωτεΐνη ακτίνης, όπως η α-ακτινίνη και η βινκουλίνη. Η σύνδεση των καδερινών με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης σταθεροποιεί τις δομές των συνδέσμων και συμβάλλει στη διατήρηση της μορφολογίας και στον έλεγχο της κίνησης του κυττάρου (Εικ. 3).

Η β-κατενίνη περιέχει 13 επαναλήψεις μια χαρακτηριστικής περιοχής armadillo 42 αμινοξέων (Vittet et al., 1997), συνδέεται με παράγοντες μεταγραφής γονιδίων στον πυρήνα (Bullions and Levine, 1998) και ρυθμίζεται με φωσφορυλίωση (Perez-Moreno and Fuchs, 2006). Η β-κατενίνη μετακινείται στον πυρήνα και ενεργοποιεί αρκετά γονίδια μεταξύ των οποίων την κυκλίνη D1 και το myc των οποίων τα παράγωγα επάγουν την είσοδο στον κυτταρικό κύκλο (Goodwin and D'Amore, 2002). Κατά την ανάπτυξη του εμβρύου η β-κατενίνη σταθεροποιείται στο κυτταρόπλασμα μετά από δράση του σηματοδοτικού μονοπατιού wnt.

Οι καδερίνες επίσης συνδέονται με την p120, η οποία ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών armadillo (Reynolds et al., 1992). Η p120 αποτελείται από 10 αντίγραφα της περιοχής armadillo. Υπάρχουν τέσσερις ισομορφές της που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Reynolds and Rocznik-Ferguson, 2004). Συνδέεται με τις καδερίνες σε μια ιδιαίτερα συντηρημένη περιοχή. Από μελέτες προκύπτει ότι η p120 ρυθμίζει τα επίπεδα της καδερίνης στην κυτταρική μεμβράνη



καθώς κατά κάποιο τρόπο τη συγκρατεί εκεί εμποδίζοντας την ενδοκύττωση της [(Davis et al., 2003), (Iyer et al., 2004), (Maeda et al., 2006), (Xiao et al., 2003),(Piedra et al., 2003)].



**Εικόνα 3 :** Μοριακή οργάνωση των συνδέσμων προσκόλλησης. Η καδερίνη απεικονίζεται ως διμερές. Οι p120 και η β-κατενίνη αλληλεπιδρούν άμεσα με την καδερίνες. Η α-κατενίνη (α-cat) είτε αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο καδερίνης-β κατενίνης είτε σχηματίζει διμερή και αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Επίσης απεικονίζεται η μεταγραφική δραστηριότητα των β-κατενίνη και p120 (Rudini and Dejana, 2008).

Η p120 επίσης ρυθμίζει την ικανότητα κίνησης του κυττάρου μέσω του κυτταροσκελετού της ακτίνης αλληλεπιδρώντας με την οικογένεια των Rho GTPασων (Noren et al., 2000).

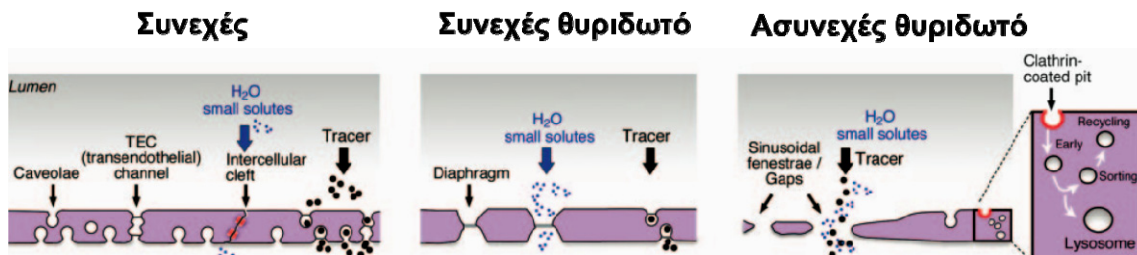
Η α-κατενίνη συνδέεται με τα ινίδια ακτίνης και έχει δείχθει ότι αλληλεπιδρά και με άλλες συνδετικές πρωτεΐνες ακτίνης όπως η βινκουλίνη [(Watabe-Uchida et al., 1998),(Lowin-Kropf et al., 1998)], η σπεκτρίνη (Pradhan et al., 2001), η ZO-1 (Imamura et al., 1999) και η αφαντίνη (Scott et al., 2006) καθώς και με πρωτεΐνες υπεύθυνες για τη συγκρότηση των ινιδίων ακτίνης, όπως οι φορμίνες (Kobielak and Fuchs, 2004). Η μονομερής α-κατενίνη αλληλεπιδρά με την β-κατενίνη και την πλακογλοβίνη ενώ τα ομοδιμερή της α-κατενίνης μπορούν να συνδεθούν με τα ινίδια ακτίνης και να ρυθμίσουν τον πολυμερισμό τους [(Yamada et al., 2005),(Drees et al., 2005)]. Για πολλά χρόνια υπήρχε η εντύπωση ότι η α-κατενίνη συνδέεται ταυτόχρονα

με το σύμπλοκο καδερίνης-β κατενίνης και την ακτίνη. Ωστόσο, οι προαναφερθείσες μελέτες δείχνουν ότι η α-κατενίνη είναι μια αλλοστερική πρωτεΐνη in vitro που δεν είναι σε θέση να συνδεθεί με την β-κατενίνη και την ακτίνη ταυτόχρονα. Αν ωστόσο η α-κατενίνη δεν παρέχει ένα σταθερό σύνδεσμο μεταξύ καδερινών και ακτίνης τότε ποιος είναι ο ρόλος της; Μια πιθανότητα είναι ότι δεν υπάρχει άμεση ή έμμεση σύνδεση μεταξύ κυτταροσκελετού και των συνδέσμων προσκόλλησης. Αρκετές παρατηρήσεις καθιστούν αυτό το ενδεχόμενο απίθανο. Μια δεύτερη πιθανότητα είναι ότι άλλα μόρια διαμεσολαβούν μια άμεση σύνδεση όπως η πρωτεΐνη eplln. Τέλος, η τρίτη πιθανότητα είναι η σύνδεση μεταξύ α-κατενίνης και ακτίνης να διαμεσολαβείται από μη ισχυρές και παροδικές αλληλεπιδράσεις. Είναι πιθανό η α-κατενίνη να δρα ως ένας μοριακός διακόπτης που ρυθμίζει τη δυναμική των συνδέσμων προσκόλλησης. Αυτό γίνεται γιατί η κατενίνη δρα αλλοστερικά, καθώς η συγγένεια για τον ένα συνδέτη επηρεάζεται από τη σύνδεση με τον άλλο συνδέτη. Το ετεροδιμερές α-κατενίνης/β-κατενίνης έχει υψηλή συγγένεια για την καδερίνη αλλά χαμηλή συγγένεια για την ακτίνη, ενώ η διμερής α-κατενίνη δε μπορεί να συνδεθεί με το σύμπλοκο καδερίνης/β-κατενίνης καθώς έχει υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την ακτίνη.

### **1.3 Το Ενδοθήλιο – Ιδιότητες**

Το ενδοθήλιο αποτελεί τον ιστό που επενδύει τα αγγεία του αίματος και σχηματίζει ένα φράγμα μεταξύ του αίματος και των παρακείμενων ιστών. Ο όρος «ενδοθήλιο» εισήχθη για πρώτη φορά το 1865 από τον ανατόμο Wilhelm His για να καταδείξει την ιδιαιτερότητά του ότι επενδύει εσωτερικές κοιλότητες του οργανισμού, σε αντιδιαστολή με το επιθήλιο. Αρχικά στον ορισμό εκτός από τα κύτταρα που επενδύουν τα αγγεία του αίματος και της λέμφου, περιλαμβάνονταν και τα κύτταρα του μεσοθηλίου που ταυτοποιήθηκαν αργότερα ως διαφορετικός κυτταρικός τύπος. Το ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο σε λειτουργίες όπως στη ρύθμιση του αγγειοκινητικού τόνου, τη διαπίδυση κυττάρων του αίματος, το ισοζύγιο της αιμόστασης, τη διαπερατότητα, την κυτταρική αύξηση, την επιβίωση και την ανοσολογική απόκριση. Ένα βασικό χαρακτηριστικό του ενδοθηλιακού ιστού αποτελεί η φαινοτυπική και λειτουργική ετερογένεια που παρουσιάζει, κάτι που ρυθμίζεται από το μικροπεριβάλλον του ιστού που βρίσκεται αλλά και κατά το στάδιο της διαφοροποίησης.

Διακρίνονται τρεις τύποι ενδοθηλίου: το συνεχές ενδοθήλιο (στον πνεύμονα, την καρδιά, το δέρμα), το συνεχές θυριδωτό (στους ενδοκρινείς αδένες, το νεφρικό σπείραμα, το βλεννογόνο του γαστρεντερικού) και το ασυνεχές θυριδωτό του ήπατος. Είναι πλέον γνωστό ότι στον ώριμο οργανισμό υπάρχουν διαφορετικοί «ενδοθηλιακοί» φαινότυποι που παρουσιάζουν σε πολλές περιπτώσεις διαφορετική λειτουργικότητα (Aird, 2007) (Εικ. 4).



**Εικόνα 4:** Οι τρεις διαφορετικοί τύποι του ενδοθηλίου. Στο συνεχές ενδοθήλιο, νερό και μικρές σε μέγεθος διαλυτές ουσίες (με ακτίνα μικρότερη από 3μm) περνούν ανάμεσα από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενώ μεγαλύτερες ουσίες περνούν είτε μέσω διακυτταρικών καναλιών ή μέσω μιας διακυτταρικής οδού που διαμεσολαβείται από τα caveolae. Το συνεχές θυριδωτό ενδοθήλιο παρουσιάζει μεγαλύτερη διαπερατότητα στο νερό και σε διαλυτές ουσίες. Το ασυνεχές ενδοθήλιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μεγάλων κενών διαστημάτων και από μια υποτυπωδώς οργανωμένη βασική μεμβράνη. Επίσης περιέχει πολλές εσοχές καλυμμένες με κλαθρίνη που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκύττωση (Aird, 2007).

Όπως είναι φυσικό η ενδοθηλιακή διαπερατότητα εμφανίζει διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με τον ενδοθηλιακό τύπο.

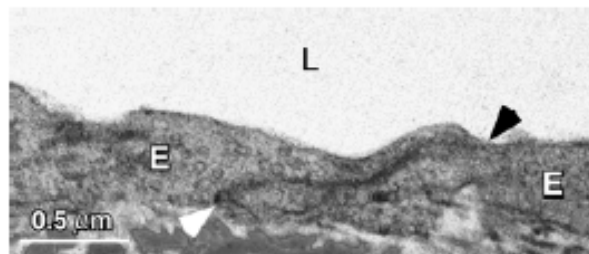
Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε ένα συγκεκριμένο μικροπεριβάλλον αλληλεπιδρούν με διάφορους τύπους κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες, τα περικύτταρα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, τα κύτταρα οργάνων ή και όγκων. Επιπλέον, τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το εξωκυττάριο στρώμα και εκτίθενται σε διάφορους αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες που απελευθερώνονται από γειτονικά κύτταρα (Jung et al., 2002). Έτσι, τα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτουν διαφορετικά αγγεία σε διαφορετικούς ιστούς και παρουσιάζουν μορφολογικές και λειτουργικές εξειδικεύσεις που αντανακλώνται στο προφίλ της γονιδιακής τους έκφρασης.

Λόγω της ετερογένειας του ενδοθηλίου η ταυτοποίησή του δεν είναι απλή. Τα ανατομικά χαρακτηριστικά του μπορούν να μιμηθούν άλλοι κυτταρικοί τύποι όπως τα

τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα. Από την άλλη, μορφολογικά χαρακτηριστικά του όπως ο σχηματισμός θυρίδων (fenestrae) ή των ενδοκυτταρικών δομών Palade Bodies δεν παρουσιάζονται σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ τα caveolae υπάρχουν και σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Τα μόρια διακυτταρικής προσκόλλησης CD31 ή PECAM-1 (που εκφράζεται και στα μονοκύτταρα), η VE-cadherin (που εκφράζεται επίσης στα τροφοβλαστικά κύτταρα και σε εμβρυικά βλαστικά κύτταρα) καθώς και ο αντιθρομβωτικός παράγοντας θρομβομοντουλίνη (που εκφράζεται και στα κερατινοκύτταρα) αποτελούν τους πλέον αξιόπιστους ενδοθηλιακούς δείκτες. Τα μόρια αυτά εκφράζονται με σχετική ιστοειδική πιστότητα και ομοιογενώς όσον αφορά τους τύπους ενδοθηλίου και τα επίπεδα έκφρασης.

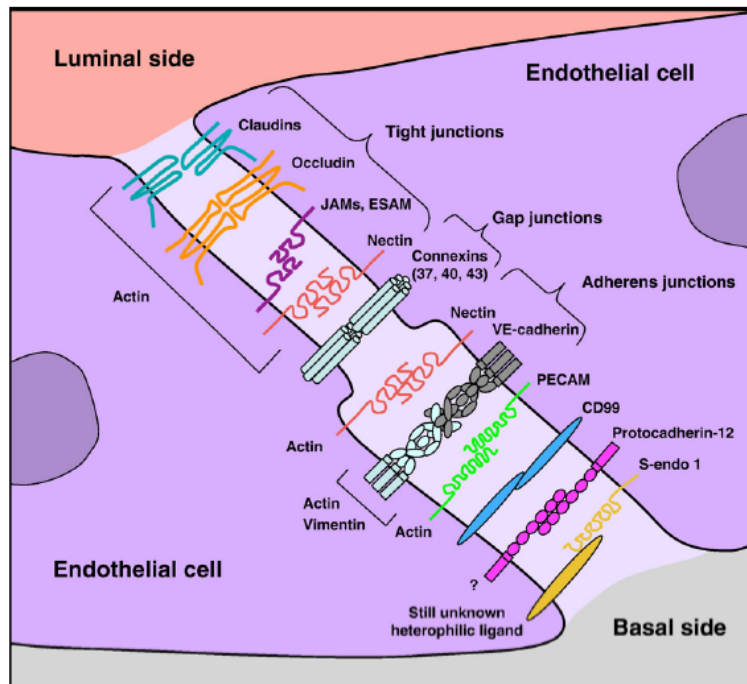
### 1.3.1 Ενδοθηλιακή διαπερατότητα

Η μελέτη της ανυσματικής μεταφοράς κυττάρων και υγρών διαμέσου της ενδοθηλιακής στοιβάδας έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των φυσιολόγων και των κυτταρικών βιολόγων με σημαντικά αμφιλεγόμενα θέματα να κυριαρχούν στο πεδίο για δεκαετίες. Υπάρχει πλέον συμφωνία ότι η ενδοθηλιακή διαπερατότητα διαμεσολαβείται από δύο γενικούς μηχανισμούς μεταφοράς: α) τα υγρά και οι μικρομοριακές ενώσεις κινούνται με παθητικό τρόπο διαμέσου του φραγμού ακολουθώντας μια παρακυτταρική οδό (paracellular pathway) και β) τα μακρομόρια χρησιμοποιούν μια διακυτταρική οδό (transcellular pathway). Ως οχήματα μεταφοράς σ' αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται μεμβρανικά κυστίδια, όπως τα caveolae και τα VVOs (Vesiculo-Vacuolar Organelles). Η διακυτταρική διέλευση μπορεί να εξαρτάται από την ύπαρξη ειδικών υποδοχέων (receptor-mediated transcytosis) ή να είναι ανεξάρτητη από υποδοχείς (fluid-phase transcytosis) (Aird, 2007).



**Εικόνα 5:** Φωτογραφία ηλεκτρονικής μικροσκοπίας όπου απεικονίζεται ένας ενδοθηλιακός σύνδεσμος προσκόλλησης σε αρτητή ποντικού. Η διακυτταρική περιοχή μεταξύ δύο κυττάρων (E) επεκτείνεται από τη βασική μεμβράνη μέχρι τον αυλό (L) (Wallez and Huber, 2008).

Τα κύτταρα που διέρχονται την ενδοθηλιακή στοιβάδα χρησιμοποιούν κυρίως την παρακυτταρική οδό, ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιήσουν και την διακυτταρική οδό. Η παρακυτταρική οδός διέλευσης εξαρτάται από δυναμικούς μηχανισμούς που ελέγχουν το άνοιγμα και το κλείσιμο των ενδοθηλιακών διακυτταρικών συνδέσεων (Dejana et al., 2008) ενώ η διακυτταρική οδός περιλαμβάνει συστήματα μεταφοράς μέσω κυστιδίων, μεταφορά μέσω θυρίδων (fenestrae) και βιοχημικούς μεταφορείς (Dvorak et al., 1996).



**Εικόνα 6:** Οι τύποι των διακυτταρικών συνδέσεων στο ενδοθήλιο. Οι στεγανοί σύνδεσμοι και οι σύνδεσμοι προσκόλλησης συνδέονται με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Wallez and Huber, 2008).

Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι και κυρίως οι καδερίνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας του ενδοθηλίου, στην κυτταρική ανάπτυξη και στην αγγειογένεση (Εικ. 6).

### 1.3.2 VE-cadherin : η ιστοειδική καδερίνη του ενδοθηλίου

Η αγγειακή ενδοθηλιακή καδερίνη (Vascular Endothelial cadherin) VE-cadherin εκφράζεται ειδικά στο ενδοθήλιο και σε προγονικά κύτταρα του αιμοποιητικού. Εντοπίζεται επίσης στους κυτοτροφοβλάστες μαζί με άλλους δείκτες του ενδοθηλίου και στα αιμοποιητικά εμβρυϊκά κύτταρα. Η VE-cadherin αποτελεί έναν από τους πρώτους δείκτες των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων και εντοπίζεται σε όλους τους τύπους του ενδοθηλίου (Breier and Risau, 1996).

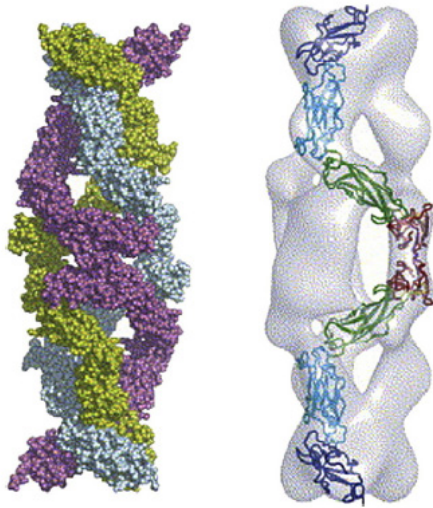
### 1.3.2.1 Γονιδιακή έκφραση της VE-cadherin

Το γονίδιο της αποτελείται από 36 εξώνια. Όπως και σε άλλα γονίδια καδερινών που έχουν χαρακτηριστεί, στο 5'-άκρο της VE-cadherin εντοπίζονται μεγάλα ιντρόνια, γεγονός που θεωρείται σημαντικό για τη μεταγραφική ρύθμιση (Huber et al., 1996). Το κυτταροπλασματικό τμήμα κωδικοποιείται από ένα εξώνιο ενώ στις άλλες κλασικές καδερίνες από τρία εξώνια. Μια περιοχή 2500 bp στον υποκινητή της VE-cadherin φαίνεται ότι κατευθύνει τη μεταγραφή *in vitro* και *in vivo* στο ενδοθήλιο του ενήλικου ποντικού κατά την αγγειακή ανάπτυξη (Gory et al., 1999). Η περιοχή του υποκινητή περιέχει τρεις περιοχές που είναι σημαντικές για τη μεταγραφική ρύθμιση: μια κεντρική περιοχή που προάγει τη μεταγραφή ανεξάρτητα από τον κυτταρική σειρά και δύο αρνητικά σημεία ελέγχου που δεν επιτρέπουν τη μεταγραφή σε μη ενδοθηλιακά κύτταρα (Gory et al., 1998).

### 1.3.2.2 Δομή της VE-cadherin και αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες

Η VE-cadherin αποτελεί το βασικό μόριο που είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης και τη ρύθμιση της λειτουργίας του ενδοθηλιακού φραγμού. Η αλληλεπίδραση της με άλλα μόρια όπως οι κατενίνες, οι φωσφατάσες και κινάσες καταλοίπων τυροσίνης παίζει ρόλο στην έναρξη των μορφογενετικών λειτουργιών, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την κυτταρική επιβίωση.

Για την VE-cadherin έχουν προταθεί δύο διαφορετικά μοντέλα όσον αφορά στην ομοφιλική αλληλεπίδραση. Το πρώτο μοντέλο βασίζεται στη μελέτη μιας ανασυνδυσμένης μορφή VE-cadherin που εκφράζεται σε βακτήρια και περιλαμβάνει τις περιοχές EC1 έως EC4 (Legrand et al., 2001). Βρέθηκε ότι αυτή η πρωτεΐνη σχηματίζει εξαμερή τα οποία αναλύθηκαν βιοχημικά όπως και με κρυσταλλογραφική μικροσκοπία. Σαν πρότυπο στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε η δομή της C-καδερίνης (Boggon et al., 2002). Προτείνεται ότι η διαμόρφωση των 6 μορίων καδερίνης αποτελείται από 2 'τριπλές έλικες' με κάθε έλικα να περιέχει 3 παράλληλα μονομερή και τα 2 τριμερή να συνδέονται *in trans* με αλληλεπιδράσεις μεταξύ στην EC1 περιοχή μεταξύ των 3 ζευγών. Η προτεινόμενη τριπλή έλικα βασίζεται σε τριμερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών EC4 (Hewat et al., 2007) (Εικ. 7).



**Εικόνα 7:** Μοντέλο συγκρότησης του εξωκυττάριου τμήματος της VE-cadherin σε εξαμερές. Το μοντέλο περιλαμβάνει τις περιοχές EC1-EC4. Αριστερά: τα διμερή της VE-cadherin παρουσιάζονται με χρώμα μωβ, πράσινο και γαλάζιο. Δεξιά: Η εντόπιση των EC περιοχών στο μοντέλο του εξαμερούς όπου EC1: με κόκκινο χρώμα, EC2: με πράσινο χρώμα, EC3 : με γαλάζιο χρώμα, EC4: με μπλε χρώμα (Hewat et al., 2007).

Το δεύτερο μοντέλο βασίζεται σε μια ανασυνδυασμένη διαλυτή μορφή της VE-cadherin από ποντικό που εκφράζεται σε κύτταρα θηλαστικών και περιλαμβάνει και τις 5 EC περιοχές συνδεδεμένες στο N-τελικό άκρο της υπερσπειρωμένης έλικας της πρωτεΐνης CMP (cartilage matrix protein) (Ahrens et al., 2003). Αυτή η πρωτεΐνη σχηματίζει δακτυλίους παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$  καθώς και δομές διπλών δακτυλίων που βασίζονται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιοχών EC1 και EC2. Στη μελέτη αυτή προβλέπονται μόνο διμερή και όχι εξαμερή.

Και τα δύο μοντέλα βασίζονται στα δεδομένα που προέκυψαν από την κρυσταλλογραφία της C-καδερίνης και εστιάζουν στην επιμηκυμένη κυρτή διαμόρφωση του μορίου. Κάποιες μελέτες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχουν δείξει ότι η κυρτή αυτή διαμόρφωση του μορίου ισχύει για τις E-, N- και VE-cadherin. Το δεύτερο μοντέλο είναι περισσότερο πειστικό δίνοντας έμφαση στην σημαντικό ρόλο που παίζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ EC1 και EC2 περιοχών που έχουν αναφερθεί και για την C-cadherin.

Όσον αφορά στο κυτταροπλασματικό τμήμα της VE-cadherin συνδέεται με τη β-κατενίνη, την πλακογλοβίνη και την p120. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα ενηλίκων εν ηρεμία, η β-κατενίνη φαίνεται να συγκεντρώνεται αποκλειστικά στα σημεία των διακυτταρικών συνδέσεων [(Eberhart and Argani, 2001), (Eberhart et al., 2000), (Blankesteyn et al., 2000)]. Η απενεργοποίηση της β-κατενίνης στο ενδοθήλιο οδηγεί σε μορφολογικές μεταβολές των αγγείων, σε αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που καταλήγει σε θάνατο του εμβρύου [(Liebner et al., 2004), (Cattelino et al., 2003)].

Το σύμπλεγμα καδερίνης-β κατενίνης είναι ιδιαίτερα δυναμικό και η σύνθεση του μπορεί να αλλάξει ανάλογα με τη λειτουργική κατάσταση των κυττάρων. Στην κυτταροκαλλιέργεια, πριν τα κύτταρα σχηματίσουν συνεχές ταπήτιο η καδερίνη

φωσφορυλιώνεται και συνδέεται αρχικά με τις β-κατενίνη και p120. Όταν ο σύνδεσμος ωριμάσει, χαλαρώνει η φωσφορυλίωση στο κατάλοιπο τυροσίνης στην καδερίνη και η β-κατενίνη και η p120 απομακρύνονται από το σύμπλοκο και αντικαθίστανται από την πλακογλοβίνη. Μετά την απομάκρυνση αυτή οι πρωτεΐνες είναι πλέον διαθέσιμες έτσι ώστε να παίξουν κάποιο ρόλο στη σηματοδότηση (Lampugnani et al., 1997). Έχει αναφερθεί ότι η σύνδεση της p120 με την VE-cadherin τη σταθεροποιεί στη μεμβράνη κατά τη δημιουργία των διακυτταρικών συνδέσεων [(Yap et al., 1998), (Ferber et al., 2002),(Thoreson et al., 2000)].

### 1.3.3 Παράγοντες που εμπλέκονται στην ενδοθηλιακή διαπερατότητα μέσω του συμπλόκου VE-cadherin/κατενινών

Οι σύνδεσμοι προσκόλλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας και της ακεραιότητας του ενδοθηλίου. Μεταβολές στη διαπερατότητα του ενδοθηλίου συνοδεύονται από μερική αποκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους με ακόλουθη έκθεση του υποενδοθηλιακού στρώματος (Dejana et al., 2008). Παράγοντες όπως υψηλές συγκεντρώσεις ισταμίνης, θρομβίνης ή αυξητικών παραγόντων μπορούν να αυξήσουν τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου μέσω φωσφορυλίωσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης καθώς και ενεργοποίησης της Rho και της πρωτεΐνης PAK (p21-activated kinase) (Stockton et al., 2004) (Πίνακας 2).

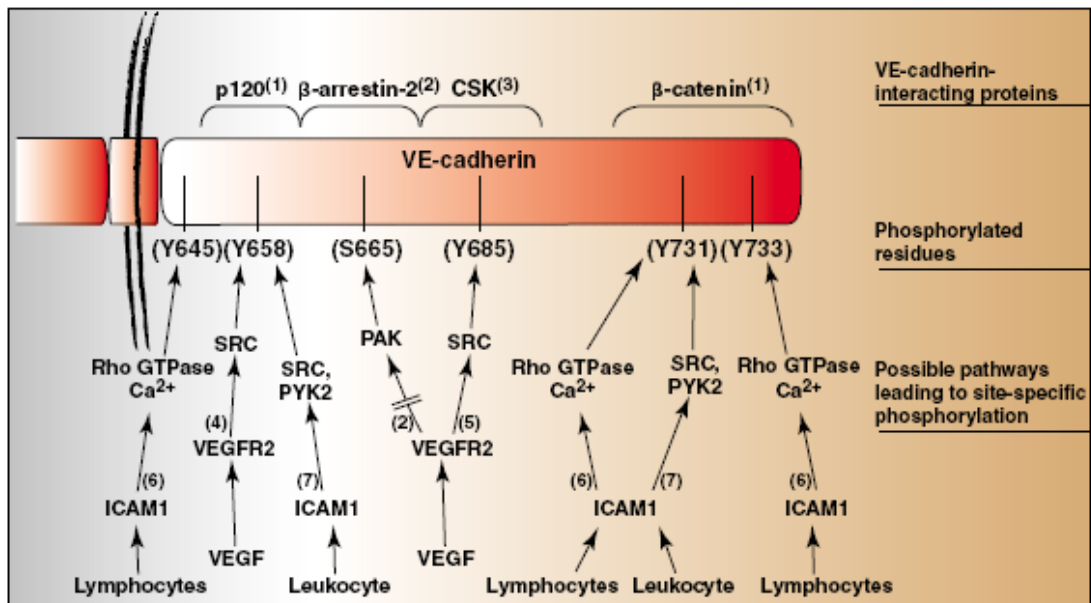
Παράγοντες	Επίδραση στη VE-cadherin	Βιβλιογραφικές Αναφορές
<b>VEGF</b>	Φωσφορυλίωση  Ενδοκύττωση  Αποσύνδεση κατενίνης	(Risau, 1998), (Wallez et al., 2006), (Lambeng et al., 2005)  (Schnittler and Preissner, 2005), (Gavard and Gutkind, 2006)
<b>Θρομβίνη</b>	Φωσφορυλίωση	(Ukropec et al., 2000),(Konstantoulaki et al., 2003; Mehta et al., 2003)



	Αποσύνδεση κατενίνης	(Rabiet et al., 1996)
<b>Ισταμίνη</b>	Φωσφορυλίωση Αποσύνδεση κατενίνης Ενδοκύττωση	(Andriopoulou et al., 1999)  (Shasby et al., 2002)
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Φωσφορυλίωση	(Shasby et al., 2002)

**Πίνακας 2:** Παράγοντες που επιδρούν στην ενδοθηλιακή διαπερατότητα μέσω του συμπλόκου VE-cadherin/κατενινών.

Η ισταμίνη, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων PAF (Platelet Activating Factor) και ο αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) επάγουν την φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα τυροσίνης της VE-cadherin, της  $\beta$ -κατενίνης, της πλακογλοβίνης και της p120 με αποτέλεσμα την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας τουλάχιστον σε συστήματα κυτταροκαλλιέργειας (Dejana et al., 2008). Ο μηχανισμός της φωσφορυλίωσης δεν έχει ακόμη αποσαφηνιστεί πλήρως. Η κινάση Src μάλλον εμπλέκεται σε αυτές τις φωσφορυλιώσεις καθώς συνδέεται άμεσα με το σύμπλεγμα VE-cadherin/κατενινών (Weis et al., 2004). Η VE-cadherin μπορεί επίσης να παραμένει σε φωσφορυλιωμένη κατάσταση μέσω αναστολής των συνδεδεμένων με αυτή φωσφατάσων. Η φωσφατάση VE-PTP παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς είναι ειδική για το ενδοθήλιο και συνδέεται με τη VE-cadherin. Άλλες φωσφατάσες όπως οι Dep-1, PTP- $\mu$  και SHP2 μπορούν να συνδέονται με τη VE-cadherin και να μειώνουν άμεσα ή έμμεσα τη φωσφορυλίωση αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα του ενδοθηλίου (Dejana et al., 2008) (Εικ. 8).



**Εικόνα 8:** Φωσφορυλίωση της VE-cadherin. Παρουσιάζονται τα κατάλοιπα τυροσίνης (Y) και σερίνης (S) που φωσφορυλιώνονται. Η αλληλεπίδραση της VE-cadherin με κάποιες πρωτεΐνες ρυθμίζεται είτε θετικά (CSK,β-αρεστίνη-2) είτε αρνητικά (p120, β-κατενίνη) με φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα αμινοξέα. Κάποιες οδοί που οδηγούν σε φωσφορυλίωση αναφέρονται στην εικόνα. (Βιβλιογραφικές αναφορές : 1)(Potter et al., 2005), 2)(Gavard and Gutkind, 2006) 3)(Baumeister et al., 2005), 4)(Galaup and Germain, 2008), 5)(Wallez et al., 2006), 6)(Martinelli et al., 2009), 7)(Allingham et al., 2007), (Dejana et al., 2008).

Οι κατενίνες β-κατενίνη, p120 και πλακογλοβίνη μπορούν επίσης να φωσφορυλιωθούν σε κατάλοιπο τυροσίνης από τους ίδιους παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για τη φωσφορυλίωση της VE-cadherin [(Lampugnani and Dejana, 2007), (Esser et al., 1998)]. Ωστόσο οι συνέπειες της φωσφορυλίωσης των κατενινών όσον αφορά στον ενδοθηλιακό φραγμό είναι ακόμη άγνωστες. Σε αρκετά συστήματα, η φωσφορυλίωση της β-κατενίνης μειώνει τη συγγένεια σύνδεσης στο κυτταροπλασματικό ακραίο τμήμα της καδερίνης και αυξάνει το ρυθμό ανακύκλωσης της στα σημεία των συνδέσμων [(Huber et al., 2001), (Lilien and Balsamo, 2005)].

Η ενδοκύττωση της VE-cadherin είναι άλλος ένας μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζεται η διαπερατότητα του ενδοθηλίου. Η VE-cadherin ενδοκυττώνεται μέσω κυστιδίων κλαθρίνης (Xiao et al., 2005). Η σύνδεση της p120 με τη VE-cadherin αποτρέπει την ενδοκύττωση της, γεγονός που δείχνει ότι η p120 συγκρατεί την VE-cadherin στην πλασματική μεμβράνη. Ωστόσο οποιαδήποτε συνθήκη μειώνει τη συγγένεια σύνδεσης της VE-cadherin για την p120, όπως η φωσφορυλίωση, αυξάνει το ρυθμό ενδοκύττωσης της. Προσφάτως βρέθηκε ότι ο VEGF αυξάνει τη

διαπερατότητα ενεργοποιώντας την κινάση Src η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει τον παράγοντα Vav που είναι GEF (παράγων ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GDP προς GTP) της GTPάσης Rac (Gavard and Gutkind, 2006). Η ενεργοποιημένη Rac επάγει τη φωσφορυλίωση της VE-cadherin στη σερίνη 665, στρατολογεί τη β-αρεστίνη και ακολουθεί η ενδοκύττωση της VE-cadherin μέσω κυστιδίων κλαθρίνης.

Άλλο μονοπάτι μέσω του οποίου πραγματοποιείται αύξηση της διαπερατότητας είναι μέσω πρωτεολυτικής πέψης του μορίου της VE-cadherin. Η VE-cadherin είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην ενζυμική πρωτεόλυση. Τα λευκοκύτταρα και τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν μεγάλες ποσότητες πρωτεολυτικών ενζύμων, προάγοντας την αποκοπή της VE-cadherin και αυξάνοντας έτσι την εξαγγείωση [(Xiao et al., 2003), (Schulz et al., 2008)].

#### **1.3.4 Η δράση της θρομβίνης στο ενδοθήλιο**

Η θρομβίνη είναι μια πολυλειτουργική πρωτεάση (Coughlin, 2000). Οι προθρομβωτικές τις δράσεις περιλαμβάνουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, τη δημιουργία του ινώδους και την ενεργοποίηση παραγόντων της πήξης όπως οι παράγοντες V, VIII και XIII. Επίσης μεταβάλλει το σχήμα των αιμοπεταλίων και προκαλεί την απελευθέρωση σεροτονίνης και της θρομβοξάνης A<sub>2</sub> καθώς επίσης κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Ενεργοποιεί την P-σελεκτίνη, ένα μόριο προσκόλλησης και την ιντεγκρίνη αIIb/β<sub>3</sub> [(Stenberg et al., 1985), (Henn et al., 1998)]. Η ιντεγκρίνη αυτή συνδέεται με το ινωδογόνο και τον παράγοντα von Willebrand (vWF) με στόχο τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Colman et al. 1994). Σε ενδοθηλιακά κύτταρα της καλλιέργειας, η θρομβίνη προκαλεί την απελευθέρωση του vWF, την επαγωγή της έκφρασης και μεταφορά της P-σελεκτίνης στην πλασματική μεμβράνη και την παραγωγή χυμοκινών, γεγονότα που προκαλούν την πρόσδεση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια του ενδοθηλίου in vivo [(Hattori et al., 1989), (Frenette and Wagner, 1996)].

Ως απόκριση στη θρομβίνη τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταβάλλουν το σχήμα τους και το ενδοθήλιο παρουσιάζει αυξημένη διαπερατότητα. Οι υποδοχείς που ενεργοποιούνται μέσω της θρομβίνης ανήκουν στην οικογένεια υποδοχέων PAR (Proteinase Activated Receptors) που διασυνδέονται με G πρωτεΐνες. Ο υποδοχέας PAR-1 ενεργοποιείται όταν η θρομβίνη αποκόπτει το αμινοτελικό του άκρο σε συγκεκριμένο σημείο του υποδοχέα (Coughlin, 2000). Αυτή η αντίδραση διάσπασης

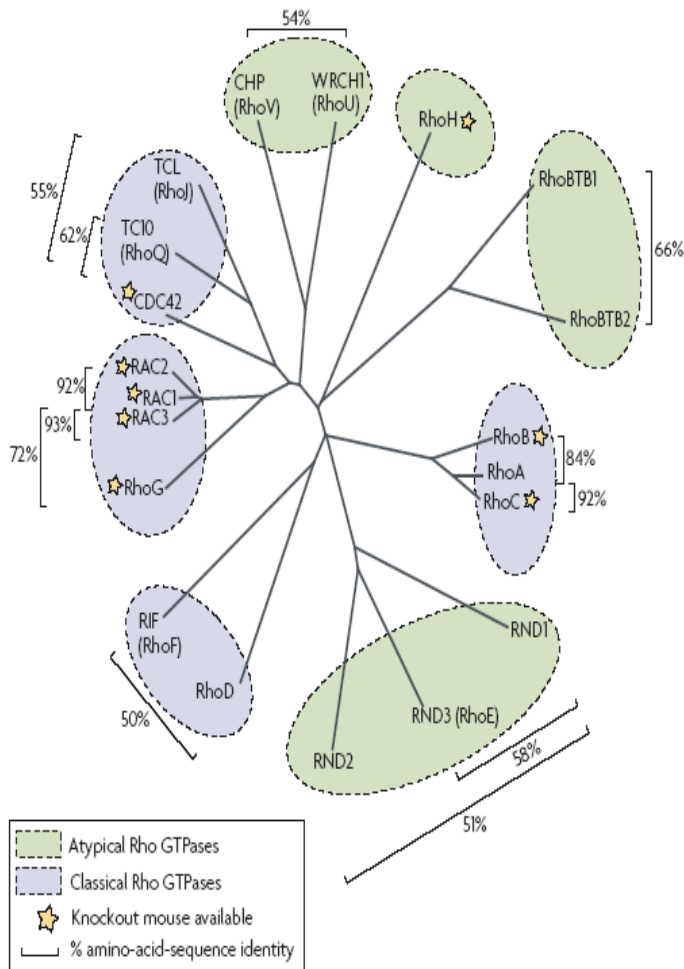
αποκαλύπτει ένα νέο αμινοτελικό άκρο, το οποίο στη συνέχεια συνδέεται ενδομοριακά στο σώμα του υποδοχέα. Κατόπιν ο υποδοχέας PAR-1 ενδοκυττώνεται έπειτα από φωσφορυλίωση και δεν ανακυκλώνεται, αντίθετα οδηγείται για αποδόμηση στα λυσοσώματα. Κάποια μόρια υποδοχέων της οικογένειας PAR αποφεύγουν αυτή τη διαδικασία και επιστρέφουν στην επιφάνεια του κυττάρου σε ανενεργή κατάσταση.

Τα ανθρώπινα αιμοπετάλια εκφράζουν του υποδοχείς PAR-1 και PAR-4 και η ενεργοποίηση οποιουδήποτε από τους δύο είναι αρκετή για να προκαλέσει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη συσσώρευση τους [(Xu et al., 1998), (Kahn et al., 1999)]. Μελέτες δείχνουν ότι ο υποδοχέας PAR-1 είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε χαμηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης, και απουσία του υποδοχέα αυτού, ο υποδοχέας PAR-4 μπορεί να αναλάβει το ρόλο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων αλλά μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις θρομβίνης. Δεδομένου ότι ο PAR-1 λειτουργεί στα ανθρώπινα αιμοπετάλια, ο υποδοχέας PAR-4 παρέχει ένα εναλλακτικό σύστημα υποστήριξης (Kahn et al., 1999).

#### **1.4 Ρύθμιση των συνδέσμων προσκόλλησης μέσω πρωτεϊνών Rho**

Περίπου το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες οι οποίες είτε ρυθμίζουν είτε ρυθμίζονται αλληλεπιδρώντας άμεσα με μέλη των μικρών GTPασων της οικογένειας Rho. Πρόκειται για πολύ συντηρημένα μόρια που ελέγχουν μερικές από τις θεμελιώδεις διαδικασίες της κυτταρικής βιολογίας των ευκαρυωτικών οργανισμών, όπως η μορφογένεση, η κυτταρική πολικότητα, η μετανάστευση και η διαίρεση μέσω πολύπλοκων βιοχημικών δικτύων.

Η οικογένεια των Rho GTPασων στα θηλαστικά αποτελείται από 8 μέλη: τις πρωτεΐνες Rho (ισομορφές A, B και C), Rac (ισομορφές 1, 2, 3), τη Cdc42 (ισομορφές G25K και Cdc42Hs), RhoD, RhoG, TC10, Rnd (Rnd1, RhoE/Rnd3, Rnd6) και TTF (Aspenstrom, 1999) (Εικ. 9). Σύγκριση των αλληλουχιών των αμινοξέων των Rho πρωτεϊνών από διαφορετικά είδη αποκάλυψε ότι έχουν συντηρημένη πρωτοταγή δομή και παρουσιάζουν 50-55% ομολογία μεταξύ τους (Heasman and Ridley, 2008).



**Εικόνα 9:** Η οικογένεια των RhoGTPασων. Φυλογενετικό δέντρο που βασίζεται στη σύγκριση των αλληλουχιών 20 GTPασων με τον αλγόριθμο ClustalW. Το δέντρο δείχνει τη σχέση μεταξύ διαφορετικών μελών της οικογένειας. Οι RhoGTPασες υπάγονται σε οχτώ υποοικογένειες: η υποοικογένεια 1 περιλαμβάνει τις Rac1, Rac2, Rac3 και RhoG, η υποοικογένεια 2 περιλαμβάνει τις Cdc42, TC10 και τη RhoJ, η υποοικογένεια 3 περιλαμβάνει τις CHP και WRCH1, η υποοικογένεια 4 τη RhoH, η υποοικογένεια 5 τις RhoBTB1 και RhoBTB2, η υποοικογένεια 6 τις RhoA, RhoB και RhoC, η υποοικογένεια 7 τις Rnd1, Rnd2 και Rnd3 ενώ η υποοικογένεια 8 τις RhoD και RhoF.

Οι Rho GTPασες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες, που μεταπίπτουν μεταξύ μιας ανενεργού κατάστασης κατά την οποία συνδέονται με GDP και μιας ενεργού κατάστασης κατά την οποία συνδέονται με GTP. Στην ενεργό μορφή τους μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μόρια-στόχους με αποτέλεσμα κάποια απόκριση (Εικ. 10). Αυτή η μετάβαση από την ενεργό στην ανενεργό κατάσταση ελέγχεται από:

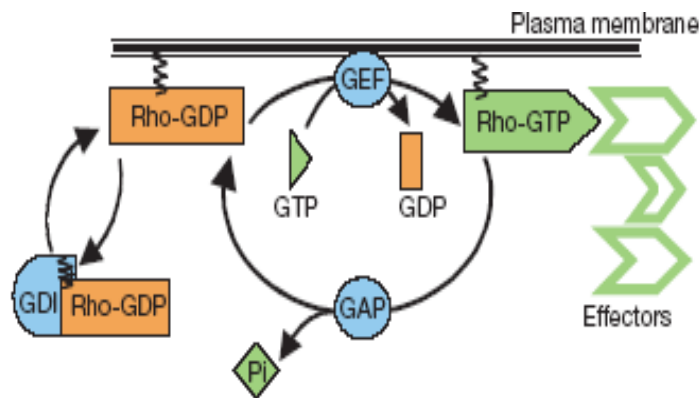
**α) Παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης GEFs** (Guanine nucleotide Exchange Factors) οι οποίοι προάγουν την αντικατάσταση του GDP με GTP. Έχουν περιγραφεί περίπου 70 GEFs στον άνθρωπο, οι περισσότεροι από τους οποίους έχουν μια DH (Dbl homology domain) περιοχή και δίπλα από αυτή βρίσκεται η περιοχή PH (Pleckstrin Homology domain) (Heasman and Ridley, 2008). Πολλοί GEFs μπορούν να ενεργοποιήσουν διαφορετικές RhoGTPασες, για παράδειγμα ο Tiam1 ενεργοποιεί τις Rac1, Rac2 και Rac3 ενώ ο Vav1 ενεργοποιεί τις RhoA, Rac1, RhoG και Cdc42.

**β) Πρωτεΐνες με ενεργότητα GTPασης, GAPs** (GTPase Activating Proteins) οι οποίες αυξάνουν την ενδογενή δραστηριότητα GTPασης των πρωτεϊνών αυτών. Έτσι οι RhoGTPασες απενεργοποιούνται, επιστρέφουν στην ανενεργό κατάσταση και

τερματίζεται η μεταγωγή σήματος (Bernards, 2003). Υπάρχουν περίπου 80 GAPs στα θηλαστικά, κάποιες από τις οποίες παρουσιάζουν εκλεκτική ενεργότητα για μια GTPαση ενώ άλλες δρουν σε περισσότερες της μιας.

γ) **Τους αναστολείς διαχωρισμού των νουκλεοτιδίων γουανίνης GDIs** (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) οι οποίοι φαίνεται να εμποδίζουν την αυθόρμητη ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών (Olofsson, 1999). Προσδένονται σε GTPασες, τις απομονώνουν από τις πρωτεΐνες-τελεστές και από ρυθμιστικά μόρια και τις συγκρατούν στο κυτταρόπλασμα. Οι RhoGTPασες εμπλέκονται:

- στη ρύθμιση της οργάνωσης του κυτταροσκελετού,
- στους διακυτταρικούς συνδέσμους,
- στην κυτταρική πολικότητα,
- στην ενδοκύττωση,
- στη μεταφορά μέσω κυστιδίων,
- στη διαφοροποίηση,
- στην ογκογένεση και
- στη μεταγραφή γονιδίων.



**Εικόνα 10:** Ο κύκλος των RhoGTPασων. Μεταπίπτουν μεταξύ μιας ενεργού και μιας ανενεργού κατάστασης. Στην ενεργό κατάσταση αλληλεπιδρούν με μια από περίπου 60 πρωτεΐνες-τελεστές. Στα θηλαστικά ο κύκλος αυτός ρυθμίζεται από 60 παράγοντες ανταλλαγής νουκλεοτιδίων GEFs, από περισσότερες από 70 πρωτεΐνες της ενδογενούς δραστηριότητας GTPασης GAPs οι οποίες διεγείρουν την υδρόλυση και οδηγούν σε απενεργοποίηση και από 4 παράγοντες αναστολής της αντικατάστασης των νουκλεοτιδίων GDIs (Hall, 2005).

Οι καλύτερα μελετημένες πρωτεΐνες της οικογένειας είναι οι Rho, Rac και Cdc42 των οποίων η λειτουργία σχετίζεται κυρίως με την αναδιοργάνωση του

κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η μελέτη των RhoGTPασων διευκολύνεται από τη διαθεσιμότητα βακτηριακών τοξινών και ενζύμων τα οποία τροποποιούν ειδικά τα μέλη αυτής της οικογένειας (Machesky and Hall, 1996). Η πιο γνωστή είναι η C3 τρανσφεράση, ένα ένζυμο που παράγεται από *Clostridium botulinum* και η οποία απενεργοποιεί την Rho. Επίσης επιδρά και στις Rac και Cdc42 αλλά με μικρότερη αποτελεσματικότητα (Ridley et al., 1992). Επίσης πολύτιμα εργαλεία για τη μελέτη τους αποτελούν ιδιοστατικά ενεργά και επικρατώς αρνητικά μεταλλάγματα αυτών των πρωτεϊνών. Η πλειοψηφία των ιδιοστατικά ενεργών μεταλλαγμάτων δε μπορεί να υδρολύσει το προσδεδεμένο GTP και γι' αυτό στέλνουν σήμα συνεχώς στις πρωτεΐνες-τελεστές (Bourne et al., 1991). Τα επικρατώς αρνητικά μεταλλάγματα των πρωτεϊνών Rho προκύπτουν με μετάλλαξη του αμινοξέος 17 από σερίνη / θρεονίνη σε ασπαραγίνη. Αυτές οι μορφές 'κλειδώνουν' κατά κάποιο τρόπο στην ανενεργό μορφή, συνδέονται πιο ισχυρά με τους παράγοντες GDIs και δεν συνδέονται με πρωτεΐνες-τελεστές (Farnsworth and Feig, 1991).

#### 1.4.1 Πρωτεΐνες Rho και Rac

Η μικροέγχυση ή η έκφραση ιδιοστατικά ενεργών μεταλλαγμάτων της Rho σε κυτταρικές σειρές επάγει το σχηματισμό ινιδίων πίεσης (stress fibers). Τα ινίδια πίεσης αποτελούνται από δέσμες ινιδίων ακτίνης που εκτείνονται σε ευθείες γραμμές στο κυτταρόπλασμα και καταλήγουν σε περιοχές της πλασματικής μεμβράνης όπου το κύτταρο έρχεται σε επαφή με κάποιο εξωτερικό υπόστρωμα. Τα ινίδια πίεσης συνδέονται με ινίδια μυοσίνης II και σχηματίζουν την κύρια κυτταροπλασματική μηχανή σύσπασης (Tapon and Hall, 1997).

Οι πρωτεΐνες Rho αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες-τελεστές με αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η διαμεσολαβούμενη από τις Rho συστολή επιτυγχάνεται μέσω της Rho κινάσης (γνωστή και ως ROCK), μιας κινάσης σερίνης-θρεονίνης η οποία επάγει τη φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης II είτε αναστέλλει τη δραστηριότητα της φωσφατάσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης II [(Amano et al., 1996), (Kureishi et al., 1997)]. Η φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης II προάγει το σχηματισμό ινιδίων μυοσίνης II. Η αλληλεπίδραση αυτών με τα ινίδια ακτίνης είναι πιθανό να οδηγεί στη συγκέντρωση ινιδίων ακτομυοσίνης στα συσταλά ινίδια πίεσης [(Ridley, 1996), (BurrIDGE and Chrzanowska-Wodnicka, 1996)]. Άλλη πρωτεΐνη-στόχος των Rho που εμπλέκεται στον πολυμερισμό της

ακτίνης είναι η p140mDia η οποία συνδέεται στην προφιλίνη και επάγει τη δημιουργία ινιδίων ακτίνης όταν υπερεκφράζεται σε κύτταρα cos (Watanabe et al., 1997).

Οι πρωτεΐνες Rac επάγουν το σχηματισμό ελασματοποδίων και μεμβρανικών πτυχώσεων (Taron and Hall, 1997). Τα ελασματοπόδια είναι προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης, αποτελούνται από πλέγματα ινιδίων ακτίνης και εκτείνονται στο υπόστρωμα προκειμένου να σχηματίσουν νέους εστιακούς σύνδεσμούς (Mitchison and Cramer, 1996).

Έχουν αναγνωριστεί κάποιες πρωτεΐνες-στόχοι για τη Rac οι οποίες παίζουν ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Μερικές από αυτές είναι κάποιες κινάσες σερίνης-θρεονίνης, μέλη της οικογένειας PAK [(Manser et al., 1997), (Sells and Chernoff, 1997)]. Άλλοι πιθανοί στόχοι είναι η Rho κινάση ROCK η οποία έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με τη Rac in vitro (Lamarche et al., 1996). Επίσης μπορεί να αλληλεπιδρά με την PI(4) 5-κινάση η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του PIP2. Στα αιμοπετάλια έχει δειχθεί ότι η Rac διεγείρει το σχηματισμό PIP2 (Hartwig et al., 1995).

#### **1.4.2 Πρωτεΐνη Cdc42**

Η Cdc42 επάγει το σχηματισμό φιλοποδίων σε διάφορους κυτταρικούς τύπους θηλαστικών, ανάμεσα στους οποίους βρίσκονται τα μακροφάγα και οι ινοβλάστες [(Taron and Hall, 1997), (Allen et al., 1997)]. Τα φιλοπόδια είναι λεπτές προεκβολές της πλασματικής μεμβράνης που αποτελούνται από δέσμες ινιδίων ακτίνης που εκτείνονται από την οδηγούσα παρυφή του μετακινούμενου κυττάρου το οποίο με αυτό τον τρόπο δημιουργεί νέους συνδέσμούς με το υπόστρωμα (Lauffenburger, 1996).

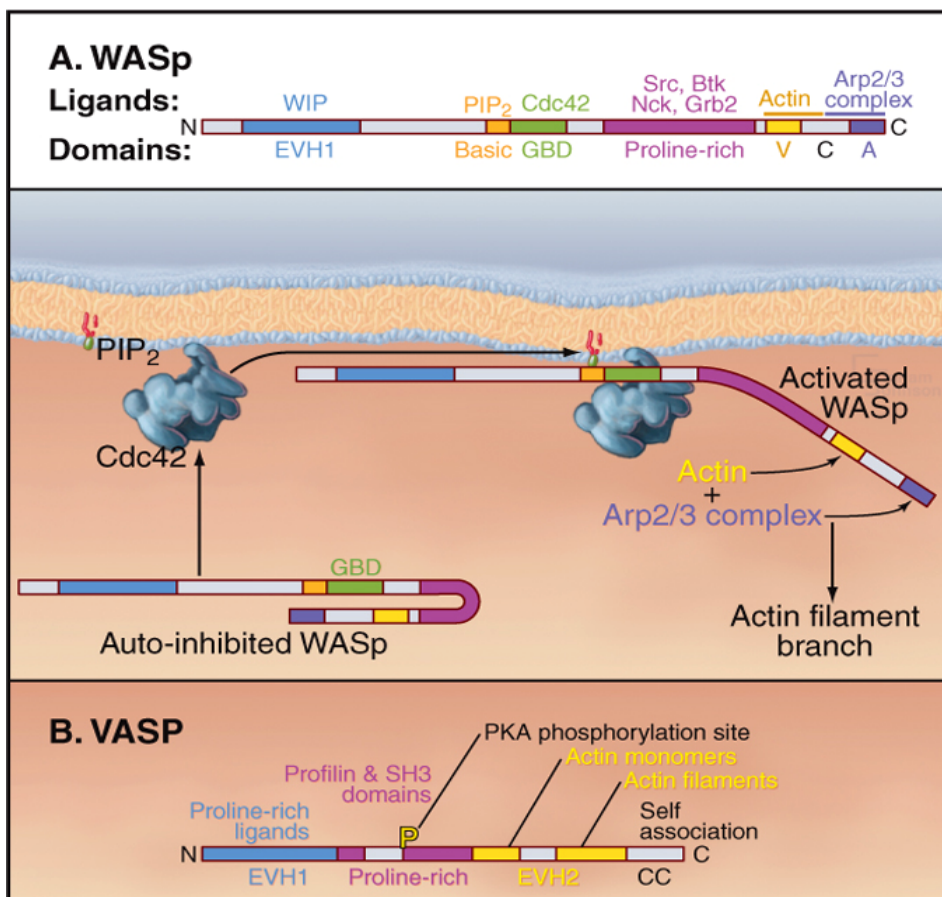
Έχουν αναγνωριστεί μια σειρά πρωτεϊνών-τελεστών για τη Cdc42 μεταξύ των οποίων βρίσκονται οι πρωτεΐνες της οικογένειας PAK. Άλλη πρωτεΐνη-τελεστής της Cdc42 είναι η πρωτεΐνη WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) (Symons et al., 1996). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας WASP συμμετέχουν στη διαδικασία πυρήνωσης και επιμήκυνσης των ινιδίων ακτίνης που επιτυγχάνεται μέσω του συμπλόκου Arp2/3. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής διαιρούνται σε δύο υπο-ομάδες: τις πρωτεΐνες WASPs (WASP, N-WASP) και τις πρωτεΐνες WAVEs (WAVE 1-3). Η πρωτεΐνη WASP αποτελείται από 502 αμινοξέα και εκφράζεται αποκλειστικά στα



αιμοποιητικά κύτταρα. Τα άλλα κύτταρα εκφράζουν την ευρέως διαδεδομένη N-WASP και τις WAVES [(Pollard and Borisy, 2003), (Millard et al., 2004)].

Όλες οι πρωτεΐνες WASP και WAVE έχουν παρόμοια δομική οργάνωση με μια εξελικτικά συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή. Η καρβοξυτελική περιοχή είναι υπεύθυνη για την έναρξη της επιμήκυνσης των νέων ινιδίων ακτίνης φέρνοντας σε επαφή τα μονομερή ακτίνης και το σύμπλοκο Arp2/3. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του τμήματος VCA της WASP που αποτελείται από : α) μια περιοχή V (verprolin rich domain), η οποία συνδέεται με μονομερή ακτίνης, β) μια καρβοξυτελική όξινη περιοχή A, η οποία ενώνεται με το σύμπλοκο Arp2/3, και γ) μια ενδιάμεση, εξελικτικά συντηρημένη, περιοχή C (cofilin homology domain). Οι περιοχές V και A συνδέονται με τα μονομερή της ακτίνης και το σύμπλοκο Arp2/3 αντίστοιχα. Η περιοχή C δρα συνεργιστικά με τις περιοχές V και A, προκαλώντας δομικές αλλαγές στο σύμπλοκο Arp2/3 οι οποίες είναι απαραίτητες για την έναρξη πυρήνωσης της ακτίνης (Panchal et al. 2003). Άλλο κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ των μελών της οικογένειας WASP είναι η παρουσία ανοδικά του τμήματος VCA μιας βασικής περιοχής η οποία ακολουθείται από την περιοχή που είναι πλούσια σε προλίνη. Οι WASP και οι N-WASP διαθέτουν επίσης μια κεντρική περιοχή για τη σύνδεση με GTPασες (GBD) και μια NH<sub>2</sub>-τελική περιοχή WASP Homology domain (WH1).

Οι πρωτεΐνες WASP και N-WASP υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα ως αυτό-αναστελλόμενα μονομερή μόρια (κλειστή διαμόρφωση) (Prehoda et al., 2000). Όταν η πρωτεΐνη WASP έχει κλειστή διαμόρφωση αυτο-αναστέλλεται μέσω ενδομοριακής αλληλεπίδρασης μεταξύ των τμημάτων VCA και GBD αποτρέποντας τη σύνδεση και την ενεργοποίηση του συμπλέγματος Arp2/3. Με την πρόσδεση της ενεργοποιημένης Cdc42 και της 4,5-διφοσφορικής ινοσιτόλης PIP<sub>2</sub> στη GBD και τη βασική περιοχή αντίστοιχα αίρεται η αναστολή (ανοιχτή διαμόρφωση) και επιτυγχάνεται η σύνδεση της WASP με το σύμπλοκο Arp2/3 (Εικόνα 11).



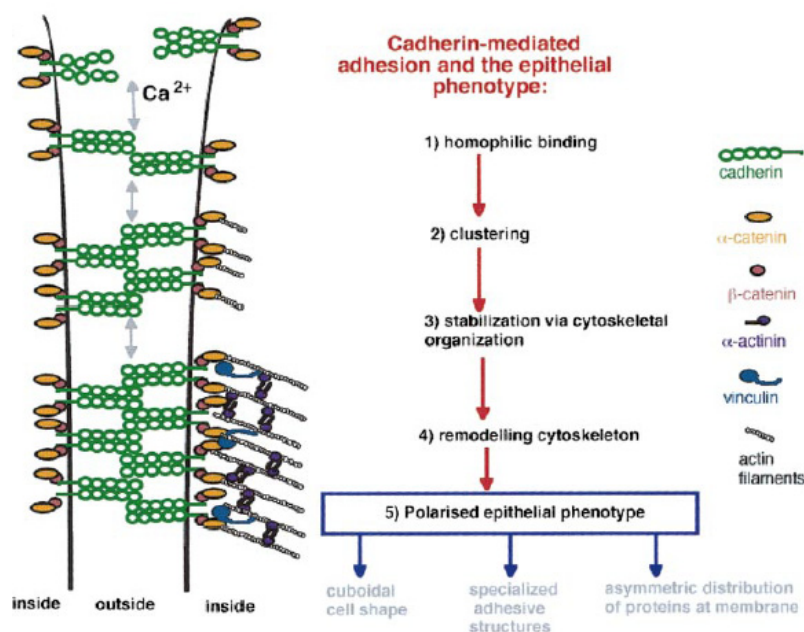
**Εικόνα 11:** Σε κανονικές συνθήκες η WASP βρίσκεται σε ανενεργή κατάσταση στο κυτταρόπλασμα μέσω αλληλεπίδρασης της περιοχής GBD και C του τμήματος VCA. Ως απόκριση σε εξωκυττάριο ερέθισμα η αυτο-αναστολή της N-WASP τερματίζεται με την πρόσδεση της ενεργοποιημένης Cdc42 και του PIP<sub>2</sub>. Η δημιουργία αυτού του συμπλέγματος επάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης (Prehoda et al., 2000).

### 1.4.3 Η επίδραση των Rho GTPασων στη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης

Η δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης περιλαμβάνει μια σειρά βημάτων αυξανόμενης πολυπλοκότητας που συμβάλλουν στην ανάπτυξη της επιθηλιακής μορφολογίας. Μετά την προσθήκη ιόντων Ca<sup>2+</sup> οι υποδοχείς γίνονται ικανοί για πρόσδεση σε όμοια διμερή σε γειτονικά κύτταρα (ομοφιλική σύνδεση, βήμα 1). Μετά την αρχική αλληλεπίδραση τα μόρια συγκεντρώνονται στα σημεία των διακυτταρικών επαφών (βήμα 2) και συγκρατούνται λόγω της αλληλεπίδρασης με τον κυτταροσκελετό (βήμα 3). Η ομαδοποίηση περισσότερων διμερών (clustering) και η αλληλεπίδραση τους με τον κυτταροσκελετό είναι σημαντικές για την ενίσχυση της

συγκολλητικής τους ισχύος δεδομένου ότι οι δυνάμεις της ομοφιλικής σύνδεσης είναι σχετικά χαλαρές (Braga, 2000).

Στη συνέχεια υπάρχει αυξανόμενη δέσμευση των υποδοχέων προσκόλλησης με την ακτίνη μέσω των κατενινών και την στρατολόγηση νέων ινιδίων ακτίνης στα σημεία της επαφής. Ενώ πραγματοποιείται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης λαμβάνουν χώρα η αλλαγή του κυτταρικού σχήματος, η δημιουργία νέων διακυτταρικών συνδέσμων όπως και δημιουργία διακριτών περιοχών στη μεμβράνη που έχουν ως αποτέλεσμα να προκύπτει ο επιθηλιακός φαινότυπος (Εικ. 12). Αυτές οι διαφορετικές διαδικασίες δε πραγματοποιούνται ταυτόχρονα αλλά μπορούν να αλληλεπικαλύπτονται χρονικά.



**Εικόνα 12:** Μετά την προσθήκη ιόντων  $Ca^{2+}$  τα διμερή καδερίνης αλληλεπιδρούν με αντιπαράλληλο τρόπο με τον ίδιο τύπο μορίου που εντοπίζεται στα γειτονικά κύτταρα (ομοφιλική σύνδεση, βήμα 1). Η δημιουργία συσσωματωμάτων των υποδοχέων επιτυγχάνεται και διατηρείται από τη σύνδεση με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (βήματα 2 και 3). Η σύνδεση των μορίων αυτών με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης είναι σημαντική για την αναδιοργάνωση του κυτταρικού σχήματος (βήματα 4 και 5) (Braga, 2000).

Η δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης μπορεί να ενεργοποιήσει τις Rho, Rac και Cdc42. Μελέτες δείχνουν ότι η ενεργοποίηση των Rac και Cdc42 πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (Braga, 2002).

Πώς όμως η δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης επάγει την ενεργοποίηση των μικρών GTPασων; Πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση

διαφορετικών υποδοχέων καδερίνης υποδεικνύουν ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα των καδερινών είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση πρωτεϊνών της οικογένειας Rho. Ωστόσο δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη η περιοχή του κυτταροπλασματικού τμήματος που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση αυτή [(Noren et al., 2001), (Lampugnani et al., 2002)]. Η λειτουργία των GTPασων ελέγχεται αυστηρά χωρικά και χρονικά από τους παράγοντες GEFs και τις πρωτεΐνες ενεργοποίησης της ενδογενούς δραστηριότητας GTPασης, GAPs. Μετά την ομοφιλική σύνδεση των καδερινών υπάρχουν δύο πιθανότητες: είτε ενεργοποιούνται οι παράγοντες GEFs είτε απενεργοποιούνται οι παράγοντες GAPs. Και οι δύο μηχανισμοί έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργοποιημένης μορφής της αντίστοιχης GTPασης. Εναλλακτικά, και τα δύο ενδεχόμενα μπορούν να συμβαίνουν κατά τη δημιουργία των διακυτταρικών επαφών. Ωστόσο, τα μέχρι τώρα διαθέσιμα στοιχεία είναι ανεπαρκή για να υποστηρίξουν κάποια από τις δύο πιθανότητες (Braga, 2002).

Η Rho είναι απαραίτητη για τους συνδέσμους προσκόλλησης σε επιθηλιακά κύτταρα [(Braga et al., 1997), (Takaishi et al., 1997), (Jou and Nelson, 1998)]. Αναστολή της ενδογενούς Rho με τη χρήση της βακτηριακής τοξίνης C3-τρανσφεράσης απομακρύνει πολύ γρήγορα τα μόρια καδερίνης από συνδέσμους που μόλις έχουν δημιουργηθεί ή ακόμα και από ώριμους συνδέσμους. Υπάρχουν δύο μοντέλα με τα οποία μπορεί να εξηγηθεί η συμμετοχή της Rho. Το πρώτο προβλέπει ότι η Rho είναι απαραίτητη μόνο για τη δημιουργία πολωμένου κυτταρικού σχήματος και αυτό έμμεσα συμβάλλει στη σταθερότητα των υποδοχέων στους συνδέσμους (Nakano et al., 1999). Το δεύτερο αναγνωρίζει ότι η συσταλτικότητα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του κυτταρικού σχήματος και έτσι ενεργοποιούνται παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης (Braga, 2000)]. Τα πειραματικά δεδομένα ευνοούν το δεύτερο μοντέλο. Έτσι η Rho μπορεί να συμμετέχει στη σταθεροποίηση των καδερινών μέσω της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγει. Η αναδιοργάνωση αυτή οδηγεί στη δημιουργία συσταλτικής δύναμης και την ανάπτυξη επιθηλιακού φαινοτύπου.

Δεν είναι ξεκάθαρο αν τα ελασματοπόδια τα οποία επάγονται από τη Rac παίζουν κάποιο ρόλο κατά τη δημιουργία των διακυτταρικών συνδέσμων. Στην πραγματικότητα υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της παρουσίας των συνδέσμων και την παρουσία ελασματοποδίων στο επιθήλιο (Braga, 2000). Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι η Rac είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση ακτίνης στα σημεία όπου έχουν συγκεντρωθεί τα μόρια καδερίνης (Braga, 1999).

Η Cdc42 εμπλέκεται και αυτή στον πολυμερισμό της ακτίνης και στην μεταφορά εκκριτικών κυστιδίων στο επιθήλιο [(Kroschewski et al., 1999), (Zigmond et al., 1998), (Chen et al., 2000)]. Όλες αυτές οι κυτταρικές λειτουργίες ίσως παίζουν κάποιο ρόλο κατά το σχηματισμό των συνδέσμων προσκόλλησης και στην ανάπτυξη της πολικότητας του επιθηλίου. Εκτός από το ρόλο που παίζει στην ανάπτυξη διακριτών κορυφαίων και βασεοπλευρικών περιοχών στο επιθήλιο φαίνεται επίσης να ρυθμίζει την πολικότητα διαφόρων κυτταρικών διαδικασιών όπως η κυτταρική μετακίνηση [(Nobes and Hall, 1999),(Drubin and Nelson, 1996)].

Σε σύγκριση με τις Rho και Rac τα στοιχεία που υπάρχουν για τη συμμετοχή της Cdc42 στη ρύθμιση της λειτουργίας των καδερινών είναι τα λιγότερα. Πρώτον, η αναστολή της Rac επηρεάζει τη στρατολόγηση της ακτίνης στα συγκεντρωμένα μόρια καδερίνης, αλλά η συμμετοχή της Cdc42 δεν έχει αποδειχθεί ακόμη. Ωστόσο, παρομοίως με ότι έχει παρατηρηθεί για τη Rac, η έκφραση ενεργοποιημένης Cdc42 στα επιθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν πιο πυκνοί διακυτταρικοί σύνδεσμοι (Braga et al., 1997). Δεύτερον, παρόλο που το επικρατές αρνητικό μετάλλαγμα της Cdc42 επηρεάζει την ασύμμετρη κατανομή των πρωτεϊνών στη μεμβράνη, δεν αποτρέπει τον εντοπισμό της E-καδερίνης στους συνδέσμους προσκόλλησης [(Kodama et al., 1999), (Kroschewski et al., 1999)].

## **1.5 Ρόλος των μεμβρανικών λιπιδιακών περιοχών – PIP2**

Πολλές σημαντικές κυτταρικές διεργασίες οφείλουν τη λειτουργία τους στην πλασματική μεμβράνη. Η πλασματική μεμβράνη είναι μια ημιδιαπερατή δομή που περιβάλλει το κύτταρο και το χωρίζει από τα εξωκυττάριο περιβάλλον. Η μεμβρανική διπλοστιβάδα αποτελείται από ένα μίγμα αμφιπαθών λιπιδίων και πρωτεϊνών τα οποία διευθετούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η έκθεση των υδρόφοβων τμημάτων στο νερό. Η ευαίσθητη αυτή δομή έχει πάχος 4 nm και συμμετέχει σε ποικιλία διεργασιών όπως η διαλογή πρωτεϊνών, η μεταγωγή σημάτων, η πρόσληψη ή εξαγωγή ιόντων, η ενδοκύττωση και η εξωκύττωση. Διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως οι αντλίες ιόντων διαπερνούν ολόκληρη τη μεμβράνη και συχνά επεκτείνονται πέραν αυτής. Επίσης περιφερειακές πρωτεΐνες και πρωτεΐνες επιφανείας συχνά προσδένονται αντιστρεπτά στη μεμβράνη και λειτουργούν είτε ως σήματα είτε ως υπομονάδες βοηθητικές για τη λειτουργία άλλων πρωτεϊνών. Για πολλά χρόνια υπήρχε η άποψη ότι η οργάνωση της μεμβράνης είναι ένα τυχαίο μίγμα

πρωτεϊνών και λιπιδίων, το οποίο αναφερόταν ως μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού (Singer and Nicolson, 1972).

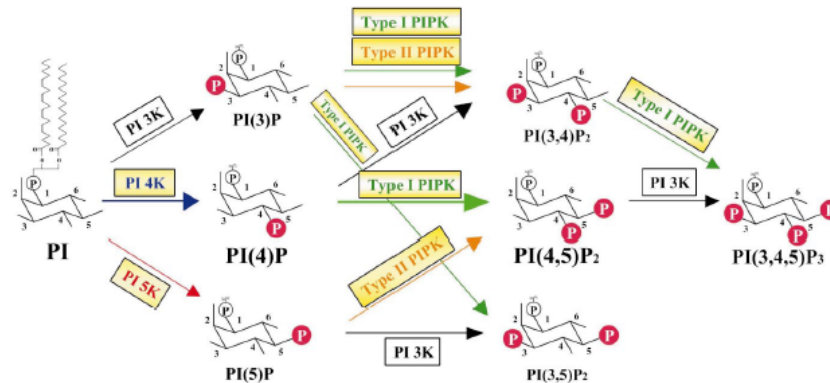
Η πιο κοινή τάξη λιπιδίων είναι αυτή των γλυκεροφωσfolιπιδίων στα οποία ανήκουν η φωσφατιδυχολίνη που εντοπίζεται στις μεμβράνες των ζωϊκών κυττάρων και η φωσφατιδυαιθανολαμίνη η οποία εντοπίζεται στις μεμβράνες των βακτηρίων (van Meer et al., 2008). Τα φωσφορυλιωμένα παράγωγα της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, οι φωσφοϊνοσίτες αποτελούν ιδιαίτερη κατηγορία των γλυκεροφωσfolιπιδίων. Η κεφαλή ινοσιτόλης των φωσφοϊνοσιτών φωσφορυλιώνεται αντιστρεπτά από κινάσες και αποφωσφορυλιώνεται από φωσφατάσες με αποτέλεσμα τη δημιουργία επτά γνωστών ισομερών. Η 4,5-διφωσφορική ινοσιτόλη PI(4,5)P<sub>2</sub> ή αλλιώς PIP<sub>2</sub> είναι γνωστό για το ρόλο που παίζει ως πρόδρομο μόριο για την παραγωγή δευτέρων αγγελιοφόρων μορίων (second messengers) (Toker, 1998).

Οι στερόλες αποτελούν μια άλλη κατηγορία λιπιδίων με μεγάλη σημασία για τη μεμβράνη. Η χοληστερόλη αποτελεί την πιο κοινή στερόλη των ζωϊκών μεμβρανών και αποτελεί το 30% του συνόλου των λιπιδίων του κυττάρου.

### **1.5.1 Μεταβολισμός και κατανομή των φωσφοϊνοσιτιδίων**

Τα φωσφοϊνοσιτιδία εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης. Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη, το πρόδρομο μόριο των φωσφοϊνοσιτιδίων, συντίθεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συνέχεια μεταφέρεται στη μεμβράνη είτε μέσω κυστιδιακής μεταφοράς είτε μέσω κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών μεταφοράς φωσφοϊνοσιτιδίων. Η αντιστρεπτή φωσφορυλίωση του δακτυλίου της ινοσιτόλης στις θέσεις 3, 4 και 5 οδηγεί στη δημιουργία επτά ειδών φωσφοϊνοσιτιδίων. Τα φωσφοϊνοσιτιδία περιλαμβάνουν την 4-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη PI(4)P, την 3-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη PI(3)P, την 5-φωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη PI(5)P, την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη PI(4,5)P<sub>2</sub>, την 3,4-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη PI(3,4)P<sub>2</sub>, την 3,5-διφωσφορική ινοσιτόλη PI(3,5)P<sub>2</sub> και τη 3,4,5-τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Rameh and Cantley, 1999). Η PI(4)P και το PI(4,5)P<sub>2</sub> αποτελούν τα κύρια φωσφοϊνοσιτιδία στο κύτταρο, παρόλο που αποτελούν το 0,5% του συνόλου των λιπιδίων της μεμβράνης των ευκαρυωτικών κυττάρων. Καθένα από αυτά τα επτά φωσφοϊνοσιτιδία έχει μοναδική κυτταρική εντόπιση αλλά κυρίως εντοπίζονται σε μεμβράνες.

Το  $PI(4,5)P_2$  παράγεται από την φωσφορυλίωση είτε της 4-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης  $PI(4)P$  (από τις κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης τύπου I) είτε της 5-φωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης  $PI(5)P$  (από τις κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης τύπου II) [(Rameh and Cantley, 1999), (Roth, 2004)]. Υπάρχει μια πολύ μικρή ποσότητα  $PI(5)P$  στα κύτταρα και το περισσότερο  $PI(4,5)P_2$  της μεμβράνης προκύπτει από την  $PI(4)P$  (Odorizzi et al., 2000).



**Εικόνα 13:** Όλοι τα φωσφοϊνοσιτίδια συντίθενται από φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη με τη δράση κινασών. Η φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη μετατρέπεται σε  $PI(4)P$  από τις 4-κινάσες της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης  $PI$  4-κινάσες, και στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $PI(4,5)P_2$  από την  $PI(4)P$  5-κινάση. Η  $PI(4)P$  5-κινάση είναι μια τύπου I κινάση PIP και περιλαμβάνει τρεις υποκατηγορίες ενζύμων  $I\alpha$ ,  $I\beta$  και  $I\gamma$  (Di Paolo and De Camilli, 2006).

Επίσης το  $PI(4,5)P_2$  μετατρέπεται σε  $PI(3,4,5)P_3$  από την τάξη I των 3-κινασών της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης. Αυτό το λιπίδιο βρίσκεται σε αμελητέα ποσότητα σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά μπορεί προσωρινά να αυξηθεί σημαντικά ως απόκριση στη διέγερση από αυξητικούς παράγοντες. Ο ρυθμιστικός του ρόλος είναι ιδιαίτερης σημασίας στους ανώτερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, καθώς παίζει ρόλο σε μια ποικιλία διεργασιών όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η κυτταρική κίνηση, ο χημειοτακτισμός, η φαγοκύτωση, η πινοκύτωση, η διαφοροποίηση και η κυτταρική επιβίωση [(Cantley, 2002), (Czech, 2003), (Katso et al., 2001)]. Κύριος στόχος της  $PI(3,4,5)P_3$  είναι τα GEFs και οι GAPs των μικρών GTPασων που λειτουργούν ως ρυθμιστές του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

### 1.5.2 Λειτουργίες του $PIP_2$

Το  $PIP_2$  που συγκεντρώνεται στην πλασματική μεμβράνη συμμετέχει σχεδόν σε όλα τα γεγονότα που συμβαίνουν στην επιφάνεια του κυττάρου. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή εξωκυττάρων σημάτων είτε μέσω των μεταβολιτών του είτε

μέσω μειορύθμισης των επιπέδων του. Συνοπτικά, το PIP2 ενεργοποιεί το de novo πολυμερισμό της ακτίνης, ενεργοποιεί πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας WASP και συμμετέχει στην ενδοκύττωση.

Το PIP2 ενεργοποιεί το de novo πολυμερισμό της ακτίνης ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα. Τα φιλοπόδια και τα ελασματοπόδια προκύπτουν από τον πολυμερισμό της ακτίνης όταν τα κύτταρα κινούνται ως απόκριση σε εξωκυττάρια σήματα. Το PIP2 συνδέεται με τις πρωτεΐνες καλύμματος της ακτίνης (capping proteins) όπως η CapZ και η τζελολίνη, απομακρύνοντάς τες από τα αγκαθωτά άκρα των ινιδίων ακτίνης (Cooper and Schafer, 2000). Επίσης, είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση της G-ακτίνης από τις πρωτεΐνες που συνδέονται με τα μονομερή της ακτίνης, με αποτέλεσμα να ενισχύεται η εμπυρήνωση και συνεπώς και ο πολυμερισμός της ακτίνης.

Το PIP2 ενεργοποιεί πρωτεΐνες-μέλη της οικογένειας WASP, οδηγώντας σε επαγόμενη από το Atp2/3 σύμπλεγμα εμπυρήνωση της ακτίνης. Όπως προαναφέρθηκε η πρωτεΐνη N-WASP ενεργοποιεί το σύμπλοκο Atp2/3 μέσω των περιοχών VCA, με αποτέλεσμα τον de novo πολυμερισμό της ακτίνης ως απόκριση σε εξωκυττάρια ερέθισμα. Η περιοχή WH1 συνδέεται με το PIP2 και η σύνδεση αυτή είναι μάλλον υπεύθυνη για την παραμονή της N-WASP στη μεμβράνη του κυττάρου [(Miki et al., 1996), (Imai et al., 1999)]. Μετά τη σύνδεση με το PIP2 η αλληλεπίδραση μεταξύ αμινοτελικού και καρβοξυτελικού τμήματος της N-WASP γίνεται πιο αδύναμη, οδηγώντας στην έκθεση της περιοχής VCA όπου και συνδέεται το Atp2/3 σύμπλοκο [(Rohatgi et al., 1999), (Rohatgi et al., 2000), (Higgs and Pollard, 2000)]. Μετά τη σύνδεση με το PIP2, εκτίθενται οι περιοχές VCA και σε συνεργασία με τη Cdc42, στη συνέχεια ενεργοποιείται το σύμπλοκο Atp2/3 οδηγώντας σε πολυμερισμό της ακτίνης.

Το PIP2 της πλασματικής μεμβράνης παίζει σημαντικό ρόλο σε όλες τις μορφές ενδοκύττωσης καθώς λειτουργεί ως σημαντικός συν-υποδοχέας για τη στρατολόγηση και τη ρύθμιση των πρωτεϊνών της ενδοκύττωσης επιλεκτικά στην πλασματική μεμβράνη [(Wenk and De Camilli, 2004), (Owen, 2004)]. Το PIP2 συνδέεται με όλες τους γνωστούς προσαρμογείς ενδοκύττωσης της κλαθρίνης (endocytic clathrin adaptors) [(Wenk and De Camilli, 2004), (Iannolo et al., 1997), (Owen, 2004)].



### 1.5.3 Μέθοδοι για τον εντοπισμό των φωσφοϊνοσιτιδίων σε κυτταρικό επίπεδο

Έχουν αναπτυχθεί αρκετά αποτελεσματικά μέσα που επιτρέπουν την απεικόνιση συγκεκριμένων φωσφοϊνοσιτιδίων και βασίζονται στον εντοπισμό τους με τη χρήση αντισωμάτων ή και τμημάτων πρωτεϊνών με υψηλή συγγένεια σύνδεσης με φωσφοϊνοσιτιδία [(Cullen et al., 2001), (Balla and Varnai, 2002), (Hurley and Meyer, 2001), (Misra et al., 2001), (Corvera, 2001)]. Η απομονωμένη περιοχή σύνδεσης με το λιπίδιο διατηρεί τη συγγένεια πρόσδεσης με τα φωσφοϊνοσιτιδία όταν συντήκεται με πεπτίδια-αναφοράς όπως ετικέτες επιτόπων ή φθορίζουσες πρωτεΐνες. Τα τμήματα περιλαμβάνουν τις περιοχές FYVE και συγκεκριμένες PX περιοχές, που παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια σύνδεσης με την PI(3)P [(Cullen et al., 2001), (Balla and Varnai, 2002), (Simonsen and Stenmark, 2001), (Sato et al., 2001)], καθώς και αρκετές PH περιοχές που αναγνωρίζουν επιλεκτικά τις PI(4)P, PI(4,5)P<sub>2</sub>, PI(3,4,5)P<sub>3</sub> και PI(3,4)P<sub>2</sub>. Η χρήση αυτών των περιοχών συνδεδεμένων με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (Green Fluorescent Protein) έχει δώσει τα πρώτα στοιχεία σχετικά με την εντόπιση αυτών των λιπιδίων.

Το 1993 δύο ομάδες χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά τον όρο ομόλογη περιοχή πλεκστρίνης PH (Pleckstrin Homology domain) για την ομόλογη περιοχή μεγέθους 120 αμινοξέων η οποία εντοπίζεται σε έναν αριθμό πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργίες [(Haslam and Coorssen, 1993)]. Η περιοχή αυτή εντοπίστηκε τόσο στο αμινοτελικό όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο της πλεκστρίνης, το κύριο υπόστρωμα της PKC στα αιμοπετάλια.

Ο αριθμός των περιοχών PH που έχουν εντοπιστεί σε διάφορες πρωτεϊνικές αλληλουχίες μέχρι σήμερα ξεπερνά τις 100. Ωστόσο σε λίγες από αυτές έχει αποδοθεί κάποια λειτουργία. Η περιοχή αυτή συνδέεται με υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση με κάποιο φωσφοϊνοσιτιδίο. Για τον εντοπισμό του PIP<sub>2</sub> χρησιμοποιούνται χιμαιρικές πρωτεΐνες της περιοχής PH της φωσφολιπάσης PLCδ1 και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Η περιοχή PH της φωσφολιπάσης PLCδ1 συγκεντρώνεται σε δυναμικές περιοχές της μεμβράνης που είναι πλούσιες σε ακτίνη καθώς και σε μεμβρανικές προεκβολές (ruffles). Υπάρχει ωστόσο κάποια αβεβαιότητα ως προς τη χρήση χιμαιρικών πρωτεϊνών PH με την GFP καθώς δεν είναι σε θέση να εντοπίσουν όλα τα αποθέματα του εκάστοτε φωσφοϊνοσιτιδίου. Η περιοχή PH της φωσφολιπάσης PLCδ1 έχει αναφερθεί ότι εντοπίζει το PIP<sub>2</sub> στην πλασματική μεμβράνη αλλά όχι στο σύστημα Golgi ή στις μεμβράνες του ενδοσώματος (Kavran et al., 1998).

#### 1.5.4 Μικροπεριοχές της μεμβράνης με δομή «λιπιδιακής σχεδίας»

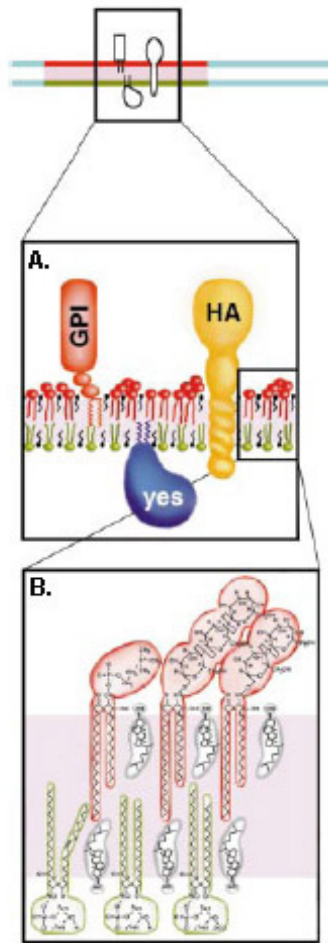
Το μοντέλο του ρευστού μωσαϊκού πρότεινε ομοιογενή κατανομή πρωτεϊνών και λιπιδίων κατά μήκος ενός δισδιάστατου μεμβρανικού χώρου (Singer and Nicolson, 1972). Αυτό έχει αναθεωρηθεί από το μοντέλο λιπιδιακής σχεδίας (lipid raft) σύμφωνα με το οποίο οι μεμβράνες διαμερισματοποιούνται ως αποτέλεσμα της ανομοιόμορφης κατανομής συγκεκριμένων λιπιδίων ή/και πρωτεϊνών σε κάποιες μικροπεριοχές (Brown and Rose, 1992). Οι μεμβρανικές μικροπεριοχές αποτελούν λειτουργικές μονάδες των μεμβρανών που έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες: 1) Πολλοί υποδοχείς και κυτταρικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στις μεμβρανικές μικροπεριοχές, και παρέχουν μια πλατφόρμα που διαμεσολαβεί για την έναρξη και το συντονισμό αρκετών σηματοδοτικών γεγονότων [(Harder and Simons, 1997), (Brown and Rose, 1992), (Charrin et al., 2003)]. 2) Αντίθετα με άλλα πρωτεϊνικά κυτταροπλασματικά συμπλέγματα, σχηματίζονται όχι μόνο στη βάση των διαπρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων αλλά και μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ λιπιδίων όσο και μεταξύ λιπιδίων-πρωτεϊνών. 3) Έχουν μέγεθος γενικά μεγαλύτερο από αυτό άλλων πρωτεϊνικών συμπλεγμάτων, με διάμετρο από nm μέχρι μερικά μm και σε ορισμένους τύπους κυττάρων καταλαμβάνουν πάνω από το 30% του συνόλου της μεμβράνης [(Dietrich et al., 2001), (Jacobson et al., 2007)]. Είναι ιδιαίτερα δυναμικά, καθώς διαρκώς στρατολογούν και απομακρύνουν πρωτεΐνες σύμφωνα με τις απαιτήσεις του κυττάρου [(Bini et al., 2003), (Gupta et al., 2006)].

Οι λιπιδιακές μικροπεριοχές και τα caveolae είναι ίσως οι καλύτερα μελετημένες μεμβρανικές μικροπεριοχές, παρόλο που τα χαρακτηριστικά τους δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστά. Είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια που δημιουργούν μια διατεταγμένη λιπιδιακή φάση (lipid-ordered phase) που διαφέρει από την υπόλοιπη πλασματική μεμβράνη [(Simons and Ikonen, 1997), (Schroeder et al., 1994), (Brown and London, 1998), (Schroeder et al., 1998), (Tamilselvam and Daefler, 2008)]. Οι λιπιδιακές μικροπεριοχές έχει αποδειχθεί ότι είναι μεμβρανικά κέντρα αντιδράσεων απαραίτητα για πολλές κυτταρικές σηματοδοτικές διεργασίες (Harder and Simons, 1997). Λόγω της εντόπισης τους στη μεμβράνη, θεωρούνται τα σημεία εισόδου συγκεκριμένων παθογόνων μικροοργανισμών [(Stuart et al., 2003; Wang and Hajishengallis, 2008)]. Όταν η ακεραιότητα των δομών αυτών διαταράσσεται από φάρμακα που απομακρύνουν τη χοληστερόλη δημιουργώντας χηλικά σύμπλοκα όπως η β-μεθυλοκυκλοδεξτρίνη (methyl-β-cyclodextrin), η

μόλυνση από τους ιούς αναστέλλεται και αυτή η αναστολή αυτή περιορίζεται καθώς το επίπεδο της χοληστερόλης αποκαθίσταται.

Η νέα θεωρία για τις περιοχές αυτές διατυπώθηκε το 2006 σε συμπόσιο στο Keystone (2006 Keystone Symposium of Lipid Rafts and Cell Function) σύμφωνα με την οποία ‘ Οι λιπιδιακές μικροπεριοχές είναι μικρές σε μέγεθος δομές, ετερογενείς, ιδιαίτερα δυναμικές, πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη όπου πραγματοποιείται η διαμερισματοποίηση των κυτταρικών διεργασιών. Οι μικρές λιπιδιακές σχεδίες μερικές φορές σταθεροποιούνται ώστε να σχηματίσουν μεγαλύτερες πλατφόρμες μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και μεταξύ πρωτεϊνών και λιπιδίων’ (Pike, 2006).

Τα caveolae, αντίθετα από τις σχεδίες είναι εγκοιλώσεις της πλασματικής μεμβράνης σε σχήμα φλάσκας. Λόγω της μοναδικής τους μορφολογίας, τα caveolae μπορούν να παρατηρηθούν εύκολα με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου ως μικρές σπηλιές παρατηρώντας την εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης [(Harder and Simons, 1997; Stan, 2005)]. Οι πρωτεΐνες της οικογένειας των caveolin αποτελούν τις δομικές πρωτεΐνες των caveolae, η παρουσία τους είναι σημαντική για τη βιογένεση των caveolae και για τη διατήρηση της σωστής δομής και λειτουργίας αυτών των μικροπεριοχών (Parton, 1996). Ταυτόχρονα, οι καβεολίνες (caveolins) αλληλεπιδρούν με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες και στρατολογούν συγκεκριμένες κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες στα caveolae. Επίσης, εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος [(Parton and Simons, 2007), (Yamamoto et al., 1998), (Nabi and Le, 2003)], στη μεταφορά κυστιδίων μέσω της διαμεσολαβούμενης από τα caveolae ενδοκύττωσης καθώς και σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με καρκίνο στον άνθρωπο [(Drab et al., 2001), (Bouras et al., 2004), (Hayashi et al., 2001), (Lee et al., 2002)].



**Εικόνα 14:** Μοντέλο για την οργάνωση των λιπιδιακών μικροπεριοχών (rafts) στη μεμβράνη

A. Οι λιπιδιακές μικροπεριοχές περιέχουν πρωτεΐνες που προσδένονται στην εξωτερική πλευρά της διπλοστιβάδας μέσω της άγκυρας GPI, πρωτεΐνες που προσδένονται στην κυτταροπλασματική πλευρά μέσω ακυλο-αλυσίδων (όπως η πρωτεΐνη Yes, μέλος της οικογένειας των Src κινασών), ή πρωτεΐνες που συνδέονται μέσω του διαμεμβρανικού τους τμήματος (όπως η αιμαγλουτινίνη HA). B. Η λιπιδιακή διπλοστιβάδα στις μικροπεριοχές αυτές είναι ασύμμετρη καθώς η σφιγγομυελίνη (με κόκκινο χρώμα) και τα σφιγγολιπίδια (με κόκκινο χρώμα) εντοπίζονται στην εξωτερική πλευρά της μεμβράνης ενώ τα γλυκερολιπίδια στην εσωτερική πλευρά. Η χοληστερόλη (με γκρι χρώμα) εντοπίζεται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης (Simons and Ikonen, 1997).

Πρωτεΐνες με μεγάλη συγγένεια για τις λιπιδιακές μικροπεριοχές αποτελούν οι πρωτεΐνες με άγκυρα γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GPI (GlycosylPhosphatidyInositol - anchored) (Chatterjee et al., 2001), οι ακυλιωμένες πρωτεΐνες όπως μέλη της οικογένειας των κινασών σερίνης-θρεονίνης όπως οι Lck, Fyn και Lyn (Simons and Toomre, 2000), οι ετεροτριμερείς G-πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες που συνδέονται με τη χοληστερόλη όπως η καβεολίνη-1 (Kurzchalia and Parton, 1999), πρωτεΐνες που συνδέονται με φωσφολιπίδια όπως η ανεξίνη-2

(Babiychuk et al., 2002), πρωτεΐνες που έχουν υποστεί μυριστοϋλίωση (myristoylation) όπως οι φλοτιλίνες (Rajendran et al., 2003) και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. Δεν είναι ακόμη γνωστό γιατί οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες εντοπίζονται στις μικροπεριοχές αυτές αλλά αναλύσεις μεταλλαξιγένεσης έχουν δείξει ότι αμινοξέα της διαμεμβρανικής περιοχής κοντά στην εξωτερική στιβάδα της μεμβράνης είναι κρίσιμα (Gurta et al., 2006) (Εικ. 14). Η παλμιτοϋλίωση (palmitoylation) επίσης αυξάνει τη συγγένεια μιας πρωτεΐνης για τις λιπιδιακές μικροπεριοχές (Rajendran et al., 2003).

Από μελέτες ανοσοϊστοχημείας εντοπίστηκαν ασυνεχή συσσωματώματα PIP2 τα οποία μοιάζουν με τα συσσωματώματα των λιπιδιακών σχεδίων. Το PIP2 στα συσσωματώματα των λιπιδιακών σχεδίων συνεντοπίζεται με τις πρωτεΐνες GAP43, MARCKS και CAP23 οι οποίες συνδέονται με το PIP2. Ο εντοπισμός του PIP2 σε δομές τύπου λιπιδιακής σχεδίας είναι σύμφωνη και με βιοχημικά δεδομένα για την παρουσία του PIP2 και της 4-κινάσης της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης τύπου II σε μεμβράνες πλούσιες σε χοληστερόλη οι οποίες είναι ανθεκτικές στη διαλυτοποίηση από απορρυπαντικά [(Hope and Pike, 1996), (Gambhir et al., 2004)].

### **1.5.5 Λιπιδιακές μικροπεριοχές και PIP2**

Αρκετές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μεταγωγή σήματος περιλαμβάνουν στην πρωτοταγή τους δομή αρκετά βασικά αμινοξέα (Erland, 2008). Τέτοια συγκέντρωση θετικού φορτίου έχει δείχθει ότι προάγει τη συγκέντρωση των όξινων λιπιδίων σε συγκεκριμένες περιοχές. Ένα τέτοιο όξινο λιπίδιο είναι και το PIP2. Μελέτες με κύτταρα MDCK (Madin-Darby kidney cells), κύτταρα A431 και Neuro 2a έχουν δείξει ότι μεγάλες ποσότητες του PIP2 που σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελεί τη μισή ποσότητα του συνολικού κυτταρικού PIP2, βρίσκεται σε συγκεκριμένες περιοχές της μεμβράνης πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη, τις λιπιδιακές σχεδίες (Hope and Pike, 1996).

Είναι πιθανό ότι κάποια ποσότητα PIP2 εντοπίζεται στις περιοχές των λιπιδιακών μικροπεριοχών γιατί συνδέεται με πρωτεΐνες που εντοπίζονται εκεί. Από παρατηρήσεις της πλευρικής κινητικότητας του PIP2, φαίνεται ότι διαφέρει από κυτταρικό τύπο σε κυτταρικό τύπο. Η κινητικότητα αυτή είναι χαμηλή σε μυοκύτταρα (Cho et al., 2005) αλλά είναι υψηλότερη σε κύτταρα HEK293 ή στους ινοβλάστες (Haugh et al., 2000).

Από δεδομένα που έχουν προκύψει σε συστήματα-μοντέλα έχει προταθεί ότι μερικές πρωτεΐνες μπορούν να στρατολογήσουν το PIP2 σε περιοχές που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη. Αρκετές περιφερειακές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιέχουν συσσωματώματα βασικών αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με όξινα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης. Η εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης περιέχει τόσο μονοσθενή όσο και πολυσθενή όξινα λιπίδια. Αρκετές μεμβρανικές πρωτεΐνες με συσσωματώματα βασικών αμινοξέων μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτά τα αρνητικά φορτισμένα λιπίδια. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι πρωτεΐνες MARCKS, GAP 43 και κάποιες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες όπως ο υποδοχέας EGF. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών MARCKS και GAP 43 βοηθούν στη στόχευση τους στην πλασματική μεμβράνη [(McLaughlin and Aderem, 1995), (Okeley and Gelb, 2004)]. Μελέτες λοιπόν έχουν δείξει ότι πεπτίδια που αντιστοιχούν στα βασικά τμήματα των MARCKS και GAP 43 απομονώνουν πολυσθενή όξινα λιπίδια, όπως το PIP2 μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [(Wang et al., 2002), (Gambhir et al., 2004), (McLaughlin et al., 2005)]. Αυτό συμβαίνει γιατί όταν βασικά πεπτίδια προσδένονται στη μεμβράνη, παράγουν ένα θετικό ηλεκτρικό δυναμικό το οποίο προσελκύει πολυσθενή όξινα λιπίδια .

### **1.5.6 Μέθοδοι για τη μελέτη των λιπιδιακών μικροπεριοχών**

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας μιας πρωτεΐνης σε λιπιδιακές μικροπεριοχές βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν η κυτταροπλασματική μεμβράνη υποστεί επεξεργασία με το μη ιονικό απορρυπαντικό TX-100 στους 4°C ένα τμήμα των συστατικών της διαλυτοποιείται [(Yu et al., 1973), (Edidin, 2003)]. Συγκεκριμένα, κύτταρα ή κυτταρικές μεμβράνες εκτίθενται στο απορρυπαντικό, τοποθετούνται στο κατώτατο σημείο μιας βαθμίδωσης πυκνότητας και υποβάλλονται σε φυγοκέντρηση, ώστε να επιτραπεί στις ανθεκτικές στο απορρυπαντικό μεμβράνες να επιπλεύσουν στην κορυφή της βαθμίδωσης μακριά από το διαλυτοποιημένο υλικό (Brown and Rose, 1992). Υποστηρίζεται ότι οι μεμβράνες που ανθίστανται στη διαλυτοποίηση αντιπροσωπεύουν τις λιπιδιακές μικροπεριοχές. Παρά το ότι η μέθοδος αυτή είναι εύκολη στο χειρισμό παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα. Μια πρωτεΐνη των λιπιδιακών μικροπεριοχών είναι πιθανό να συνδέεται και με τον κυτταροσκελετό, έτσι δεν θα επιπλεύσει μετά τη διαλυτοποίηση με το απορρυπαντικό. Ακόμη η σύνδεση της με τις περιοχές αυτές μπορεί να είναι τόσο

αδύναμη που να καταστραφεί με τη χρήση απορρυπαντικού. Νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι το TX-100 από μόνο του δεν είναι αρκετό αλλά απαιτείται η χρήση και άλλων απορρυπαντικών όπως το Lubrol WX και το Brij 96 για να διαπιστωθεί η σύνδεση μιας πρωτεΐνης με αυτές τις λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης.

Επίσης, οι λιπιδιακές μικροπεριοχές έχουν συσχετιστεί με οδούς μεταγωγής σήματος ή και με άλλες κυτταρικές διεργασίες βασισμένες στα αποτελέσματα της μείωσης της χοληστερόλης των κυττάρων. Η ελάττωση της χοληστερόλης επιτυγχάνεται είτε με τη χρήση αναστολέων της σύνθεσης της είτε με απευθείας εξαγωγή από τις μεμβράνες με τη χρήση κυκλοδεξτρινών ή με τη χρήση αντιβιοτικών όπως η nystatin και η filipin τα οποία συγκεντρώνουν τη μεμβρανική χοληστερόλη. Κύριο πρόβλημα στην συγκεκριμένη πειραματική προσέγγιση είναι ότι η χοληστερόλη έχει και άλλες λειτουργίες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη εκτός από το να συμμετέχει σε λιπιδιακές μικροπεριοχές. Σε αυτήν την περίπτωση, μείωση της χοληστερόλης θα μπορούσε να έχει επιπτώσεις σε αυτές τις λειτουργίες, που δεν σχετίζονται απαραίτητως με τη διαταραχή των λιπιδιακών μικροπεριοχών. Διάφοροι ρόλοι που δε σχετίζονται με λιπιδιακές μικροπεριοχές (rafts) έχουν προταθεί για τη χοληστερόλη συμπεριλαμβανομένης και της αλλαγής των φυσικών ιδιοτήτων των κυτταρικών μεμβρανών όπως η ρευστότητα [(Ohvo-Rekila et al., 2002), (Ramstedt and Slotte, 2002), (Kurzchalia, 2003)].

## 1.6 Σκοπός της παρούσας εργασίας

Οι καδερίνες (cadherins) είναι πρωτεΐνες-υποδοχείς που διαμεσολαβούν στη διακυτταρική προσκόλληση. Η λειτουργία τους όμως επεκτείνεται πέραν αυτού του ρόλου και έχει τεκμηριωθεί η συμμετοχή τους σε σηματοδοτικά και μορφογενετικά μονοπάτια. Αυτό πηγάζει από τις ιδιότητες που έχουν να συνδέονται απευθείας με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, τις κατενίνες. Αυτές με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και την ενεργότητα σηματοδοτικών και μεταγραφικών παραγόντων.

Ο ευρύς στόχος της μελέτης οριοθετείται στην εξερεύνηση νέων σηματοδοτικών λειτουργιών της καδερίνης VE-cadherin που εξυπηρετούν ιστοειδικές ανάγκες ειδικά στο ενδοθήλιο.

Συγκεκριμένος στόχος ήταν η διερεύνηση του λειτουργικού ρόλου του διαμεμβρανικού και κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin στον καθορισμό της τοπολογίας της πρωτεΐνης και στην εμπλοκή της σε σηματοδοτικές οδούς. Για το σκοπό αυτό τέθηκαν τα παρακάτω ειδικά ερωτήματα:

A) Ο εντοπισμός της VE-cadherin είναι τυχαίος ή βρίσκεται σε συγκεκριμένες λιπιδιακές μικροπεριοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του ενδοθηλιακού κυττάρου;

B) Ποια είναι η αλληλεπίδραση των συστημάτων προσκόλλησης και κυτταροσκελετού στο ενδοθήλιο; Η τοπολογία της VE-cadherin καθορίζεται ή καθορίζει τις δυναμικές ιδιότητες του κυτταροσκελετού; Με ποιους σηματοδοτικούς μηχανισμούς επιτυγχάνεται αυτό;

Γ) Μεταβάλλεται ο πιθανός εντοπισμός της VE-cadherin στην κυτταροπλασματική μεμβράνη κατά τη διάρκεια των διαδικασιών της φλεγμονής και της κυτταρικής μετανάστευσης; Τι επίπτωση έχει αυτό στη δυναμική του κυτταροσκελετού;

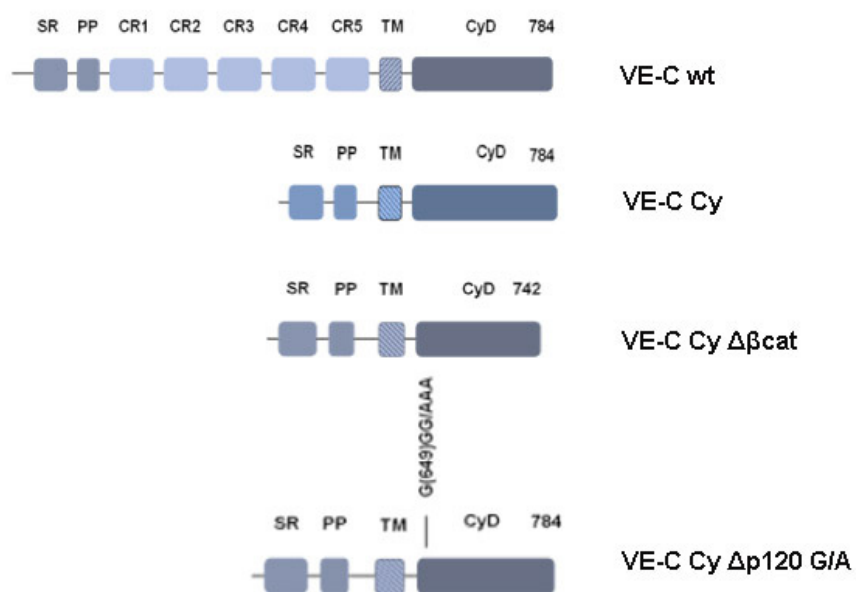


## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**



## 2.1 Πλασμιδιακοί φορείς

Όνομα κατασκευής	Φορέας	Βιβλιογραφικές αναφορές
VE-C wt	pcDNA3	(Navarro et al., 1995)
VE-C Cy	pcDNA3	(Kouklis et al., 2003)
VE-C Cy Δp120 G/A	pcDNA3	(Kouklis et al., 2003)
VE-C Cy Δβcat	pcDNA3	(Kouklis et al., 2003)
VE-C Cy mcherry	pcDNA3	-
VE-C wt mcherry	pcDNA3	-
VE-C wt mcherry	pPYCAGIP	-
PH-GFP	pEGFP-N1	(Stauffer et al., 1998)
Cdc42 wt-GFP	pEGFP-N1	-
Cdc42 N17-GFP	pEGFP-N1	-
Cdc42 V12-GFP	pEGFP-N1	-



**Εικόνα 15:** Τα μεταλλάγματα της VE-cadherin που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Στην πλασμιδιακή κατασκευή VE-C Cy έχει απαλειφθεί το εξωκυττάριο τμήμα και στη θέση αυτή έγινε εισαγωγή του

επιτόπου FLAG. Στην κατασκευή VE-C Cy Dβcat έχουν απαλειφτεί 42 κατάλοιπα από το καρβοξυτελικό τμήμα, τα οποία είναι υπεύθυνα για τη σύνδεση με τη β-κατενίνη. Στην κατασκευή VE-C Cy G/A τα κατάλοιπα AAA (649-651) αντικαταστάθηκαν με GGG στην κατασκευή VE-C Cy. Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν το πεπτιδίο σήματος SP(signal peptide), το προ-πεπτιδίο PP (pro-peptide) και το διαμεμβρανικό τμήμα TM (transmembrane domain) είναι απαραίτητα έτσι ώστε οι κατασκευές να εισαχθούν στη μεμβράνη.

## 2.2 Αντισώματα

### Πρωτογενή αντισώματα έναντι

- VE-cadherin (πολυκλωνικό αντίσωμα για το κυτταροπλασματικό τμήμα σε κατσίκια - Santa Cruz Biotechnology)
- caveolin-1 (πολυκλωνικό αντίσωμα σε κουνέλι - Santa Cruz Biotechnology)
- α-τουμπουλίνη (μονοκλωνικό αντίσωμα - Sigma)
- GFP (πολυκλωνικό αντίσωμα σε κουνέλι - Santa Cruz Biotechnology)
- 9G3 (μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του εξωκυττάριου τμήματος της VE-cadherin που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο μας)
- Cdc42 (πολυκλωνικό αντίσωμα σε κουνέλι - Santa Cruz Biotechnology)
- FLAG (μονοκλωνικό αντίσωμα M2 - Sigma)
- PECAM (μονοκλωνικό αντίσωμα - Santa Cruz Biotechnology)
- IQGAP1 (μονοκλωνικό αντίσωμα - BD Transduction laboratories)
- β-catenin (μονοκλωνικό αντίσωμα - BD Transduction laboratories)
- α-catenin (μονοκλωνικό αντίσωμα - BD Transduction laboratories)

### Δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP έναντι

- κατσίκας, Donkey Anti Goat HRP (Jackson Immunoresearch)
- κουνελιού, Donkey Anti Rabbit HRP (Jackson Immunoresearch)
- ποντικού, Goat Anti Mouse HRP (Jackson Immunoresearch)

### Δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRITC) έναντι

- ποντικού, Donkey Anti Mouse Texas Red (Jackson Immunoresearch)
- κατσίκας, Donkey Anti Goat Alexa Fluor 594 (Molecular Probes)

## 2.3 Καλλιέργεια κυττάρων

### Ανθρώπινα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HMEC-1, Human Microvascular Endothelial Cells).

Τα κύτταρα αυτά αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS, Biosera) θερμικά απενεργοποιημένο, 50 ng/ml υδροκορτιζόνη (Sigma) και 0,01 μg/ml EGF (Immunotools).

### Ανθρώπινα πνευμονικά μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HPMEC, Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells).

Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 (Gibco) εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (FBS, Biosera) θερμικά απενεργοποιημένο, 50 μg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS, Upstate), 50 μg/ml ηπαρίνη (Sigma), 100 U/ml πενικιλίνη (Gibco) και 100 U/ml στρεπτομυκίνη (Gibco) και 2 mM Glutamax (Invitrogen).

### Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC)

Τα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου HUVEC απομονώθηκαν στο εργαστήριο του κ. Χριστοφορίδη και χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση κάποιων πειραμάτων στην παρούσα μελέτη. Καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 (με L-γλουταμίνη και Earle's, Invitrogen), εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (Fetal calf serum, FCS, Invitrogen) θερμικά απενεργοποιημένο, 50 μg/ml εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS, Sigma), 10 units/μl ηπαρίνη (Sigma), 100 U/ml πενικιλίνη (Gibco) και 100 U/ml στρεπτομυκίνη (Gibco), 2 mM L-γλουταμίνη.

Τα τρυβλία και οι καλυπτρίδες στα οποία καλλιεργήθηκαν τα HUVEC και τα HPMEC είχαν υποστεί επεξεργασία προηγουμένως με διάλυμα ζελατίνης 0,2% και εκπλυθεί με διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline, PBS, Invitrogen).

Cos-7 (κυτταρική σειρά με μορφολογία ινοβλαστών, προεργόμενη από μετασχηματισμό κυττάρων CV1 με μεταλλαγμένο στέλεχος του ιού SV40)

Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS, Biosera) θερμικά απενεργοποιημένο, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM L-γλουταμίνη.

#### Υβριδώματα

Τα κύτταρα αυτά καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI (PAA), εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός (FBS, Biosera) θερμικά απενεργοποιημένο, 100 U/ml πενικιλίνη και 100 U/ml στρεπτομυκίνη και 2 mM L-γλουταμίνη.

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο ο οποίος διατηρείται στείρος με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας. Όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έλαβαν χώρα εντός εστίας νηματικής ροής (AURA 2000 MAC). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific CO<sub>2</sub> Incubator) σταθερής θερμοκρασίας, κάτω από κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5% CO<sub>2</sub>.

Οι εκπλύσεις των κυττάρων πραγματοποιούνται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Η αποκόλληση των κυττάρων επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος τρυψίνης / EDTA (trypsin / EDTA solution PAA 0,05% / 0,02% w/v).

## **2.4 Παρασκευαστικές μέθοδοι**

### **2.4.1 Παραγωγή ασκιδών σε BALB/c ποντίκια**

Η παραγωγή των μονοκλωνικών αντισωμάτων μπορεί να επιτευχθεί *in vivo* μέσω των ασκιδών είτε *in vitro* με τη χρήση διαφόρων συστημάτων στην κυτταροκαλλιέργεια. Για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μονοκλωνικού αντισώματος 9G3, ο επίτοπος του οποίου βρίσκεται στο εξωκυτταρικό τμήμα της VE-cadherin και συγκεκριμένα στις περιοχές EC3 και EC4, παράχθηκε ασκιδικό υγρό σε ποντίκια BALB/c.

Αρχικά διεγέρθηκε το ανοσοποιητικό σύστημα BALB/c αρσενικών ποντικών ηλικίας τουλάχιστον έξι εβδομάδων με 100 μl μη πλήρες Freund's adjuvant. Μετά από

δεκατέσσερις μέρες ακολούθησε η έγχυση  $1 \times 10^6$  κυττάρων υβριδωμάτων που παράγουν το αντίσωμα 9G3 και επαναιωρήθηκαν σε 500 μl PBS. Η έγχυση έγινε με τη χρήση σύριγγας με βελόνα 21 g. Τα υβριδώματα θα πρέπει να βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Μετά την έγχυση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε καθημερινή παρακολούθηση των ποντικών προκειμένου να διαπιστωθεί εγκαίρως κάποια ενόχληση όπως και τυχόν ανάπτυξη ασκίτικού υγρού. Μετά από περίπου δέκα μέρες παρατηρήθηκαν οι πρώτοι όγκοι στην περιοχή της κοιλιάς από όπου έγινε και η λήψη του υγρού. Η αύξηση του βάρους που αποδίδεται στο υγρό των ασκικών δε θα πρέπει να ξεπερνά το 20% του αρχικού βάρους του ποντικού. Η λήψη του υγρού έγινε με τη χρήση σύριγγας με βελόνα 18 g. Μετά από 48 ώρες έγινε η λήψη του δεύτερου δείγματος την οποία ακολούθησε η θανάτωση του ποντικού. Στη συνέχεια το υγρό που συλλέχθηκε φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στα 1500 g στους 4°C. Ακολούθησε αποθήκευση στους -80°C.

#### **2.4.2 Παρασκευή σφαιριδίων συγγένειας**

Ποσότητα 1,5 ml σφαιριδίων Affigel 10 (Bio-Rad) μεταφέρθηκε σε συσκευή Buchner funnel εκπλύθηκε αρχικά με αιθανόλη 100% κρύα, στη συνέχεια με αιθανόλη 50% κρύα και τέλος με απιονισμένο κρύο νερό. Τα σφαιρίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 3 λεπτά. Έπειτα επώαστηκαν με 5 ml MOPS 0,1 M pH 7,5 και 1 ml αντισώματος 9G3 που προέρχεται από ασκίτες. Είχε προηγηθεί καθαρισμός του αντισώματος 9G3 με τη χρήση μεμβρανών διαπίδυσης (Pierce, Dialysis tubing). Συγκεκριμένα κομμάτια μεμβράνης εκπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό, επώαστηκαν με απεσταγμένο νερό στους 100°C για 5 λεπτά και αποθηκεύτηκαν στους 4°C. Στη συνέχεια, το διάλυμα του αντισώματος προστέθηκε στην επεξεργασμένη μεμβράνη, τοποθετήθηκε σε διάλυμα διαπίδυσης MOPS 0,1 M pH 7,5 και επώασθηκε στους 4°C υπό ανάδευση ολονύκτια.

Η αντίδραση σφαιριδίων και αντισώματος πραγματοποιήθηκε στους 4°C υπό ανάδευση για 4 ώρες είτε σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα 30 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη διαλύματος 0,2 M αιθανολαμίνης pH 8,0 στους 4°C υπό ανάδευση για 1 ώρα.

Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν διαδοχικά, δυο φορές με διάλυμα PBS, μια φορά με διάλυμα 100 mM γλυκίνης pH 2.5 για να απομακρυνθεί η περίσσεια του αντισώματος

που δεν έχει προσδεθεί ομοιοπολικά, και τέλος μια φορά με διάλυμα PBS στο οποίο και διατηρούνται.

#### **2.4.3 Επίπλευση σε βαθμίδωση σουκρόζης μετά από διαλυτοποίηση με απορρυπαντικό**

Κύτταρα HMEC-1, HUVEC και HPMEC αναμίχθηκαν με διάλυμα TNE (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA), 1 mM διθειοθρεϊτόλη, 1% Triton X-100, ή 2% Lubrol WX (ICN Biomedicals) ή Brij 96 (Fluka) και αναστολείς πρωτεασών, ενώ η ομογενοποίηση τους επιτεύχθηκε με τη χρήση σύριγγας 27 g. Κατόπιν το μίγμα (580  $\mu$ l) επώαστηκε για 30 λεπτά στους 4°C με περιστροφή, προσαρμόστηκε σε 40% κ.β. σακχαρόζη με την προσθήκη 820  $\mu$ l σακχαρόζης 62% κ.β. και φορτώθηκε στο κατώτατο σημείο σωλήνων για κεφαλή MLS-50 υπερφυγοκέντρου Beckman. Ακολούθησε διαδοχική επίστρωση με διαλύματα σακχαρόζης 35%, 30%, 25%, 20%, 15% και 10% κ.β. (600  $\mu$ l το κάθε κλάσμα). Στη συνέχεια οι σωλήνες υπερφυγοκεντρήθηκαν σε 45000 rpm για 18 ώρες στους 4°C. Μετά από τη φυγοκέντρηση, κλάσματα 600  $\mu$ l συλλέχθηκαν από την κορυφή ως το κατώτατο σημείο του σωλήνα και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western.

#### **2.4.4 Επίπλευση σε βαθμίδωση σουκρόζης μετά από αλκαλική υπέρηχηση**

Κύτταρα HMEC-1 και HPMEC επαναιωρήθηκαν σε 580  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 500 mM, pH 11.0. Στη συνέχεια το δείγμα υπέστη επεξεργασία με υπέρηχους (sonication) σε πλάτος (amplitude) 40%, για χρονικό διάστημα 10 sec 4 φορές. Το ομογενοποίημα προσαρμόστηκε σε 40% κ.β. σακχαρόζη με την προσθήκη 820  $\mu$ l σακχαρόζης 62% κ.β. παρασκευασμένης σε διάλυμα MBS (25 mM Mes, pH 6.5, 0.15 M NaCl) και φορτώθηκε στο κατώτατο σημείο σωλήνων για κεφαλή MLS-50 υπερφυγοκέντρου Beckman. Επιστρώθηκε με ασυνεχή βαθμίδωση σακχαρόζης 30% - 5% κ.β. (3,3 ml σακχαρόζης 30% κ.β και 0,3 ml σακχαρόζης 5% κ.β.) και το δείγμα υπερφυγοκεντρήθηκε σε 45000 rpm στους 4°C για 20 ώρες. Μετά από τη φυγοκέντρηση, κλάσματα 300  $\mu$ l συλλέχθηκαν από την κορυφή ως το κατώτατο σημείο του σωλήνα και υποβλήθηκαν σε ανοσοαποτύπωση κατά Western.



## **2.5 Βιοχημικές μέθοδοι**

### **2.5.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών**

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση του πακέτου της BCA (Pierce), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αρχικά, δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη συσχέτισης της οπτικής πυκνότητας με την πρωτεϊνική συγκέντρωση με τη χρήση δειγμάτων πρωτεΐνης γνωστής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, ποσότητες από 1 έως 20  $\mu\text{g}$  αλβουμίνης του ορού του βοός (BSA) (ή IgG προκειμένου για αντισώματα) διαλύθηκαν σε 100  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O. Στη συνέχεια προετοιμάστηκε διάλυμα αντίδρασης (Working solution) που αποτελείται από το αντιδραστήριο BCA A και το αντιδραστήριο BCA B σε αναλογία 50:1. 2 ml του διαλύματος δράσης προστέθηκαν στα δείγματα, ακολούθησε έντονη ανάδευση με αναδευτήρα τύπου vortex και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 30 λεπτά. Τέλος, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε κυψελίδα και φωτομετρήθηκαν στα 562 nm, εντός 10 λεπτών. Από τις οπτικές πυκνότητες των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ως εξής: Ποσότητες διαλύματος πρωτεΐνης από 1 έως 20  $\mu\text{g}$  αραιώθηκαν με ddH<sub>2</sub>O έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 100  $\mu\text{l}$  και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία. Η οπτική πυκνότητα που προέκυψε από τη φωτομέτρηση του δείγματος αντιστοιχήθηκε στην πρότυπη καμπύλη και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

### **2.5.2 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών με τη χρήση πηκτής ακρυλαμιδίου**

Οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με τη χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, υπό αναγωγικές συνθήκες, σύμφωνα με τη μέθοδο του Laemmli, 1970. Στα προς ανάλυση δείγματα προστέθηκε, πριν τη χρήση τους, 4 φορές συγκεντρωμένο διάλυμα Laemmli (Tris-HCl (pH 7), 9,2% SDS, 40% γλυκερόλη, 0,2% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης και 100 mM DTT). Ακολούθησε η θέρμανση τους στους 95°C για 5 λεπτά.

Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκαν είχαν συγκέντρωση 8%, 10%, 12% και η ηλεκτροφόρηση έγινε σε διάλυμα που είχε 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris base και 0,1% SDS.

### **2.5.3 Χρώση πηκτών ακρυλαμιδίου**

Αμέσως μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, έγινε χρώση των πηκτών σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 12% οξικού οξέος και 0,1% Coomassie Blue G250. Απομακρύνθηκε η περίσσεια της χρωστικής και ακολούθησε επώαση σε διάλυμα 10-40% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος έως ότου οι ζώνες των πρωτεϊνών γίνουν ορατές.

### **2.5.4 Ανοσοαποτύπωση κατά Western**

Τα δείγματα αναλύθηκαν πρώτα με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE και ακολούθησε μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Whatman), υπό σταθερή τάση 50 V για 1 ώρα και 30 λεπτά. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 192 mM γλυκίνη, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS και 20% μεθανόλη. Οι μεμβράνες επώασθησαν με διάλυμα πλύσης (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 155 mM NaCl, 0,05% Tween 20) όπου είχε προστεθεί 1% ζελατίνης από δέρμα ιχθύος (Fish skin gelatin, Sigma) σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 1 ώρα για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Η επώαση με τα πρωτογενή αντισώματα έγινε σε διάλυμα πλύσης με 1% ζελατίνης είτε στους 4°C ολονυχτίως είτε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες υπό ανάδευση. Έπειτα οι μεμβράνες πλύθηκαν 4 φορές για 10 λεπτά με διάλυμα πλύσης παρουσία ζελατίνης και επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Η ραφανιδική υπεροξειδάση είναι υπεύθυνη για την αντίδραση χημειοφωταύγειας. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 10 λεπτών με διάλυμα πλύσης, επώαση για 5 λεπτά με αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρείας Pierce και εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο.

### **2.5.5 Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών με τη χρήση σφαιριδίων συγγένειας**

Ποσότητα 100 μl από το σύμπλοκο αντισώματος-σφαιριδίων αναμίχθηκε με 500 μl κυτταρικού εκχυλίσματος που προέκυψε έπειτα από προσθήκη διαλύματος λύσης χαμηλής ιονικής ισχύος (100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% TX-100, 200 mM sucrose, and 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM PMSF). Το μείγμα επώαστηκε στους

4°C υπό ανάδευση ολονυχτίως. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν με διάλυμα λύσης χαμηλής ιονικής ισχύος τρεις φορές. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μια έκπλυση με διάλυμα 100 mM γλυκίνης pH 2.5. Το έκλουσμα συλλέχθηκε, προστέθηκε 4 φορές συγκεντρωμένο διάλυμα φόρτωσης Laemmli, βρασμός στους 95°C για 10 λεπτά και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

### **2.5.6 Έμμεση ανοσοκατακρήμνιση**

Κύτταρα HMEC-1 εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με διάλυμα λύσης (150 mM NaCl, 20 Mm Tris-HCl pH 7.5, 1% TX-100, 1mM PMSF), vortex και φυγοκέντρηση στις 14000 rpm στους 4°C για 10 λεπτά. Το εκχύλισμα υπέστη μια προεργασία καθαρισμού (preclearing) με IgG και σφαιρίδια Protein A/G στους 4°C υπό ανάδευση για 45 λεπτά.

Ποσότητα 30 μl σφαιριδίων Protein A/G (Santa Cruz Biotechnology) εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 rpm για 5 λεπτά. Ακολούθησε η επώαση τους με 1-5 μg αντισώματος σε 50 μl διαλύματος λύσης σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

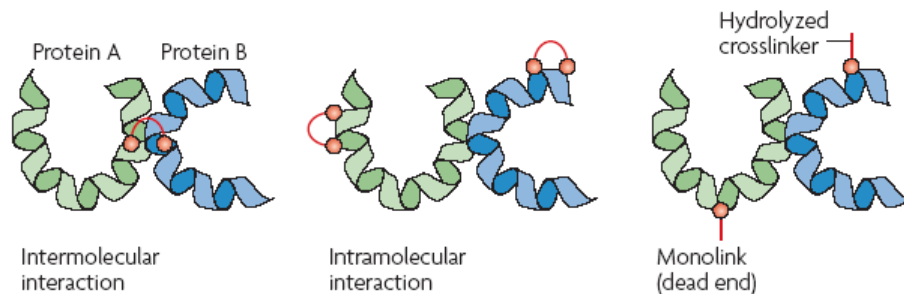
Τέλος, το μίγμα αντισώματος-σφαιριδίων και κυτταρικού εκχυλίσματος επώαστηκε στους 4°C υπό ανάδευση για 3 ώρες. Τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα λύσης και μια φορά με PBS, προστέθηκε 4 φορές συγκεντρωμένο διάλυμα Laemmli, θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου.

### **2.5.7 Χημική σταυροσύνδεση (crosslinking) in vivo**

Κατά την εκχύλιση κυττάρων είναι δυνατό λόγω της χρήσης απορρυπαντικών να αποσταθεροποιούνται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών. Για τη σταθεροποίηση των αλληλεπιδράσεων αυτών είναι δυνατή η χρήση ουσιών που λειτουργούν ως χημικοί διασυνδέτες. Οι χημικοί διασυνδέτες έχουν τουλάχιστον δύο δραστικές ομάδες οι οποίες σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με τα μόρια-στόχους.

Αυτές οι δραστικές ομάδες διαχωρίζονται από ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους (με εύρος από 5-15 Å) και το οποίο καθορίζει και τη μέγιστη απόσταση μεταξύ δύο μορίων. Αυτό προσδίδει εξειδίκευση (specificity) στη διαδικασία αυτή καθώς τα

μόρια που βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους είναι πιο πιθανό να συνδεθούν με αυτό τον τρόπο (Gingras et al. 2007). Από τους πιο συχνούς χημικούς διασυνδέτες είναι η φορμαλδεΐδη και ο διθειοδισουκινιμιδυλικός προπιονικός εστέρας DSP (dithiobissuccinimidyl propionate). Ο εστέρας αυτός αντιδρά με πρωτοταγείς αμίνες και σχηματίζει ομοιοπολικούς αμιδικούς δεσμούς. Πρόκειται για μη φορτισμένο μόριο το οποίο είναι σε θέση να περνά μέσω της μεμβράνης και να σταθεροποιεί τις συνδέσεις μεταξύ πρωτεϊνών της μεμβράνης του κυττάρου.



**Εικόνα 16:** Οι χημικοί διασυνδέτες έχουν τουλάχιστον δύο δραστικές ομάδες, οι οποίες κατευθύνονται προς διαφορετικές λειτουργικές ομάδες. Όταν διλειτουργικοί χημικές διασυνδέτες επωάζονται με ένα χημικό σύμπλοκο, μπορούν να συμβούν αρκετές διαφορετικές αντιδράσεις, οι δύο δραστικές ομάδες μπορούν η καθεμία να αντιδράσει με διαφορετικά μόρια του συμπλέγματος (διαμοριακή αλληλεπίδραση, intermolecular interaction). Επίσης, οι δραστικές ομάδες του διασυνδέτη μπορεί να πραγματοποιήσουν ενδομοριακή αλληλεπίδραση με μια μόνο πρωτεΐνη του συμπλόκου, ή ακόμη μπορεί μόνο μια από τις δραστικές ομάδες να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνη, ενώ το άλλο άκρο του διασυνδέτη υδρολύεται (Gingras et al., 2007).

Για την πραγματοποίηση πειραμάτων χημική σταυροσύνδεσης *in vivo* χρησιμοποιήθηκε ο εστέρας DSP (ThermoScientific). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κύτταρα HMEC-1 ( $2,5 \times 10^5$  κύτταρα / 100 mm πιάτο). Τα κύτταρα αρχικά εκπλύθηκαν με διάλυμα Krebs (11,6 mM Hepes (pH 7.3), 135 mM NaCl, 5,9 mM KCl, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 11,5 mM γλυκόζη) (37°C) τρεις φορές. Στη συνέχεια καλύφθηκαν με 1,3 ml διάλυμα Krebs (37°C) που περιείχε 400 µg / ml DSP και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 5 ml διαλύματος 50 mM glycine/Krebs solution (37°C) σε

θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μετά την αντίδραση της χημικής διασύνδεσης τα κύτταρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα Krebs (37°C). Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν υπό ανάδευση στους 4°C.

Ακολούθησε προσθήκη 5 ml διαλύματος λύσης (100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% TX-100, 200 mM sucrose, and 20 mM Hepes (pH 7.5)) εμπλουτισμένου με αναστολείς πρωτεασών και επώαση των κυττάρων υπό ανάδευση στους 4°C για 5 λεπτά. Αφού απομακρύνθηκαν οι διαλυτές οι πρωτεΐνες, το αδιάλυτο κλάσμα που προέκυψε λόγω της αντίδρασης χημικής διασύνδεσης εκπλύθηκε με διάλυμα λύσης το οποίο δεν περιέχει TX-100 στους 4°C δύο φορές για 2,5 λεπτά υπό ανάδευση. Το κλάσμα αυτό διαλυτοποιήθηκε σε 700 µl διαλύματος U [150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 30 mM Hepes (pH 7.5), 1% TX-100, and 6 M urea] και ομογενοποιήθηκε με τη χρήση σύριγγας 22 g. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε στις 16000 g για 15 λεπτά και έπειτα ακολούθησε υπερφυγοκέντρωση στις 100000 g για 30 λεπτά. Το διαλυτό υπερκείμενο συλλέχθηκε και ακολουθήθηκε πρωτόκολλο επαναδιάταξης των πρωτεϊνών με διαδοχικές διαπιδύσεις σε διαλύματα ελαττούμενης συγκέντρωσης ουρίας. Τα διαλύματα διαπίδυσης περιείχαν το διάλυμα U με συγκεντρώσεις ουρίας 1, 0,5, και 0,1 M. Τέλος τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 16000 g για 15 λεπτά και τα υπερκείμενα χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοκατακρήμιση.

## **2.6 Μέθοδοι γενετικής Μηχανικής**

### **2.6.1 Ανάπτυξη βακτηρίων**

Ως θρεπτικό υλικό ανάπτυξης των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκε το 2YT (Sigma). Τα στερεά θρεπτικά υλικά παρασκευάστηκαν μετά από προσθήκη 1,5% άγαρ στο υγρό θρεπτικό υλικό. Η ανάπτυξη των βακτηρίων έγινε στους 37°C σε τροχιακά επωαστήρα (Model G25 incubator shaker, New Brunswick) υπό ανακίνηση στις 200 rpm. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αμπικιλίνη (Sigma) σε συγκέντρωση 75 µg/ml και καναμυκίνη (Sigma) σε συγκέντρωση 50 µg/ml.

### **2.6.2 Μετασηματισμός βακτηρίων**

Για τον μετασηματισμό επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων αναμίχθηκε 1 ng πλασμιδιακού DNA με 100 µl κυττάρων. Το μίγμα επώαστηκε στον πάγο για 20

λεπτά, μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο των 42°C για 1,5 λεπτό και αμέσως στον πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν στο μίγμα κυττάρων και DNA όσα ml θρεπτικού υλικού 2 YT χωρίς αντιβιοτικό χρειάζεται ώστε να συμπληρωθεί 1 ml τελικός όγκος, επώσθησαν στους 37°C για 1 ώρα και τέλος επιστρώθηκαν σε τρυβλία στερεού 2 YT με αμπικιλίνη. Τα μετασχηματισμένα κύτταρα δημιούργησαν αποικίες ύστερα από ολονύκτια επώαση στους 37°C, οι οποίες και συλλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση.

### **2.6.3 Παρασκευή πλασμιδιακού DNA**

Σε μικρή κλίμακα : Για την απομόνωση DNA σε μικρή κλίμακα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης των βακτηρίων ως εξής: Μετασχηματισμένες βακτηριακές αποικίες μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια που περιείχαν 2 ml 2 YT και κατάλληλο αντιβιοτικό και επώσθησαν ολονύκτια υπό ανάδευση στους 37°C. Στη συνέχεια 1,2 ml από κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα και φυγοκεντρήθηκε στα 12000 g για 1,5 λεπτό. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 100 μl διαλύματος I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA), 200 μl διαλύματος II (0,2 N NaOH, 1% w/v SDS), 150 μl διαλύματος III (2,5 M CH<sub>3</sub>COONa) και μετά από ήπια ανάδευση ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 13500 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα όπου πραγματοποιήθηκε κατακρήμνιση του DNA με 2,5 όγκους κρύας αιθανόλης 100%, ακολούθησε vortex και φυγοκέντρωση στις 13500 rpm για 15 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 150 μl κρύας αιθανόλης 70%. Ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση, το ίζημα αποξηράνθηκε και επαναιωρήθηκε σε 30 μl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

Σε μεγάλη κλίμακα : Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το πακέτο Nucleobond PC 100 (Machey – Nagel). Το παραπάνω πρωτόκολλο αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο της αλκαλικής λύσης βακτηρίων.

### **2.6.4 Δημιουργία πλασμιδιακών κατασκευών VE-cadherin wt mcherry- pcDNA3 και VE-C wt mcherry-pPYCAGIP**

Για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής VE-cadherin wt mcherry - pCDNA3 χρησιμοποιήθηκαν οι προϋπάρχουσες πλασμιδιακές κατασκευές VE-C Cy

mcherry και VE-cadherin wt. Συγκεκριμένα το πλασμίδιο VE- C Cy mcherry επώασθη παρουσία των περιοριστικών ενζύμων B1p I και Xba I. Το προκύπτον θραύσμα μεγέθους 1640 bp απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 0,8% και αποτέλεσε το ένθεμα για τη δημιουργία της νέας πλασμιδιακής κατασκευής. Το πλασμίδιο VE-cadherin αγρίου τύπου επώασθη παρουσία των περιοριστικών ενζύμων B1p I και Xba I. Το προκύπτον θραύσμα μεγέθους 6900 bp απομονώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης και αποτέλεσε τον φορέα. Συγκεκριμένα αποκόπηκε από την πηκτή η ζώνη που αντιστοιχεί στο φορέα και τοποθετήθηκε σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο το οποίο στον πυθμένα του περιείχε υαλοβάμβακα και μια οπή από όπου διήλθε η πηκτή μετά από φυγοκέντρωση στις 6000 rpm για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το προκύπτον διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 rpm για 30 δευτερόλεπτα σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο που περιέχει φίλτρο και είναι γνωστό ως SpinX. Ακολούθησε εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και καταβύθιση του DNA με 2,5 όγκους κρύας αιθανόλης 100% στους -80°C για 20 λεπτά. Μετά από τη φυγοκέντρωση στις 13000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά, το ίζημα εκπλύθηκε με 50 μl κρύας αιθανόλης 70%. Τέλος, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 20 μl TE.

Η δημιουργία της κατασκευής πραγματοποιήθηκε με επώαση του ενθέματος και του φορέα σε αναλογία 7:1 παρουσία DNA λιγάσης σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Τέλος, επιλεκτικά βακτηριακά κύτταρα DH5a μετασχηματίστηκαν με το μίγμα που προέκυψε από την αντίδραση λιγάσης.

Για τη δημιουργία της πλασμιδιακής κατασκευής VE-C wt mcherry-pPYCAGIP χρησιμοποιήθηκαν οι πλασμιδιακές κατασκευές VE-C wt mcherry-pCDNA3 και ο φορέας pPYCAGIP. Το πλασμίδιο VE-C wt mcherry-pCDNA3 επώασθη με το ένζυμο EcoRI. Προέκυψε θραύσμα μεγέθους 3311 bp, το οποίο απομονώθηκε σε πηκτή αγαρόζης και αποτέλεσε το ένθεμα για τη νέα κατασκευή. Ακολούθησε πέψη του φορέα pPYCAGIP με το ένζυμο EcoRI. Απομονώθηκε θραύσμα μεγέθους 6383 bp που αποτέλεσε το φορέα. Ακολούθησε η αντίδραση λιγάσης όπου επώασθη φορέας και ένθεμα σε αναλογία 5:1 σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Επιλεκτικά κύτταρα DH5a μετασχηματίστηκαν με το μίγμα που προέκυψε από την αντίδραση λιγάσης.

Η λιγάση και τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από τις εταιρείες Fermentas και New England Biolabs. Η χρήση των παραπάνω ενζύμων έγινε σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Τα πλασμίδια ελέγχθηκαν με πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

### 2.6.5 Πλασμιδιακή διαμόλυνση κυττάρων

Για τη διαμόλυνση κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές, η τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης για τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η τεχνική της διαμόλυνσης με τη χρήση της πολυαιθυλενιμίνης (polyethylenimine PEI, Sigma) για τα κύτταρα cos-7.

Όσον αφορά στην τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης, μετρήθηκαν  $1 \times 10^6$  κύτταρα την προηγούμενη μέρα της διαμόλυνσης. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα αναμίχθηκαν σε εναιώρημα με 10  $\mu\text{g}$  του προς διαμόλυνση πλασμιδίου σε συνολικό όγκο 250  $\mu\text{l}$ . Για την ηλεκτροδιάτρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή BTX ECM 630-Harvard Apparatus στις κάτωθι συνθήκες:

A) για τα ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1:

Ένταση V : 190 V

Αντίσταση R : None

Χωρητικότητα C : 975  $\mu\text{F}$

B) για τα ενδοθηλιακά κύτταρα HPMEC:

Ένταση V : 200 V

Αντίσταση R : None

Χωρητικότητα C : 1025  $\mu\text{F}$

Στη τεχνική της διαμόλυνσης με τη χρήση της ουσίας πολυαιθυλενιμίνης πραγματοποιήθηκε θρυψινοποίηση των κυττάρων την προηγούμενη της διαμόλυνσης, έτσι ώστε την επομένη μέρα να παρουσιάζουν πυκνότητα ταπητίου 50%. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα αντίδρασης που προέκυψε από αραίωση 1:100 του συμπυκνωμένου διαλύματος αντίδρασης (25% PEI) σε απεσταγμένο νερό. Για ένα τρυβλίο 100 mm χρησιμοποιήθηκαν 4,5  $\mu\text{l}$  διαλύματος αντίδρασης σε 300  $\mu\text{l}$  θρεπτικού μέσου απουσία ορού. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν 10  $\mu\text{g}$  DNA εντός 50  $\mu\text{l}$  θρεπτικού μέσου απουσία ορού. Ακολούθησε προσθήκη του διαλύματος PEI στο θρεπτικό μέσο που περιέχει DNA, ακολούθησε vortex και στη συνέχεια το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το μίγμα προστέθηκε στάγδην στα κύτταρα που καλύπτονται με 3 ml πλήρους θρεπτικού μέσου. Τα κύτταρα επώαστηκαν με αυτό για 3-5 ώρες και το θρεπτικό μέσο αντικαταστάθηκε στη συνέχεια με φρέσκο θρεπτικό υλικό.



## **2.7 Μορφολογικές μέθοδοι**

### **2.7.1 Ανοσοφθορισμός**

Κύτταρα που αναπτύχθηκαν προσκολλούμενα σε καλυπτρίδες εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΐδης 3,7% για 10 λεπτά. Τα μονιμοποιηθέντα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και στη συνέχεια επώαστηκαν με διάλυμα χρώσης σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Το διάλυμα χρώσης αποτελείται από ισοτονικό διάλυμα PBS που περιέχει 0,1% Triton X-100 και 0,2% ζελατίνη από δέρμα ιχθύος. Το Triton X-100 διαλυτοποιεί τα μεμβρανικά λιπίδια και χρησιμοποιείται για να γίνουν τα κύτταρα διαπερατά στα αντισώματα. Ακολούθησε η προσθήκη του πρωτογενούς αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση σε διάλυμα χρώσης και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα χρώσης και επώαση με το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με ισοθιοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRITC) σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για 45 λεπτά. Τα κύτταρα ξεπλύθηκαν 3 φορές με διάλυμα χρώσης για 5 λεπτά ακολούθησε η χρώση των πυρήνων με DAPI (40ng/ml σε PBS) για 5 λεπτά. Τέλος τα κύτταρα εκπλύθηκαν 2 φορές με PBS και οι καλυπτρίδες επικολλήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με τη χρήση 10μl διαλύματος 1 mg/ml p-φαινυλενεδιαμίνης (Sigma), αντιδραστήριο που χρησιμοποιείται για τη σταθεροποίηση του φθορισμού (anti-fade).

### **2.7.2 Συνεστιακή μικροσκοπία**

Η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ αργού-κρυπτού και λογισμικό Leica TCS. Η διέγερση των FITC και TRITC επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας τα μήκη κύματος 488 και 568 αντίστοιχα.

## **2.8 Άλλες μέθοδοι**

Η ποσοτικοποίηση των ζωνών που συνδέθηκαν με το αντίσωμα στην ανοσοαποτύπωση κατά Western έγινε με το υπολογιστικό πρόγραμμα Quantity One της εταιρίας Biogad.



### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



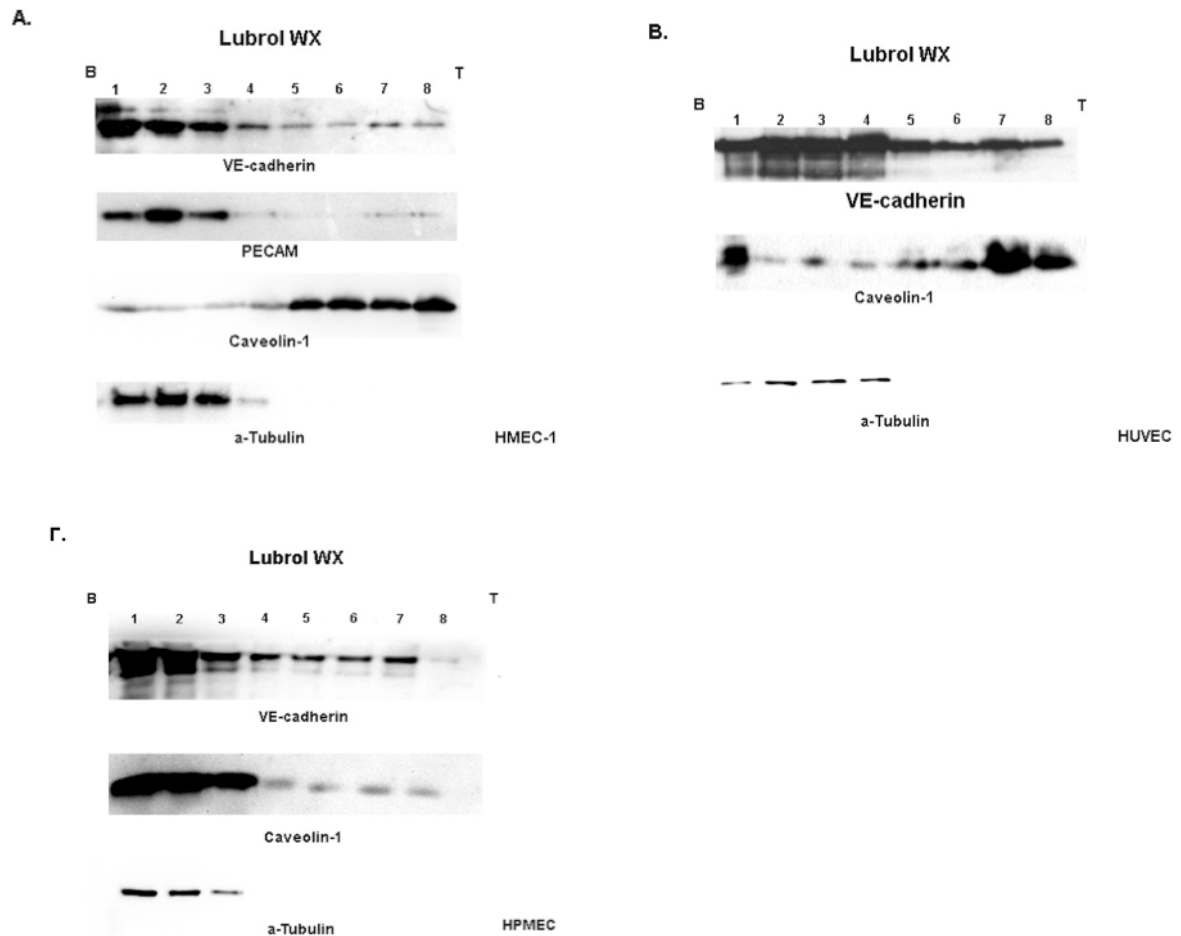
### **3.1 Εντοπισμός της VE-cadherin σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης**

#### **3.1.1 Η VE-cadherin εντοπίζεται μερικώς σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης**

Εξετάστηκε το ενδεχόμενο η VE-cadherin να εντοπίζεται σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης, οι οποίες εμπλέκονται σε σηματοδοτικά μονοπάτια. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε βιοχημική προσέγγιση που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών της μεμβράνης που παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη δράση μη-ιοντικών απορρυπαντικών. Η ανθεκτικότητα στη διαλυτοποίηση αποτελεί ένα κριτήριο για τον έλεγχο της σύνδεσης μιας πρωτεΐνης με λιπιδιακές μικροπεριοχές ειδικής σύστασης. Μελέτες έχουν δείξει ότι στις μεμβράνες συνυπάρχουν πολλοί και διακριτοί τύποι λιπιδιακών υποπεριοχών, που έχουν διαφορετική σύνθεση σε λιπίδια και πρωτεΐνες και παραμένουν ανθεκτικές στη δράση μη ιοντικών απορρυπαντικών. Αυτό σημαίνει ότι μια δεδομένη μεμβρανική πρωτεΐνη μπορεί να παραμένει συνδεδεμένη με μια λιπιδιακή περιοχή στην παρουσία ενός απορρυπαντικού κάτω από κατάλληλες συνθήκες.

Έγινε ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων διαλυτοποιημένων με απορρυπαντικά με την τεχνική της επίπλευσης σε βαθμίδωση σακχαρόζης. Η ικανότητα επίπλευσης μιας πρωτεΐνης στα «ελαφρά» κλάσματα υποδηλώνει ότι αυτή βρίσκεται σε λιπιδιακό μικροπεριβάλλον που ανθίσταται στη διαλυτοποίηση.

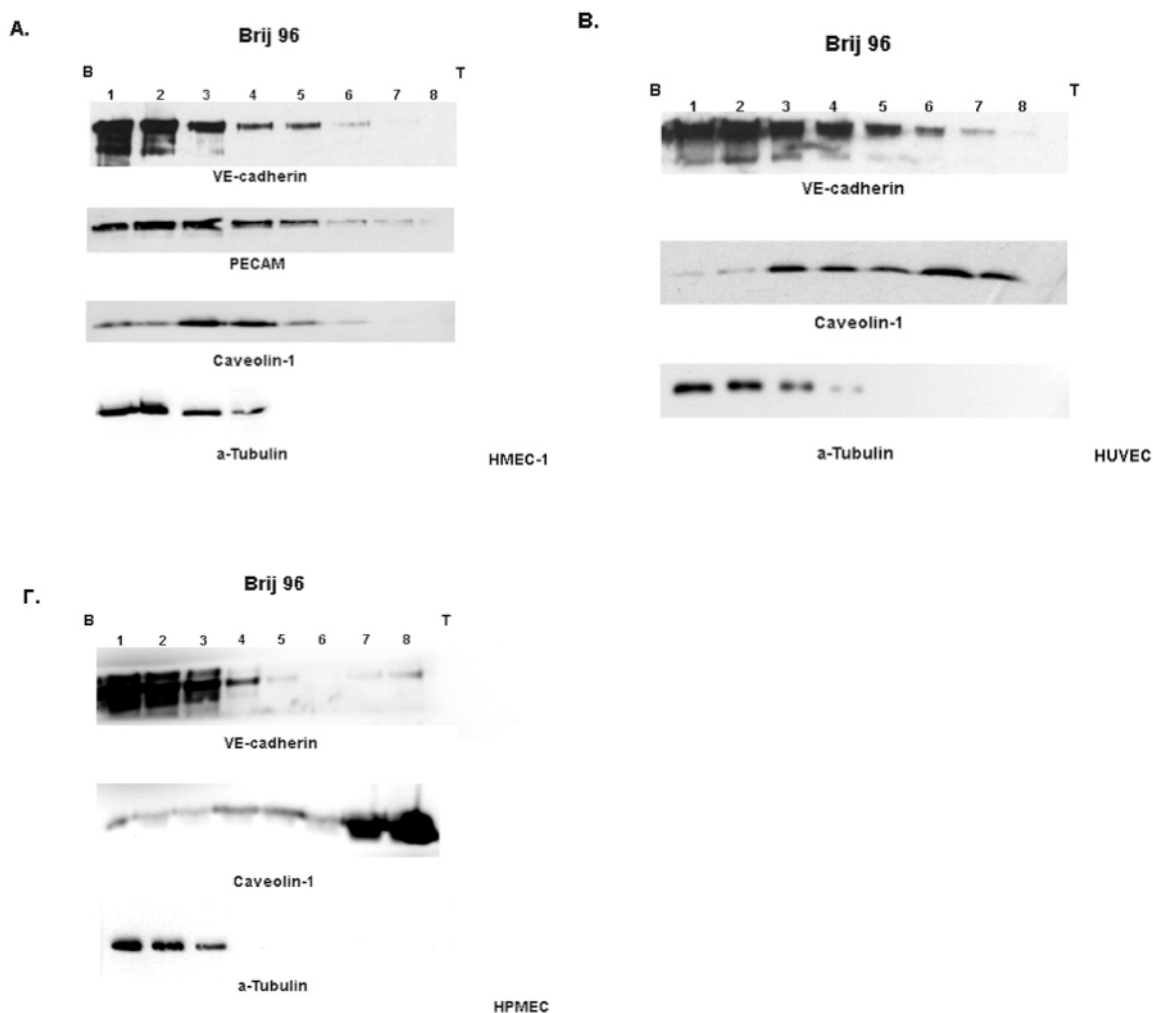
Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά απορρυπαντικά, συγκεκριμένα Lubrol WX συγκέντρωσης 2%, Brij 96 συγκέντρωσης 2% και Triton X-100 συγκέντρωσης 1%. Χρησιμοποιήθηκαν ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1, HUVEC και HPMEC σε συνθήκες ηρεμίας και μετά από προσθήκη θρομβίνης. Το κυτταρικό εκχύλισμα που προέκυψε, μετά από τη λύση με καθένα από τα τρία απορρυπαντικά ρυθμίστηκε σε συγκέντρωση σακχαρόζης 40% και τοποθετήθηκε στον πυθμένα σωλήνων υπερφυγοκέντρωσης. Πάνω από τα δείγματα τοποθετήθηκαν διαδοχικά έξι στιβάδες σακχαρόζης συγκεντρώσεων 35, 30, 25, 20, 15 και 10%. Μετά την υπερφυγοκέντρωση στις 45000 rpm για 16 ώρες, συλλέχθηκαν οκτώ κλάσματα και αναλύθηκαν για την παρουσία της VE-cadherin με την τεχνική SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση. Παράλληλα ελέγχθηκε σε αυτά η παρουσία πρωτεϊνών που είναι γνωστό πως εντοπίζονται σε λιπιδιακές υποπεριοχές, όπως η καβεολίνη-1 (caveolin-1) και η CD31 (PECAM).



**Εικόνα 17:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin, της CD31, της καβεολίνης-1 και της  $\alpha$ -τουμπουλίνης σε εκχυλίσματα κυττάρων HMEC-1 (A), HUVEC (B) και HPMEC (Γ) που διαλυτοποιήθηκαν με 2% Lubrol WX. Η αντιστοιχία αρίθμησης των δειγμάτων και συγκέντρωσης σακχαρόζης έχει ως εξής 1: 40% σακχαρόζη 2: 40% σακχαρόζη 3: 35% σακχαρόζη 4: 30% σακχαρόζη 5: 25% σακχαρόζη 6: 20% σακχαρόζη 7: 15% σακχαρόζη 8: 10% σακχαρόζη.

Με τη χρήση Lubrol WX, αρκετά μεγάλη ποσότητα VE-cadherin εντοπίζεται στα πιο πυκνά κλάσματα της βαθμίδωσης, ωστόσο μια σημαντική ποσότητα της πρωτεΐνης εντοπίζεται στα ελαφρά κλάσματα. Η κατανομή της VE-cadherin είναι παρόμοια και στις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Εικ. 17). Είναι σημαντικό ότι κάτω από τις συνθήκες αυτές η κατανομή της VE-cadherin στη διαβάθμιση σακχαρόζης εμφανίζεται **διφασική** στα κύτταρα HMEC-1 και στα HUVEC, γεγονός που υποδεικνύει την ειδικότητα της μεθόδου. Η κατανομή αυτή συμφωνεί με το πρότυπο κατανομής των πρωτεϊνών που αποτελούν μάρτυρες των λιπιδιακών υποπεριοχών όπως η CD31 και η καβεολίνη-1 κάτω από τις ίδιες

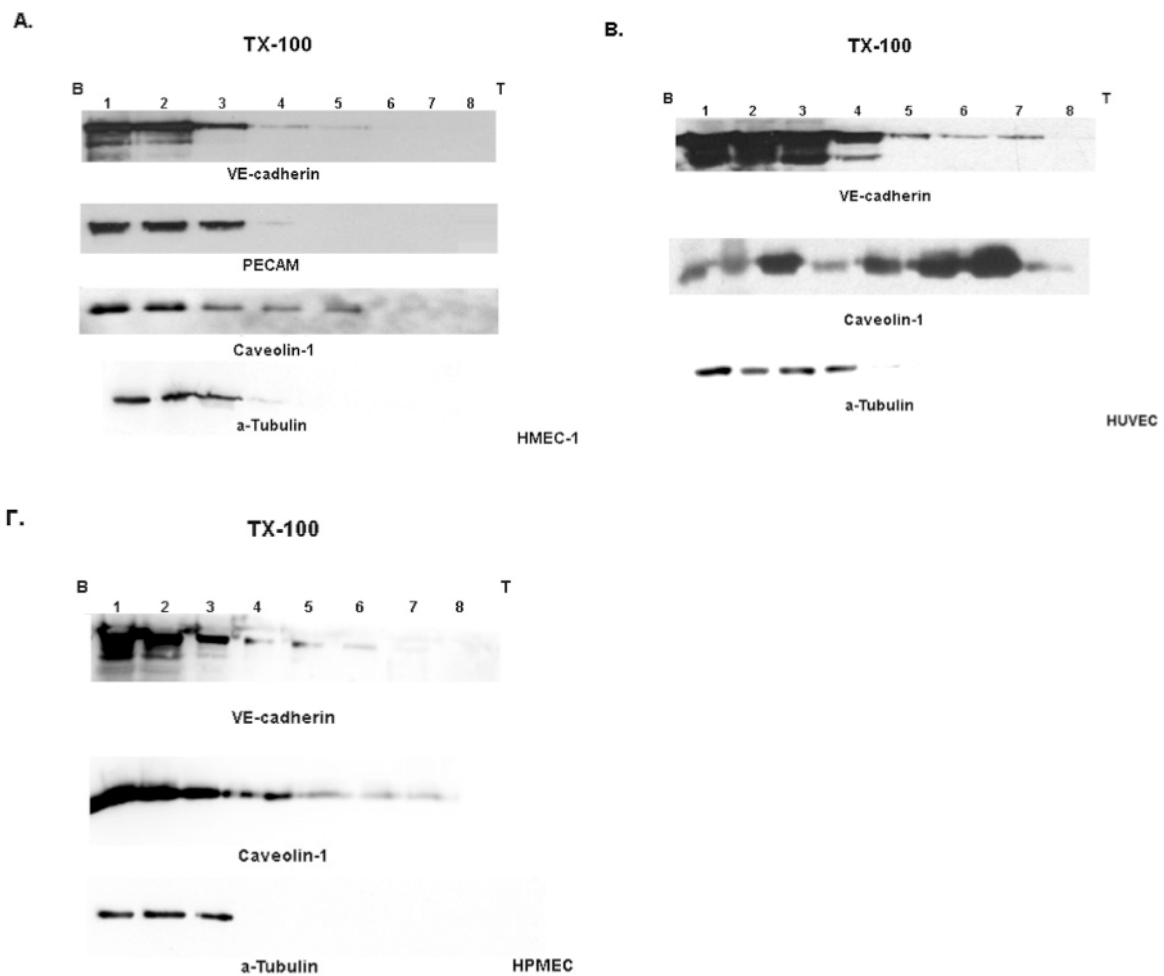
συνθήκες. Η α-τουμπουλίνη χρησιμοποιείται σαν πρωτεΐνη ελέγχου που δεν βρίσκεται στις λιπιδιακές υποπεριοχές.



**Εικόνα 18:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin, της καβεολίνης-1 και της α-τουμπουλίνης σε κυτταρικά εκχυλίσματα από HMEC-1 (A), HUVEC (B) και HPMEC (Γ) που διαλυτοποιήθηκαν με 2% Brij 96. Η αντιστοιχία αρίθμησης των δειγμάτων και συγκέντρωσης σακχαρόζης έχει ως εξής 1: 40% σακχαρόζη 2: 40% σακχαρόζη 3: 35% σακχαρόζη 4: 30% σακχαρόζη 5: 25% σακχαρόζη 6: 20% σακχαρόζη 7: 15% σακχαρόζη 8: 10% σακχαρόζη.

Με τη χρήση του Brij 96 αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μέρος της VE-cadherin εντοπίζεται στα κλάσματα πυκνότητας 10-20% σακχαρόζης, ιδιαίτερα στα κύτταρα HPMEC, σε αντίθεση με τη συμπεριφορά των κυττάρων αυτών στο Lubrol WX (Εικ. 18).

Με τη χρήση TX100 η VE-cadherin διαλυτοποιείται πλήρως και γι' αυτό εντοπίζεται στα κατώτερα κλάσματα της βαθμίδωσης (Εικ. 19).



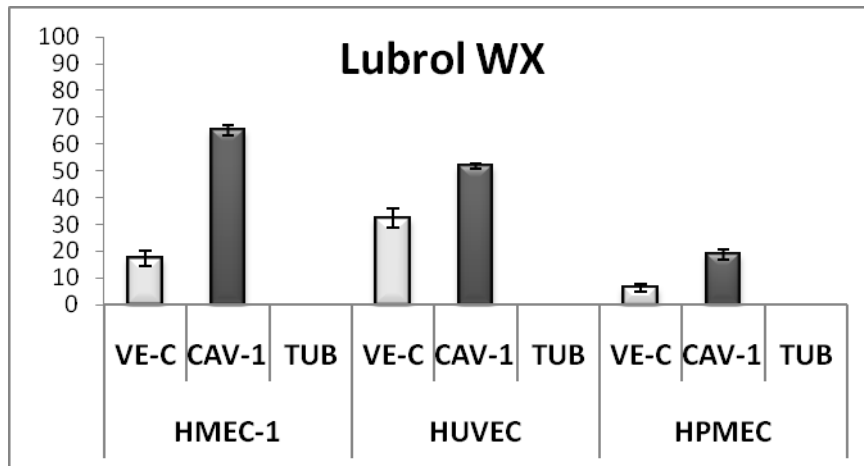
**Εικόνα 19:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin, της καβεολίνης και της α-τουμπουλίνης σε εκχυλίσματα από κύτταρα HMEC-1 (A), HUVEC (B) και HPMEC (Γ) που διαλυτοποιήθηκαν με 1% TX-100. Η αντιστοιχία αρίθμησης των δειγμάτων και συγκέντρωσης σακχαρόζης έχει ως εξής 1: 40% σακχαρόζη 2: 40% σακχαρόζη 3: 35% σακχαρόζη 4: 30% σακχαρόζη 5: 25% σακχαρόζη 6: 20% σακχαρόζη 7: 15% σακχαρόζη 8: 10% σακχαρόζη.



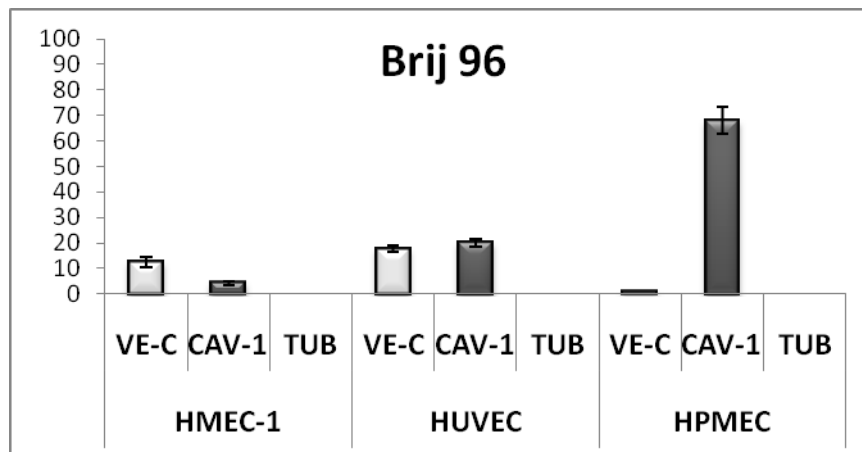
Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών στα ελαφρά κλάσματα της βαθμίδωσης 6 έως 8 με τη χρήση του προγράμματος Quantity One της Biorad προκειμένου να υπολογιστεί το ποσοστό της VE-cadherin που παραμένει ανθεκτικό στη διαλυτοποίηση με καθένα από τα απορρυπαντικά και στις τρεις σειρές ενδοθηλιακών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν (Πίνακας 3).

<b>HMEC-1</b>	<b>Lubrol WX</b>	<b>Brij 96</b>	<b>TX-100</b>
	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>
<b>VE-cadherin (%)</b>	17,1% ( $\pm 2,8$ )	12,26% ( $\pm 4,7$ )	0%
<b>Καβεολίνη-1(%)</b>	65,3% ( $\pm 1,9$ )	4,24% ( $\pm 0,7$ )	0%
<b><math>\alpha</math>-τουμπουλίνη (%)</b>	0%	0%	0%
<b>HUVEC</b>	<b>Lubrol WX</b>	<b>Brij 96</b>	<b>TX-100</b>
	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>
<b>VE-cadherin(%)</b>	32,2% ( $\pm 3,5$ )	17,6% ( $\pm 1,4$ )	12,1% ( $\pm 2,2$ )
<b>Καβεολίνη-1(%)</b>	51,7% ( $\pm 1,1$ )	19,8% ( $\pm 1,5$ )	38,7 % ( $\pm 0,9$ )
<b><math>\alpha</math>-τουμπουλίνη(%)</b>	0%	0%	0%
<b>HPMEC</b>	<b>Lubrol WX</b>	<b>Brij 96</b>	<b>TX-100</b>
	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>	<b>Κλάσματα 6-8</b> <b>(n=3)</b>
<b>VE-cadherin (%)</b>	6,2% ( $\pm 2,2$ )	0,9% ( $\pm 0,3$ )	1,1% ( $\pm 0,32$ )
<b>Καβεολίνη-1(%)</b>	18,8% ( $\pm 1,9$ )	67,9% ( $\pm 6,3$ )	16,4% ( $\pm 2,1$ )
<b><math>\alpha</math>-τουμπουλίνη(%)</b>	0%	0%	0%

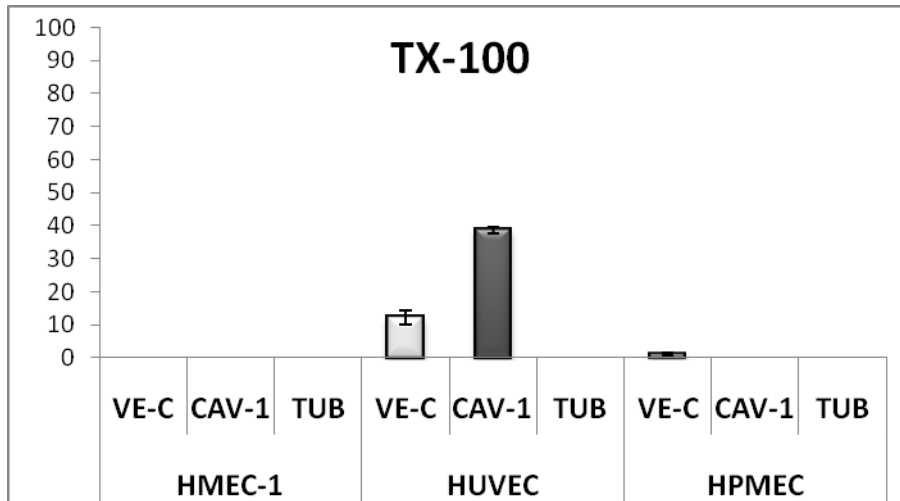
**Πίνακας 3:** Κατανομή της VE-cadherin, της καβεολίνης-1 και της  $\alpha$ -τουμπουλίνης στα ελαφρά κλάσματα 6-8 της βαθμίδωσης στις κυτταρικές σειρές HMEC-1, HUVEC και HPMEC.



**Εικόνα 20:** Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής της VE-cadherin, της καβεολίνης-1 και της  $\alpha$ -τουμπουλίνης στα ελαφρά κλάσματα 6-8 της βαθμίδωσης μετά από διαλυτοποίηση με Lubrol WX σε HMEC-1, σε HUVEC και σε HPMEC.



**Εικόνα 21:** Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής της VE-cadherin, της καβεολίνης-1 και της  $\alpha$ -τουμπουλίνης στα ελαφρά κλάσματα 6-8 της βαθμίδωσης μετά από διαλυτοποίηση με Brij 96 σε HMEC-1, σε HUVEC και σε HPMEC.

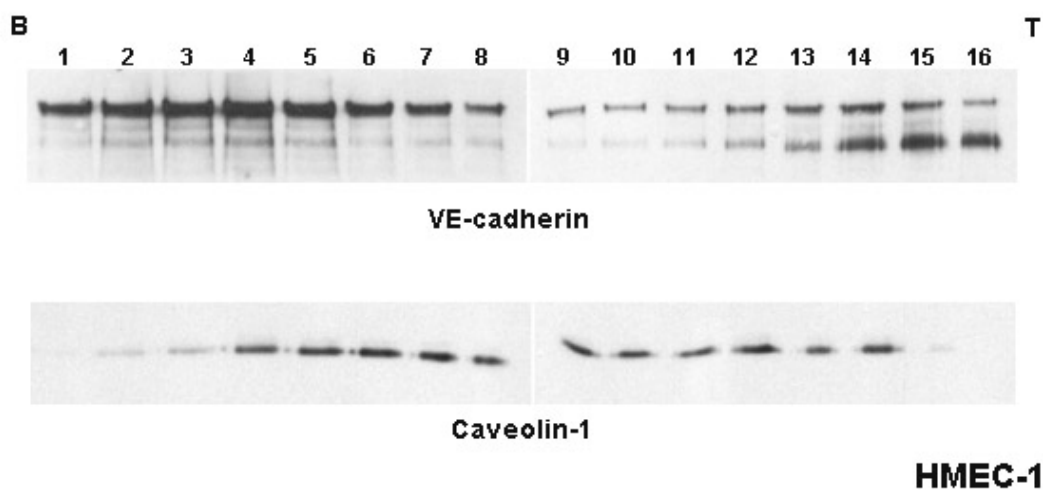


**Εικόνα 22:** Διαγραμματική απεικόνιση της κατανομής της VE-cadherin, της καβεολίνης-1 και της α-τουμπουλίνης στα ελαφρά κλάσματα 6-8 της βαθμίδωσης σε HMEC-1, HUVEC και HPMEC μετά από εκχύλιση με TX-100.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι υπάρχει ένας υποπληθυσμός μορίων της VE-cadherin ο οποίος ανθίσταται στη διαλυτοποίηση με μη ιοντικά απορρυπαντικά και στις τρεις κυτταρικές σειρές.

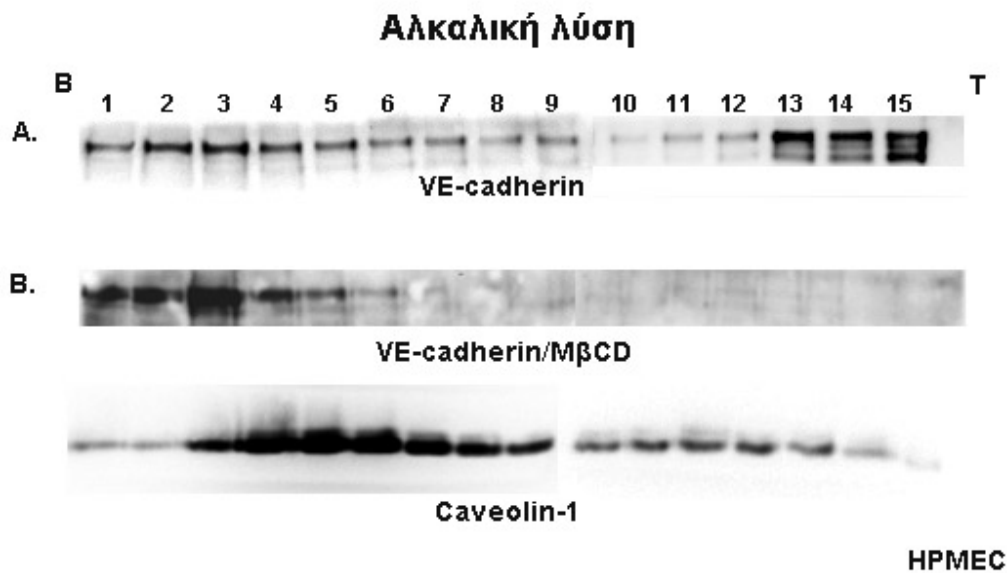
Προκειμένου να ελεγχθούν περαιτέρω τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την χρήση απορρυπαντικών, ακολουθήθηκε και η προσέγγιση της αλκαλικής λύσης σε συνδυασμό με τη χρήση υπερήχων. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στον κατακερματισμό (και όχι διαλυτοποίηση) των μεμβρανών. Το εκχύλισμα που προκύπτει αναμιγνύεται με σακχαρόζη ώστε η τελική συγκέντρωση να γίνει 40%. Το δείγμα τοποθετείται στον πυθμένα σωλήνα φυγοκέντρησης και στη συνέχεια τοποθετούνται διαδοχικά δύο στιβάδες σακχαρόζης με συγκεντρώσεις 30% και 5%. Συλλέχθηκαν οκτώ κλάσματα μετά από υπερφυγοκέντρηση τα οποία αναλύθηκαν με SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με κατάλληλα αντισώματα. Από τα πειράματα αυτά φαίνεται πως μια σημαντική ποσότητα VE-cadherin εντοπίζεται στα κλάσματα χαμηλής πυκνότητας κάτω από αυτές τις συνθήκες (Εικ. 23).

## Αλκαλική λύση



**Εικόνα 23:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin και της καβεολίνης-1 σε εκχυλίσματα κυττάρων HMEC-1 στα οποία έχει γίνει αλκαλική λύση και επίδραση με υπέρηχους. Η αντιστοιχία αρίθμησης των δειγμάτων και συγκέντρωσης σουκρόζης έχει ως εξής: 1-2: 40% σακχαρόζη 3-15: 35% σακχαρόζη 16: 5% σακχαρόζη.

Για να εξετάσουμε αν η επίπλευση της VE-cadherin εξαρτάται από τη χοληστερόλη, ενδοθηλιακά κύτταρα HPMEC επώασθησαν με μεθυλ-β-κυκλοδεξτρίνη (MβCD). Η MβCD χρησιμοποιείται για την αφαίρεση της χοληστερόλης από τις μεμβράνες [(Klein et al., 1995), (Schuck et al., 2003)], προκειμένου να διαταραχθούν οι λιπιδιακές υποπεριοχές. Η επώαση των κυττάρων με MβCD προκάλεσε τη μετατόπιση της VE-cadherin στα κλάσματα υψηλής πυκνότητας, γεγονός που δείχνει ότι η χοληστερόλη αποτελεί σημαντικό συστατικό του λιπιδιακού μικροπεριβάλλοντος της VE-cadherin (Εικ. 24 Β).



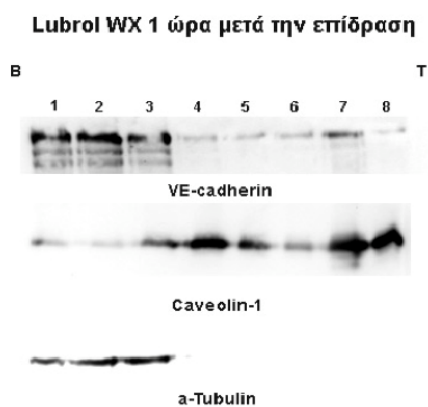
**Εικόνα 24:** Α. Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin σε εκχυλίσματα κυττάρων HPMEC στα οποία έχει γίνει αλκαλική λύση και επίδραση με υπέρηχους. Η αντιστοιχία αρίθμησης των δειγμάτων και συγκέντρωσης σουκρόζης έχει ως εξής: 1-2: 40% σακχαρόζη 3-15: 35% σακχαρόζη 16: 5% σακχαρόζη. Ως θετικό σημείο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε η καβεολίνη-1. Β. Σε αυτή την πειραματική συνθήκη οι μεμβράνες επώαστηκαν αρχικά με MβCD πριν την αλκαλική λύση και την επίδραση με υπέρηχους.

Από τα παραπάνω πειράματα συμπεραίνουμε ότι σε ενδοθηλιακά κύτταρα που έχουν σχηματίσει πλήρες ταπήτιο υπάρχουν υποπληθυσμοί μορίων της VE-cadherin που είναι ανθεκτικοί στην εκχύλιση με μη ιοντικά απορρυπαντικά και συνεντοπίζονται μερικά με πρωτεΐνες δείκτες που είναι γνωστό ότι βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη.

### **3.1.2 Κατανομή της VE-cadherin στις λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης μετά από επίδραση με θρομβίνη**

Οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι του ενδοθηλίου αποσυντίθεται εντός πέντε λεπτών από την επίδραση της θρομβίνης. Το σύμπλοκο της VE-cadherin αναδιανέμεται στη μεμβράνη σε συνδυασμό με αύξηση της διαπερατότητας [(Lampugnani et al., 1992), (Ratcliffe et al., 1999)] μετά από επίδραση με θρομβίνη. Έτσι οι συνδέσεις εξαφανίζονται και επανασχηματίζονται μετά από δύο ώρες. Πρόκειται συνεπώς για μια διαδικασία η οποία χαρακτηρίζεται από έντονη κινητικότητα της VE-cadherin. Γι' αυτό ακολούθησαν πειράματα προκειμένου να διαπιστωθεί αν η VE-cadherin απομακρύνεται ή συγκεντρώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στις λιπιδιακές υποπεριοχές μετά από επίδραση με θρομβίνη και αν επανέρχεται στις δομές αυτές κατά την επαναδημιουργία των συνδέσμων. Πραγματοποιήθηκε επίδραση με 3 U/ml θρομβίνη για 15 λεπτά σε κύτταρα HMEC-1 και στη συνέχεια τα κύτταρα αφέθηκαν να επανέλθουν για 2 ώρες μετά την επίδραση. Λήφθηκαν δείγματα 1 ώρα και 2 ώρες μετά την επίδραση. Λήφθηκε δείγμα 1 ώρα μετά την επίδραση με θρομβίνη καθώς είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι σ' αυτό το χρονικό σημείο υπάρχει αύξηση της ενεργοποίησης μιας GTPασης, της Cdc42 (Kouklis et al., 2004). Στη συνέχεια ακολούθησε εκχύλιση των κυττάρων με 2% Lubrol WX και υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση σακχαρόζης. Για τα πειράματα αυτά η διαλυτοποίηση έγινε με Lubrol WX καθώς από τη διαλυτοποίηση με αυτό το απορρυπαντικό εντοπίζεται η μεγαλύτερη ποσότητα VE-cadherin στα ελαφρά κλάσματα της βαθμίδωσης σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας (Εικ. 25).

A.



B.

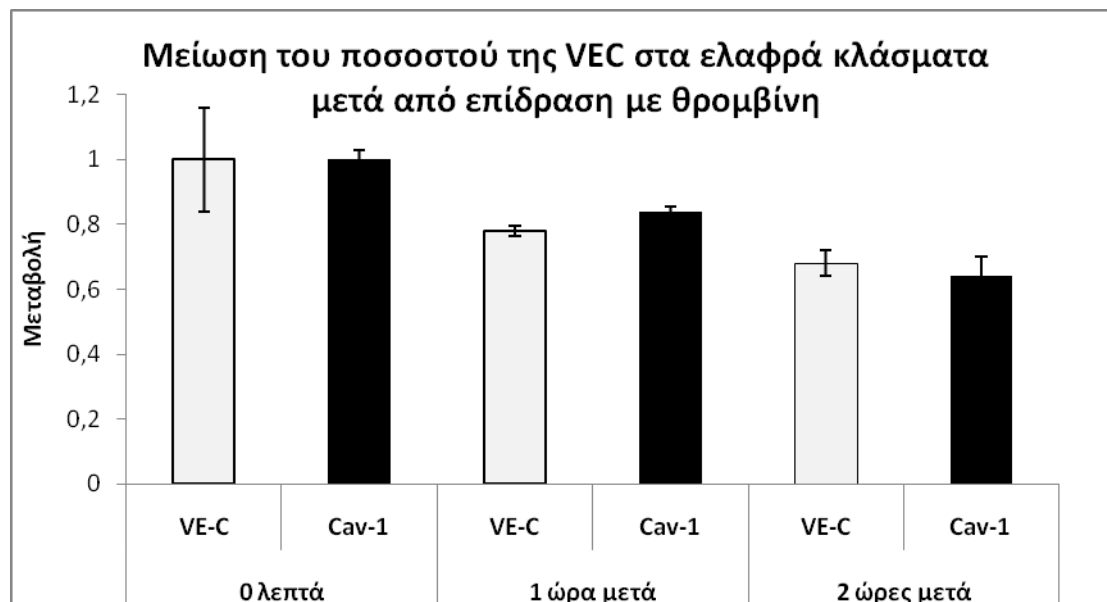


**Εικόνα 25:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin, της καβεολίνης-1 και της α-τουμπουλίνης σε κυτταρικά εκχυλίσματα από HMEC-1 που διαλυτοποιήθηκαν με 2% Lubrol WX 1 ώρα και 2 ώρες μετά την επίδραση με θρομβίνη. Προηγήθηκε επίδραση για 15 λεπτά με 3 U/ml θρομβίνη.

Ακολούθησε ποσοτικοποίηση με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Image J (Πίνακας 4). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα και αναφέρονται στην ποσότητα της πρωτεΐνης στα κλάσματα 6 έως 8 της βαθμίδωσης.

	<b>VE-cadherin στα κλάσματα (6-8)</b>	<b>Καβεολίνη-1 στα κλάσματα (6-8)</b>
<b>Κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας</b>	17,1% ( $\pm 2,8$ )	65,3 % ( $\pm 1,9$ )
<b>1 ώρα μετά την επίδραση με θρομβίνη</b>	13,5 % ( $\pm 0,3$ )	55,2 % ( $\pm 1$ )
<b>2 ώρες μετά την επίδραση με θρομβίνη</b>	11,7% ( $\pm 0,7$ )	42,1% ( $\pm 3,8$ )

**Πίνακας 4:** Κατανομή της VE-cadherin και της καβεολίνης-1 στα ελαφρά κλάσματα 6-8 της βαθμίδωσης σε HMEC-1 σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας καθώς και 1 ώρα και 2 ώρες μετά από επίδραση με θρομβίνη.



**Εικόνα 26:** Διαγραμματική απεικόνιση της μεταβολής της ποσότητας της VE-cadherin και της καβεολίνης-1 στα ελαφρά κλάσματα κατά την ανάκαμψη των συνδέσμων προσκόλλησης μετά την επίδραση με θρομβίνη. Το ποσοστό της πρωτεΐνης στα ελαφρά κλάσματα των κυττάρων εν ηρεμία λήφθηκε ως σημείο αναφοράς ίσο με 1.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η ποσότητα της VE-cadherin που εντοπίζεται στις λιπιδιακές μικροπεριοχές φαίνεται ότι μειώνεται κατά την επανασυγκρότηση των συνδέσμων προσκόλλησης μετά από επίδραση με θρομβίνη (Εικ. 26). Η μείωση αυτή αν και είναι μικρού μεγέθους εμφανίζεται με εξαιρετικά επαναλαμβανόμενο τρόπο μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων.

### 3.1.3 Συνεντοπισμός του διαμεμβρανικού/κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin με το PIP2

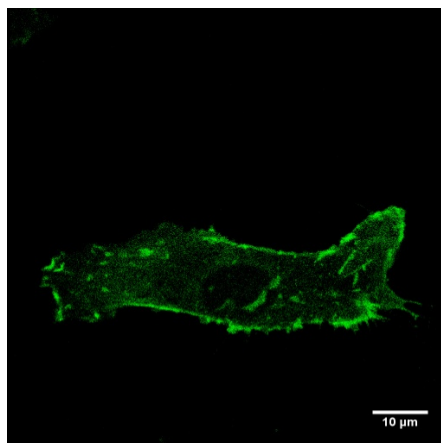
Σε προηγούμενες μελέτες είχε αναφερθεί ότι η έκφραση του κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin προκαλεί την ενεργοποίηση μηχανισμών πολυμερισμού της ακτίνης και δημιουργία μεμβρανικών προσεκβολών (Kouklis et al. 2003). Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια της κυτταρικής μετανάστευσης, όπου υπάρχει ενεργοποίηση παρόμοιων μηχανισμών, κεντρικό ρόλο παίζουν τα λιπίδια PIP2 και PIP3 [Devreotes and Janetopoulos, 2003] (Dawes and Edelstein-Keshet, 2007)]. Αρχικά μελετήθηκε ο εντοπισμός ενός τμήματος της VE-cadherin που περιλαμβάνει



την διαμεμβρανική και κυτταροπλασματική περιοχή με το PIP2 του κυττάρου για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ τους. Για τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν:

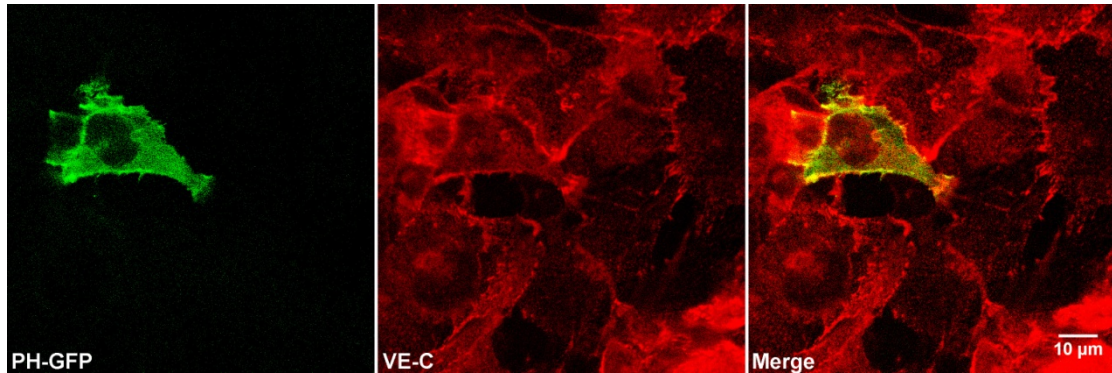
- α) αθανатоποιημένα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου (HMEC-1 Human Microvascular Endothelial Cells),
- β) ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) και
- γ) ανθρώπινα πνευμονικά μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα (HPMEC, Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells).

Ο εντοπισμός λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες είναι σχετικά δύσκολο να γίνει με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων και γι' αυτό το λόγο έχει αναπτυχθεί μια τεχνολογία που βασίζεται στην έκφραση ειδικών πρωτεϊνικών περιοχών που προσδέονται με μεγάλη εξειδίκευση σε συγκεκριμένους τύπους λιπιδίων. Για την σήμανση της κυτταρικής κατανομής του λιπιδίου PIP2, εκφράστηκε στα ενδοθηλιακά κύτταρα η χμαιοική πρωτεΐνη PH (Pleckstrin Homology) –GFP (Green fluorescent protein). Η περιοχή PH προέρχεται από την πρωτεΐνη phospholipase D, η οποία συνδέεται ειδικά με το PIP2 (και όχι με το PIP3 ή άλλα φωσφολιπίδια) (Stauffer et al., 1998). Μετά από πειράματα παροδικής διαμόλυνσης κυττάρων HMEC-1, η PH-GFP εντοπίζεται σε περιοχές τόσο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, όσο και στο κυτταρόπλασμα (Εικ. 27).



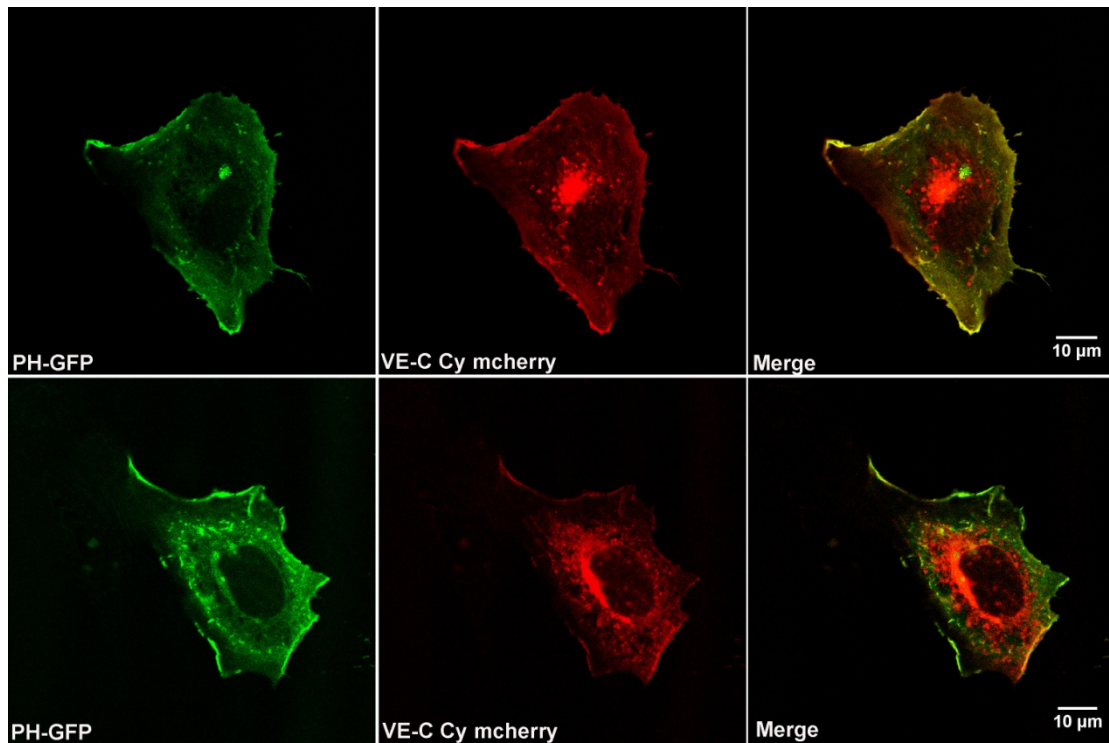
**Εικόνα 27:** Κατανομή του PH-GFP μετά από ηλεκτροδιάτρηση σε ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1.

Κατόπιν, εξετάστηκε αν η ενδογενής VE-cadherin συνεντοπίζεται με το PIP2. Ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1 διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός για την ενδογενή VE-C. Φαίνεται ότι η ενδογενής VE-cadherin συνεντοπίζεται τουλάχιστον μερικώς με το λιπίδιο PIP2 (Εικ. 28).



**Εικόνα 28:** Ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν διαμολυνθεί με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός για την ενδογενή VE-cadherin.

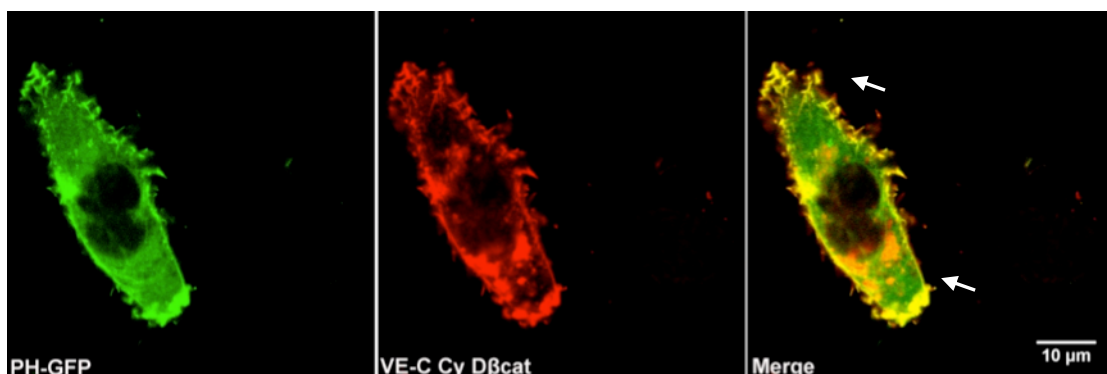
Στη συνέχεια ελέγχθηκε ο συνεντοπισμός μεταξύ του λιπιδίου PIP2 και ενός τμήματος της VE-cadherin του οποίου έχει αφαιρεθεί το εξωκυττάριο τμήμα με μεταλλαξιγένεση, έτσι ώστε να περιλαμβάνει τη διαμεμβρανική και την κυτταροπλασματική περιοχή του μορίου (VE-C Cy).



**Εικόνα 29:** Κύτταρα HMEC-1 που έχουν συνδιαμολυνθεί με τα πλασμίδια έκφρασης PH-GFP και VE-Cy mcherry. Στην τρίτη εικόνα (merge) φαίνεται ο μερικός συνεντοπισμός των δύο πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη.

Η μεταλλαγμένη αυτή μορφή εκφράστηκε είτε ως χμαιρική πρωτεΐνη με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry, που είναι μονομερές, είτε χωρίς αυτή. Σε αυτή την περίπτωση, ο εντοπισμός της έγινε μέσω του επιτόπου FLAG που έχει εισαχθεί στο μόριο. Ενδοθηλιακά κύτταρα συνδιαμολύνθηκαν με την κατασκευή PH-GFP και τη VE-Cy mcherry. Από τα πειράματα αυτά προέκυψε ότι το κυτταροπλασματικό τμήμα της VE-cadherin συνεντοπίζεται μερικώς με το φωσφολιπίδιο PIP2 (Εικ. 29).

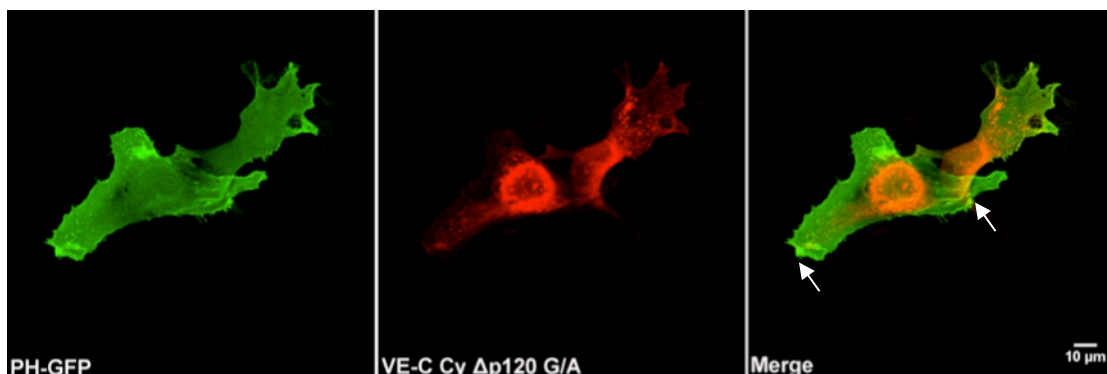
Προκειμένου να διαπιστωθεί αν ο κυτταροσκελετός της ακτίνης παίζει κάποιο ρόλο στη σχέση συνεντοπισμού μεταξύ αυτών των δύο μορίων ακολούθησαν πειράματα όπου εκφράστηκε η πλασμιδιακή κατασκευή από την οποία λείπει η θέση σύνδεσης με την β-κατενίνη (VE-Cy Δβcat). Η μορφή αυτή φέρει τον επίτοπο FLAG. Ενδοθηλιακά κύτταρα διαμολύνθηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές VE-Cy Δβcat και PH-GFP και ακολούθησε ανοσοφθορισμός για τον επίτοπο FLAG.



**Εικόνα 30:** Συνεντοπισμός του VE-Cy Δβcat με το PIP2 (υποδεικνύεται με βέλη). Ο συνεντοπισμός εμφανίζεται αποκλειστικά σε περιοχές της μεμβράνης.

Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι το VE-C Cy Δβcat παρουσιάζει σχεδόν πλήρη συνεντοπισμό με το PH-GFP στην πλασματική μεμβράνη (Εικ. 30). Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η τοπολογία της VE-cadherin επηρεάζεται από α) τη διαμεσολαβούμενη από τη β-κατενίνη σύνδεση με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, β) και από το λιπιδιακό περιβάλλον.

Το κυτταροπλασματικό τμήμα των μορίων καδερίνης συνδέεται επίσης με την p120, που ανήκει στην οικογένεια των κατενινών, σε μια καλά χαρακτηρισμένη παραμεμβρανική περιοχή που περιλαμβάνει τα αμινοξέα GGG. Ακολούθησαν πειράματα ηλεκτροδιάτρησης κυττάρων HMEC-1 με τις κατασκευές VE-C Cy Δp120 G/A και PH-GFP. Από τη μεταλλαγμένη αυτή μορφή απουσιάζει η θέση σύνδεσης της p120. Η μορφή αυτή της VE-cadherin φέρει επίσης τον επίτοπο FLAG.



**Εικόνα 31:** Κύτταρα HMEC-1 συνδιαμολύνθηκαν με τις κατασκευές PH-GFP και VE- C Cy Δp120 G/A.

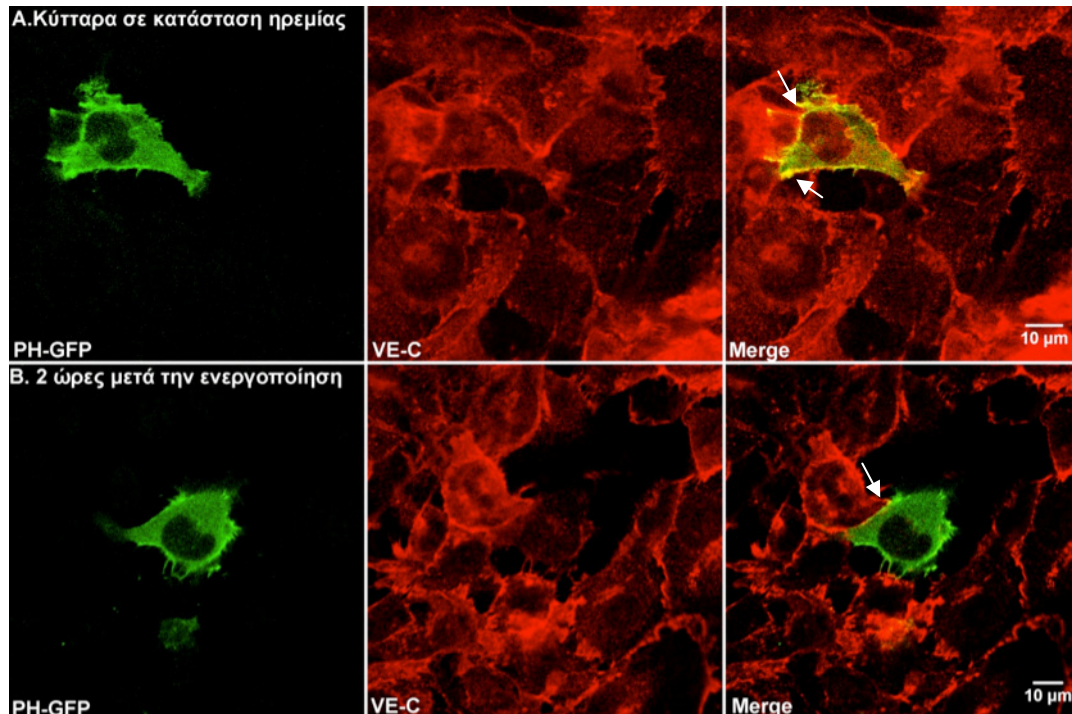
Από τη συνέκφραση του PH-GFP με τη VE-C Cy Δp120 G/A τροποποιείται ο φαινότυπος που προέκυπτε από την έκφραση μόνο της πλασμιδιακής κατασκευής VE-C Cy Δp120 G/A. Παρατηρήθηκε ότι ενώ το PH-GFP εντοπίζεται στην περιοχή της μεμβράνης η μεταλλαγμένη μορφή VE-C Cy Δp120 G/A δεν εντοπίζεται στην

ίδια περιοχή (Εικ. 31). Συνεπώς η σύνδεση της VE-cadherin με την πρωτεΐνη p120 παίζει σημαντικό ρόλο για τον συνεντοπισμό της με το PIP2.

### 3.1.4 Ο ρόλος του φωσφολιπιδίου PIP2 κατά την επανασύσταση των συνδέσμων προσκόλλησης μετά από επίδραση θρομβίνης

Εξετάστηκε η τοπολογία του PIP2 στην παρουσία θρομβίνης (1-3 Units/ml), ενός παράγοντα που προκαλεί φλεγμονή, αποσύνθεση των ενδοθηλιακών διακυτταρικών συνδέσμων και είναι δυνατόν να επηρεάζει την τοπολογία τόσο της VE-cadherin όσο και του PIP2. Σε χρονικό διάστημα 15 λεπτών, η αποσύνθεση των ενδοκυτταρικών συνδέσμων είναι πλήρης, ενώ το φαινόμενο είναι αντιστρεπτό: οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι επανασχηματίζονται με αυθόρμητο τρόπο μετά από δύο ώρες.

Τα διαμολυσμένα με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση ανοσοφθορισμού για την ενδογενή VE-cadherin και συνεστιακή μικροσκοπία. Η μελέτη της κατανομής του PIP2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1 μετά από ενεργοποίηση με θρομβίνη έγινε σε τρεις χρονικές στιγμές : 0 λεπτά, 15 λεπτά επίδρασης και 2 ώρες μετά την επίδραση.



**Εικόνα 32:** A. Ενδοθηλιακά κύτταρα διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός για την ενδογενή VE-cadherin. B. Πραγματοποιήθηκε επίδραση με 3 U/ml θρομβίνη για 15 λεπτά και αφέθηκαν να επανασχηματιστούν οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι 2 ώρες μετά την επίδραση. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός για την ενδογενή VE-cadherin.

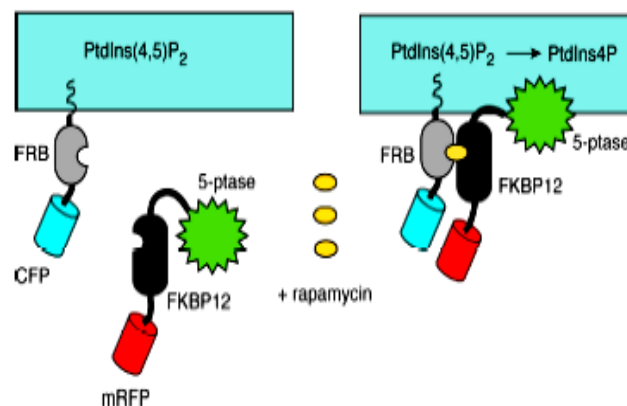


Παρατηρήθηκε ότι το λιπίδιο PIP2 συνεντοπίζεται με την ενδογενή VE-cadherin τουλάχιστον μερικώς σε κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας (Εικ. 32 Α). **Ωστόσο, μετά την επίδραση με τη θρομβίνη φαίνεται ότι το PH-GFP εμποδίζει το σχηματισμό των διακυτταρικών συνδέσεων ακόμη και δύο ώρες μετά την επίδραση, χρονικό σημείο κατά το οποίο σε φυσιολογικές συνθήκες οι διακυτταρικοί σύνδεσμοι επανέρχονται** (Εικ. 32 Β).

Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτά, φαίνεται ότι το PIP2 εμπλέκεται στη δυναμική των διακυτταρικών συνδέσεων. Επίσης είναι πιθανόν η ακολουθία PH συνδεόμενη με το PIP2 να παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του με άλλες πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη δημιουργία των συνδέσεων προσκόλλησης. Η πιθανότητα αυτή εξετάστηκε παρακάτω σε πειράματα μειорύθμισης του PIP2.

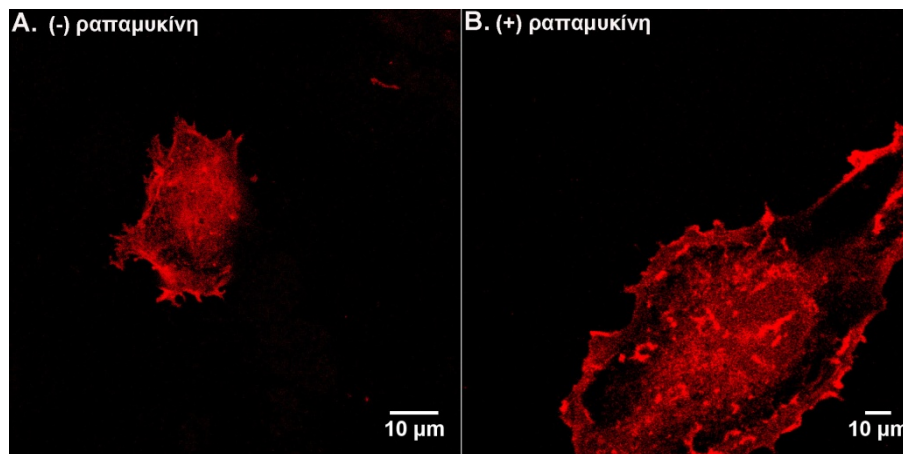
### 3.1.5 Στοχευμένη μειорύθμιση των επιπέδων του PIP2 δεν διασπά τους συνδέσμους προσκόλλησης, αλλά αποτρέπει το σχηματισμό τους

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω ο ρόλος του PIP2 όσον αφορά στους συνδέσμους χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση η οποία βασίζεται στη ελεγχόμενη μειорύθμιση των επιπέδων του PIP2 μέσω επαγωγής της λιπιδιακής φωσφατάσης IV 5-ptase στη μεμβράνη, διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από την παρουσία ραπαμυκίνης (Varnai et al., 2006). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον ετεροδιμερισμό της επικράτειας FRB (Fragment of mammalian target of rapamycin, mTOR), που προσδένει στην FKBP12. Η φωσφατάση είναι συνδεδεμένη με την πρωτεΐνη FKBP12 και μετά την προσθήκη ραπαμυκίνης το ένζυμο μετακινείται στη μεμβράνη όπου βρίσκεται η επικράτεια FRB με την οποία συνδέεται (Εικ. 33).



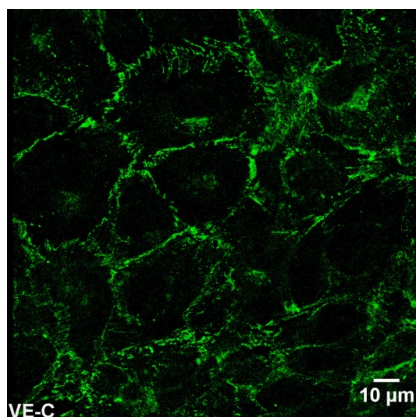
**Εικόνα 33:** Ετεροδιμερισμός της επικράτειας FRB-CFP με την κυτταροπλασματική φωσφατάση IV 5-ptase η οποία συνδέεται με την FKBP12-mRFP μετά από προσθήκη ραπαμυκίνης οδηγεί στη στρατολόγηση της φωσφατάσης στη μεμβράνη με αποτέλεσμα την αποφωσφορύλωση του PIP2 (Varnai et al., 2006).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε συνδιαμόλυνση των πλασμιδιακών κατασκευών FRB-CFP και 5ptase-FKBP12mRFP σε ενδοθηλιακά κύτταρα HPMEC με ηλεκτροδιάτρηση. Η φωσφατάση εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα χωρίς την προσθήκη ραπαμυκίνης, ενώ μετά την προσθήκη ραπαμυκίνης μετακινείται στη μεμβράνη (Εικ. 34).



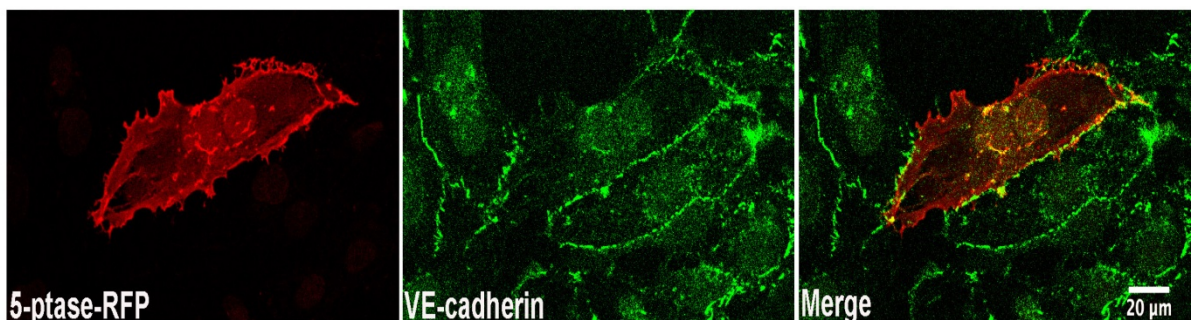
**Εικόνα 34:** (A) Η IV 5-ptase απουσία ραπαμυκίνης εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. (B) Μετά την προσθήκη 100 nM ραπαμυκίνης μετατοπίζεται στην περιοχή της μεμβράνης.

Ακολούθησαν πειράματα συνδιαμόλυνσης κυττάρων με τις πλασμιδιακές κατασκευές FRB-CFP και 5ptase-FKBP12mRFP σε ενδοθηλιακά κύτταρα HPMEC με ηλεκτροδιάτρηση. Τα κύτταρα αφέθηκαν για 48 ώρες προκειμένου να δημιουργήσουν ένα πλήρες ταπήτιο. Μετά από το χρονικό αυτό διάστημα ακολούθησε ενεργοποίηση του συστήματος με προσθήκη 100 nM ραπαμυκίνης, ποσότητα που δεν προκαλεί αλλαγή στον ενδοθηλιακό φαινότυπο για 4 ώρες (Εικ. 35).



**Εικόνα 35:** Κύτταρα HPMEC στα οποία έχει πραγματοποιηθεί επίδραση με 100 nM ραπαμυκίνης για 4 ώρες. Όπως φαίνεται δεν προκύπτει κάποια αλλαγή στο φαινότυπο τους από την επίδραση.

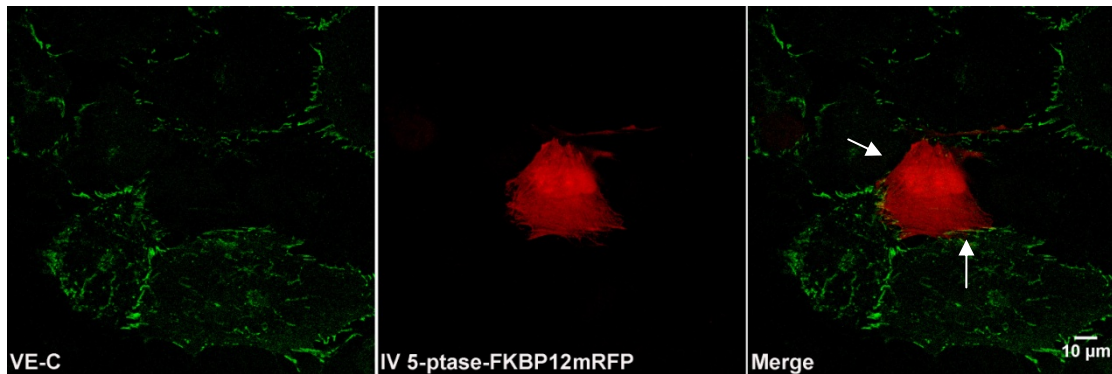
Στη συνέχεια τα δείγματα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε χρώση ανοσοφθορισμού και συνεστιακή μικροσκοπία. Παρατηρήθηκε ότι η ενεργοποίηση της IV 5-ptase και η μετατόπιση της στη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή των διακυτταρικών συνδέσμων αλλά σε μικρό αριθμό κυττάρων, γεγονός που δεν μπορεί να εκτιμηθεί ως στατιστικά σημαντικό (Εικ. 36). Επομένως, φαίνεται ότι η επίδραση της IV 5-ptase σε κύτταρα που έχουν σχηματίσει πλήρες ταπήτιο δεν προκαλεί την προφανή αποσύνθεση των διακυτταρικών συνδέσμων, σύμφωνα με την χρώση της VE-cadherin.



**Εικόνα 36:** Κύτταρα HPMEC διαμολύνθηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές FRB-CFP και 5ptase-FKBP12mRFP. Ακολούθησε ενεργοποίηση με 100 nM ραπαμυκίνης για 4 ώρες και ανοσοφθορισμός για την ενδογενή VE-cadherin.

Ακολούθησαν πειράματα προκειμένου να διαπιστωθεί αν είναι δυνατή η επανασύσταση των διακυτταρικών συνδέσεων απουσία PIP2. Έτσι κύτταρα HPMEC που εκφράζουν FRB-CFP και 5ptase-FKBP12mRFP αφέθηκαν να σχηματίσουν συνδέσμους. 48 ώρες μετά την ηλεκτροδιάτρηση πραγματοποιήθηκε διάρρηξη των διακυτταρικών συνδέσμων με την προσθήκη θρεπτικού μέσου που περιείχε 2 mM EDTA για 20 λεπτά και επίδραση 100 nM ραπαμυκίνης για 4 ώρες στους 37°C. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανοσοφθορισμός για την VE-cadherin.





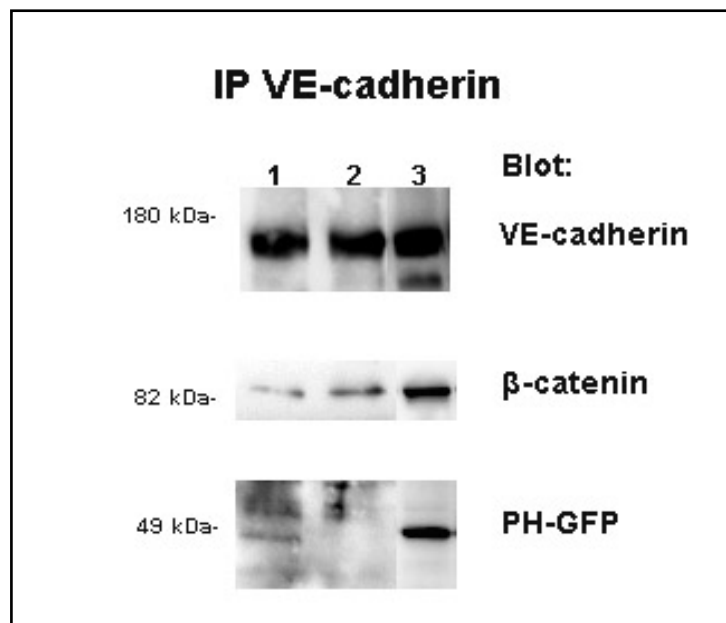
**Εικόνα 37:** Ενδοθηλιακά κύτταρα HPMEC διαμολύνθηκαν με τις κατασκευές FRB-CFP και 5ptase-FKBP12mRFP. Ακολούθησε διάρρηξη των συνδέσεων με την προσθήκη EDTA και επίδραση με ραπαμυκίνη για 4 ώρες.

Διαπιστώθηκε ότι η επανασύσταση των διακυτταρικών συνδέσεων γίνεται κανονικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά όχι στα κύτταρα όπου έχει δράσει η ενεργοποιημένη IV 5 ptase (Εικ. 37). Συνεπώς, το PIP2 επιδρά στη δυναμική των συνδέσεων καθώς η απομάκρυνση του από τη μεμβράνη έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία σχηματισμού τους. Το αποτέλεσμα αυτό εξηγεί γιατί η απενεργοποίηση των Rac και Cdc42 προκαλεί παρεμπόδιση του σχηματισμού των συνδέσεων προσκόλλησης. Είναι πιθανό επίσης και άλλες πρωτεΐνες να συνδέονται με το PIP2.

### 3.1.6 Σύνδεση της VE-cadherin με την περιοχή PH μετά από χημική σταυροσύνδεση *in vivo*

Προκειμένου να διαπιστώσουμε αν η VE-cadherin αλληλεπιδρά με το PIP2 πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκατακρήμνισης μετά από *in vivo* χημική σταυροσύνδεση. Συγκεκριμένα, ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1 διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP που συνδέεται ειδικά με το φωσφολιπίδιο PIP2. Στη συνέχεια προστέθηκε στην καλλιέργεια ο χημικός διασυνδέτης DSP σε συγκέντρωση 400 μg/ml και τα κύτταρα εκχυλίσθηκαν με το απορρυπαντικό TX-100. Στα πειράματα χημικής σταυροσύνδεσης ως διασυνδέτης χρησιμοποιήθηκε ο διθειοδισουκινιμιδυλικός προπιονικός εστέρας DSP. Ο εστέρας αυτός αντιδρά με πρωτοταγείς αμίνες και σχηματίζει ομοιοπολικούς αμιδικούς δεσμούς. Το αδιάλυτο υλικό περιέχει τις πρωτεΐνες των οποίων οι αλληλεπιδράσεις σταθεροποιήθηκαν με τη χρήση του DSP. Το υλικό αυτό διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα με την εξής σύσταση : 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 30 mM Hepes (pH 7.4), 1% TX-100,

6M ουρία. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι της VE-cadherin. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western προκειμένου να διαπιστωθεί αν η VE-cadherin συγκατακρημνίζεται με το PH-GFP. Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η χημική σταυροσύνδεση προκάλεσε τη συγκατακρήμιση μεταξύ VE-cadherin και PH-GFP (Εικ. 38). Συνεπώς τα δύο μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, αλλά δεν είναι σαφές εάν η αλληλεπίδραση αυτή είναι άμεση ή έμμεση καθώς δεν έχει αποδειχθεί ότι η VE-cadherin περιέχει κάποια περιοχή άμεσης σύνδεσης με το PIP2.



**Εικόνα 38:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP. Ανοσοκατακρήμιση (IP) της VE-cadherin σε εκχύλισμα κυττάρων HMEC-1 τα οποία είχαν διαμολυνθεί με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP. Διαδρομή 1: ανοσοκατακρήμιση έναντι της VE-cadherin σε εκχύλιμα κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με PH-GFP παρουσία 400 μg/ml χημικού διασυνδέτη DSP, διαδρομή 2: ανοσοκατακρήμιση έναντι της VE-cadherin σε εκχύλιμα κυττάρων απουσία χημικού διασυνδέτη, διαδρομή 3: εκχύλιμα κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με την πλασμιδιακή κατασκευή PH-GFP. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin και της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP.

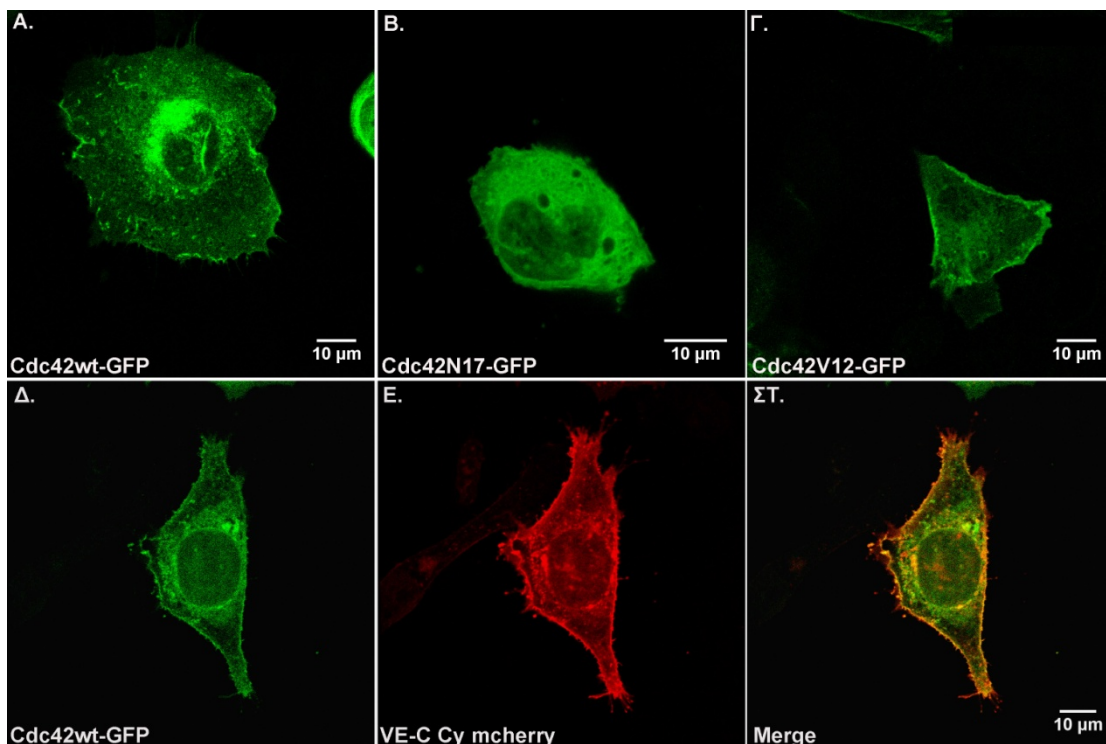
### 3.2 Αλληλεπιδράσεις της Cdc42 με πρωτεΐνες-μέλη των διακυτταρικών συνδέσμων (AJs)

Οι πρωτεΐνες Cdc42 και Rac-1 εμπλέκονται στο σχηματισμό των συνδέσμων προσκόλλησης και στη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού. Οι πρωτεΐνες αυτές όταν ενεργοποιηθούν συνδέονται με τα φωσφολιπίδια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης PIP2 και PIP3 και προκαλούν στη συνέχεια την έναρξη πολυμερισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Δεδομένου της σχέσης μεταξύ VE-cadherin και PIP2 εξετάστηκε στη συνέχεια η πιθανότητα άμεσης ή έμμεσης σύνδεσης της Cdc42 με το σύμπλοκο cadherin/catenin.

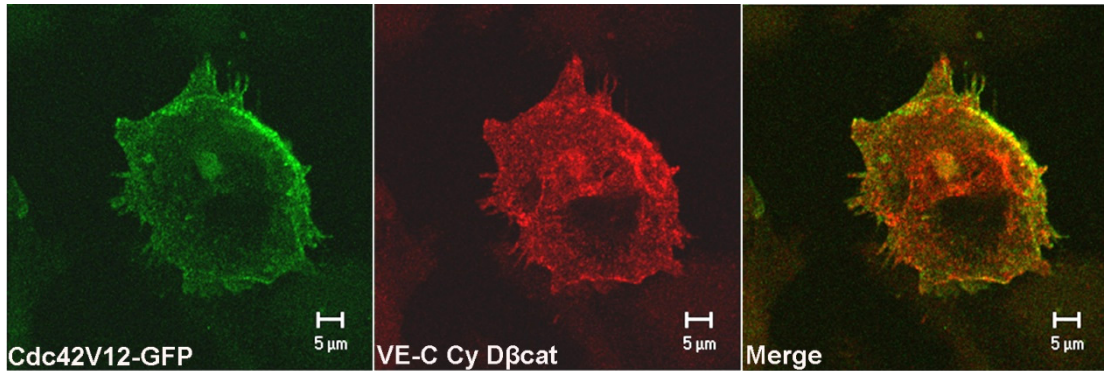
#### 3.2.1 Συσχέτιση της έκφρασης του κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin και των $\beta$ - και p120 κατενινών με τον εντοπισμό της Cdc42

Προκειμένου να μελετηθεί η σχέση μεταξύ της VE-cadherin και Cdc42 ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC συνδιαμολύνθηκαν με τις πλασμιδιακές κατασκευές Cdc42wt-GFP και VE-C Cy mcherry.



**Εικόνα 39:** Έκφραση της wtCdc42-GFP και των μεταλλαγμάτων Cdc42N17-GFP (επικρατές αρνητικό) και Cdc42V12-GFP (ιδιοστατικά ενεργό) (Α-Γ). Συνέκφραση της wtCdc42-GFP με το κυτταροπλασματικό τμήμα VE-C Cy mcherry (Δ-ΣΤ).

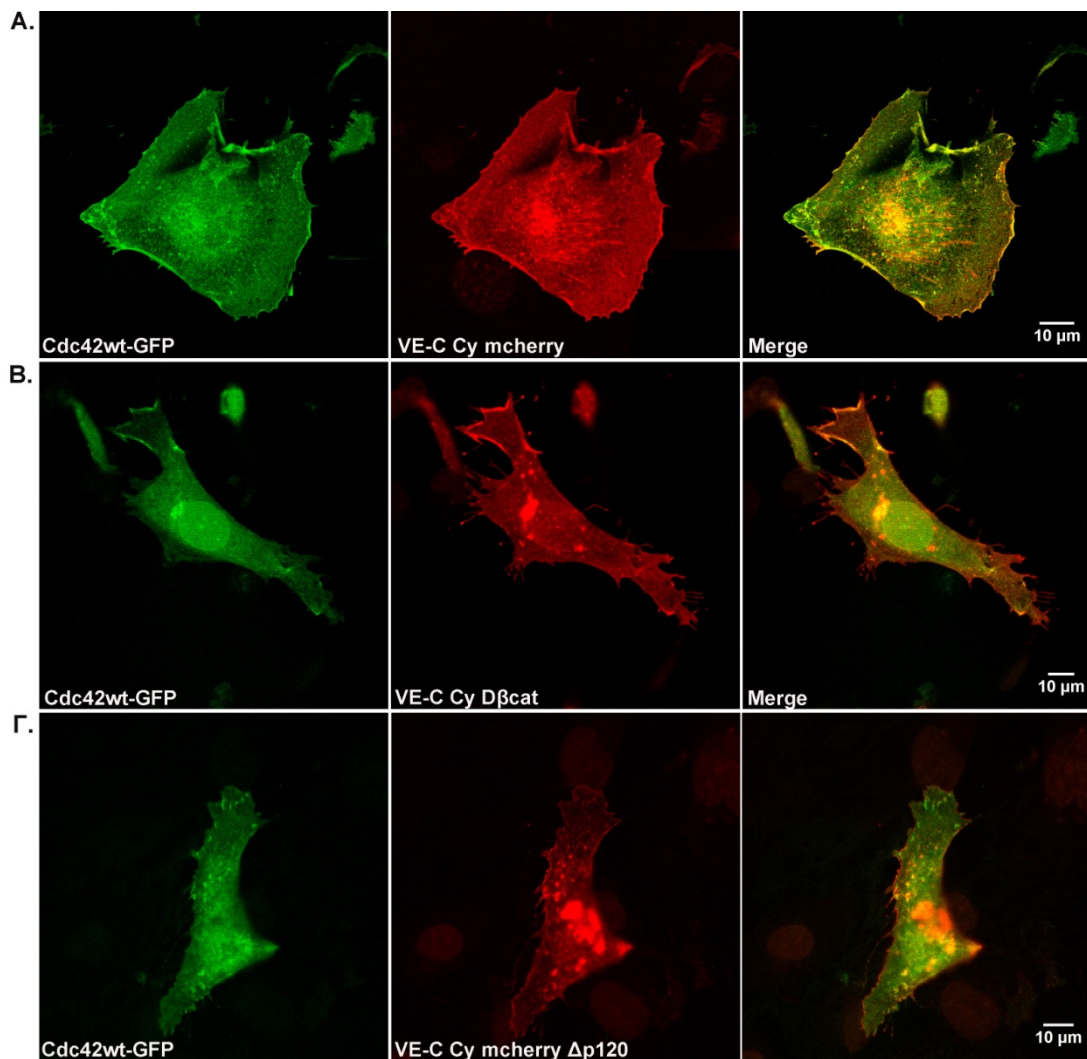
Από τα πειράματα αυτά προκύπτει ότι η Cdc42wt-GFP συνεντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό με το κυτταροπλασματικό τμήμα VE-C Cy-mcherry όταν αυτό βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Παρατηρούμε επίσης ότι σε αυτά τα κύτταρα ο μεμβρανικός εντοπισμός της Cdc42 αγρίου τύπου αυξάνει σε σύγκριση με κύτταρα που εκφράζουν μόνο Cdc42wt-GFP (Εικ. 39 Δ-ΣΤ). Προφανώς πρόκειται για Cdc42 που όπως έχει δειχθεί ενεργοποιείται λόγω της έκφρασης του κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin, VE-C Cy mcherry (Kouklis et al., 2003).



**Εικόνα 40:** Συνέκφραση της Cdc42V12-GFP (ιδιοστατικά ενεργό μετάλλαγμα) με το κυτταροπλασματικό τμήμα VE-C Cy mcherry.

Για να εξετασθεί αν για το εντοπισμό της Cdc42 στη μεμβράνη συμμετέχουν οι κατενίνες β-catenin και η p120, που συνδέονται με την VE-cadherin, έγινε συνδιαμόλυνση της Cdc42-GFP με κάθε μια από τις μεταλλαγμένες μορφές της VE-cadherin, VE-C Cy Δβcat και VE-C Cy Δp120. Από τις μορφές αυτές έχουν απαλειφθεί οι περιοχές σύνδεσης της β-κατενίνης και p120 αντίστοιχα.

Όταν η Cdc42 συνεκφράσθηκε με τη VE-C Cy Δp120 δεν παρατηρήθηκε συνεντοπισμός σε παρόμοια έκταση με αυτή που συμβαίνει με την VEC Cy αγρίου τύπου (Εικ. 41 Γ). Το αποτέλεσμα αυτό συνιστά ότι η παρουσία της p120 συμμετέχει στη στρατολόγηση της Cdc42 στην περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που βρίσκεται η VE-cadherin. Αντίθετα η απουσία της β-κατενίνης δεν απέτρεψε τον συνεντοπισμό της Cdc42 με την VEC Cy Δβcat (Εικ. 41 Β).

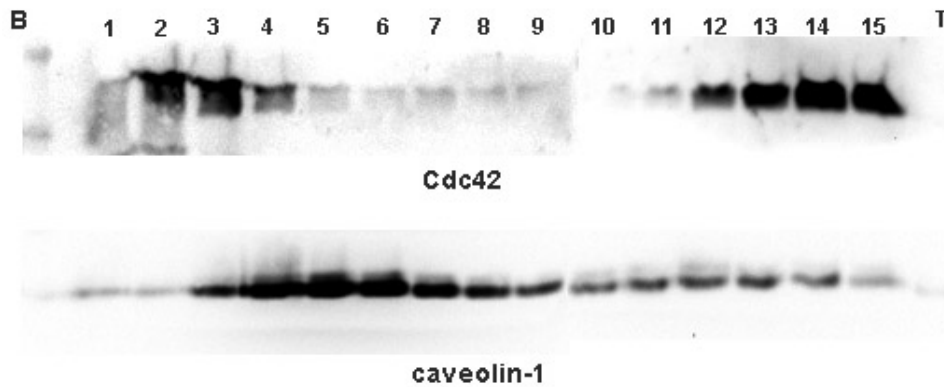


**Εικόνα 41:** Συνέκφραση της Cdc42wt με το κυτταροπλασματικό τμήμα VE-Cy mcherry (Σειρά A) και με τις μεταλλαγμένες μορφές VE-Cy Δp120 (B) και VE-Cy Δβcat (Γ).

### 3.2.2 Πιθανός εντοπισμός της Cdc42 σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης

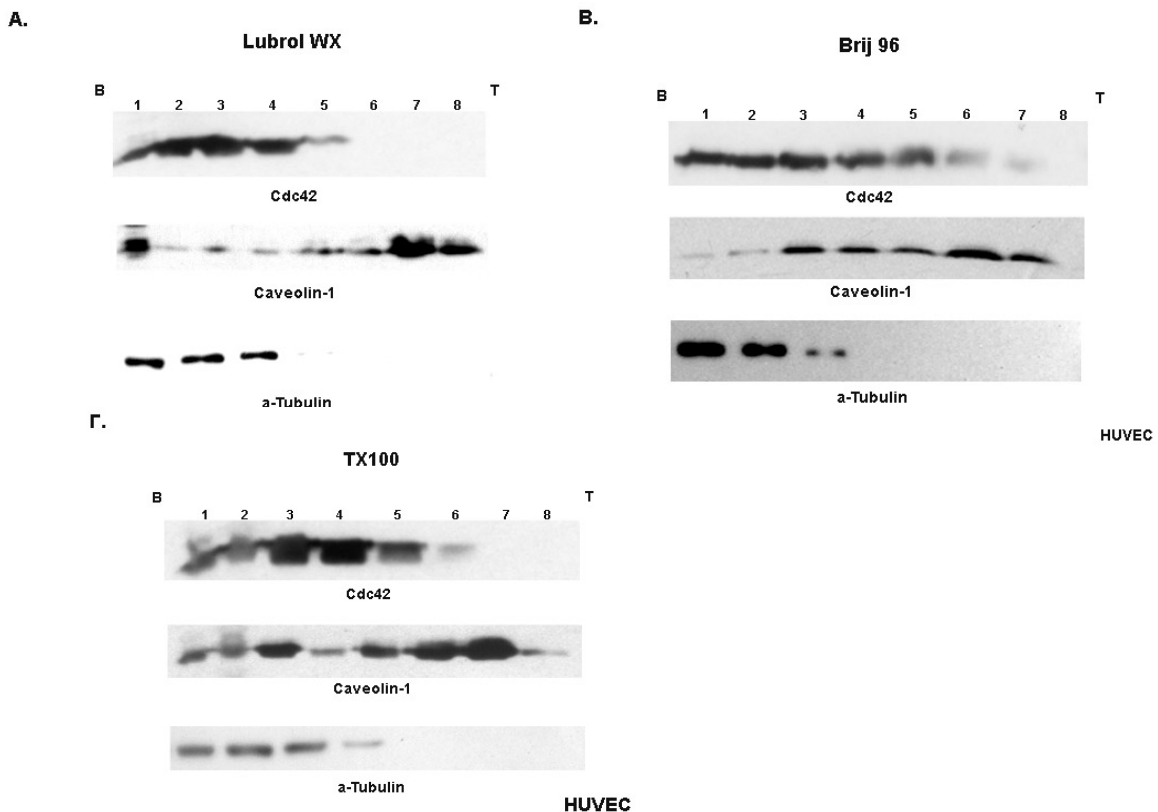
Με αφορμή την παρατήρηση αυτή ακολούθησαν βιοχημικά πειράματα προκειμένου να διαπιστωθεί αν η Cdc42 εντοπίζεται σε εξειδικευμένες λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης. Είναι γνωστό ότι η Cdc42 αφού ενεργοποιηθεί δημιουργεί ένα σύμπλοκο με την WASP και το PIP2 στη μεμβράνη. Αρχικά ακολουθήθηκε η προσέγγιση της αλκαλικής λύσης ενδοθηλιακών κυττάρων HPMEC. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ένα σημαντικό τμήμα της Cdc42 επέπλευσε στα ελαφρά κλάσματα (Εικ. 42).

## Αλκαλική λύση



**Εικόνα 42:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της Cdc42 σε εκχυλίσματα κυττάρων HPMEC στα οποία έχει γίνει αλκαλική λύση και επίδραση με υπέρηχους. Η αντιστοιχία αρίθμησης των δειγμάτων και συγκέντρωσης σουκρόζης έχει ως εξής: 1-2: 40% σουκρόζη 3-15: 35% σακχαρόζη 16: 5% σακχαρόζη.

Τα πειράματα αυτά δείχνουν εντοπισμό της Cdc42 σε περιοχές της μεμβράνης. Ακολούθησαν πειράματα εκχύλισης κυττάρων HUVEC με τα απορρυπαντικά Lubrol WX, Brij 96 και TX-100. Παρόμοια πειράματα πραγματοποιήθηκαν και στις κυτταρικές σειρές HMEC-1 και HPMEC αλλά φαίνεται ότι αυτές εκφράζουν χαμηλά επίπεδα Cdc42, γεγονός που δεν επέτρεψε την περαιτέρω ανάλυση σχετικά με την κατανομή της πρωτεΐνης σε αυτές.





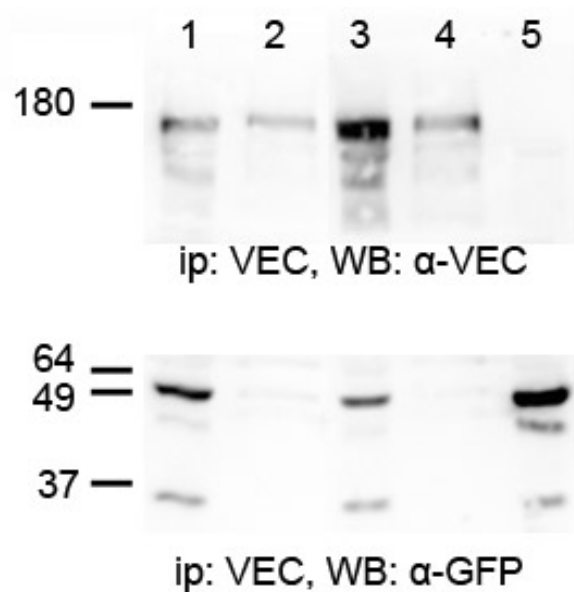
**Εικόνα 43:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της Cdc42, της καβεολίνης-1 και της α-τουμπουλίνης σε εκχυλίσματα κυττάρων HUVEC που διαλυτοποιήθηκαν με Lubrol WX (A), Brij 96 (B) και TX-100 (Γ).

Μετά τη διαλυτοποίηση των κυττάρων με Lubrol WX σε συγκέντρωση 2% σε κύτταρα HUVEC η Cdc42 εντοπίζεται στα κατώτερα κλάσματα της βαθμίδωσης (Εικ. 43 A). Με τη χρήση του απορρυπαντικού Brij 96 σε συγκέντρωση 2% εντοπίζεται μια μικρή ποσότητα της Cdc42 στα ελαφρά κλάσματα της βαθμίδωσης (Εικ. 43 B). Τέλος, με τη χρήση του απορρυπαντικού TX100 η Cdc42 διαλυτοποιείται σχεδόν καθ'ολοκληρία (Εικ. 43 Γ).

Από τα παραπάνω πειράματα προέκυψε ότι η Cdc42 συνδέεται με μεμβρανικές περιοχές, όπως αυτό φαίνεται από τα αποτελέσματα της μεθόδου αλκαλικής λύσης, όμως η σύνδεση αυτή φαίνεται πως είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στην παρουσία απορρυπαντικών.

### **3.2.3 Η VE-cadherin δεν αλληλεπιδρά άμεσα με τη Cdc42**

Προκειμένου να μελετήσουμε αν η Cdc42 συνδέεται άμεσα με τη VE-cadherin ακολούθησαν πειράματα ανοσο-συγκατακρήμνισης σε κύτταρα cos-7 τα οποία συνδιαμολύνθηκαν με wtCdc42 και wtVEC. Τα κύτταρα αυτά επιλέχθηκαν λόγω της υψηλής συχνότητας διαμόλυνσης και των υψηλών επιπέδων έκφρασης που επιτυγχάνονται. Τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με την πλασμιδιακή κατασκευή έκφρασης της VE-cadherin σε συνδυασμό είτε με την Cdc42-GFP αγρίου τύπου είτε με το ιδιοστατικά ενεργό μετάλλαγμα Cdc42V12GFP. Στη συνέχεια, έγινε ανοσοκατακρήμνιση με ειδικά αντισώματα έναντι της VE-cadherin και ελέγχθηκε αν συγκατακρημνίζεται η Cdc42wt-GFP με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 43).



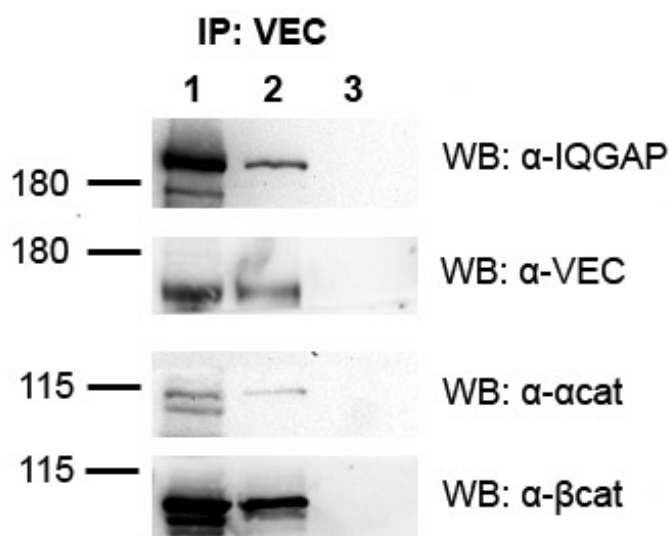
**Εικόνα 44:** Ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-cadherin και της Cdc42wt-GFP.

Ανοσοκατακρήμιση (IP) της VE-cadherin σε εκχυλίσματα κυττάρων *cos-7* τα οποία είχαν διαμολυνθεί με τις πλασμιδιακές κατασκευές VE-C wt και Cdc42wt-GFP ή VE-C wt και Cdc42V12-GFP. Η ανοσοκατακρήμιση πραγματοποιήθηκε σε εκχυλίσματα κυττάρων με αντίσωμα έναντι της VE-cadherin. Διαδρομή 1: εκχύλισμα κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με VE-C wt και Cdc42wt-GFP, διαδρομή 2: IP στο παραπάνω εκχύλισμα, διαδρομή 3: εκχύλισμα κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με VE-C wt και Cdc42V12-GFP, διαδρομή 4: IP στο παραπάνω εκχύλισμα, διαδρομή 5: εκχύλισμα κυττάρων που είχαν διαμολυνθεί με την πλασμιδιακή κατασκευή Cdc42wt-GFP-αρνητικό δείγμα ελέγχου). Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικά αντισώματα έναντι της VE-cadherin (πάνω) και της GFP (κάτω).

Από τα πειράματα αυτά φαίνεται ότι η VE-cadherin δεν αλληλεπιδρά άμεσα ή έμμεσα με τη Cdc42wt κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν (Εικ. 44). Είναι πιθανόν ότι στο περιβάλλον των κυττάρων *cos-7*, παρότι επιτρέπουν την έκφραση μεγάλων ποσοτήτων πρωτεϊνών, απουσιάζουν ενδοθηλιακοί ή άλλοι απαραίτητοι παράγοντες, όπως η p120. Από τα προηγούμενα πειράματα βρέθηκε ότι δεν υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ VE-cadherin και της Cdc42. Η IQGAP είναι μια πρωτεΐνη που πιθανώς διασυνδέει τη Cdc42 με την VE-cadherin στο ενδοθήλιο. Εξετάστηκε αρχικά αν η IQGAP συνδέεται με την VE-cadherin σε εκχυλίσματα ενδοθηλιακών κυττάρων HMEC-1 μετά από πειράματα ανοσοκατακρήμισης. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα για τη VE-cadherin και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western έναντι της VE-C, των μορίων α- και β-κατενίνης και



της πρωτεΐνης IQGAP (Εικ. 45). Βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν πρωτεϊνικό σύμπλοκο.



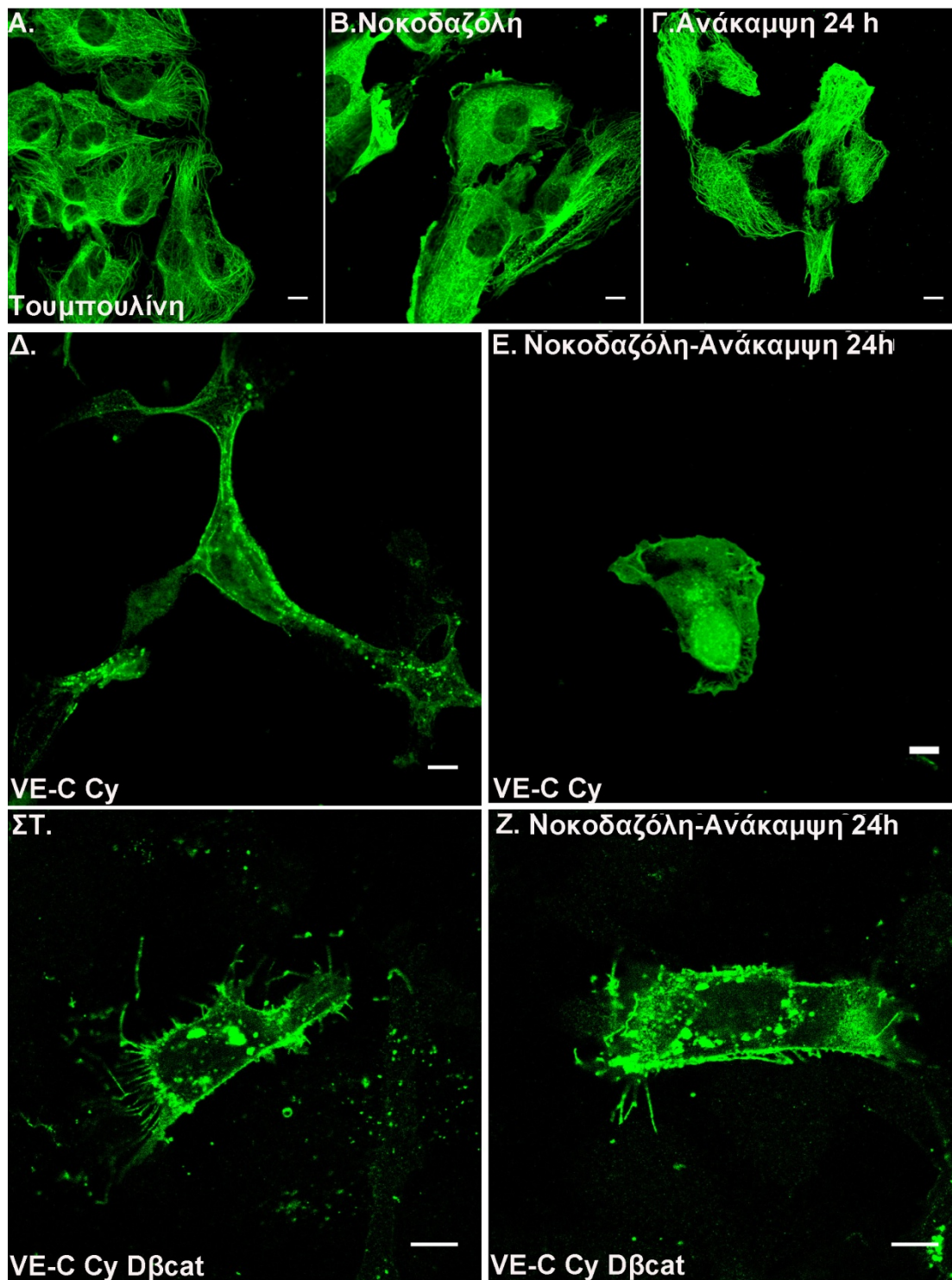
**Εικόνα 45:** Ανοσοκατακρήμιση (IP) της VE-cadherin σε κύτταρα HMEC-1. Διαδρομή 1: εκχύλισμα κυττάρων HMEC-1, διαδρομή 2: IP στο παραπάνω εκχύλισμα, διαδρομή 3: αρνητικό δείγμα ελέγχου. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με ειδικά αντισώματα έναντι της IQGAP, της VE-cadherin, της α-κατενίνης και της β-κατενίνης.

Σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες έχει δειχθεί ότι υπερέκφραση του κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin, VE-C Cy προκαλεί το σχηματισμό μεμβρανικών προσεκβολών, οι οποίες εξαρτώνται/προκύπτουν από την ενεργοποίηση του πολυμερισμού κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω της Cdc42 (Kouklis et al., 2003) (Εικ. 45 Δ). Παραταύτα οι ενδιάμεσοι παράγοντες που εμπλέκονται σε αυτό το μηχανισμό δεν ήταν γνωστοί. Επίσης δεν είναι ο μηχανισμός με τον οποίο η έκφραση του τμήματος VE-C Cy Δβcat οδηγεί στο σχηματισμό λεπτών απολήξεων με μορφολογία φιλοποδίων (Εικ. 46 ΣΤ). Η πρωτεΐνη IQGAP είναι ένα μόριο πολλαπλής διασύνδεσης μεταξύ διαφορετικών συστημάτων του κυτταροσκελετού καθώς και σηματοδοτικών μονοπατιών. Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι μέσω αυτής συντονίζονται λειτουργίες του κυτταροσκελετού της ακτίνης με αυτές των μικροσωληνίσκων (Noritake et al., 2005). Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στοιχεία ότι η παρουσία της VE-cadherin στην πλασματική μεμβράνη προκαλεί την συγκέντρωση μορίων PIP<sub>2</sub>, της Cdc42 καθώς και της IQGAP. Είναι γνωστό ότι το PIP<sub>2</sub> των μικροπεριοχών της μεμβράνης συνδέεται με τους μικροσωληνίσκους μέσω

της IQGAP και τους σταθεροποιεί (Golub and Caroni, 2005). Η παρουσία του PIP2 στο σύμπλοκο της VE-cadherin, οδηγεί στη σκέψη ότι για το σχηματισμό μεμβρανικών προεκβολών, εκτός του κυτταροσκελετού της ακτίνης, πιθανόν συμμετέχει και ο κυτταροσκελετός των μικροσωληνίσκων.

Ενδοθηλιακά κύτταρα διαμολύνθηκαν με φορείς έκφρασης της VEC Cy είτε της VE-C Cy Δβcat. Τρεις ώρες μετά τη διαμόλυνση, χρόνος που αντιστοιχεί με την συσσώρευση των υπό έκφραση μορίων στη μεμβράνη, προστέθηκε στα κύτταρα νοκοδαζόλη σε συγκέντρωση 50 ng/ml για μια ώρα. Η νοκοδαζόλη προκάλεσε την καταστροφή του δικτύου των μικροσωληνίσκων, με πλήρως αντιστρεπτό τρόπο εντός δύο ωρών κάτω από τις συνθήκες που χρησιμοποιήθηκε (Εικ. 46 Α-Γ). Αφού αφαιρέθηκε η νοκοδαζόλη τα κύτταρα αφέθηκαν για 20 ώρες στην καλλιέργεια, μονιμοποιήθηκαν και έγινε χρώση ανοσοφθορισμού με αντίσωμα ειδικό για τον επίτοπο FLAG. Φαίνεται ότι η καταστροφή του δικτύου των μικροσωληνίσκων έστω και παροδικά αποτρέπει το σχηματισμό μεμβρανικών προεκβολών που προκαλούνται από την έκφραση του VE-C Cy τμήματος. Αντίθετα ο σχηματισμός φιλοποδίων που προκαλείται από τη έκφραση του VE-C Cy Δβcat, φαίνεται πως δεν αποτρέπεται (Εικ. 46 ΣΤ,Ζ).

Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο κυτταροσκελετός των μικροσωληνίσκων είναι εξίσου απαραίτητος με τον πολυμερισμό της ακτίνης για τις δυναμικές ιδιότητες της μεμβράνης στην περιοχή των συνδέσμων προσκόλλησης.



**Εικόνα 46:** Ανοσοφθορισμός σε ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1 με αντίσωμα για την  $\alpha$ -τουμπουλίνη πριν και μετά την επίδραση με 50 ng/ml νοκοδαζόλη για μια ώρα (Α-Γ). (Δ-Ε) Ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1 διαμολύνθηκαν με την κατασκευή VE-C Cy και 3 ώρες μετά πραγματοποιήθηκε επίδραση με 50 ng/ml νοκοδαζόλη για μια ώρα. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τον επίτοπο FLAG. (ΣΤ-Ζ) Ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1 διαμολύνθηκαν με την κατασκευή VE-C Cy Dβcat και 3 ώρες μετά ακολούθησε επίδραση με 50 ng/ml νοκοδαζόλη για μία ώρα. Ακολούθησε ανοσοφθορισμός με αντίσωμα για τον επίτοπο FLAG.



## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**



## Καδερίνες και μεμβρανικές μικροπεριοχές

Η κλασική θεωρία σύμφωνα με την οποία οι πρωτεΐνες της μεμβράνης διαχέονται ελεύθερα σε μια διδιάστατη ομοιογενή λιπιδιακή διπλοστιβάδα έχει υποστεί ριζικές αλλαγές την τελευταία δεκαετία. Τα δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει σε μεγάλο βαθμό μικρής ή μεγαλύτερης κλίμακας πλευρική οργάνωση στην πλασματική μεμβράνη καθώς και στις μεμβράνες άλλων οργανιδίων όπως σε αυτές του Golgi. Οι διακριτές αυτές υποπεριοχές που ονομάστηκαν «λιπιδιακές σχεδίες» (lipid rafts), είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια και συνδέονται με συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Με βάση συγκεκριμένες φυσικοχημικές ιδιότητες οι περιοχές αυτές έχουν απομονωθεί βιοχημικά ως κλάσματα μεμβρανών τα οποία ανθίστανται στη διαλυτοποίηση με τη χρήση απορρυπαντικών και παρουσιάζουν χαμηλή πυκνότητα. Πειράματα σε μοντέλα μεμβρανών υπέδειξαν τον κρίσιμο ρόλο που παίζει η χοληστερόλη στην ανθεκτικότητα των μεμβρανών στη διαλυτοποίηση. Απουσία στερολών, οι διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων βρίσκονται σε μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από 'αταξία' (liquid-disordered phase) ανάλογα με τη λιπιδιακή σύσταση και τη θερμοκρασία. Μετά την ενσωμάτωση της χοληστερόλης στο λιπιδιακό αυτό μίγμα, σχηματίζεται μια 'οργανωμένη' φάση (liquid-ordered phase) η οποία συνυπάρχει με τις μη 'οργανωμένες' περιοχές της μεμβράνης [(Schroeder et al., 1998), (London, 2002), (Sinha et al., 2003)]. Έχει αποδειχθεί σε πολλές περιπτώσεις ότι η ενσωμάτωση πρωτεϊνών στο λιπιδιακό αυτό μικροπεριβάλλον δεν είναι τυχαία, αλλά εξυπηρετεί στη συγκρότηση μηχανισμών μεταγωγής σήματος σε καθορισμένα σημεία της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Οι περιοχές αυτές είναι κομβικές για τη μετάδοση εξωκυττάριων σημάτων προς το εσωτερικό του κυττάρου και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων ειδικούς υποδοχείς και δομικές πρωτεΐνες.

Σε ενδοθηλιακά κύτταρα HMEC-1, HPMEC και HUVEC φαίνεται ότι ένα ποσοστό της VE-cadherin επιπλέει στα ελαφρά κλάσματα της βαθμίδωσης μετά από εκχύλιση με απορρυπαντικά. Με τη χρήση της εναλλακτικής μεθόδου αλκαλικής λύσης, ένα μεγάλο μέρος της VE-cadherin ανιχνεύεται στα ελαφρά κλάσματα της βαθμίδωσης. Η VE-cadherin φαίνεται ότι βρίσκεται σε λιπιδιακές μικροπεριοχές που διαφέρουν από τις κλασικές λιπιδιακές περιοχές οι οποίες ανθίστανται στη διαλυτοποίηση με τη χρήση του απορρυπαντικού TX-100, καθώς η ποσότητα της

πρωτεΐνης που εντοπίζεται στα ελαφρά κλάσματα με τη χρήση του συγκεκριμένου απορρυπαντικού είναι ελάχιστη και στις τρεις κυτταρικές σειρές. Αντίθετα, μέρος της VE-cadherin εντοπίζεται στα ελαφρά κλάσματα με τη χρήση των απορρυπαντικών Lubrol WX (κυρίως) και Brij 96. Τα δεδομένα αυτά συμφωνούν με μελέτες που αναφέρουν ότι οι μεμβράνες που είναι ανθεκτικές στη διαλυτοποίηση μετά τη χρήση διαφορετικών απορρυπαντικών δεν είναι απαραίτητα συγκρίσιμα και το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει την ύπαρξη διακριτών βιοχημικών μικροπεριοχών (Schuck et al., 2003), (Pike, 2004), (Mishra and Joshi, 2007)]. Τέτοιες διαφορές είναι πιθανό να είναι αποτέλεσμα της επιλεκτικότητας των απορρυπαντικών ή της ετερογένειας στη λιπιδιακή σύσταση των μικροπεριοχών αυτών.

Έχει παρατηρηθεί ότι η λιπιδιακή και πρωτεϊνική σύσταση των ανθεκτικών μεμβρανών παρουσιάζει ουσιαστικές διαφορές ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο απορρυπαντικό. Διαλυτοποίηση με απορρυπαντικά Lubrol WX, Lubrol PX, Brij 58, Brij 96, Brij 98, Nonidet P40, CHAPS έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν ανθεκτικά μεμβρανικά τμήματα με διαφορετική λιπιδιακή σύσταση από αυτά που προκύπτουν με TX-100 (Schuck et al., 2003). Φαίνεται ότι οι μεμβρανικές μικροπεριοχές που προκύπτουν μετά από διαλυτοποίηση με TX-100 και CHAPS είναι εμπλουτισμένες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη σε αντίθεση με αυτές των Tween 20, Brij 58 ή Lubrol WX οι οποίες περιέχουν μικρότερες ποσότητες χοληστερόλης και σφιγγομυελίνης.

Είναι επίσης πιθανό οι λιπιδιακές αυτές μικροπεριοχές να είναι περισσότερο συμπαγείς στον πυρήνα και σχετικά λιγότερο οργανωμένες στην περιφέρεια και έτσι διαφορετικά απορρυπαντικά διαλυτοποιούν διαφορετικά στρώματα αυτών των διαστρωματωμένων μικροπεριοχών. Έτσι, διαφορετικά απορρυπαντικά εκχυλίζουν επιλεκτικά συγκεκριμένα λιπίδια ή και πρωτεΐνες από τον ετερογενή πληθυσμό μικροπεριοχών (Pike, 2004). Παρόμοια συμπεριφορά έχει περιγραφεί για πρωτεΐνες με αγκυροβόλιο GPI, οι οποίες ήταν οι πρώτες πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν ότι εντοπίζονται στις λιπιδιακές μικροπεριοχές (Brown and Rose, 1992). Η αλκαλική φωσφατάση του πλακούντα, πρωτεΐνη που συνδέεται στη μεμβράνη με GPI, ανθίστανται στη διαλυτοποίηση με Lubrol WX ή με TX-100. Αντίθετα, η προμινίνη, μια πρωτεΐνη με πέντε διαμεμβρανικά τμήματα, είναι διαλυτή στο TX-100 αλλά αδιάλυτη σε Lubrol WX (Roper et al., 2000).

Το ποσοστό της VE-cadherin που επιπλέει μετά από επίδραση του ίδιου απορρυπαντικού διαφέρει μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων που



χρησιμοποιήθηκαν. Όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή, τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι εκ φύσεως ετερογενή και παρουσιάζουν διαφορετικές ιδιότητες, αλλά και η έκφραση πρωτεϊνών και τα επίπεδά τους δεν είναι ομοιόμορφη. Μια μορφολογική διαφορά μεταξύ τους αφορά στο σχηματισμό των συνδέσμων προσκόλλησης. Γενικά τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών έχουν λιγότερες συνδέσεις αφού εκεί γίνεται κυρίως η διαπύδιση. Ένας άλλος παράγοντας είναι οι ιδιότητες που έχουν αθανатоποιημένα κύτταρα που εμφανίζουν ελαττωμένα επίπεδα VE-cadherin σε σχέση με πρωτογενείς καλλιέργειες.

Στα πειράματα μας βρέθηκε ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της VE-cadherin (το μικρότερο ποσοστό είναι 0,9% σε κύτταρα HPMEC) συνδέεται με λιπιδιακές μικροπεριοχές στις συνθήκες διαλυτοποίησης με απορρυπαντικά. Δεδομένου ότι το μόριο αυτό ως δομικό συστατικό εκφράζεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα, εάν η ποσότητα αυτή έχει σχέση με σηματοδοτικά μονοπάτια, θεωρείται υψηλή. Επίσης η ποσότητα πρωτεΐνης που επιπλέει στη βαθμίδωση σακχαρόζης δεν αντικατοπτρίζει απαραίτητα την *in vivo* κατάσταση. Είναι πιθανό αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα σε λιπίδια και πρωτεΐνες *in vivo* να διαταράσσονται από τη χρήση απορρυπαντικού (Schuck et al., 2003). Το δεδομένο αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι πολύ μεγαλύτερη ποσότητα VE-cadherin επιπλέει στα κλάσματα χαμηλής πυκνότητας σακχαρόζης όταν χρησιμοποιείται η μεθοδολογία της αλκαλικής λύσης απουσία απορρυπαντικού.

Η VE-cadherin εντοπίστηκε αποκλειστικά στα βαριά κλάσματα της βαθμίδωσης μετά από επίδραση β-μεθυλοκυκλοδεξτρίνης. Η β-μεθυλοκυκλοδεξτρίνη εκχυλίζει τη χοληστερόλη από τις μεμβράνες και καταστρέφει τις περιοχές των οποίων η ακεραιότητα εξαρτάται από χοληστερόλη. Δεδομένου ότι η χοληστερόλη είναι κρίσιμη για τη δημιουργία αυτών των μεμβρανικών μικροπεριοχών, μεταβολές στο επίπεδο της χοληστερόλης των κυττάρων πιθανό να οδηγούν σε διάρρηξη των μικροπεριοχών αυτών [(Pike and Miller, 1998), (Bodin et al., 2001), (Peiro et al., 2000), (Watson et al., 2001), (Huo et al., 2003)].

Κατά την επίδραση του προφλεγμονώδους παράγοντα θρομβίνη η κατανομή της VE-cadherin φαίνεται να μειώνεται στα ελαφρά κλάσματα της βαθμίδωσης όπως και κατά την επαναδημιουργία των συνδέσεων. Το αποτέλεσμα αυτό δεν ήταν αναμενόμενο δεδομένου ότι στο διάστημα αυτό ολόκληρη η ποσότητα της VE-cadherin φαίνεται, τουλάχιστον μορφολογικά, να συναθροίζεται σε ορισμένα σημεία της μεμβράνης (Konstantoulaki et al., 2003). Είναι πιθανόν αυτά τα σύμπλοκα όπου

εντοπίζεται η VE-cadherin να αποτελούνται από πρωτεΐνες και μόρια λιπιδίων με πολύ μικρή διάρκεια ζωής (από μερικά  $\mu$ s μέχρι ms) καθώς συγκροτούνται και αποσυναρμολογούνται πολύ γρήγορα επιτρέποντας την ανταλλαγή συστατικών με την υπόλοιπη μεμβράνη. Πειραματικά δεδομένα σε άλλα συστήματα έδειξαν ότι οι μεμβρανικές μικροπεριοχές είναι δυναμικές και υφίστανται συνεχείς μεταβολές στρατολογώντας ή απομακρύνοντας πρωτεΐνες ή λιπίδια κατά τη μεταγωγή του σήματος. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μικροπεριοχές συναθροίζονται σε μακροπεριοχές που έχουν μέγεθος της κλίμακα των  $\mu$ m και χρησιμεύουν ως σηματοδοτικές πλατφόρμες. Οι μακροπεριοχές αυτές έχουν διάρκεια ζωής μερικών δευτερολέπτων ή ακόμη και ωρών και σταθεροποιούνται μέσω μοριακών αλληλεπιδράσεων στο επίπεδο της μεμβράνης ή και μέσω αλληλεπίδρασης με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Rodgers and Zavzavadjian, 2001).

Άλλα μέλη της υπερικογένειας των καδερινών έχουν εντοπιστεί σε μικροπεριοχές της μεμβράνης. Ένα ποσοστό της E-καδερίνης συναθροίζεται σε πολύ σταθερές μικροπεριοχές της μεμβράνης όπου τα ομοδιμερή της E-καδερίνης δεν είναι τυχαία ούτε ομοιόμορφα κατανεμημένα (Cavey et al., 2008). Η συγκέντρωση της E-cadherin σε μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης φαίνεται πως εξαρτάται κυρίως από τις συνδέσεις της με τον κυτταροσκελετό. Συγκεκριμένα εντοπίστηκαν δύο διακριτοί πληθυσμοί ακτίνης με διαφορετική κατανομή, δυναμική και λειτουργία που έχουν σχέση με την κυτταρική προσκόλληση. Ένα μικρό αλλά σταθερό ποσοστό ακτίνης εντοπίζεται στους συνδέσμους προσκόλλησης, και θεωρείται υπεύθυνο για τη σταθεροποίηση των ομοδιμερών E-καδερίνης. Η υπόλοιπη ακτίνη σχηματίζει ένα δυναμικό συστατικό δίκτυο γύρω από το σύνδεσμο που είναι απαραίτητο για τον περιορισμό της κινητικότητας των μορίων προσκόλλησης. Επίσης η  $\alpha$ -κατενίνη είναι διαθέσιμη για τη σταθεροποίηση των συνδέσμων και της ακτίνης στις συνδέσεις, αλλά είναι επίσης απαραίτητη και για τον περιορισμό της πλευρικής κινητικότητας (lateral mobility) αυτών. Αυτά τα ευρήματα αποδεικνύουν την ύπαρξη και άλλων μορίων που διαμεσολαβούν τη σταθερή σύνδεση των ομοδιμερών της E-καδερίνης με την ακτίνη, ανεξάρτητα από την  $\alpha$ -κατενίνη.

Η N-cadherin εντοπίζεται σε μικροπεριοχές της μεμβράνης μυοβλαστών που είναι πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη και η παρουσία της στις μικροπεριοχές εξαρτάται από τη σύνδεση με την κατενίνη p120 [(Causeret et al., 2005), (Taulet et al., 2009)]. Η ανάλυση του καρβοξυτελικού τμήματος της p120 αποκάλυψε την παρουσία πιθανών αλληλουχιών που μπορούν να αναγνωρίσουν ή και να

αλληλεπιδράσουν με τη χοληστερόλη (Erpand, 2008). Επομένως η σύνδεση με την p120 μπορεί να σταθεροποιεί την N-καδερίνη μέσω της αλληλεπίδρασης με τις μικροπεριοχές που είναι πλούσιες σε χοληστερόλη. Δεδομένου του ρόλου της p120 στο σχηματισμό σταθερών συνδέσμων προσκόλλησης (βλ. παρακάτω), οι μελέτες αυτές δίνουν τα πρώτα στοιχεία ότι οι λιπιδιακές αυτές μικροπεριοχές παίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση της N-καδερίνης στις συνδέσεις προσκόλλησης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο σενάριο ότι οι λιπιδιακές μικροπεριοχές **προϋπάρχουν** στα σημεία των διακυτταρικών συνδέσεων ενώ η N-καδερίνη διαχέεται ελεύθερα μέχρι να ακινητοποιηθεί σε αυτές τις δομές.

### **Η σχέση της VE-cadherin με το φωσφολιπίδιο PIP2**

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μελέτης δημοσιεύθηκαν δύο αναφορές σχετικά με την τοπολογία της VE-cadherin στην πλασματική μεμβράνη. Αρχικά μια μελέτη έδειξε ότι η ανεξίνη-2, μια πρωτεΐνη που συνδέεται με τον κυτταροσκελετό, αγκυροβολεί τη VE-cadherin στις λιπιδιακές μικροπεριοχές, σταματώντας έτσι την πλευρική της διάχυση (Heyraud et al., 2008). Η δεύτερη μελέτη που μόλις κυκλοφόρησε (Νοέμβριος 2010) δείχνει ότι ένα μέρος της VE-cadherin (και όχι της N-cadherin) βρίσκεται σε μικροπεριοχές της μεμβράνης πλούσιες σε σφιγγολιπίδια και χοληστερόλη, όπου συνδέεται με την p120. Υποστηρίζεται ότι η σύνδεση αυτή είναι απαραίτητη για τη στρατολόγηση της VE-cadherin στις λιπιδιακές μικροπεριοχές (Gentil-dit-Maurin et al.). Το ποσοστό της VE-cadherin σε αυτές τις περιοχές είναι παρόμοιο με αυτό που περιγράφεται στα αποτελέσματα μας. Η απουσία της N-cadherin, δικαιολογείται από την αδυναμία της να συνδεθεί με την p120 στην παρουσία VE-cadherin ειδικά στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα μας ωστόσο διευκρινίζουν για **πρώτη φορά** ότι η VE-cadherin συνεντοπίζεται σε σημαντικό βαθμό συγκεκριμένα με το φωσφολιπίδιο PIP2. Αυτό επετεύχθη αρχικά με δύο ανεξάρτητες μεθόδους: Με μορφολογικό συνεντοπισμό της VE-cadherin-mCherry/PH-GFP μετά από άμεσο ανοσοφθορισμό (μεθοδολογία που αποκλείει πιθανά artifacts προερχόμενα από τη μονιμοποίηση κυττάρων και έμμεσο ανοσοφθορισμό) και βιοχημικά με τη χρήση χημικής διασύνδεσης in vivo.

Έχει δειχθεί ότι ένα πέμπτο περίπου του συνολικού PIP2 του κυττάρου εντοπίζεται σε δομές λιπιδιακής σχεδίας, ανθεκτικές σε διαλυτοποίηση με απορρυπαντικά (Hope and Pike, 1996). Νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση του PIP2 σε

αυτές τις περιοχές εξαρτάται από την παρουσία χοληστερόλης ενώ τα επίπεδα του μειώνονται μετά την απομάκρυνση της χοληστερόλης [(Pike and Miller, 1998), (Sechi and Wehland, 2000), (Laux et al., 2000), (Rozelle et al., 2000), (Kwik et al., 2003)].

Με βάση πειραματικά δεδομένα έχουν προταθεί πρόσφατα τρεις μηχανισμοί που συμβάλλουν στην συγκέντρωση του PIP2 σε συγκεκριμένα τμήματα της μεμβράνης:

α) Η τοπική «κύρτωση» της μεμβράνης συμβάλλει στη συγκέντρωση φωσφοϊνοσιτιδίων καθώς το μεγάλο μέγεθος της πολικής κεφαλής και το ηλεκτροστατικό φορτίο του PIP2 το καθιστούν ασταθές σε μια επίπεδη μεμβράνη, και πιο σταθερό σε ιδιαίτερα καμπυλωτές δομές.

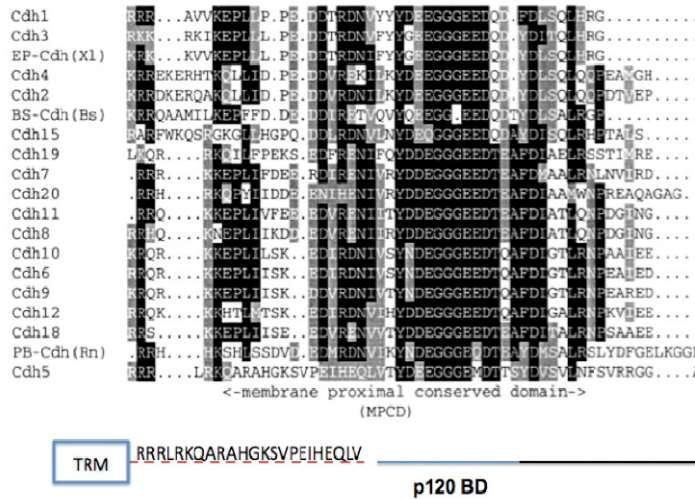
β) Η συγκέντρωση φωσφοϊνοσιτιδίων επηρεάζεται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ θετικά φορτισμένων τμημάτων πρωτεϊνών και των αρνητικά φορτισμένων πολικών κεφαλών των φωσφοϊνοσιτιδίων. Δημιουργούνται έτσι λιπιδιακές περιοχές πλούσιες σε φωσφοϊνοσιτίδια μετά από αλληλεπιδράσεις με κυτταροπλασματικές, περιφερειακές πρωτεΐνες της μεμβράνης ή διαμεμβρανικούς υποδοχείς. Αρκετές περιφερειακές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες περιέχουν ομάδες βασικών αμινοξέων που αλληλεπιδρούν με μονοσθενή και πολυσθενή όξινα λιπίδια της εσωτερικής πλευράς της πλασματικής μεμβράνης. Παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι οι MARCKS, GAP43 και ο υποδοχέας EGF. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών MARCKS και GAP 43 συμβάλλουν στη στόχευση τους στην πλασματική μεμβράνη [(McLaughlin and Aderem, 1995), (Okeley and Gelb, 2004)]. Στην περίπτωση της MARCKS οι βασικές περιοχές συγκεντρώνουν γύρω τους πολυσθενή όξινα λιπίδια, όπως το PIP2, μέσω μη ειδικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων [(Wang et al., 2002), (Gambhir et al., 2004), (McLaughlin et al., 2005)]. Παρόμοια αναδιοργάνωση φωσφοϊνοσιτιδίων σε λιπιδιακά συστήματα επάγεται από ένα κατιοντικό πεπτίδιο που προκύπτει από τη τζελσολίνη (Steimle et al., 1999).

γ) Τα φωσφοϊνοσιτίδια σχηματίζουν εγγενώς συσσωματώματα. Όταν PIP2 αναμείχθηκε με φωσφατιδυλοχολίνη σε μια λιπιδιακή διπλοστιβάδα παρατηρήθηκε ότι η διασπορά του στη μικτή λιπιδιακή διπλοστιβάδα δεν ήταν τυχαία. Αντίθετα τα μόρια PIP2 σχημάτισαν μεταξύ τους σύμπλοκο που σταθεροποιήθηκε από δεσμούς υδρογόνου (Lierpina et al., 2003).

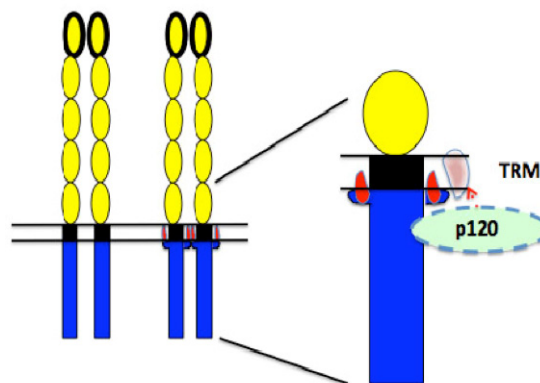
Με βάση την πρωτοταγή δομή της VE-cadherin, προβλέπεται η σύνδεσή της με το PIP2 στην αμινοξική ακολουθία (RRRIRKQAHHSKSALEIHEQLV) η οποία

βρίσκεται σε άμεση γειτνίαση με τη διαμεμβρανική της περιοχή και είναι εξαιρετικά βασική (pI 11.4) (Εικόνα 46). Έχει περιγραφεί η ικανότητά της να διαπερνά την πλασματική μεμβράνη και να λειτουργεί ως πεπτιδικός φορέας μεταφοράς εντός του κυττάρου (Elmqvist et al., 2001). Επιπλέον, είναι μοναδική σε σχέση με τις αντίστοιχες περιοχές των άλλων μελών της οικογένειας καδερίνης (Εικόνα 47 Α).

**A.**



**B.**



**Εικόνα 47:** Α) Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας πρωτεϊνών της οικογένειας καδερίνης παραπλεύρως του διαμεμβρανικού τμήματος (TRM). Έχει αποκοπεί η ακολουθία που βρίσκεται ειδικά στη VE-cadherin. Β) Διαγραμματική απεικόνιση-μοντέλο που απεικονίζει τους πιθανούς παράγοντες που συμβάλλουν στη συσσώρευση της VE-cadherin σε μικροπεριοχές.

Εξετάσθηκε αν η σύνδεση της VE-cadherin με τις κατενίνες, β-κατενίνη και p120 συμβάλλει στη συγκέντρωση PIP2. Η p120 είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση του συμπλέγματος καδερινών-κατενινών αλληλεπιδρώντας με το παραμεμβρανικό τμήμα της VE-cadherin [(Davis et al., 2003), (Ireton et al., 2002), (Lampugnani and Dejana, 1997), (Thoreson et al., 2000), (Xiao et al., 2003)]. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης μεταξύ p120 και του παραμεμβρανικού τμήματος όπου αυτή συνδέεται, ή μείωση των επιπέδων της p120 σε κύτταρα στην καλλιέργεια αυξάνει τα επίπεδα της VE-cadherin που ενδοκυττώνεται και μειώνει την ποσότητα της VE-cadherin που είναι διαθέσιμη για τις διακυτταρικές συνδέσεις [(Miyashita and Ozawa, 2007), (Perez-Moreno and Fuchs, 2006), (Xiao et al., 2003)]. Η β-κατενίνη διασυνδέει την VE-cadherin με την ακτίνη (βλ. Εισαγωγή).

Η περιοχή RRRIRKQAHAAHSKSALEIHEQLV βρίσκεται ακριβώς μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής και της θέσης σύνδεσης με την p120. Πειράματα υπερέκφρασης των πλασμιδιακών κατασκευών PH-GFP και τη μεταλλαγμένης μορφής της VE-C Cy Δp120 δείχνουν ότι σύνδεση με την p120 είναι απαραίτητη για τον συνεντοπισμό της VE-cadherin με το PIP2. Το αποτέλεσμα αυτό είναι δύσκολο να εκτιμηθεί επειδή δεν ξεκαθαρίζει την πιθανότητα αδυναμίας μεταφοράς του μεταλλάγματος στη μεμβράνη λόγω έλλειψης σύνδεσης με την p120 [(Chen et al., 2003), (Xiao et al., 2003)]. Αντίθετα η απάλειψη της θέσης σύνδεσης με την β-κατενίνη στο μετάλλαγμα VE-C CyΔβcat, όχι μόνο δεν επηρέασε, αλλά φαίνεται ότι αυτό συνεντοπίζεται σχεδόν πλήρως με το PH-GFP. Με αυτό τα αποτελέσματα εξηγούνται τα ευρήματα των Gentil-dit-Maurin et al. 2010 που δείχνουν ότι η p120 είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό της VE-cadherin στις λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης.

Συμπερασματικά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η τοπολογία της VE-cadherin εξαρτάται από δύο αντίρροπες δυνάμεις: τη σύνδεση με τον κυτταροσκελετό και την συγγένεια με το λιπιδιακό μικροπεριβάλλον. Για την περαιτέρω διερεύνηση των βιοχημικών ιδιοτήτων αυτών των περιοχών, το εργαστήριό μας έχει εκφράσει το κυτταροπλασματικό τμήμα της VE-cadherin, συμπεριλαμβανομένου και του διαμεμβρανικού τμήματος, στη ζύμη *Pichia Pastoris*. Από όσο γνωρίζουμε είναι η πρώτη φορά, όσον αφορά όλα τα μέλη της οικογένειας καδερίνης, που το τμήμα αυτό εκφράσθηκε επιτυχώς.

## Ρύθμιση των συνδέσμων προσκόλλησης από τις RhoGTPασες

Φαίνεται ότι κατά τη δημιουργία των συνδέσμων προσκόλλησης ενεργοποιούνται μηχανισμοί αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης στη μεμβράνη. Ορισμένοι από τους παράγοντες αυτούς συμμετέχουν επίσης σε μηχανισμούς της κυτταρικής μετανάστευσης. Τα φωσφολιπίδια ινοσιτόλης είναι γνωστό ότι αποτελούν μόρια τα οποία συμμετέχουν στη ρύθμιση της αρχιτεκτονικής και τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης, κατά τη μετανάστευση, αλλά είναι η πρώτη φορά που εμπλέκονται σε μηχανισμούς διακυτταρικής προσκόλλησης. Το φωσφολιπίδιο PIP2 ενώ φαίνεται ότι δεν επηρεάζει τη σταθερότητα των ήδη σχηματισθέντων ενδοθηλιακών συνδέσμων προσκόλλησης, είναι απαραίτητο στη δυναμική τους, αφού στοχευμένη καταστροφή του προκαλεί αδυναμία σχηματισμού των συνδέσμων προσκόλλησης. Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει μετά από την έκφραση της αλληλουχίας PH η οποία συνδέεται ειδικά με το υδρόφιλο τμήμα του PIP2 και αποτρέπει τη σύνδεσή του με πρωτεΐνες. Είναι πιθανόν ότι μέσω αναστολής της λειτουργικότητάς του PIP2 παρεμποδίζεται η σύνδεση πρωτεϊνών κάτι που υπό κανονικές συνθήκες είναι απαραίτητο για την διακυτταρική προσκόλληση που διαμεσολαβείται από την VE-cadherin.

Προφανείς υποψήφιες πρωτεΐνες-προσδέτες του PIP2 για αυτό το σκοπό είναι τα μέλη της οικογένειας των Rho GTPασων Rac και Cdc42 είναι γνωστό ότι συντονίζουν τον πολυμερισμό των ινιδίων ακτίνης σε ελασματοπόδια και φιλοπόδια αντίστοιχα (Hall, 2005). Έχει βρεθεί ότι ενεργοποίηση των Cdc42 και Rac1 είναι απαραίτητη για τις διαμεσολαβούμενες από την E-cadherin διακυτταρικές συνδέσεις στα κύτταρα MDCK II (Kodama et al., 1999). Υπερέκφραση του επικρατώς αρνητικού μεταλλάγματος Rac1 (Rac1N17) σε επιθηλιακά κύτταρα MDCK μειώνει τα επίπεδα της E-cadherin, της β-κατενίνης και των ινιδίων ακτίνης στα σημεία των διακυτταρικών συνδέσεων. Μικροέγχυση του ίδιου μεταλλάγματος αναστέλλει τη συσσώρευση των καδερινών στα σημεία των διακυτταρικών συνδέσεων σε κερατινοκύτταρα (Braga et al., 1997).

Κατά τη διάρκεια της αποδιοργάνωσης των συνδέσμων προσκόλλησης που προκαλείται από προφλεγμονώδεις παράγοντες όπως η θρομβίνη, η ισταμίνη στο ενδοθήλιο, ενεργοποιείται η RhoA που προάγει τη δημιουργία συσταλτών ινιδίων πίεσης (στρες) και οδηγεί σε κυτταρική σύσπαση. Αρχικά ενεργοποιείται η RhoA εντός 30sec. Αναστολή της RhoA εμποδίζει την αποδιοργάνωση των συνδέσμων

προσκόλλησης και την αύξηση της ενδοθηλιακής διαπερατότητας (Wojciak-Stothard et al., 2001). Αντίθετα οι Rac1 και Cdc42 ενεργοποιούνται κατά την επανασυγκρότηση των συνδέσμων προσκόλλησης [(Fukata and Kaibuchi, 2001), (Zigmond, 2004), (Lampugnani et al., 2002)]. Σε αυτό το χρονικό σημείο η Cdc42 μετατοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων (Kouklis et al., 2004). Διαμόλυνση με το αρνητικό επικρατές μετάλλαγμα της Cdc42 καθυστερεί την επαναφορά των διακυτταρικών συνδέσεων *in vitro* και στον πνεύμονα ποντικού (Kouklis et al., 2004). Η Cdc42 όταν ενεργοποιηθεί θεωρείται ότι δρα ώστε να σταθεροποιεί τις νεοσχηματιζόμενες αλληλεπιδράσεις προκαλώντας πολυμερισμό του κυτταροσκελετού της ακτίνης ανοδικά της WASP-Arp2/3, αλλά οι παράγοντες και ο μηχανισμός που υπεύθυνοι για την ενεργοποίηση της Cdc42 δεν είναι γνωστοί (Mehta and Malik, 2006).

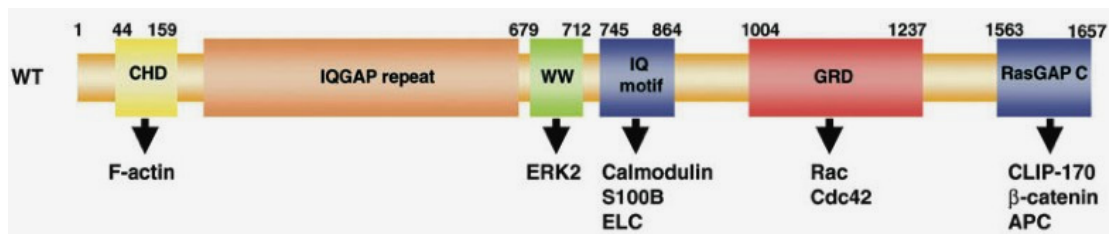
Η Cdc42 εμπλέκεται στη δημιουργία μεμβρανικών προσεκβολών και φιλοποδίων αλλά η συνάθροισή της σε λιπιδιακές μικροπεριοχές είναι υπό αμφισβήτηση. Σε μονοκύτταρα του αίματος η Cdc42 φαίνεται να ανθίσταται στη διαλυτοποίηση με Lubrol WX αλλά δεν εμφανίζεται στα ελαφρά κλάσματα μετά από διαλυτοποίηση με TX-100. Στην ίδια μελέτη σε άλλη κυτταρική σειρά, σε ινοβλάστες, η Cdc42 δεν εντοπίζεται στα ελαφρά κλάσματα εκχυλισμάτων με Lubrol WX και TX-100 (Drobnik et al., 2002). Σε ουδετερόφιλα έχει παρατηρηθεί ότι η μεγαλύτερη ποσότητα της Cdc42 δεν εντοπίζεται σε λιπιδιακές μικροπεριοχές σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Κατόπιν ενεργοποίησης με τον λιποπολυσακχαρίτη LPS παρατηρείται ότι η Cdc42 ενεργοποιείται στις λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης (Fessler et al., 2004).

Στη μελέτη αυτή βρέθηκε για πρώτη φορά ότι η διακυτταρική και η αμέσως παράπλευρη περιοχή της VE-cadherin φαίνεται ότι έχει εγγενώς την ιδιότητα να συγκεντρώνει το PIP2 στην μεμβράνη, ανεξάρτητα από την προσθήκη θρομβίνης, αλλά η φύση του συνεντοπισμού αυτού δεν είναι σαφής. Έγινε έλεγχος πιθανής σύνδεσης μεταξύ VE-cadherin και Cdc42 σε ενδοθηλιακά κύτταρα εν ηρεμία και κατά τα διάφορα στάδια της επανασυγκρότησης των συνδέσμων προσκόλλησης. Οι δύο αυτές πρωτεΐνες δεν βρέθηκαν σε καμία περίπτωση να αλληλεπιδρούν σε πειράματα ανοσο-συγκατακρήμνισης. Είναι πιθανόν η αλληλεπίδραση αυτή να μην μπορεί να ανιχνευθεί λόγω τεχνικών δυσκολιών, όπως η χαμηλή συγγένεια των διαθέσιμων αντισωμάτων ειδικών έναντι της Cdc42 και της ευκολίας διαλυτοποίησης της με απορρυπαντικά. Είναι επίσης πιθανόν η Cdc42 που συνεντοπίζεται με την VE-



cadherin να αφορά μόνο την ενεργοποιημένη μορφή Cdc42-GTP, η οποία αποτελεί μικρό ποσοστό, γεγονός που καθιστά την ανίχνευσή της μέσω αντισωμάτων πολύ δύσκολη.

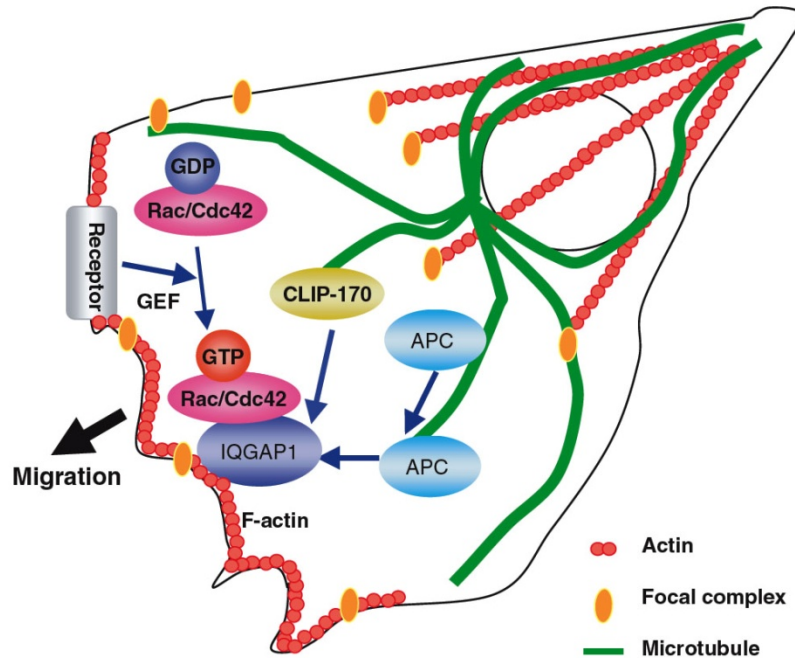
Ο παρατηρούμενος συνεντοπισμός είναι δυνατόν να διαμεσολαβείται από άλλες πρωτεΐνες-διασυνδέτες και ως τέτοια η πρωτεΐνη-ικρίωμα υπονήφια αποτελεί η IQGAP για αυτή τη λειτουργία. Η IQGAP είχε αρχικά περιγραφεί ως RasGAP, αλλά στη συνέχεια βρέθηκε ότι συνδέεται και παρεμποδίζει την ενεργότητα GTPάσης των Cdc42 και Rac1 σταθεροποιώντας τις στην GTP-συνδεδεμένη μορφή (Brandt and Grosse, 2007). Αυτή η ιδιότητα είναι κρίσιμη για τη ρύθμιση των συνδέσμων προσκόλλησης. Η IQGAP εντοπίζεται στους διακυτταρικούς συνδέσμους και όταν υπερεκφράζεται μειώνει την ισχύ του διακυτταρικού συνδέσμου αλληλεπιδρώντας με τη β-κατενίνη, προκαλώντας έτσι απομάκρυνση της α-κατενίνης από το σύμπλοκο καδερίνης-κατενινών (Kuroda et al., 1998). Αυτό έχει συνέπεια την αποσυναρμολόγηση του συμπλόκου και με βάση αυτή την ιδιότητα η IQGAP θεωρείται μειορυθμιστής της ισχύος διακυτταρικών συνδέσμων. Παρόλα ταύτα υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις για το ρόλο αυτό κυρίως διότι δεν έχει παρατηρηθεί αποσύνδεση μεταξύ καδερίνης με την α-κατενίνη στη πλειοψηφία των φυσιολογικών διαδικασιών όπου γίνεται μειορύθμιση των διακυτταρικών συνδέσεων (Gumbiner, 2005).



**Εικόνα 48:** Απεικόνιση της IQGAP και των περιοχών σύνδεσής της με άλλες πρωτεΐνες (Noritake et al., 2005).

Σύνδεση της IQGAP1 με τις ενεργοποιημένες μορφές των Cdc42 και Rac1 αποτρέπει τη σύνδεσή της με την β-κατενίνη. Με αυτό τον τρόπο το σύμπλοκο καδερίνης/κατενινών παραμένει σταθερό και αυξάνεται η ισχύς των συνδέσμων προσκόλλησης (Noritake et al., 2005). Είναι πιθανό να υπάρχει ισορροπία μεταξύ της πρόσδεσης της β-κατενίνης στην α-κατενίνη και στην IQGAP, η οποία ελέγχει τη σταθερότητα των συνδέσμων προσκόλλησης.

Η IQGAP αποτελεί πρωτεΐνη-ικρίωμα για πληθώρα άλλων μορίων που συμμετέχουν στη δυναμική του πολυμερισμού των ινιδίων ακτίνης και των μικροσωληνίσκων (Εικόνα 49) [(Noritake et al., 2005), (Brandt and Grosse, 2007)].



**Εικόνα 49:** Μοντέλο αλληλεπιδράσεων μεταξύ του κυτταροσκελετού της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη που διαμεσολαβούνται από την IQGAP (Noritake et al., 2005).

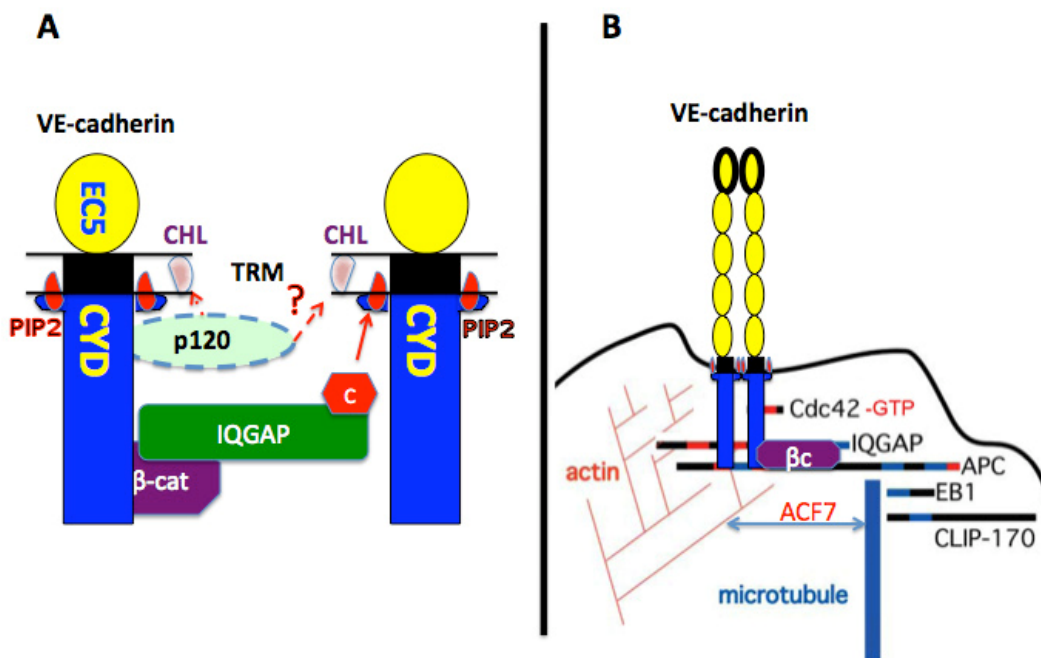
Στα πειράματά μας βρέθηκε ότι η IQGAP συνδέεται και με την VE-cadherin και συγκατακρημνίζεται με το σύμπλοκο VE-cadherin, β-κατενίνης και α-catenin. Παραταύτα δεν κατέστη δυνατή η ανίχνευση της Cdc42 στο ίδιο σύμπλοκο παρά το γεγονός ότι η απευθείας αλληλεπίδραση IQGAP-Cdc42 έχει επαληθευθεί σε άλλα συστήματα. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες αυτές είναι μοναδικές και δεν έχουν βρεθεί ιστοειδικές μορφές τους, για την αδυναμία ανίχνευσης της αλληλεπίδρασης στα ενδοθηλιακά κύτταρα θεωρούμε ότι αυτό είναι θέμα τεχνικού προβλήματος όπως εξηγήθηκε παραπάνω.

### **Υπάρχει εμπλοκή του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων στο σύμπλοκο της VE-cadherin;**

Το δόγμα που υπάρχει αυτή τη στιγμή στη βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι στους συνδέσμους προσκόλλησης συμμετέχει αποκλειστικά ο κυτταροσκελετός της

ακτίνης. Αυτός συνδέεται με το σύμπλοκο καδερίνης/κατενινών, ρυθμίζοντας την ισχύ της προσκόλλησης και τη δυναμική των διακυτταρικών συνδέσμων (βλ. Εισαγωγή). Από τα στοιχεία που βρέθηκαν σε αυτή τη μελέτη σε συνδυασμό με μεμονωμένες αναφορές φαίνεται ότι είναι πιθανόν να υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ των συνδέσμων προσκόλλησης (τουλάχιστον του ενδοθηλίου) με τον κυτταροσκελετό των μικροσωληνίσκων. Έχει αναφερθεί ότι συνάθροιση του PIP2 σε μεμβρανικές μικροπεριοχές αποτελεί σημείο που «συλλαμβάνει» τα + άκρα των μικροσωληνίσκων (Golub and Caroni, 2005). Ο μηχανισμός αυτός εξαρτάται από τη διαμεσολάβηση των Cdc42 και IQGAP και ενεργοποιείται κατά την κυτταρική μετανάστευση. Από τη μελέτη μας φαίνεται ότι η έκφραση της VE-cadherin και η στόχευσή της στην μεμβράνη προκαλεί την συνάθροιση PIP2 και Cdc42 γύρω από αυτό. Δεδομένου ότι η Cdc42 βρίσκεται σε ενεργοποιημένη μορφή (Kouklis et al., 2003) και το σύμπλοκο της VE-cadherin συνδέεται με την IQGAP, εξετάσαμε σε ένα προκαταρκτικό σύστημα την πιθανότητα να υπάρχει εμπλοκή των μικροσωληνίσκων στη δημιουργία μεμβρανικών προεκβολών μετά από έκφραση της VE-cadherin σε ενδοθηλιακά κύτταρα.

Πρόσκαιρη καταστροφή του δικτύου των μικροσωληνίσκων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας στόχευσης της VE-cadherin στη μεμβράνη είχε ως αποτέλεσμα την παντελή έλλειψη σχηματισμού προεκβολών. Το γεγονός αυτό δεν οφείλεται στην αδυναμία στόχευσης της VE-cadherin αφού αυτή τελικώς επετεύχθη κατά τη διάρκεια της επανάκαμψης του συστήματος των μικροσωληνίσκων. Αν και δεν είναι ξεκάθαρο φαίνεται ότι υπάρχει κάποια αλληλεπίδραση μεταξύ μικροσωληνίσκων και του συμπλόκου VE-cadherin που παρεμποδίζεται σε αυτό το σύστημα. Έχει προταθεί ότι στην περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης υπάρχει ένα σύστημα διασύνδεσης μεταξύ του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων και της ακτίνης που περιλαμβάνει πρωτεΐνες που συνδέονται με το θετικό άκρο των μικροσωληνίσκων όπως την APC (Adenomatous Polyposis Coli), EB1 και CLIP170. Αυτές μπορούν να συνδεθούν απευθείας με την β-κατενίνη (APC), μέσω της Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall, 2003) είτε με την IQGAP (Fukata et al., 2002). Άλλες υποψήφιες για το ρόλο αυτό είναι πρωτεΐνες της οικογένειας plakin [(Kodama et al., 2004), (Lechler and Fuchs, 2007)]. Εναλλακτικά έχει αναφερθεί ότι η δυνείνη μπορεί να συνδέεται με τους συνδέσμους προσκόλλησης μέσω της β-κατενίνης (Ligon et al., 2001).



**Εικόνα 50:** Προτεινόμενο μοντέλο εμπλοκής της VE-cadherin σε σηματοδοτικές οδούς που ρυθμίζουν τη δυναμική του κυτταροσκελετού της ακτίνης (A) και πιθανώς τη διασύνδεσή του με τους μικροσωληνίσκους (B).

A) Έκφραση του κυτταροπλασματικού τμήματος της VE-cadherin (CYD) προκαλεί τη δημιουργία λιπιδιακού μικροπεριβάλλοντος πλούσιο σε PIP2 και χοληστερόλη (CHL). Παράλληλα συνάθροισή των β-κατενίνης (β-cat) και IQGAP. Ο συνδυασμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση και προσέλκυση της Cdc42 (C). Η p120 φαίνεται επίσης να εμπλέκεται μέσω πιθανής σύνδεσής της με τη χοληστερόλη. (Η περιοχή EC5 απεικονίζει στην πέμπτη εξωκυττάρια επανάληψη τύπου καδερίνης, ενώ οι επαναλήψεις 1-4 έχουν παραληφθεί στο σχήμα).

B) Πιθανός μηχανισμός διασύνδεσης και συμμετοχής των μικροσωληνίσκων στη δυναμική των συνδέσμων προσκόλλησης μέσω δημιουργίας του συμπλόκου VE-cadherin/β-catenin/APC/IQGAP/Cdc42 που συνδέεται με τις πρωτεΐνες του + άκρου των μικροσωληνίσκων EB1 και CLIP-170 (σημειώνεται ότι η APC είναι η ίδια πρωτεΐνη του + άκρου). Οι διασύνδεση μπορεί να ισχυροποιείται μέσω πρωτεϊνών της οικογένειας plakins, όπως η ACF7 ή άλλες.

Οι συνδέσεις αυτές είναι καλά τεκμηριωμένες και αποτελούν σημείο εκκίνησης για μελλοντικές μελέτες αλλά δεν είναι σαφές ποιος είναι ο ρόλος τους σε φυσιολογικές διαδικασίες στο ενδοθήλιο. Είναι δυνατόν να συμμετέχουν στη σταθεροποίηση του ενδοθηλιακού φραγμού, όσο/είτε στην κυτταρική μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης.

## **5. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ**



## 5.1 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διατριβή εστιάζεται στη μελέτη των ιδιοτήτων της διαμεμβρανικής και της παραπλεύρως της μεμβράνης περιοχής της VE-cadherin στο λιπιδιακό μικροπεριβάλλον και στις λειτουργίες του για το σχηματισμό των διακυτταρικών συνδέσεων στο ενδοθήλιο.

Αρχικά εξετάστηκε το ενδεχόμενο η VE-cadherin να εντοπίζεται σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της πλασματικής μεμβράνης. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η VE-cadherin εντοπίζεται σε λιπιδιακές μικροπεριοχές της μεμβράνης που χαρακτηρίζονται από την παρουσία χοληστερόλης καθώς και PIP2. Συνεπώς διευκρινίζεται για πρώτη φορά ότι η VE-cadherin συνεντοπίζεται σε σημαντικό βαθμό συγκεκριμένα με το φωσφολιπίδιο PIP2 στην περιοχή της πλασματικής μεμβράνης. Αυτό επετεύχθη με δύο ανεξάρτητες μεθόδους: Με μορφολογικό συνεντοπισμό της VE-cadherin-mCherry/PH-GFP μετά από άμεσο ανοσοφθορισμό και βιοχημικά με τη χρήση χημικής διασύνδεσης *in vivo*.

Η σχέση VE-cadherin και PIP2 επιβεβαιώθηκε επίσης λειτουργικά: ελεγχόμενη μειорύθμιση των επιπέδων του PIP2 μέσω επαγωγής της λιπιδιακής φωσφατάσης IV 5-ptase στη μεμβράνη ανέστειλε το σχηματισμό των συνδέσεων. Το ίδιο αποτέλεσμα είχε η αδρανοποίησή του στη μεμβράνη.

Μεταξύ των πρωτεϊνών που όταν ενεργοποιηθούν συνδέονται με το PIP2 και προάγουν τον σχηματισμό των συνδέσεων προσκόλλησης είναι η Cdc42, μέλος της οικογένειας των Rho GTPασων. Με αυτό τον τρόπο η Cdc42 εμπλέκεται στη λειτουργία του ενδοθηλιακού φραγμού ως βασικός αποδέκτης ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την επαγωγή του πολυμερισμού της ακτίνης, αλλά τα ανοδικά στάδια είναι δεν είναι γνωστά. Δεδομένου ότι η έκφραση της VE-cadherin συγκεντρώνει PIP2 εξετάστηκε στη συνέχεια εάν έχει την ίδια δράση όσον αφορά την Cdc42. Παρατηρήθηκε ότι η VEC παρουσία της p120, αλλά όχι της β-κατενίνης, συμμετέχει στη στρατολόγηση της Cdc42 στην περιοχή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που βρίσκεται η VE-cadherin. Παραταύτα δεν υπάρχει άμεση σύνδεση μεταξύ του συμπλόκου της VE-cadherin με την Cdc42. Ανάμεσα στις πιθανές πρωτεΐνες-διασυνδέτες μεταξύ VE-cadherin και Cdc42 εξετάστηκε η IQGAP η οποία βρέθηκε ότι συγκατακρημνίζεται με το σύμπλοκο της VE-cadherin.

Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στοιχεία που διευρύνουν τις γνωστές δομικές και λειτουργικές ιδιότητες της VE- C στην πλασματική μεμβράνη. Συγκεκριμένα η παρουσία του μορίου αυτού πυροδοτεί την συνάθροιση του φωσφολιπιδίου PIP<sub>2</sub>, του σηματοδοτικού μορίου Cdc42 και πιθανόν του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων. Τα αποτελέσματα αυτά φωτίζουν το ρόλο που έχει η δυναμική της ακτίνης στη συγκρότηση των συνδέσμων προσκόλλησης του ενδοθηλίου και η εισάγουν για πρώτη φορά τη σημασία των μικροσωληνίσκων σε αυτή. Τα δεδομένα ανοίγουν το δρόμο για τη διερεύνηση άγνωστων μέχρι σήμερα λειτουργιών της VE-cadherin στην κυτταρική προσκόλληση και τη μεταγωγή σήματος.



## 5.2 Summary

This work focuses on the study of the properties of transmembrane and juxtamembrane domain of VE-cadherin (VE-C) in a special lipid microenvironment and on its functions for the assembly of adherens junctions at the endothelium.

First, we examined the hypothesis if VE-C is located in special lipid microdomains of the plasma membrane. The results of this study showed that VE-C is located in lipid microdomains of the membrane which are characterized by the presence of cholesterol and PIP2. The fact that VE-C colocalises at great extent with PIP2 at the plasma membrane is revealed for the first time. This was confirmed by two independent experimental approaches: morphological colocalisation analysis of VE-cadherin mCherry and PH-GFP after immunofluorescence and *in vivo* crosslinking, a biochemical approach.

The relationship between VE-cadherin and PIP2 was confirmed also functionally : downregulation of PIP2 after induction of IV 5-ptase at the membrane inhibits the assembly of adherens junctions . Also, its inactivation at the membrane had the same effect.

Cdc42, a member of the family of RhoGTPases is among the proteins that when they are activated they bind to PIP2 and they promote the assembly of adherens junctions. In this way Cdc42 is involved in the function of endothelial barrier as the principal receiver of a mechanism that includes the induction of actin polymerization, but upstream events have not been elucidated yet. Given the fact that VE-cadherin accumulates PIP2, whether VE-cadherin has the same action as far as Cdc42 is concerned, was further examined. It was observed that at the presence of p120, VE-cadherin participates at the recruitment of Cdc42 at the membrane where VE-cadherin is located. Also, there isn't direct interaction between VE-cadherin complex and Cdc42. Among the possible candidate scaffold proteins between VE-cadherin and Cdc42 that were examined was IQGAP. IQGAP coprecipitates with VE-cadherin complex.

At this work data which broaden the known structural and functional properties of VE-cadherin at the plasma membrane is presented. In particular, the presence of VE-cadherin causes the accumulation of PIP2, of the signaling molecule Cdc42 and possibly of microtubules. These results shed light at the role of actin dynamics at the

assembly of adherens junctions and they introduce the importance of microtubules at this process for the first time. Based on these results unknown functions of VE-cadherin at adhesion and signaling will be examined in the future.

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



- Ahrens, T., Lambert, M., Pertz, O., Sasaki, T., Schulthess, T., Mege, R. M., Timpl, R., and Engel, J. (2003). Homoassociation of VE-cadherin follows a mechanism common to "classical" cadherins. *J Mol Biol* 325, 733-742.
- Ahrens, T., Pertz, O., Haussinger, D., Fauser, C., Schulthess, T., and Engel, J. (2002). Analysis of heterophilic and homophilic interactions of cadherins using the c-Jun/c-Fos dimerization domains. *J Biol Chem* 277, 19455-19460.
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* 100, 158-173.
- Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. W., and Ridley, A. J. (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci* 110 ( Pt 6), 707-720.
- Allingham, M. J., van Buul, J. D., and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol* 179, 4053-4064.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271, 20246-20249.
- Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti, A., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1999). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 2286-2297.
- Angst, B. D., Marcozzi, C., and Magee, A. I. (2001). The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 114, 629-641.
- Aspenstrom, P. (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 11, 95-102.
- Babiychuk, E. B., Babiychuk, V. S., Danilova, V. M., Tregubov, V. S., Sagach, V. F., and Draeger, A. (2002). Stress fibres-a Ca<sup>2+</sup> -independent store for annexins? *Biochim Biophys Acta* 1600, 154-161.
- Balla, T., and Varnai, P. (2002). Visualizing cellular phosphoinositide pools with GFP-fused protein-modules. *Sci STKE* 2002, pl3.
- Baumeister, U., Funke, R., Ebnet, K., Vorschmitt, H., Koch, S., and Vestweber, D. (2005). Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *Embo J* 24, 1686-1695.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84, 869-901.
- Bernards, A. (2003). GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* 1603, 47-82.
- Bini, L., Pacini, S., Liberatori, S., Valensin, S., Pellegrini, M., Raggiaschi, R., Pallini, V., and Baldari, C. T. (2003). Extensive temporally regulated reorganization of the lipid raft proteome following T-cell antigen receptor triggering. *Biochem J* 369, 301-309.
- Blankesteyn, W. M., van Gijn, M. E., Essers-Janssen, Y. P., Daemen, M. J., and Smits, J. F. (2000). Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction. *Am J Pathol* 157, 877-883.
- Blaschuk, O. W., Sullivan, R., David, S., and Pouliot, Y. (1990). Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence. *Dev Biol* 139, 227-229.

Bodin, S., Giuriato, S., Ragab, J., Humbel, B. M., Viala, C., Vieu, C., Chap, H., and Payraastre, B. (2001). Production of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidic acid in platelet rafts: evidence for a critical role of cholesterol-enriched domains in human platelet activation. *Biochemistry* *40*, 15290-15299.

Boggon, T. J., Murray, J., Chappuis-Flament, S., Wong, E., Gumbiner, B. M., and Shapiro, L. (2002). C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science* *296*, 1308-1313.

Bouras, T., Lisanti, M. P., and Pestell, R. G. (2004). Caveolin-1 in breast cancer. *Cancer Biol Ther* *3*, 931-941.

Bourne, H. R., Sanders, D. A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.

Braga, V. (2000). Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Exp Cell Res* *261*, 83-90.

Braga, V. M. (1999). Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol Pathol* *52*, 197-202.

Braga, V. M. (2002). Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 546-556.

Braga, V. M., Machesky, L. M., Hall, A., and Hotchin, N. A. (1997). The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol* *137*, 1421-1431.

Brandt, D. T., and Grosse, R. (2007). Get to grips: steering local actin dynamics with IQGAPs. *EMBO Rep* *8*, 1019-1023.

Breier, G., and Risau, W. (1996). The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol* *6*, 454-456.

Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* *14*, 111-136.

Brown, D. A., and Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* *68*, 533-544.

Bullions, L. C., and Levine, A. J. (1998). The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer. *Curr Opin Oncol* *10*, 81-87.

Burrige, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* *12*, 463-518.

Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* *296*, 1655-1657.

Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bianco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., *et al.* (2003). The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol* *162*, 1111-1122.

Causeret, M., Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., and Gauthier-Rouviere, C. (2005). N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. *Mol Biol Cell* *16*, 2168-2180.

Cavey, M., Rauzi, M., Lenne, P. F., and Lecuit, T. (2008). A two-tiered mechanism for stabilization and immobilization of E-cadherin. *Nature* *453*, 751-756.

Charrin, S., Manie, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2003). A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol* *33*, 2479-2489.

Chatterjee, S., Smith, E. R., Hanada, K., Stevens, V. L., and Mayor, S. (2001). GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. *Embo J* *20*, 1583-1592.

- Chen, F., Ma, L., Parrini, M. C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P. W., Davidson, L., Kwiatkowski, D. J., Kirchhausen, T., *et al.* (2000). Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr Biol* *10*, 758-765.
- Chen, X., Kojima, S., Borisy, G. G., and Green, K. J. (2003). p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* *163*, 547-557.
- Cho, H., Kim, Y. A., Yoon, J. Y., Lee, D., Kim, J. H., Lee, S. H., and Ho, W. K. (2005). Low mobility of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate underlies receptor specificity of Gq-mediated ion channel regulation in atrial myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15241-15246.
- Cooper, J. A., and Schafer, D. A. (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* *12*, 97-103.
- Corvera, S. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase and the control of endosome dynamics: new players defined by structural motifs. *Traffic* *2*, 859-866.
- Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* *407*, 258-264.
- Cullen, P. J., Cozier, G. E., Banting, G., and Mellor, H. (2001). Modular phosphoinositide-binding domains--their role in signalling and membrane trafficking. *Curr Biol* *11*, R882-893.
- Czech, M. P. (2003). Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol* *65*, 791-815.
- Davis, M. A., Ireton, R. C., and Reynolds, A. B. (2003). A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol* *163*, 525-534.
- Dawes, A. T., and Edelstein-Keshet, L. (2007). Phosphoinositides and Rho proteins spatially regulate actin polymerization to initiate and maintain directed movement in a one-dimensional model of a motile cell. *Biophys J* *92*, 744-768.
- Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* *121*, 2115-2122.
- Devreotes, P., and Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem* *278*, 20445-20448.
- Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* *443*, 651-657.
- Dietrich, C., Volovyk, Z. N., Levi, M., Thompson, N. L., and Jacobson, K. (2001). Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 10642-10647.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C., *et al.* (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* *293*, 2449-2452.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* *123*, 903-915.
- Drobnik, W., Borsukova, H., Bottcher, A., Pfeiffer, A., Liebisch, G., Schutz, G. J., Schindler, H., and Schmitz, G. (2002). Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic* *3*, 268-278.
- Drubin, D. G., and Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* *84*, 335-344.

- Dvorak, A. M., MacGlashan, D. W., Jr., Morgan, E. S., and Lichtenstein, L. M. (1996). Vesicular transport of histamine in stimulated human basophils. *Blood* 88, 4090-4101.
- Eberhart, C. G., and Argani, P. (2001). Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage. *Pediatr Dev Pathol* 4, 351-357.
- Eberhart, C. G., Tihan, T., and Burger, P. C. (2000). Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 333-337.
- Eddin, M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 414-418.
- Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., and Langel, U. (2001). VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp Cell Res* 269, 237-244.
- Epand, R. M. (2008). Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1576-1582.
- Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13), 1853-1865.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421, 753-756.
- Farnsworth, C. L., and Feig, L. A. (1991). Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP. *Mol Cell Biol* 11, 4822-4829.
- Ferber, A., Yaen, C., Sarmiento, E., and Martinez, J. (2002). An octapeptide in the juxtamembrane domain of VE-cadherin is important for p120ctn binding and cell proliferation. *Exp Cell Res* 274, 35-44.
- Fessler, M. B., Arndt, P. G., Frasch, S. C., Lieber, J. G., Johnson, C. A., Murphy, R. C., Nick, J. A., Bratton, D. L., Malcolm, K. C., and Worthen, G. S. (2004). Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil. *J Biol Chem* 279, 39989-39998.
- Frenette, P. S., and Wagner, D. D. (1996). Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* 335, 43-45.
- Fukata, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 887-897.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109, 873-885.
- Galaup, A., and Germain, S. (2008). [Blocking PlGF, a future in anti-angiogenic therapy?]. *Med Sci (Paris)* 24, 459-462.
- Gallin, W. J. (1998). Evolution of the "classical" cadherin family of cell adhesion molecules in vertebrates. *Mol Biol Evol* 15, 1099-1107.
- Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I., Cafiso, D. S., Wang, J., Murray, D., Pentylala, S. N., Smith, S. O., and McLaughlin, S. (2004). Electrostatic sequestration of PIP2 on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys J* 86, 2188-2207.
- Gavard, J., and Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8, 1223-1234.
- Gentil-dit-Maurin, A., Oun, S., Almagro, S., Bouillot, S., Courcon, M., Linnepe, R., Vestweber, D., Huber, P., and Tillet, E. Unraveling the distinct distributions of VE-



and N-cadherins in endothelial cells: a key role for p120-catenin. *Exp Cell Res* 316, 2587-2599.

Gingras, A. C., Gstaiger, M., Raught, B., and Aebersold, R. (2007). Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 645-654.

Golub, T., and Caroni, P. (2005). PI(4,5)P2-dependent microdomain assemblies capture microtubules to promote and control leading edge motility. *J Cell Biol* 169, 151-165.

Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R., and Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1778, 729-756.

Goodwin, A. M., and D'Amore, P. A. (2002). Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 5, 1-9.

Gory, S., Dalmon, J., Prandini, M. H., Kortulewski, T., de Launoit, Y., and Huber, P. (1998). Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem* 273, 6750-6755.

Gory, S., Vernet, M., Laurent, M., Dejana, E., Dalmon, J., and Huber, P. (1999). The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood* 93, 184-192.

Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 622-634.

Gupta, N., Wollscheid, B., Watts, J. D., Scheer, B., Aebersold, R., and DeFranco, A. L. (2006). Quantitative proteomic analysis of B cell lipid rafts reveals that ezrin regulates antigen receptor-mediated lipid raft dynamics. *Nat Immunol* 7, 625-633.

Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 33, 891-895.

Harder, T., and Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9, 534-542.

Hartsock, A., and Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1778, 660-669.

Hartwig, J. H., Bokoch, G. M., Carpenter, C. L., Janmey, P. A., Taylor, L. A., Toker, A., and Stossel, T. P. (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncouple actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets. *Cell* 82, 643-653.

Haslam, R. J., and Coorsen, J. R. (1993). Evidence that activation of phospholipase D can mediate secretion from permeabilized platelets. *Adv Exp Med Biol* 344, 149-164.

Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., and Sims, P. J. (1989). Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* 264, 7768-7771.

Haugh, J. M., Codazzi, F., Teruel, M., and Meyer, T. (2000). Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J Cell Biol* 151, 1269-1280.

Hayashi, K., Matsuda, S., Machida, K., Yamamoto, T., Fukuda, Y., Nimura, Y., Hayakawa, T., and Hamaguchi, M. (2001). Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res* 61, 2361-2364.

Heasman, S. J., and Ridley, A. J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.

Henn, V., Slupsky, J. R., Grafe, M., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Muller-Berghaus, G., and Kroczek, R. A. (1998). CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391, 591-594.

Hewat, E. A., Durmort, C., Jacquamet, L., Concord, E., and Gulino-Debrac, D. (2007). Architecture of the VE-cadherin hexamer. *J Mol Biol* 365, 744-751.

Heyraud, S., Jaquinod, M., Durmort, C., Dambroise, E., Concord, E., Schaal, J. P., Huber, P., and Gulino-Debrac, D. (2008). Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions. *Mol Cell Biol* 28, 1657-1668.

Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (2000). Activation by Cdc42 and PIP(2) of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) stimulates actin nucleation by Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 150, 1311-1320.

Hope, H. R., and Pike, L. J. (1996). Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* 7, 843-851.

Huber, A. H., Stewart, D. B., Laurents, D. V., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2001). The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem* 276, 12301-12309.

Huber, P., Dalmon, J., Engiles, J., Breviario, F., Gory, S., Siracusa, L. D., Buchberg, A. M., and Dejana, E. (1996). Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse VE-cadherin gene (*Cdh5*). *Genomics* 32, 21-28.

Huo, H., Guo, X., Hong, S., Jiang, M., Liu, X., and Liao, K. (2003). Lipid rafts/caveolae are essential for insulin-like growth factor-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction. *J Biol Chem* 278, 11561-11569.

Hurley, J. H., and Meyer, T. (2001). Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol* 13, 146-152.

Iannolo, G., Salcini, A. E., Gaidarov, I., Goodman, O. B., Jr., Baulida, J., Carpenter, G., Pelicci, P. G., Di Fiore, P. P., and Keen, J. H. (1997). Mapping of the molecular determinants involved in the interaction between eps15 and AP-2. *Cancer Res* 57, 240-245.

Imai, K., Nonoyama, S., Miki, H., Morio, T., Fukami, K., Zhu, Q., Aruffo, A., Ochs, H. D., Yata, J., and Takenawa, T. (1999). The pleckstrin homology domain of the Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in the organization of actin cytoskeleton. *Clin Immunol* 92, 128-137.

Imamura, Y., Itoh, M., Maeno, Y., Tsukita, S., and Nagafuchi, A. (1999). Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol* 144, 1311-1322.

Ireton, R. C., Davis, M. A., van Hengel, J., Mariner, D. J., Barnes, K., Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Matrisian, L., Bundy, L. M., Sealy, L., *et al.* (2002). A novel role for p120 catenin in E-cadherin function. *J Cell Biol* 159, 465-476.

Iyer, S., Ferreri, D. M., DeCocco, N. C., Minnear, F. L., and Vincent, P. A. (2004). VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286, L1143-1153.

Jacobson, K., Mouritsen, O. G., and Anderson, R. G. (2007). Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nat Cell Biol* 9, 7-14.

Johnson, J. P. (1999). Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 18, 345-357.

Jou, T. S., and Nelson, W. J. (1998). Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol* 142, 85-100.

Jung, F., Haendeler, J., Hoffmann, J., Reissner, A., Dermbach, E., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2002). Hypoxic induction of the hypoxia-inducible factor is mediated via the adaptor protein Shc in endothelial cells. *Circ Res* 91, 38-45.

- Kahn, M. L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M. J., Ishihara, H., and Coughlin, S. R. (1999). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest* *103*, 879-887.
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M. D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* *17*, 615-675.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., and Lemmon, M. A. (1998). Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* *273*, 30497-30508.
- Klein, U., Gimpl, G., and Fahrenholz, F. (1995). Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* *34*, 13784-13793.
- Knudsen, K. A., Frankowski, C., Johnson, K. R., and Wheelock, M. J. (1998). A role for cadherins in cellular signaling and differentiation. *J Cell Biochem Suppl* *30-31*, 168-176.
- Kobielak, A., and Fuchs, E. (2004). Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 614-625.
- Koch, A. W., Bozic, D., Pertz, O., and Engel, J. (1999). Homophilic adhesion by cadherins. *Curr Opin Struct Biol* *9*, 275-281.
- Kodama, A., Lechler, T., and Fuchs, E. (2004). Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements. *J Cell Biol* *167*, 203-207.
- Kodama, A., Takaishi, K., Nakano, K., Nishioka, H., and Takai, Y. (1999). Involvement of Cdc42 small G protein in cell-cell adhesion, migration and morphology of MDCK cells. *Oncogene* *18*, 3996-4006.
- Konstantoulaki, M., Kouklis, P., and Malik, A. B. (2003). Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* *285*, L434-442.
- Kouklis, P., Konstantoulaki, M., and Malik, A. B. (2003). VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *J Biol Chem* *278*, 16230-16236.
- Kouklis, P., Konstantoulaki, M., Vogel, S., Broman, M., and Malik, A. B. (2004). Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res* *94*, 159-166.
- Kroschewski, R., Hall, A., and Mellman, I. (1999). Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* *1*, 8-13.
- Kureishi, Y., Kobayashi, S., Amano, M., Kimura, K., Kanaide, H., Nakano, T., Kaibuchi, K., and Ito, M. (1997). Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* *272*, 12257-12260.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., *et al.* (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* *281*, 832-835.
- Kurzchalia, T. (2003). Anthrax toxin rafts into cells. *J Cell Biol* *160*, 295-296.
- Kurzchalia, T. V., and Parton, R. G. (1999). Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* *11*, 424-431.
- Kwik, J., Boyle, S., Fooksman, D., Margolis, L., Sheetz, M. P., and Edidin, M. (2003). Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-

bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13964-13969.

Lamarche, N., Tapon, N., Stowers, L., Burbelo, P. D., Aspenstrom, P., Bridges, T., Chant, J., and Hall, A. (1996). Rac and Cdc42 induce actin polymerization and G1 cell cycle progression independently of p65PAK and the JNK/SAPK MAP kinase cascade. *Cell* *87*, 519-529.

Lambeng, N., Wallez, Y., Rampon, C., Cand, F., Christe, G., Gulino-Debrac, D., Vilgrain, I., and Huber, P. (2005). Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* *96*, 384-391.

Lampugnani, M. G., Corada, M., Andriopoulou, P., Esser, S., Risau, W., and Dejana, E. (1997). Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci* *110 (Pt 17)*, 2065-2077.

Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1997). Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 674-682.

Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (2007). The control of endothelial cell functions by adherens junctions. *Novartis Found Symp* *283*, 4-13; discussion 13-17, 238-241.

Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., and Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* *118*, 1511-1522.

Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., and Dejana, E. (2002). VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell* *13*, 1175-1189.

Lauffenburger, D. A. (1996). Cell motility. Making connections count. *Nature* *383*, 390-391.

Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D., and Caroni, P. (2000). GAP43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P(2) at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex actin dynamics through a common mechanism. *J Cell Biol* *149*, 1455-1472.

Lechler, T., and Fuchs, E. (2007). Desmoplakin: an unexpected regulator of microtubule organization in the epidermis. *J Cell Biol* *176*, 147-154.

Lee, H., Park, D. S., Razani, B., Russell, R. G., Pestell, R. G., and Lisanti, M. P. (2002). Caveolin-1 mutations (P132L and null) and the pathogenesis of breast cancer: caveolin-1 (P132L) behaves in a dominant-negative manner and caveolin-1 (-/-) null mice show mammary epithelial cell hyperplasia. *Am J Pathol* *161*, 1357-1369.

Legrand, P., Bibert, S., Jaquinod, M., Ebel, C., Hewat, E., Vincent, F., Vanbelle, C., Concord, E., Vernet, T., and Gulino, D. (2001). Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca<sup>2+</sup>-dependent hexameric structure. *J Biol Chem* *276*, 3581-3588.

Liebner, S., Cattelino, A., Gallini, R., Rudini, N., Iurlaro, M., Piccolo, S., and Dejana, E. (2004). Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* *166*, 359-367.

Liepina, I., Czaplowski, C., Janmey, P., and Liwo, A. (2003). Molecular dynamics study of a gelsolin-derived peptide binding to a lipid bilayer containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biopolymers* *71*, 49-70.

Ligon, L. A., Karki, S., Tokito, M., and Holzbaur, E. L. (2001). Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol* *3*, 913-917.

Lilien, J., and Balsamo, J. (2005). The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 459-465.

- London, E. (2002). Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Curr Opin Struct Biol* *12*, 480-486.
- Lowin-Kropf, B., Shapiro, V. S., and Weiss, A. (1998). Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* *140*, 861-871.
- Machesky, L. M., and Hall, A. (1996). Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* *6*, 304-310.
- Maeda, M., Johnson, E., Mandal, S. H., Lawson, K. R., Keim, S. A., Svoboda, R. A., Caplan, S., Wahl, J. K., 3rd, Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2006). Expression of inappropriate cadherins by epithelial tumor cells promotes endocytosis and degradation of E-cadherin via competition for p120(ctn). *Oncogene* *25*, 4595-4604.
- Manser, E., Huang, H. Y., Loo, T. H., Chen, X. Q., Dong, J. M., Leung, T., and Lim, L. (1997). Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol* *17*, 1129-1143.
- Martinelli, R., Gegg, M., Longbottom, R., Adamson, P., Turowski, P., and Greenwood, J. (2009). ICAM-1-mediated endothelial nitric oxide synthase activation via calcium and AMP-activated protein kinase is required for transendothelial lymphocyte migration. *Mol Biol Cell* *20*, 995-1005.
- McLaughlin, S., and Aderem, A. (1995). The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* *20*, 272-276.
- McLaughlin, S., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I., and Golebiewska, U. (2005). Reversible - through calmodulin - electrostatic interactions between basic residues on proteins and acidic lipids in the plasma membrane. *Biochem Soc Symp*, 189-198.
- Mehta, D., Ahmed, G. U., Paria, B. C., Holinstat, M., Voyno-Yasenetskaya, T., Tirupathi, C., Minshall, R. D., and Malik, A. B. (2003). RhoA interaction with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and transient receptor potential channel-1 regulates Ca<sup>2+</sup> entry. Role in signaling increased endothelial permeability. *J Biol Chem* *278*, 33492-33500.
- Mehta, D., and Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* *86*, 279-367.
- Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *Embo J* *15*, 5326-5335.
- Millard, T. H., Sharp, S. J., and Machesky, L. M. (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem J* *380*, 1-17.
- Mishra, S., and Joshi, P. G. (2007). Lipid raft heterogeneity: an enigma. *J Neurochem* *103 Suppl 1*, 135-142.
- Misra, S., Miller, G. J., and Hurley, J. H. (2001). Recognizing phosphatidylinositol 3-phosphate. *Cell* *107*, 559-562.
- Mitchison, T. J., and Cramer, L. P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* *84*, 371-379.
- Miyashita, Y., and Ozawa, M. (2007). Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein. *J Biol Chem* *282*, 11540-11548.
- Nabi, I. R., and Le, P. U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* *161*, 673-677.
- Nakano, K., Takaishi, K., Kodama, A., Mammoto, A., Shiozaki, H., Monden, M., and Takai, Y. (1999). Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho

small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* *10*, 2481-2491.

Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mandoteanu, I., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1995). Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem* *270*, 30965-30972.

Nobes, C. D., and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* *144*, 1235-1244.

Nollet, F., Kools, P., and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* *299*, 551-572.

Noren, N. K., Liu, B. P., Burrridge, K., and Kreft, B. (2000). p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *J Cell Biol* *150*, 567-580.

Noren, N. K., Niessen, C. M., Gumbiner, B. M., and Burrridge, K. (2001). Cadherin engagement regulates Rho family GTPases. *J Biol Chem* *276*, 33305-33308.

Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S., and Kaibuchi, K. (2005). IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* *118*, 2085-2092.

Nose, A., Tsuji, K., and Takeichi, M. (1990). Localization of specificity determining sites in cadherin cell adhesion molecules. *Cell* *61*, 147-155.

Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S. D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* *25*, 229-235.

Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P., and Slotte, J. P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* *41*, 66-97.

Okeley, N. M., and Gelb, M. H. (2004). A designed probe for acidic phospholipids reveals the unique enriched anionic character of the cytosolic face of the mammalian plasma membrane. *J Biol Chem* *279*, 21833-21840.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* *11*, 545-554.

Owen, D. J. (2004). Linking endocytic cargo to clathrin: structural and functional insights into coated vesicle formation. *Biochem Soc Trans* *32*, 1-14.

Parton, R. G. (1996). Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol* *8*, 542-548.

Parton, R. G., and Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 185-194.

Peiro, S., Comella, J. X., Enrich, C., Martin-Zanca, D., and Rocamora, N. (2000). PC12 cells have caveolae that contain TrkA. Caveolae-disrupting drugs inhibit nerve growth factor-induced, but not epidermal growth factor-induced, MAPK phosphorylation. *J Biol Chem* *275*, 37846-37852.

Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell* *11*, 601-612.

Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A., and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca<sup>2+</sup> dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J* *18*, 1738-1747.

Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A., and Dunach, M. (2003). p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* *23*, 2287-2297.

Pike, L. J. (2004). Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* *378*, 281-292.

Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* *47*, 1597-1598.

- Pike, L. J., and Miller, J. M. (1998). Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* *273*, 22298-22304.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.
- Potter, M. D., Barbero, S., and Cheresh, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* *280*, 31906-31912.
- Pradhan, D., Lombardo, C. R., Roe, S., Rimm, D. L., and Morrow, J. S. (2001). alpha-Catenin binds directly to spectrin and facilitates spectrin-membrane assembly in vivo. *J Biol Chem* *276*, 4175-4181.
- Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D., and Lim, W. A. (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science* *290*, 801-806.
- Rabiet, M. J., Plantier, J. L., Rival, Y., Genoux, Y., Lampugnani, M. G., and Dejana, E. (1996). Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *16*, 488-496.
- Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A., Plattner, H., and Illges, H. (2003). Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8241-8246.
- Rameh, L. E., and Cantley, L. C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* *274*, 8347-8350.
- Ramstedt, B., and Slotte, J. P. (2002). Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Lett* *531*, 33-37.
- Ratcliffe, K. E., Anthony, F. W., Richardson, M. C., and Stones, R. W. (1999). Morphology and functional characteristics of human ovarian microvascular endothelium. *Hum Reprod* *14*, 1549-1554.
- Reynolds, A. B., Herbert, L., Cleveland, J. L., Berg, S. T., and Gaut, J. R. (1992). p120, a novel substrate of protein tyrosine kinase receptors and of p60v-src, is related to cadherin-binding factors beta-catenin, plakoglobin and armadillo. *Oncogene* *7*, 2439-2445.
- Reynolds, A. B., and Roczniak-Ferguson, A. (2004). Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene* *23*, 7947-7956.
- Ridley, A. J. (1996). Rho: theme and variations. *Curr Biol* *6*, 1256-1264.
- Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* *70*, 401-410.
- Risau, W. (1998). Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl* *67*, S3-6.
- Rodgers, W., and Zavzavadjian, J. (2001). Glycolipid-enriched membrane domains are assembled into membrane patches by associating with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* *267*, 173-183.
- Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol* *150*, 1299-1310.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* *97*, 221-231.

- Roper, K., Corbeil, D., and Huttner, W. B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2, 582-592.
- Roth, M. G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* 84, 699-730.
- Rozelle, A. L., Machesky, L. M., Yamamoto, M., Driessens, M. H., Insall, R. H., Roth, M. G., Luby-Phelps, K., Marriott, G., Hall, A., and Yin, H. L. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* 10, 311-320.
- Rudini, N., and Dejana, E. (2008). Adherens junctions. *Curr Biol* 18, R1080-1082.
- Sato, T. K., Overduin, M., and Emr, S. D. (2001). Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* 294, 1881-1885.
- Schnittler, H. J., and Preissner, K. T. (2005). Vascular endothelium and infectious diseases: trick and treat. *Thromb Haemost* 94, 238-239.
- Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994). Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12130-12134.
- Schroeder, R. J., Ahmed, S. N., Zhu, Y., London, E., and Brown, D. A. (1998). Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J Biol Chem* 273, 1150-1157.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5795-5800.
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C. P., Saftig, P., and Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* 102, 1192-1201.
- Scott, J. A., Shewan, A. M., den Elzen, N. R., Loureiro, J. J., Gertler, F. B., and Yap, A. S. (2006). Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts. *Mol Biol Cell* 17, 1085-1095.
- Sechi, A. S., and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3685-3695.
- Sells, M. A., and Chernoff, J. (1997). Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends Cell Biol* 7, 162-167.
- Shasby, D. M., Ries, D. R., Shasby, S. S., and Winter, M. C. (2002). Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L1330-1338.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Simonsen, A., and Stenmark, H. (2001). PX domains: attracted by phosphoinositides. *Nat Cell Biol* 3, E179-182.
- Singer, S. J., and Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.



Sinha, M., Mishra, S., and Joshi, P. G. (2003). Liquid-ordered microdomains in lipid rafts and plasma membrane of U-87 MG cells: a time-resolved fluorescence study. *Eur Biophys J* 32, 381-391.

Stan, R. V. (2005). Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta* 1746, 334-348.

Stauffer, T. P., Ahn, S., and Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> concentration monitored in living cells. *Curr Biol* 8, 343-346.

Steimle, P. A., Hoffert, J. D., Adey, N. B., and Craig, S. W. (1999). Polyphosphoinositides inhibit the interaction of vinculin with actin filaments. *J Biol Chem* 274, 18414-18420.

Stenberg, P. E., McEver, R. P., Shuman, M. A., Jacques, Y. V., and Bainton, D. F. (1985). A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 101, 880-886.

Stockton, R. A., Schaefer, E., and Schwartz, M. A. (2004). p21-activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility. *J Biol Chem* 279, 46621-46630.

Stuart, E. S., Webley, W. C., and Norkin, L. C. (2003). Lipid rafts, caveolae, caveolin-1, and entry by Chlamydiae into host cells. *Exp Cell Res* 287, 67-78.

Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.

Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., and Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* 139, 1047-1059.

Takeichi, M. (1990). Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59, 237-252.

Tamilselvam, B., and Daefler, S. (2008). Francisella targets cholesterol-rich host cell membrane domains for entry into macrophages. *J Immunol* 180, 8262-8271.

Tapon, N., and Hall, A. (1997). Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 9, 86-92.

Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., Charrasse, S., Bodin, S., and Gauthier-Rouviere, C. (2009). N-cadherin/p120 catenin association at cell-cell contacts occurs in cholesterol-rich membrane domains and is required for RhoA activation and myogenesis. *J Biol Chem* 284, 23137-23145.

Thoreson, M. A., Anastasiadis, P. Z., Daniel, J. M., Ireton, R. C., Wheelock, M. J., Johnson, K. R., Hummingbird, D. K., and Reynolds, A. B. (2000). Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J Cell Biol* 148, 189-202.

Toker, A. (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* 10, 254-261.

Ukropec, J. A., Hollinger, M. K., Salva, S. M., and Woolkalis, M. J. (2000). SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J Biol Chem* 275, 5983-5986.

van Meer, G., Voelker, D. R., and Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112-124.

Varnai, P., Thyagarajan, B., Rohacs, T., and Balla, T. (2006). Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J Cell Biol* 175, 377-382.

Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., and Huber, P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6273-6278.

Wallez, Y., and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* *1778*, 794-809.

Wallez, Y., Vilgrain, I., and Huber, P. (2006). Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* *16*, 55-59.

Wang, J., Gambhir, A., Hangyas-Mihalyne, G., Murray, D., Golebiewska, U., and McLaughlin, S. (2002). Lateral sequestration of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by the basic effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate is due to nonspecific electrostatic interactions. *J Biol Chem* *277*, 34401-34412.

Wang, M., and Hajishengallis, G. (2008). Lipid raft-dependent uptake, signalling and intracellular fate of *Porphyromonas gingivalis* in mouse macrophages. *Cell Microbiol* *10*, 2029-2042.

Watabe-Uchida, M., Uchida, N., Imamura, Y., Nagafuchi, A., Fujimoto, K., Uemura, T., Vermeulen, S., van Roy, F., Adamson, E. D., and Takeichi, M. (1998). alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol* *142*, 847-857.

Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* *16*, 3044-3056.

Watson, R. T., Shigematsu, S., Chiang, S. H., Mora, S., Kanzaki, M., Macara, I. G., Saltiel, A. R., and Pessin, J. E. (2001). Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation. *J Cell Biol* *154*, 829-840.

Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y. S., Himes, N., *et al.* (2004). Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* *113*, 885-894.

Wenk, M. R., and De Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 8262-8269.

Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* *19*, 207-235.

Wojciak-Stothard, B., Potempa, S., Eichholtz, T., and Ridley, A. J. (2001). Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci* *114*, 1343-1355.

Xiao, K., Allison, D. F., Buckley, K. M., Kottke, M. D., Vincent, P. A., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2003). Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol* *163*, 535-545.

Xiao, K., Garner, J., Buckley, K. M., Vincent, P. A., Chiasson, C. M., Dejana, E., Faundez, V., and Kowalczyk, A. P. (2005). p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Mol Biol Cell* *16*, 5141-5151.

Xu, D. Y., Zhao, S. P., and Peng, W. P. (1998). Elevated plasma levels of soluble P-selectin in patients with acute myocardial infarction and unstable angina. An inverse link to lipoprotein(a). *Int J Cardiol* *64*, 253-258.

Yagi, T., and Takeichi, M. (2000). Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev* *14*, 1169-1180.

- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., and Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* *123*, 889-901.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., Jr., and Ishikawa, Y. (1998). Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* *273*, 26962-26968.
- Yap, A. S., Briehner, W. M., and Gumbiner, B. M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* *13*, 119-146.
- Yap, A. S., Niessen, C. M., and Gumbiner, B. M. (1998). The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn. *J Cell Biol* *141*, 779-789.
- Yu, J., Fischman, D. A., and Steck, T. L. (1973). Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct* *1*, 233-248.
- Zigmond, S. (2004). Formin' adherens junctions. *Nat Cell Biol* *6*, 12-14.
- Zigmond, S. H., Joyce, M., Yang, C., Brown, K., Huang, M., and Pring, M. (1998). Mechanism of Cdc42-induced actin polymerization in neutrophil extracts. *J Cell Biol* *142*, 1001-1012.