







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

*Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Γονιδίων τα οποία Ρυθμίζονται από τον VEGF  
(Vascular Endothelial Growth Factor)*

**ΕΥΔΟΞΙΑ ΚΑΡΑΛΗ**  
**ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



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



Ημερομηνία αίτησης της κ. Καραλή Ευδοξίας: 7-12-2005

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 569<sup>α</sup>/13-12-2005

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Χριστοφορίδης Σάββας Λέκτορας Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Murphy Carol Ερευνήτρια Β' ΙΒΕ-ΙΤΕ

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-3-2006

«Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Γονιδίων τα οποία ρυθμίζονται από τον VEGF»

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** : 731<sup>α</sup>/6-3-2012

Γαλάρης Δημήτριος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φριλίγγος Ευστάθιος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Χριστοφορίδης Σάββας	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Carol Murphy	Ερευνήτρια Β', Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-7-2012

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

Μαργαρίτα Τσαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής







## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

*Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών (ITE-IBE), κατά την χρονική περίοδο 2006-2012, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση. Η χρηματοδότηση για τη διεκπεραίωση της διατριβής προήλθε από το ευρωπαϊκό πρόγραμμα Pulmonary Hypertension (Pulmotension) (EU, FP6 LSHM-CT-2006-018725).*

*Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντά μου κ. Θεόδωρο Φώτση, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου στο εργαστήριο του, αλλά και για την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη την πορεία της διατριβής αυτής. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ερευνήτρια Β' κ. Carol Murphy και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σάββα Χριστοφορίδη, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Δ. Γαλάρη, τον Καθηγητή κ. Σ. Γεωργάτο, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κ. Θ. Παπαμαρκάκη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ε. Φριλίγγο για τη συμμετοχή τους στην αξιολόγηση της παρούσας εργασίας και τις πολύτιμες συμβουλές τους.*

*Δε θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου, πρώην και νυν, για τη συνεργασία τους αλλά και για τις στιγμές που μοιραστήκαμε εντός και εκτός εργαστηρίου: Νικολέτα Κωστοπούλου, Γεώργιο Σφλώμο, Κατερίνα Πανοπούλου, Λαμπρινή Κύρκου, Ελένη Μπαγκλή, Αθηνά Κύρκου, Άγγελο Παπαδόπουλο, Λάζαρο Φωτόπουλο, Παναγιώτα Χήρα, Πριμικήρη Αλεξάνδρα και Δημήτρη Κουρούπη. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω, όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών μεταξύ των οποίων την καλή μου φίλη και συνάδερφο Κατερίνα Γεωργοπούλου. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Σοφία Μπέλλου, που εκτός από στενή συνεργάτη και σύμβουλος με δίδαξε και μου μετέφερε τις γνώσεις της, στα πρώτα βήματα της εργαστηριακής μου πορείας.*

*Τελειώνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους μου τους φίλους για τη συμπαράσταση και τη βοήθεια που μου προσέφεραν, με τον τρόπο τους ο καθένας ξεχωριστά, όλα αυτά τα χρόνια. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στον Δρ. Λευτέρη Κωσταρά, για τις αμέτρητες ώρες, τις δυσκολίες και τις χαρές που περάσαμε μαζί στα πλαίσια της κοινής μας πορείας, στο εργαστήριο και στη ζωή.*

*Κλείνοντας, θα ήθελα να πω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους γονείς μου Θύμιο και Κατερίνα, που πάντα στήριζαν τις επιλογές μου και χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να φέρω εις πέρας τη διατριβή αυτή, όπως και τις αδερφές μου Ελεωνόρα και Ευαγγελία που ήταν πάντα εκεί όταν τις χρειάστηκα, να με στηρίξουν και να μου δώσουν τη δύναμη να επιτύχω τους στόχους μου.*



*Στην οικογένεια μου...*

*Θύμιο και Κατερίνα*

*Ελεωνόρα και Ευαγγελία*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1.1 Η ΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ .....	1
1.1.2 Η ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ (VASCULOGENESIS) .....	3
1.1.3 Η ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΜΥΟΓΕΝΕΣΗ .....	4
1.1.4 ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ .....	5
1.1.5 Η ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ .....	8
1.1.5.1 Αγγειογένεση με εκβλάστηση (Sprouting angiogenesis) .....	9
1.1.5.2 Αγγειογένεση με εγκολεασμό (Intussusceptive Angiogenesis) .....	10
1.1.5.3 Η αγγειογένεση σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις .....	12
<b>1.2 Ο ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR).....</b>	<b>13</b>
1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΝ VEGF.....	13
1.2.2 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ VEGF ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥΣ .....	14
1.2.2.1 Οι ισομορφές του VEGF .....	15
1.2.2.2 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF.....	16
1.2.2.3 Οι υποδοχείς του VEGF: δομή, συγγένεια πρόσδεσης, έκφραση και λειτουργία.....	18
1.2.2.3.1 Ο ρόλος των συν-υποδοχέων στη σηματοδότηση του VEGF .....	19
1.2.2.3.2 Η ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGF από μόρια προσκόλλησης .....	21
1.2.3 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΟΥ VEGF .....	23
1.2.3.1 Η μεταγωγή του σήματος από τον VEGFR1 .....	24
1.2.3.2 Η μεταγωγή του σήματος από τον VEGFR2 .....	25
1.2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΝ VEGF .....	28
1.2.4.1 Η σηματοδότηση μέσω του VEGFR2 είναι βασική για την κυτταρική επιβίωση .....	28
1.2.4.2 Ο VEGFR2 διαμεσολαβεί τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού .....	29
1.2.4.3 Ο ρόλος του υποδοχέα VEGFR2 στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και τη μετανάστευση .....	30
1.2.4.4 Ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων μέσω του VEGFR2 .....	31
1.2.4.5 Ο VEGFR3 είναι ο κύριος ρυθμιστής της λεμφαγγειογένεσης.....	32
<b>1.3 VEGF ΚΑΙ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ .....</b>	<b>33</b>
1.3.1 Ο ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ VEGF ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ UPR .....	33
1.3.1.1 Οι πρωτεΐνες DNAJB9 /ERDJ4 και HERPUD1 .....	34
<b>1.4 ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ .....</b>	<b>36</b>

1.4.1 Το ενδοπλασματικό δίκτυο και η φυσιολογική λειτουργία του κυτταρού	36
1.4.2 Η πρωτεϊνική αναδιπλώση και ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών στο ΕΔ	37
1.4.3 Η αποκρίση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR)	38
1.4.3.1 Η πρωτεΐνη BiP ως κύριος αρνητικός ρυθμιστής της UPR	41
1.4.3.2 Μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων της UPR μέσω της πρωτεΐνης ATF6	43
1.4.3.3 Η πρωτεΐνη IRE1: Ο συντηρημένος πυρήνας της UPR	45
1.4.3.4 Το μονοπάτι της πρωτεΐνης PERK και ο μεταφραστικός έλεγχος της UPR	48
1.4.3.5 Ο μηχανισμός της ΕΔ-συνδεδεμένης αποικοδόμησης, ERAD	52
1.4.3.6 Διασταυρώσεις μεταξύ των βραχιόνων της UPR	53
1.4.4 Παρατεταμένο στρες του ΕΔ και αποπτώση	54
1.4.5 Η δυναμική ρύθμιση των μονοπατιών της UPR μέσω ανατροφοδοτικής ρύθμισης (Feedback Regulation)	57
1.4.6 Ο ρολός της UPR στη φυσιολογική ενδοκυτταρική σηματοδότηση	58
1.4.7 Ο ρολός της UPR στην παθογένεση και τον καρκίνο	61
<b>1.5 ΣΚΟΠΟΣ</b>	<b>63</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>65</b>
<b>2.1 ΥΛΙΚΑ</b>	<b>65</b>
2.1.1 Αντισώματα και αυθεντικοί παράγοντες	65
2.1.2 Πλασμιδία και ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNAs	66
2.1.3 Χημικές ουσίες και αναστολείς	66
<b>2.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>	<b>67</b>
2.2.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφαλιού λωρού	67
2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών	68
2.2.3 Διαμόλυση κυττάρων με DNA και siRNA	68
2.2.4 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVE με ενσωμάτωση βρωμοδεοξυ ουριδίνης	69
2.2.5 Δοκιμασία μεταναστεύσης κυττάρων HUVE	70
2.2.6 Δοκιμασία επιβίωσης των κυττάρων HUVE με κυτταρομετρία ροής, Flow Cytometry (FACS) Assay: Σημάνση με αννεΐνη και ιωδιούχο προπιδίο	70
2.2.7 Ασβεστο-εξαρτημένη δοκιμασία φθορισμού, Fluor-4 NW Calcium Assay	72
<b>2.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>73</b>
2.3.1 Απομόνωση, ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA	73
2.3.1.1 Απομόνωση RNA	73

2.3.1.2 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA και DNA.....	74
2.3.2 ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ- QRT- PCR.....	75
2.3.4 ΣΑΡΩΣΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ (QRT-PCR), RT <sup>2</sup> PROFILER PCR ARRAY ASSAY .....	77
2.3.5 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ .....	78
2.3.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (SDS-PAGE) ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN .....	79
2.3.6.1 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	80
2.4 ΣΥΝΕΣΤΙΑΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ .....	81
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>83</b>
<b>3.1 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>HERPUD1</i> ΚΑΙ <i>DNAJB9</i> .....</b>	<b>83</b>
3.1.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΘΕΤΙΚΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>HERPUD1</i> ΚΑΙ <i>DNAJB9</i> ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ QRT-PCR.....	83
3.1.2 Ο VEGF ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ <i>HERPUD1</i> .....	84
3.1.3 Η ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>HERPUD1</i> ΚΑΙ <i>DNAJB9</i> ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF ΕΙΝΑΙ ΕΙΔΙΚΗ .....	85
<b>3.2 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΕΔ ΣΤΙΣ ΜΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ .....</b>	<b>86</b>
3.2.1 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΕΝΑ ΜΕΓΑΛΟ ΑΡΙΘΜΟ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ UPR ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ .....	87
3.2.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ UPR ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....	91
<b>3.3 Ο VEGF ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ UPR ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΧΙ ΥΠΕΡΦΟΡΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΕΔ ΜΕ ΜΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....</b>	<b>92</b>
3.3.1 Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΔΕΝ ΕΞΑΛΕΙΦΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ <i>HERPUD1</i> ΚΑΙ <i>DNAJB9</i> ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....	92
<b>3.3.2 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ <i>IRE1</i> ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF ΕΝΤΟΣ 15 ΛΕΠΤΩΝ.....</b>	<b>94</b>
3.3.3 Ο VEGF ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΚΑΘΟΔΙΚΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PERK ΕΝΤΟΣ 30 ΛΕΠΤΩΝ .....	96
3.3.4 Ο VEGF ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ATF6 ΕΝΤΟΣ 30 ΛΕΠΤΩΝ. ....	98
3.3.4.1 Ο VEGF επάγει γρήγορα τη μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού της πρωτεΐνης ATF6.....	100
3.3.4.2 Η μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων της UPR από τον VEGF απαιτεί ενεργοποίηση περισσότερων του ενός μονοπατιού του ΕΔ .....	102
<b>3.4 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ UPR ΜΕΣΩ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PLCγ.....</b>	<b>104</b>

<b>3.4.1 Ο ΑΝΑΣΤΟΛΕΑΣ ΤΗΣ PLCΓ (U73122) ΜΕΙΩΝΕΙ ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ <i>HERPUD1</i> ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....</b>	<b>104</b>
3.4.2 Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ PLCΓ ΜΕΙΩΝΕΙ ΔΡΑΣΤΙΚΑ ΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ IRE1, ATF6 ΚΑΙ PERK ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....	105
3.4.3 Ο VEGF ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ UPR, ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ PLCΓ, ΜΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΟ ΤΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ (Ca <sup>2+</sup> ).....	107
<b>3.5 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ UPR ΔΙΑΔΡΑΜΜΑΤΙΖΕΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ .....</b>	<b>111</b>
3.5.1 Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΒΡΑΧΙΟΝΩΝ ΤΗΣ ESR ΤΟΥ ΕΔ ΔΕΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....	112
3.5.2 Η ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΩΝ ΤΡΙΩΝ ΒΡΑΧΙΟΝΩΝ ΤΗΣ ESR ΤΟΥ ΕΔ ΔΕΝ ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΝΑΣΤΕΥΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....	113
3.5.3 ΤΑ ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ATF6 ΚΑΙ PERK ΔΙΑΔΡΑΜΑΤΙΖΟΥΝ ΚΑΘΟΡΙΣΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF .....	114
3.5.4 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ PLCΓ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΟΝΟΠΑΤΙΩΝ ATF6 ΚΑΙ PERK ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF ΣΥΜΜΕΤΕΧΕΙ ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΝΤΙ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΟΥ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ PI3K/ΑΚΤ .....	118
3.5.5 Ο VEGF ΔΕΝ ΑΥΞΑΝΕΙ ΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΠΡΟ-ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ CHOP ΠΑΡΑ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΗ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ .....	119
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>123</b>



# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Η ΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΑΓΓΕΙΩΝ

### 1.1.1 Γενική θεώρηση

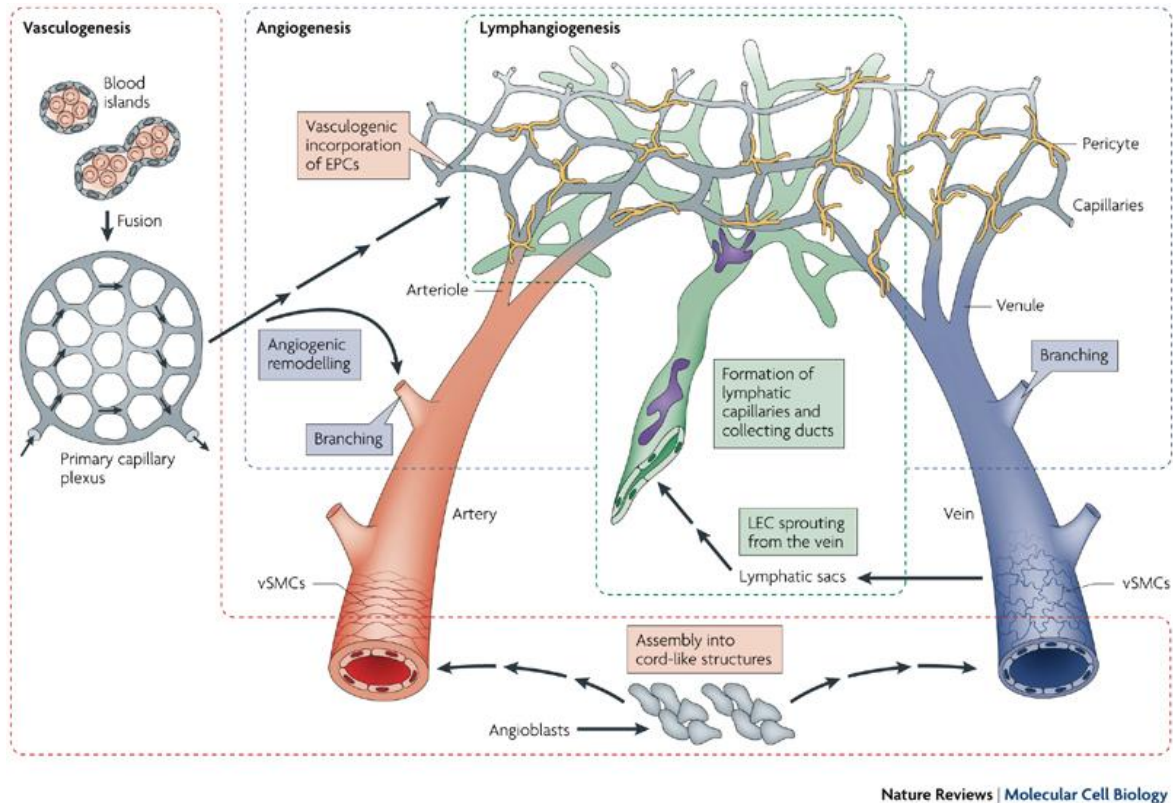
Όλα τα κύτταρα των ανώτερων οργανισμών προκειμένου να διατηρηθούν στη ζωή και να επιτελέσουν τις λειτουργίες τους χρειάζονται οξυγόνο και θρεπτικές ουσίες. Ο εφοδιασμός αυτός γίνεται από το αίμα, το οποίο ταυτόχρονα παραλαμβάνει και απομακρύνει από τα κύτταρα το CO<sub>2</sub> και τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού. Αυτή η βασική λειτουργία του αίματος, επιτυγχάνεται με την κυκλοφορία του μέσω των *αιμοφόρων αγγείων*. Τα αιμοφόρα αγγεία δημιουργούν ένα δυναμικό φραγμό μεταξύ κυκλοφορούντος αίματος και περιβάλλοντος ιστού και μαζί με την καρδιά συνιστούν το καρδιαγγειακό σύστημα. Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι το πρώτο σύστημα οργάνων που αναπτύσσεται κατά τα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια<sup>1</sup>.

Η δημιουργία του αγγειακού συστήματος περιλαμβάνει δύο συγγενείς αλλά ξεχωριστές διαδικασίες: την **αγγειακή διαφοροποίηση** (*vasculogenesis*) και την **αγγειογένεση** (*angiogenesis*). Η αγγειακή διαφοροποίηση περιλαμβάνει τον *de novo* σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων από *in situ* διαφοροποίηση των αγγειοβλάστων, με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αρχέγονου αγγειακού δικτύου<sup>1-3</sup>. Αντίθετα, η αγγειογένεση ορίζεται ως μια αυστηρά οργανωμένη διαδικασία εκβλάστησης νέων τριχοειδών αγγείων, από προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία<sup>4</sup>. Το νεοσυντιθέμενο αγγειακό δίκτυο που δημιουργείται, σταθεροποιείται στη συνέχεια με την προσέκλυση περικυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία περιβάλλουν το άωρο αγγείο με μια διαδικασία που ονομάζεται **αγγειακή μυογένεση** (*vascular myogenesis*).

Για πολύ καιρό ήταν αποδεκτό ότι η αγγειακή διαφοροποίηση περιορίζεται στην πρώιμη εμβρυογένεση και δε συμβαίνει στους ενήλικες, ενώ η αγγειογένεση συμβαίνει τόσο στο αναπτυσσόμενο έμβρυο όσο και κατά τη μετα-νεογνική ζωή. Πρόσφατα ευρήματα αποκάλυψαν ότι και οι δύο διαδικασίες παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, αλλά και της ενήλικης ζωής<sup>1,5</sup>. Είναι πλέον γνωστό ότι στα έμβρυα ο σχηματισμός των αγγείων έχει ως αφετηρία τη διαφοροποίηση των αγγειοβλαστών προς ένα πρωτογενές αγγειακό πλέγμα, το οποίο αργότερα αναδιαμορφώνεται με αγγειογένεση. Στον ενήλικα οργανισμό οι νέες αγγειακές δομές προκύπτουν από

## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

προϋπάρχοντα αγγεία (αγγειογένεση), με τη συμμετοχή προγονικών ενδοθηλιακών (EPCs, Endothelial Progenitors Cells) καθώς και αιμοποιητικών κυττάρων του μυελού των οστών (Bone Marrow, BM) (Εικόνα 1.1)<sup>6</sup>.



**Εικόνα 1.1: Η ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος.** Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη μεσοδερμικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs, αγγειοβλάστες) σχηματίζοντας εστιακές συναθροίσεις μεσεγγυματικών κυττάρων, οι οποίες είναι γνωστές ως αιματικές νησίδες (blood islands) (αριστερά). Κατόπιν, αυτές οργανώνονται σε ένα αρχέγονο αγγειακό δίκτυο (αγγειακή διαφοροποίηση). Το πρωτογενές αυτό δίκτυο στη συνέχεια, επεκτείνεται και αναδιαμορφώνεται (αγγειογένεση). Λεία μυϊκά κύτταρα (Smooth Muscle Cells, vSMCs) σταθεροποιούν τα νέα αγγεία για τη δημιουργία ενός ώριμου αγγειακού δικτύου, που αποτελείται από αρτηρίδια και αρτηρίες (κόκκινο), φλεβίδια και φλέβες (μπλέ), καθώς και τριχοειδή (γκρί) καλύπτονται από περικύτταρα (κίτρινα). Πρώιμα λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα (lymphatic endothelial cells, LECs) εκβλαστάνουν από εμβρυϊκές φλέβες, από όπου και μεταναστεύουν δημιουργώντας λεμφικούς σάκους. Νέα λεμφαγγεία (πράσινο) σχηματίζονται από προϋπάρχοντα (λεμφαγγειογένεση). Το ώριμο λεμφικό σύστημα αποτελείται από τυφλά λεμφικά τριχοειδή, που τροφοδοτούν με λέμφο τα αρτηριακά αγγεία και τους λεμφαδένες<sup>7</sup>.

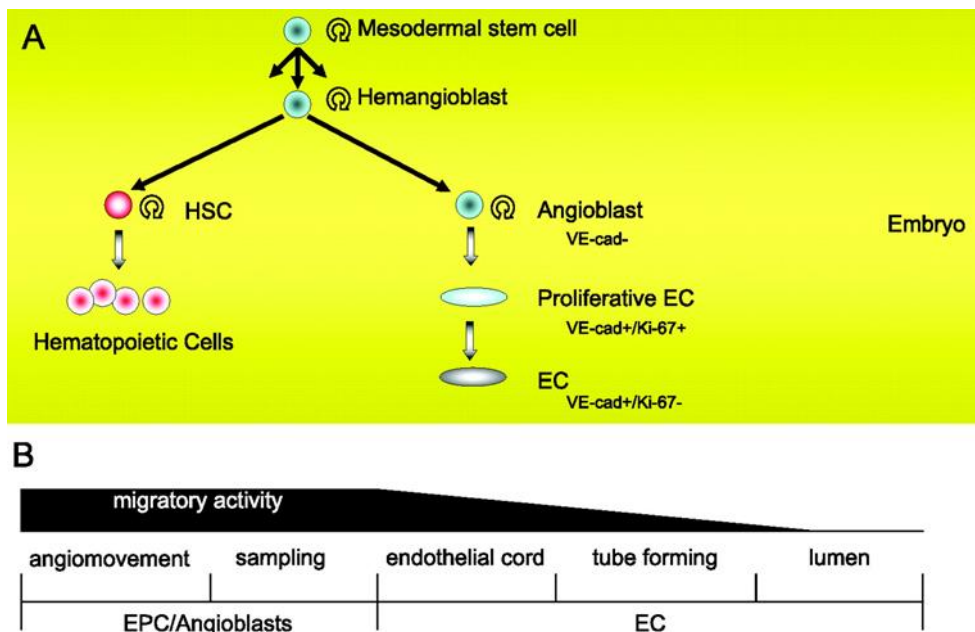
Η αγγειογένεση αποτελεί ένα δραστικό τρόπο βελτίωσης της δυνατότητας ανταλλαγής ουσιών μεταξύ αίματος και ιστών. Παράλληλα, η αύξηση του μεγέθους των υπαρχόντων αγγείων, διαδικασία γνωστή ως αρτηριογένεση, είναι απαραίτητη για την αύξηση της χωρητικότητας της αιματικής ροής σε περιφερειακά αγγειακά στοιχεία.

Όμοια με την αγγειογένεση, η **λεμφαγγειογένεση** μπορεί να οριστεί ως ο σχηματισμός λεμφικών αγγείων από προϋπάρχοντα λεμφαγγεία. Η λεμφαγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ομοιόσταση, το μεταβολισμό και την ανοσία (Εικόνα 1.1).

### 1.1.2 Η αγγειακή διαφοροποίηση (Vasculogenesis)

Ο σχηματισμός νέων αγγείων κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης εντοπίζεται στο λεκιθικό σάκο με τη μορφή εστιακών συναθροίσεων μεσεγχυματικών κυττάρων, οι οποίες είναι γνωστές ως νησίδες αίματος (blood islands)<sup>8,9</sup>. Πολλές μελέτες *in vitro* διαφοροποίησης έχουν δείξει ότι τα προγονικά κύτταρα των ενδοθηλιακών και αιματοποιητικών κυττάρων έχουν κοινή προέλευση τις αιμαγγειοβλάστες. Τα πρώτα στάδια της διαφοροποίησης των αιμαγγειοβλαστών πραγματοποιούνται μέσα στις αιματικές νησίδες και τα κύτταρα που βρίσκονται στην περίμετρο αυτών δημιουργούν τα προγονικά κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλάστες), ενώ αυτά που βρίσκονται στο κέντρο αποτελούν τα προγονικά κύτταρα των αιματοποιητικών κυττάρων. Οι αγγειοβλάστες είναι μια πρώιμη κυτταρική σειρά, η οποία εμφανίζει αυξημένη δυναμική διαφοροποίησης προς ενδοθηλιακά κύτταρα, χωρίς να έχει αποκτήσει ωστόσο, όλους τους χαρακτηριστικούς δείκτες των ενδοθηλιακών κυττάρων (π.χ VE-cadherin) (βλέπε αναλυτικά Εικόνα 1.2 A). Οι αγγειοβλάστες όπως και τα προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs) χαρακτηρίζονται από πολύ υψηλή μεταναστευτική ικανότητα (Εικόνα 1.2 B)<sup>2</sup>.

Η αγγειακή διαφοροποίηση λαμβάνει χώρα σε διακριτές τοποθεσίες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τόσο στον εξωεμβρυϊκό όσο και στον ενδοεμβρυϊκό ιστό. Τα προγονικά κύτταρα που σχηματίζουν το πρωτογενές αγγειακό πλέγμα, εντοπίζονται αρχικά, καθ' όλο το μήκος του μεσοδέρματος και είτε συγκεντρώνονται στην τοποθεσία από την οποία αναφύονται, είτε μεταναστεύουν προς την τοποθεσία ανάπτυξης ενός νέου αγγείου<sup>10</sup>. Πρόκειται για μια δυναμική διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ κυττάρων όσο και μεταξύ κυττάρων και εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (Extracellular Matrix, ECM). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές κατευθύνονται χωρικά και χρονικά από αυξητικούς παράγοντες και από μορφογόνα<sup>1,11</sup>. Οι ακριβείς μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν την τύχη των αιμοαγγειοβλαστών δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί<sup>12</sup>.



**Εικόνα 1.2: Η προέλευση των αγγειοβλαστών (A)** Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα μεσοδερμικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν πηγή τόσο για αιματοποιητικές (αριστερά) όσο και αγγειογενετικές κυτταρικές σειρές (δεξιά), έχοντας ως κοινό πρόδρομο την αιμαγγειοβλάστη. Η αιμαγγειοβλάστη δύνεται να διαφοροποιηθεί, είτε σε αιματοποιητικά βλαστικά κύτταρα (Hematopoietic Stem cells, HSCs), είτε σε αγγειοβλάστες. Οι αγγειοβλάστες εμφανίζουν υψηλό μεταναστευτικό φαινότυπο. Κατά τη διαφοροποίηση και έπειτα από τον ελλιμενισμό τους σε προκαθορισμένες θέσεις οι αγγειοβλάστες σταματούν τη μετανάστευση και σχηματίζουν ενδοθηλιακές διακλαδώσεις. Το βήμα αυτό αποτελεί και το «διακόπτη» για τη μετατροπή της αγγειοβλάστης σε διαιρούμενα ενδοθηλιακά κύτταρα (ECs), τα οποία είναι  $VE-cadherin^+/Ki67^+$ . Κατά τη διάρκεια περαιτέρω ωρίμανσης και αύξησης της λειτουργικότητας, τα ECs μετατρέπονται σε  $VE-cadherin^+/Ki67^-$ . **(B)** Σχεδιάγραμμα που αναπαριστά τη μεταναστευτική ικανότητα των αγγειοβλαστών και των EPCs (Endothelial Progenitor Cells). Στα αρχικά στάδια η μεταναστευτική ικανότητα είναι πολύ υψηλή, ενώ σταδιακά κατά την ωρίμανση των αγγείων αυτή μειώνεται.<sup>2</sup>

### 1.1.3 Η αγγειακή μυογένεση

Το άωρο αγγειακό πλέγμα, το οποίο προκύπτει από την αγγειακή διαφοροποίηση, προκειμένου να ανταποκριθεί στις ανάγκες των αναπτυσσόμενων ιστών του εμβρύου, υφίσταται συνεχή αγγειογενετική αναδιαμόρφωση. Κατά τη διάρκεια της δημιουργούνται καινούργια αγγεία με διαδικασίες όπως η εκβλάστηση, η γεφυροποίηση και ο εγκολεασμός, αλλά επίσης και η υποστροφή, εκεί όπου τα αγγεία υπερεπαρκούν ή δεν χρειάζονται πλέον. Η εκβλάστηση είναι η πιο γνωστή διαδικασία και οι μοριακοί μηχανισμοί της περισσότερο κατανοητοί (βλέπε κεφ. 1.1.5.1). Παράλληλα με την αγγειογενετική ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος, τα αγγεία πρέπει να γίνουν λειτουργικά και το τοίχωμά τους να ωριμάσει. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσέλκυση

μεσεγχυματικών κυττάρων, τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε περιενδοθηλιακά κύτταρα (περικύτταρα στο επίπεδο των τριχοειδών και λεία μυϊκά κύτταρα στο επίπεδο των αρτηριδίων και αρτηριών). Η παραπάνω διαδικασία καλείται αγγειακή μυογένεση και είναι πολύ σημαντική για τη λειτουργικότητα του αγγειακού συστήματος.

Τα λεία μυϊκά κύτταρα των αγγείων σταθεροποιούν τα νέα αγγεία και αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>13</sup>. Επίσης, τα αγγεία υποστρέφονται πιο εύκολα όταν δεν καλύπτονται από λεία μυϊκά κύτταρα και το αγγειογενετικό ερέθισμα είναι περιορισμένο<sup>14,15</sup>. Ομοίως, τα περικύτταρα έχουν πολλές δράσεις που περιλαμβάνουν ρύθμιση της αιματικής ροής και της αγγειακής διαπερατότητας μέσω μεταγωγής σημάτων μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας<sup>16</sup>. Συνολικά λοιπόν, τα περιενδοθηλιακά κύτταρα με μια ποικιλία αγγειοδραστικών πεπτιδίων και κυτταροκινών που εκκρίνουν, αλλά και με την αλληλεπίδρασή τους με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, εξασφαλίζουν σταθεροποίηση και στεγανοποίηση των αγγείων.

#### **1.1.4 Ρυθμιστές της αγγειακής διαφοροποίησης και αγγειογένεσης**

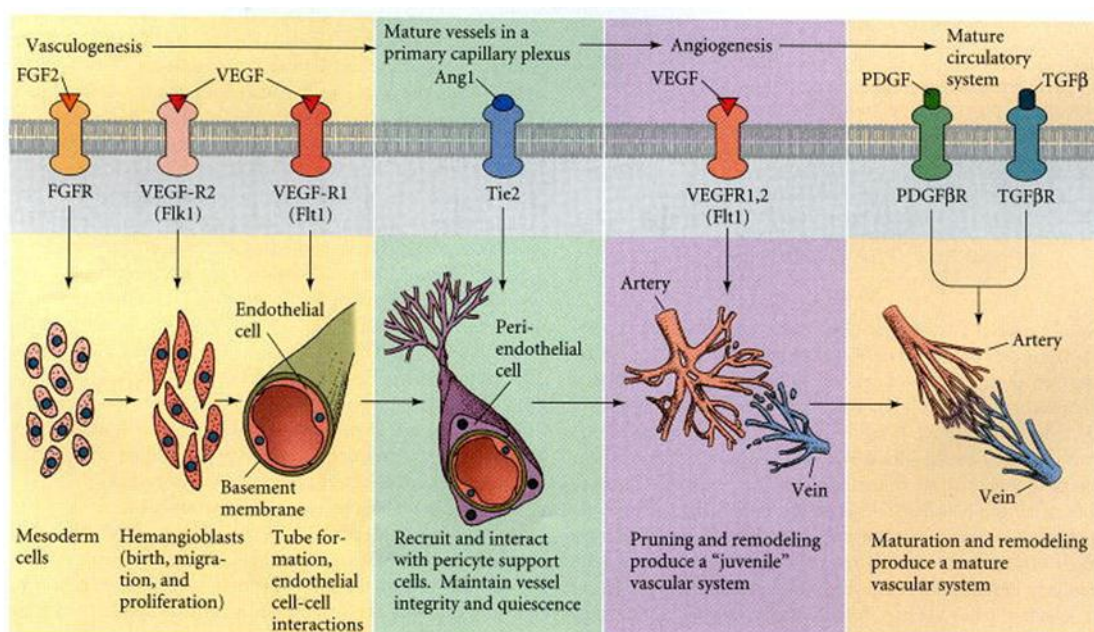
Η έναρξη της αγγειακής διαφοροποίησης ρυθμίζεται από ένα πλήθος αυξητικών παραγόντων με αυτοκρινή και παρακρινή δράση (Εικόνα 1.3). Ένας από αυτούς είναι ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας FGF2 (Basic Fibroblast Growth Factor), ο οποίος απαιτείται για την παραγωγή αιμαγγειοβλαστών από το μεσόδερμα. Ο FGF2 ενεργοποιεί τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα προσελκύει μεσεγχυματικά ή/και φλεγμονώδη κύτταρα που παράγουν πολλούς αγγειογενετικούς παράγοντες<sup>17</sup>. Παρουσία FGF2, τα προγονικά βλαστικά κύτταρα οδηγούνται στο σχηματισμό νησίδων αίματος (blood islands). Οι νησίδες αυτές, φέρουν πρώιμους δείκτες της ενδοθηλιακής σειράς (VE-cadherin) και έχουν τη δυνατότητα να ενώνονται σε αγγειακούς σχηματισμούς<sup>18</sup>.

Ο κυριότερος αυξητικός παράγοντας που εμπλέκεται τόσο στην αγγειακή διαφοροποίηση, όσο και στην αγγειογένεση είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ο VEGF καθιστά ικανή τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των αγγειοβλαστών, προκειμένου να σχηματίσουν ενδοθηλιακούς αυλούς (Εικόνα 1.3). Εκκρίνεται από μεσεγχυματικά



## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

κύτταρα κοντά στις νησίδες αίματος, ενώ τόσο οι αιμαγγειοβλάστες όσο και οι αγγειοβλάστες εμφανίζουν ειδικούς υποδοχείς για τον VEGF (VEGFR)<sup>19</sup>. Η σημαντικότητα του VEGF κατά την αγγειογενετική διαδικασία αναδεικνύεται από το γεγονός ότι απαλοιφή των γονιδίων που κωδικοποιούν είτε τον VEGF, είτε το βασικό υποδοχέα του VEGF (VEGFR2, υποδοχέας με δράση τυροσινικής κινάσης) (βλέπε κεφ.1.2.2.3) σε έμβρυα ποντικού, οδηγούν στην αποτυχία σχηματισμού νησίδων αίματος στο λεκιθικό σάκο ενώ παράλληλα παρεμποδίζεται η ολοκλήρωση της αγγειακής διαφοροποίησης<sup>20</sup>.



**Εικόνα 1.3: Αγγειακή διαφοροποίηση και Αγγειογένεση.** Η αγγειακή διαφοροποίηση προϋποθέτει το σχηματισμό αιμαγγειοβλαστικών νησίδων αίματος και την κατασκευή τριχοειδούς δικτύου από αυτές. Η αγγειογένεση προϋποθέτει το σχηματισμό νέων αγγείων με μετασχηματισμό και ανοικοδόμηση των παλαιότερων αγγείων. Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται σε ξεχωριστό πλαίσιο, οι βασικοί παρακρινικοί παράγοντες και οι αντίστοιχοι υποδοχείς που συμμετέχουν σε κάθε βήμα<sup>1,21</sup>.

Ο PDGF (Platelet Derived Growth Factor) αποτελεί επίσης βασικό αγγειογενετικό παράγοντα, καθώς προσελκύει περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα γύρω από τα νεαρά αγγεία<sup>22</sup>. Ταυτόχρονα, μέλη της υπερικογένειας του TGFβ (Transforming Growth Factor Beta) και των υποδοχέων τους σε συνδυασμό με τον παράγοντα PDGF, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του καρδιαγγειακού συστήματος, καθώς συμμετέχουν στην ωρίμανση και αναδιοργάνωση των αρτηριών και των φλεβών, έτσι ώστε να παραχθεί ένα ώριμο αγγειακό σύστημα (Εικόνα 1.3)<sup>21</sup>.

Η αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1) αποτελεί ένα ακόμα παράγοντα ρύθμισης της αγγειακής διαφοροποίησης, ο οποίος φαίνεται να εμφανίζει χημειοτακτική δράση για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, καθώς ισχυροποιεί τη δράση του VEGF και ενεργοποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, περικυττάρων και λείων μυικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά προσελκύονται, προκειμένου να σταθεροποιήσουν τα νέα αγγεία και να διατηρήσουν την ακεραιότητά τους, κατά τη διαδικασία της αγγειακής μυογένεσης (Εικόνα 1.3). Μεταλλάξεις είτε της Ang-1, είτε του υποδοχέα της Tie 2, οδηγούν στο σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων με δυσπλασίες, εξαιτίας της ανεπάρκειας σε λεία μυϊκά κύτταρα<sup>23,24</sup>. Η αγγειοποιητίνη 2 (Angiopoietin-2, Ang-2), ένα άλλο μέλος της οικογένειας των αγγειοποιητινών, είναι αναστολέας της μεταγωγής του σήματος από τον Tie-2 και ένας φυσικός ανταγωνιστής της Ang-1. Η Ang-2 εμφανίζεται στις περιοχές νεοαγγείωσης και αγγειακής αναδιαμόρφωσης και ενέχεται στη μείωση των επαφών μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, την απώλεια επαφής τους από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τη χαλάρωση της εξωκυττάριας ουσίας, η οποία επιτρέπει την πρόσβαση των διεγερτών της αγγειογένεσης, αλλά και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>25,26</sup>. Κατά συνέπεια, η Ang2 παρουσία διεγερτών της αγγειογένεσης είναι αγγειογενετική, απουσία όμως διεγερτών προκαλεί αποσταθεροποίηση του αγγείου που οδηγεί σε υποστροφή του<sup>26</sup>.

Από τους σημαντικότερους αναστολείς της αγγειογένεσης είναι η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη. Τα δύο μόρια ανήκουν σε μια κατηγορία παραγόντων που έχουν αντιαγγειογενετική δράση, ενώ προκύπτουν από πρωτεολυτική διάσπαση μεγαλύτερων πρωτεϊνών που παράγονται φυσιολογικά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περισσότεροι παράγοντες αυτής της κατηγορίας είναι προϊόντα πρωτεϊνών του εξωκυτταρικού υλικού, όπως η ινονεκτίνη και το κολλαγόνο ή ένζυμα που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του εξωκυτταρικού υλικού, όπως το πλασμινιγόνο και η μεταλλοπρωτεϊνάση-2<sup>27</sup>.

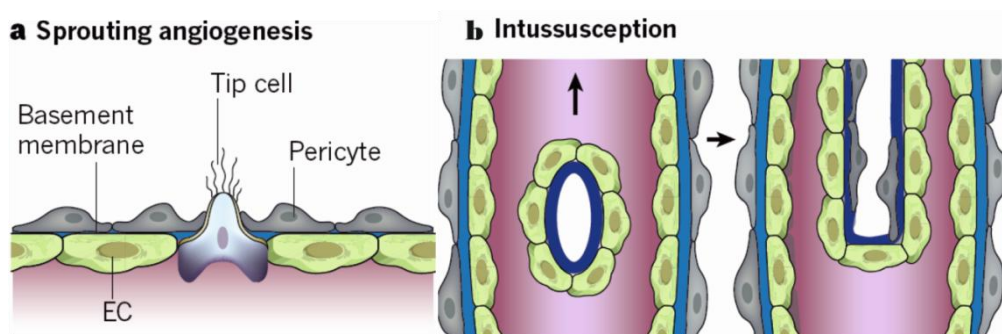
Τέλος, ένας άλλος σημαντικός αντιαγγειογενετικός παράγοντας είναι η θρομβοσποντίνη (TPS), η οποία αποτελεί μόριο του εξωκυτταρικού χώρου. Στη διαδικασία της αγγειογένεσης συμμετέχουν δύο θρομβοσποντίνες η TPS-1 και η TPS-2. Τόσο η TPS-1 όσο και η TPS-2 αναστέλλουν την ανάπτυξη των όγκων *in vivo* και *in vitro*, ενώ συμβάλλουν και στο στάδιο ηρεμίας του ενήλικου αγγειακού πλέγματος<sup>28</sup>.

### 1.1.5 Η αγγειογένεση

Η αγγειογένεση, όπως προαναφέρθηκε είναι μια αυστηρά οργανωμένη διαδικασία με την οποία νέα αγγεία αναπτύσσονται από προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία με δύο κύριους μηχανισμούς: τον *εγκολεασμό* (intussusception) και την *εκβλάστηση* (sprouting). Η φυσιολογική αγγειογένεση λαμβάνει χώρα κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, καθώς νέα αγγεία προκύπτουν από το άωρο αγγειακό πλέγμα της αγγειακής διαφοροποίησης. Στην περίπτωση αυτή, η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι στενά συνδεδεμένη με τη διαδικασία της αγγειακής μυογένεσης (βλέπε κεφ.1.1.3).

Στον υγιή ενήλικα, η διαδικασία της αγγειογένεσης περιορίζεται στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα και στη διαδικασία επούλωσης των τραυμάτων. Πρόκειται, για μια αυστηρώς ρυθμιζόμενη και αυτοπεριοριζόμενη διαδικασία, που όμως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως στο διαβήτη, στη ρευματοειδή αρθρίτιδα, στις καρδιοαγγειακές ισχαιμικές επιπλοκές, στην ψωρίαση και στη δημιουργία συμπαγών καρκινικών όγκων. Η αγγειογένεση από ώριμα αγγεία συνήθως συμβαίνει με την διαδικασία της εκβλάστησης, της οποίας οι μοριακοί μηχανισμοί είναι οι περισσότερο μελετημένοι.

Η αγγειογενετική διαδικασία πραγματοποιείται όπως προαναφέρθηκε με δύο κύριους μηχανισμούς: μέσω *εκβλάστησης* (sprouting) και μέσω *εγκολεασμού* (intussusceptive). Η αγγειογένεση μέσω εκβλάστησης είναι περισσότερο κατανοητή, καθώς ανακαλύφθηκε σχεδόν 200 χρόνια πριν, ενώ η αγγειογένεση μέσω εγκολεασμού ανακαλύφθηκε μόλις πριν από δύο δεκαετίες<sup>29</sup>. Οι βασικοί τύποι της αγγειογένεσης απεικονίζονται στην εικόνα 1.4.



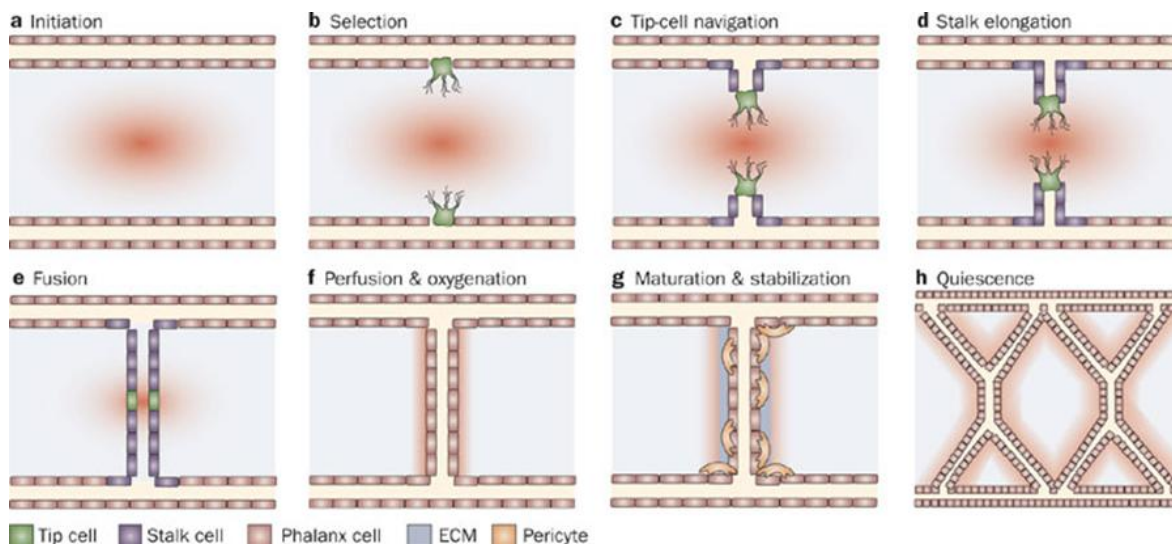
**Εικόνα 1.4:** Οι βασικοί τύποι αγγειογένεσης. Ο σχηματισμός των νέων αιμοφόρων αγγείων με αγγειογένεση μπορεί να συμβεί α) μέσω *εκβλάστησης* b) με τη διαδικασία του κυτταρικού διαχωρισμού, γνωστή ως *εγκολεασμός*<sup>30</sup>



**1.1.5.1 Αγγειογένεση με εκβλάστηση (Sprouting angiogenesis)**

Η αγγειογένεση με εκβλάστηση, περιλαμβάνει ορισμένα διαδοχικά βήματα τα οποία είναι αυστηρώς ρυθμιζόμενα, τόσο τοπικά όσο και χρονικά<sup>31</sup>. Το πρώτο βήμα αυτής της διαδικασίας προϋποθέτει, την αποικοδόμηση της βασικής κυτταρικής μεμβράνης. Η διαδικασία αυτή επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να «εισβάλουν» στην περιβάλλουσα θεμέλια ουσία και κατόπιν να πολλαπλασιαστούν και να μεταναστεύσουν μέσα από αυτή<sup>32</sup>. Στη συνέχεια, η σταθεροποίηση των ανώριμων αιμοφόρων αγγείων επιτυγχάνεται με την προσέλκυση περικυττάρων και την αναγέννηση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας<sup>33</sup>. Αναλυτικά ο κυτταρικός μηχανισμός της αγγειογένεσης με εκβλάστηση περιγράφεται στην εικόνα 1.5. Η παραπάνω διαδικασία ελέγχεται από θετικούς και αρνητικούς ρυθμιστές, η ισορροπία των οποίων καθορίζει το βαθμό της τρέχουσας αγγειογένεσης (βλέπε κεφ. 1.1.4).

Η αγγειογένεση με εκβλάστηση ενεργοποιείται όταν οι μηχανισμοί ρύθμισης του οξυγόνου ανιχνεύσουν κάποιο βαθμό υποξίας. Η υποξία δημιουργεί απαιτήσεις για νέα αιμοφόρα αγγεία, προκειμένου να ικανοποιηθούν οι μεταβολικές ανάγκες των παρεγχυματικών κυττάρων. Οι περισσότεροι τύποι παρεγχυματικών κυττάρων (μυοκύτταρα, ηπατοκύτταρα, νευρώνες, αστροκύτταρα, κ.τ.λ) ανταποκρίνονται στο υποξικό περιβάλλον εκκρίνοντας VEGF. Ο ρόλος του VEGF στην παραπάνω διαδικασία φαίνεται να είναι καθοριστικός, καθώς δεν φαίνεται να υπάρχουν άλλοι αυξητικοί παράγοντες που να μπορούν να υποκαταστήσουν το ρόλο του VEGF αγγειογένεση που επάγεται από υποξία.

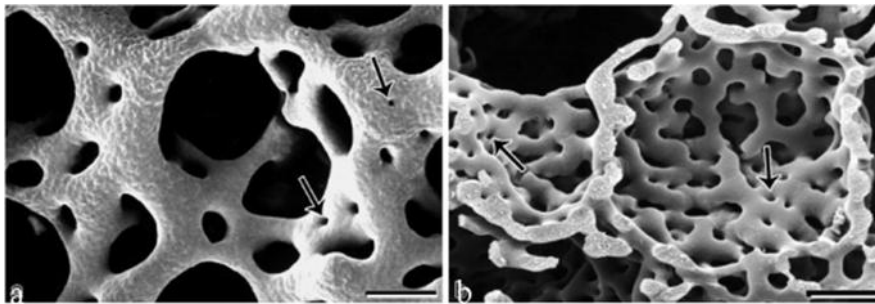


**Εικόνα 1.5:** Οι κυτταρικοί μηχανισμοί κατά την αγγειογένεση με εκβλάστηση α) Υποξικά κύτταρα εκκρίνουν VEGF δημιουργώντας μια βαθμίδωση του παράγοντα αυτού γύρω από αυτά (χαμηλές συγκεντρώσεις υποδεικνύονται με αχνό κόκκινο, έντονα χρώματα αντιπροσωπεύουν υψηλότερες συγκεντρώσεις). b) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που εκτίθενται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση VEGF επιλέγονται για να γίνουν «ακραία» κύτταρα (tip cells - πράσινο). c) Τα ακραία κύτταρα οδηγούν το εκβλάστημα εισβάλλοντας στον περιβάλλοντα ιστό, όπου εκτείνουν πολλαπλά φιλοπόδια. d) Η διακλάδωση επιμηκύνεται με πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων του στελέχους (stack cells – μωβ) που ακολουθεί τα ακραία κύτταρα e) Η νέα διακλάδωση συνδέεται με μια παλιά, με σύντηξη των ακραίων κυττάρων. f) Η δημιουργία του αγγειακού αυλού, επιτρέπει την έναρξη της ροής του αίματος και με τη σειρά της την οξυγόνωση ιστών, η οποία μειώνει τα επίπεδα του VEGF. g) Η ωρίμανση και σταθεροποίηση της αναστόμωσης βασίζεται στην προσέλκυση των περικυττάρων (πορτοκαλί) και στην εναπόθεση της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (μπλέ) h) Στο ολοκληρωμένο νέο αγγειακό σύστημα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υιοθετούν έναν εφησυχάζοντα ενδοθηλιακό φαινότυπο («phalanx» - μπεζ)<sup>34</sup>.

#### **1.1.5.2 Αγγειογένεση με εγκολεασμό (Intussusceptive Angiogenesis)**

Η αγγειογένεση με εγκολεασμό καλείται επίσης αγγειογένεση διαχωρισμού (*splitting angiogenesis*), διότι το αγγειακό τοίχωμα **επεκτείνεται** μέσα στον αυλό προκαλώντας το διαχωρισμό ενός αγγείου σε δύο. Αυτός ο τύπος της αγγειογένεσης φαίνεται να είναι πιο γρήγορος και αποτελεσματικός σε σύγκριση με την αγγειογένεση με εκβλάστηση διότι απαιτεί μόνο αναδιοργάνωση των ήδη υπάρχοντων ενδοθηλιακών κυττάρων και δεν βασίζεται σε άμεσο ενδοθηλιακό πολλαπλασιασμό ή μετανάστευση. Η αγγειογένεση με εγκολεασμό συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής, αλλά διαδραματίζει προεξέχοντα ρόλο κατά την αγγειακή ανάπτυξη στα έμβρυα, όταν η ανάπτυξη είναι γρήγορη και οι πηγές είναι περιορισμένες<sup>35,36</sup>. Ωστόσο, ο εγκολεασμός προκαλεί κυρίως την ανάπτυξη νέων αγγείων εκεί όπου ήδη προϋπάρχουν αγγεία.

Μελέτες ηλεκτρονικών μικρογραφιών από το μικροαγγειακό δίκτυο των πνευμόνων αρουραίου, οδήγησαν στην παρατήρηση πολύ μικρών οπών διαμέτρου λιγότερο από 1 με 1.5  $\mu\text{m}$  που βρίσκονταν σε μερικά αγγειακά τμήματα και μάλιστα σε περιοχές όπου τα τριχοειδή ήταν ελαφρώς μεγαλύτερα από ότι συνήθως (Εικόνα 1.6). Μέσα από την υπόθεση ότι οι παραπάνω οπές θα μπορούσε να είναι ένα πρόσφατα σχηματισμένο τριχοειδικό δίκτυο, γεννήθηκε μια νέα γνώση για το σχηματισμό και την επέκταση των αγγείων. Το τριχοειδικό δίκτυο μπορεί να αυξηθεί από την εισαγωγή νέων δια-τριχοειδικών στηλών (pillars), δηλαδή να επεκταθεί “εκ των έσω του”. Ο μηχανισμός αυτός της αγγειογένεσης ορίστηκε από τους ιστολόγους ως εγκολεασμός, ενώ ο τρόπος επέκτασης του τριχοειδικού δικτύου με το μηχανισμό αυτό ονομάστηκε μικροαγγειακή αύξηση με εγκολεασμό (intussusceptive microvascular growth)<sup>37</sup>.



**Εικόνα 1.6:** Μικρογραφίες εκμαγείων με σάρωση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου α) μικροαγγειακό δίκτυο πνεύμονα σε έμβρυο όρνιθας και β) μικροαγγειακό δίκτυο πνεύμονα αρουραίου την μεταεμβρυϊκή μέρα 44. Οι μικρές οπές που επισημαίνονται με βέλη έχουν διάμετρο περίπου 1,5  $\mu\text{m}$ . Οι οπές αντιστοιχούν σε ιστούς που εκτείνονται κατά μήκος του τριχοειδικού αυλού<sup>35</sup>.

Αυτός ο τύπος της αγγειογένεσης, που αρχικά ανακαλύφτηκε σε μεταεμβρυϊκούς πνεύμονες αρουραίων και ανθρώπων<sup>29</sup>, παρατηρείται και σε άλλους ιστούς και όργανα, ειδικά σε τριχοειδή δίκτυα τα οποία γειτνιάζουν με μια επιθηλιακή επιφάνεια όπως για παράδειγμα ο χοριοειδής του ματιού, τα αγγειακά πλέγματα που περιβάλλουν τους αδένες, ο εντερικός βλεννογόνος, οι νεφροί, οι ωθήκες και η μήτρα<sup>37</sup>. Η αγγειογένεση με εγκολεασμό συναντάται ακόμη στους σκελετικούς μυείς, στην καρδιά και στον εγκέφαλο.

### **1.1.5.3 Η αγγειογένεση σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις**

Η δημιουργία νέων αγγείων είναι μια καίρια διαδικασία που λαμβάνει χώρα κατά την ανάπτυξη και επιδιόρθωση των διαφόρων ιστών του σώματος. Η αγγειογένεση είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία. Έτσι, στον ενήλικα οργανισμό βρίσκεται υπό συνεχή αναστολή, με ορισμένες μόνο εξαιρέσεις όπως προαναφέρθηκε. Η απώλεια μηχανισμών ρύθμισης της αγγειογένεσης προκαλεί τη δημιουργία παθολογικών καταστάσεων, όπου η ανεξέλεγκτη παραγωγή νέων τριχοειδών οδηγεί στην καταστροφή της αρχιτεκτονικής και της λειτουργίας των φυσιολογικών ιστών. Με τον τρόπο αυτό, η παθολογική αγγειογένεση συμμετέχει στην παθογένεση πολλών ασθενειών, οι οποίες αποκαλούνται αγγειογενετικές νόσοι. Η πλέον εντυπωσιακή έκφραση της παθολογικής αγγειογένεσης είναι αυτή που απαντάται στα νεοπλάσματα. Πράγματι, οι περισσότεροι όγκοι προέρχονται από μικρές μη αγγειωμένες μάζες που στην συνέχεια επάγουν την ανάπτυξη και τον σχηματισμό νέων αγγείων, όταν η διάμετρος του όγκου ξεπεράσει το μέγεθος των  $2 \text{ mm}^3$ <sup>38</sup>. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι όγκοι δεν προέρχονται μόνο από μη αγγειωμένες μάζες. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται την ύπαρξη ήδη προϋπαρχόντων αγγείων (co-option) για να ξεκινήσουν την δημιουργία ενός καλά αγγειωμένου όγκου<sup>39</sup>.

Υπάρχουν αρκετά χαρακτηριστικά που διαχωρίζουν τα αγγεία, τα οποία σχηματίζονται σε φυσιολογικές διεργασίες από εκείνα των παθολογικών καταστάσεων. Τα υγιή αγγεία διευθετούνται με ιεραρχικό τρόπο (αρτηρίες, τριχοειδή και φλέβες), ενώ το αγγειακό δίκτυο που προκύπτει από καρκινικά κύτταρα είναι αποδιοργανωμένο και μορφολογικά μη ομαλό. Τα καρκινικά αγγεία παρουσιάζουν μερική ή ολική απόφραξη, οδηγώντας σε φτωχή ροή αίματος<sup>40</sup>. Επίσης, τα περικύτταρα που περιβάλλουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα υγιή τριχοειδή υφίστανται χαλάρωση της απαρτίωσής τους στο αγγειακό τοίχωμα ή είναι δυνατό να απουσιάζουν εντελώς<sup>41</sup>. Ακόμη, η αγγειακή βασική μεμβράνη μπορεί να εμφανίζει ασυνέχειες. Τα καρκινικά αγγεία εμφανίζουν διαρροή, εν μέρει εξαιτίας της ελλιπούς περιαγγειακής υποστήριξης, καθώς και της άφθονης έκφρασης του παράγοντα VEGF-A στον αυξανόμενο όγκο<sup>40</sup>. Αυτή η διαρροή οδηγεί στη βαθμιαία αύξηση της ενδιάμεσης πίεσης και στην εξασθένιση της μεταφοράς φαρμάκων. Έτσι, η μείωση της στεγανότητας των αγγείων είναι υπεύθυνη για τις αλλοιώσεις του αμφιβληστροειδή στο διαβήτη και την εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, οι

οποίες οδηγούν σταδιακά σε τύφλωση. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά γνωρίσματα των παθολογικών αγγείων αποδίδονται σε μεγάλο βαθμό στην έκφραση του VEGF-A από καρκινικά κύτταρα ή τα επιθηλιακά κύτταρα του οφθαλμού.

## **1.2 Ο ΑΓΓΕΙΑΚΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΟΣ ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR)**

### **1.2.1 Εισαγωγή στον VEGF**

Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, VEGF είναι ένα πολυπεπτίδιο με μοριακό βάρος 45KDa. Πρόκειται για έναν αγγειογενετικό αυξητικό παράγοντα, ο οποίος ρυθμίζει πολλαπλές φυσιολογικές λειτουργίες των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση προκειμένου να σχηματίσουν νέα αγγεία<sup>42</sup>. Σε φυσιολογικές συνθήκες εκκρίνεται από τις αρτηρίες, τις φλέβες και τους λεμφαδένες<sup>43</sup>. Αρχικά, τα μέλη της οικογένειας του VEGF αναγνωρίστηκαν ως αγγειακοί παράγοντες διαπερατότητας (Vascular Permeability Factor, VPF)<sup>44</sup>. Αυτή η ιδιότητα της αύξησης της διαπερατότητας, αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό του VEGF, καθώς του προσδίδει σημαντικό ρόλο σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις και φλεγμονές.

Είναι γνωστό ότι ο VEGF είναι ο κύριος ρυθμιστής τόσο της φυσιολογικής όσο και της παθολογικής αγγειογένεσης, καθώς προάγει ισχυρά την αγγειογενετική απόκριση σε ευρύ φάσμα *in vivo* μοντέλων<sup>45</sup>. Η υπερέκφρασή του φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία παθολογικής αγγειογένεσης ανατρέποντας την ισορροπία διεγερτών και αναστολέων της. Σημαντικές επίσης λειτουργίες του VEGF είναι η επαγωγή αγγειογενετικών παραγόντων, η αυξημένη έκφραση συστατικών του θρομβολυτικού και πηκτικού μονοπατιού, η καταστολή της υπερπλασίας των λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων, η υπόταση και η χαλάρωση των αγγείων<sup>46,47</sup>. Ο κεντρικός του ρόλος κατά την αγγειογένεση τον κάνουν ελκυστικό, όχι μόνο ως θεραπευτικό στόχο για την ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων, αλλά και ως αγγειογενετική κυτταροκίνη για τη θεραπεία των ισχαιμικών καρδιακών νόσων.

Επιπλέον, ο VEGF είναι ένας πλειοτροπικός παράγοντας που δρα σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και ιστούς<sup>48</sup>. Η πολυπλοκότητα της δομής του VEGF αντικατοπτρίζει

και την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων των διαφόρων μορφών του με τους υποδοχείς του. Είναι γεγονός ότι η ενεργοποίηση του οδηγεί σε πληθώρα καθοδικών μονοπατιών που μεσολαβούν για τη μεταγωγή του σήματός του από τους υποδοχείς του. Το πλήρες φάσμα των αλληλεπιδράσεων που προκύπτουν από τη δράση του VEGF δεν είναι ακόμα γνωστό. Συνεχώς, νέα πειραματικά δεδομένα οδηγούν σε νέα πιθανά μονοπάτια του πολύπλοκου αυτού μορίου.

### **1.2.2 Η οικογένεια των VEGF αυξητικών παραγόντων και οι υποδοχείς τους**

Τα μέλη της οικογένειας του VEGF εκκρίνονται ως διμερείς γλυκοπρωτεΐνες. Στα θηλαστικά, η οικογένεια του VEGF αποτελείται από πέντε μέλη, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (Placental Growth Factor, PLGF). Επιπρόσθετα, πρωτεΐνες οι οποίες παρουσιάζουν δομική αναλογία με τον VEGF υπάρχουν και στους ιούς (pararoxivirus) όπως η πρωτεΐνη VEGF-E<sup>49</sup>, καθώς και στο δηλητήριο αρκετών φιδιών, μια ομάδα πρωτεϊνών γνωστές ως VEGF-F<sup>50</sup>. Δομικά τα μέλη της οικογένειας του VEGF σχετίζονται με την οικογένεια των PDGF αυξητικών παραγόντων και χαρακτηρίζονται από μια κοινή ομόλογη περιοχή. Αυτή η κεντρική περιοχή αποτελείται από ένα μοτίβο κυστεϊνικού κόμβου, με οχτώ συντηρημένα κυστεϊνικά κατάλοιπα τα οποία σχηματίζουν ενδο- και εξωμοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς.

Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, στα οποία υπολειπόταν η έκφραση διαφορετικών VEGF, ανέδειξαν τον κρίσιμο ρόλο των μελών της οικογένειας του VEGF στο σχηματισμό των αγγείων. Στα έμβρυα των ποντικών η έκφραση του VEGF ξεκινά στην έβδομη εμβρυϊκή ημέρα (E7), στο εξω-εμβρυϊκό αλλά και ενδο-εμβρυϊκό εξώδερμα<sup>51</sup>. Ομόζυγα VEGF knockout ποντίκια πεθαίνουν την E8-9 μέρα εξαιτίας της αδυναμίας σχηματισμού νησίδων αίματος, της παρουσίας ανωμαλιών κατά την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και το σχηματισμό των αγγείων<sup>52</sup>. Τα επίπεδα των VEGF πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης είναι πολύ κρίσιμα, αφού ποντίκια που υπολείπονται έστω και ένα αλληλόμορφο του VEGF πεθαίνουν κατά την E11-E12 μέρα, αφού εμφανίζουν ανωμαλίες κατά την πρώιμη αγγειακή ανάπτυξη<sup>52</sup>. Τα πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα έχουν βρεθεί για τον VEGF-A, απουσία του οποίου τα έμβρυα τελικά υποκύπτουν, όταν έστω και ένα μόνο αλληλομόρφο εκλείψει<sup>53,54</sup>.

Ο VEGF-A, ήταν το πρώτο πρόσδεμα του VEGFR που ανακαλύφθηκε και παραμένει ο πιο καλά μελετημένος. Ο VEGF-A είναι σημαντικός για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης και την οργάνωση του αγγειακού δικτύου. Επίσης, απαιτείται για την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε υγιείς ιστούς. Ο VEGF-A που παράγεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μπορεί να δράσει με έναν αυτοκρινή τρόπο προκειμένου να διεγείρει την αγγειακή επιβίωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο VEGF-A που παράγεται από γειτονικά κύτταρα δεν μπορεί να αντισταθμίσει τον ενδογενή ενδοθηλιακό VEGF<sup>55,56</sup>.

Αντισώματα τα οποία προσδένουν τον VEGF προκειμένου να παρεμποδίσουν την πρόσδεσή του στους VEGF-υποδοχείς, αναστέλλουν την αγγειογένεση και έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά σε παθολογίες που χαρακτηρίζονται από έντονη αγγειογένεση, όπως στον καρκίνο και στις ρετινοπάθειες<sup>57</sup>.

**Πίνακας 1.1:** Τα μέλη της οικογένειας του VEGF και οι ισομορφές που προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα, οι υποδοχείς και συν-υποδοχείς του VEGF

VEGF ligands	VEGFR binding	NRP binding	HS/H binding*	Biological function
VEGFA165	VEGFR1, VEGFR2	NRP1, NRP2	Exon 6	Angiogenesis (permeability, survival, migration of EC)
VEGFA121	VEGFR1, VEGFR2	NRP1**	No	Angiogenic/anti-angiogenic***
VEGFA145	VEGFR1, VEGFR2	NRP2	Exon 6	Angiogenesis
VEGFA189	VEGFR1, VEGFR2	NRP1	Exon 6	Angiogenesis
VEGFA(xxx)b	VEGFR1, VEGFR2	No	No	Anti-angiogenic
VEGFB	VEGFR1	NRP1	VEGFB167 (not isoform VEGFB186)	Fatty acid uptake in EC of the heart
VEGFC (processed)	VEGFR3, (VEGFR2)	NRP2	No	Lymphangiogenesis
VEGFD (processed)	VEGFR3, (VEGFR2)	NRP2	Yes	Lymphangiogenesis
PIGF	VEGFR1	NRP1, NRP2 (only isoform PLGF2)	PIGF2 (not isoform PIGF1)	Inflammatory cell recruitment

### **1.2.2.1 Οι ισομορφές του VEGF**

Εναλλακτικό μάτισμα του ανθρώπινου mRNA ενός μόνο γονιδίου VEGF (VEGF-A) το οποίο περιέχει οχτώ εξώνια, παράγει τουλάχιστον πέντε διαφορετικές ισομορφές του VEGF, 121, 145, 165, 189 και 206 αμινοξικών καταλοίπων<sup>58,59</sup> (Εικόνα 1.7 α-β). Οι VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> και VEGF-A<sub>189</sub> αποτελούν τις κύριες ισομορφές που εκκρίνονται από τους περισσότερους τύπους κυττάρων<sup>60</sup>. Ο VEGF-A<sub>165</sub> αποτελεί την επικρατούσα μορφή του VEGF-A στα διάφορα είδη κυττάρων<sup>61</sup>. Επιπλέον, ο VEGF-A<sub>145</sub> αποτελεί το κύριο εναλλακτικό μετάγραφο σε πολλές περιπτώσεις καρκινικών κυτταρικών σειρών, προερχόμενες από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα<sup>59</sup>. Σε αντίθεση, η ισομορφή VEGF-A<sub>206</sub> είναι σπάνια. Πρόσφατα μια πρόσθετη ισομορφή αναγνωρίστηκε, ο VEGF-

## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

A<sub>165b</sub><sup>62</sup>, η οποία προκύπτει από μάτισμα επιλογής ακραίας θέσης (distal splice site selection, DSS) του εξωνίου 8 (Εικόνα 1.7 b).

Τα εναλλακτικά μετάγραφα που προκύπτουν από το μάτισμα διαφέρουν στις βιοχημικές τους ιδιότητες. Η VEGF-A<sub>121</sub> είναι μια ελεύθερα διαχεόμενη πρωτεΐνη και δεν προσδένει ηπαρίνη, ενώ όλες οι άλλες μεγαλύτερες ισομορφές προσδένουν ηπαρίνη με μεγαλύτερη συγγένεια, μέσω μιας περιοχής πλούσιας σε φορτισμένα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα<sup>63</sup> (Εικόνα 1.7 c). Η απώλεια του υπεύθυνου τομέα για την πρόσδεση της ηπαρίνης προκαλεί την απώλεια της μιτογόνου δράσης του VEGF<sup>64</sup>.

Κατά το μεγαλύτερο ποσοστό του ο VEGF-A<sub>165</sub> εκκρίνεται, αν και ένα σημαντικό κλάσμα του εκκρινόμενου VEGF-A<sub>165</sub> παραμένει δεσμευμένο στην κυτταρική επιφάνεια και στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία. Αντίθετα, οι VEGF-A<sub>189</sub> και VEGF-A<sub>206</sub> δεσμεύονται σχεδόν εξολοκλήρου στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία<sup>65</sup>. Ο ανθρώπινος VEGF-A<sub>165</sub> υφίσταται γλυκοσυλίωση στην Asp75<sup>66</sup> και εκφράζεται τυπικά ως ένα ομοδιμερές των 46kDa, ενώ αποτελεί την πιο άφθονη μορφή και σε *in vivo* μελέτες την πιο βιολογικά ενεργή μορφή<sup>66,67</sup>.

Οι VEGF-B και PlGF εκφράζονται και οι δύο ως ισομορφές που παράγονται από εναλλακτικό μάτισμα<sup>68,69</sup>. Ο VEGF-B παρουσιάζει παρόμοια ενδοθηλιακή μιτογόνο δράση με αυτή του VEGF-A. Θετική ρύθμιση των VEGF-B και PlGF έχει αναφερθεί σε ασθενείς με αντι-αγγειογενετικά φάρμακα που έχουν ως στόχο το μονοπάτι του VEGF<sup>70</sup>.

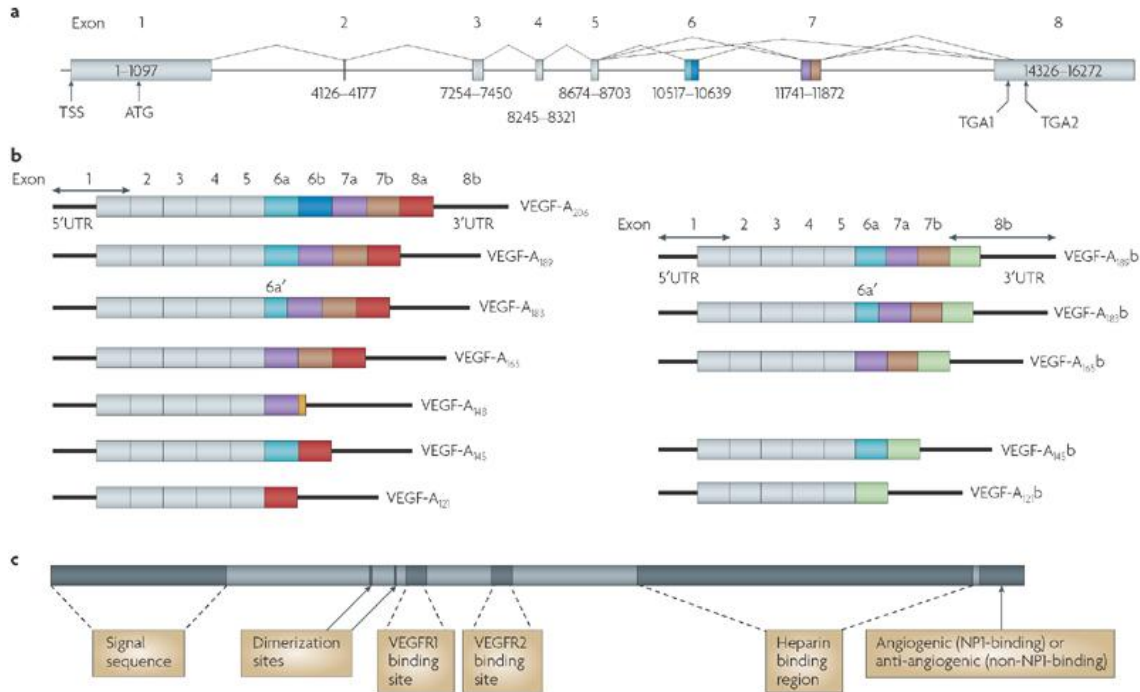
Οι VEGF-C και VEGF-D είχαν αρχικά χαρακτηριστεί για το ρόλο τους στη λεμφαγγειογένεση, εξαιτίας της αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα VEGFR3<sup>71</sup>. Ωστόσο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ο VEGFR3 εκτός από τα λεμφαγγεία βρίσκεται και στο αγγειακό δίκτυο που σχηματίζεται κατά τη δημιουργία όγκων<sup>72</sup>. Τέλος ο VEGF-E είναι ένας ιικά κωδικοποιούμενος VEGF.

### **1.2.2.2 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF**

Η μεταγραφή του mRNA του VEGF επάγεται από ποικιλία αυξητικών παραγόντων και κυτταροκινών που συμπεριλαμβάνουν τον αυξητικό παράγοντα των αιμοπεταλίων (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), τον επιδερμικό αυξητικό παράγοντα (Epidermal Growth Factor, EGF), τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ,



TNFα), τον αυξητικό παράγοντα μετασχηματισμού-Beta1 (Transformed Growth Factor – β1, TGF-β1) και την ιντερλευκίνη-1β.



Nature Reviews | Cancer

**Εικόνα 1.7:** Το γονίδιο, η πρωτεΐνη και τα προϊόντα του mRNA του ανθρώπινου VEGF-A. *a)* Η δομή του γονιδίου του ανθρώπινου VEGF-A. Ο VEGF-A αποτελείται από οχτώ εξώνια. Εναλλακτικό μάτισμα των 5'κα 3' πλευρών στα εξώνια 6, 7 και 8 δίνουν πολλαπλές ισομορφές. Τα εξώνια 6 και 7 κωδικοποιούν τις περιοχές πρόσδεσης της ηπαρίνης. *b)* Οι ισομορφές του VEGF-A<sub>xxx</sub> και VEGF-A<sub>xxx</sub>b. *c)* Η δομή της πρωτεΐνης του VEGF-A, η οποία περιέχει τις περιοχές διμερισμού και τις περιοχές πρόσδεσης της ηπαρίνης, οι οποίες είναι παρούσες στις περισσότερες ισομορφές.<sup>73</sup>

Είναι αξιοσημείωτο ότι η ανάγκη των ιστών για πρόσληψη οξυγόνου ρυθμίζει αυστηρά τα επίπεδα του VEGF. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα του είναι η ευαισθησία του στην υποξία, η οποία επάγει την έκφρασή του, όπως έχει προαναφερθεί (βλέπε κεφ. 1.2.2.2). Ο μεταγραφικός παράγοντας HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) είναι ένας ισχυρός ρυθμιστής της έκφρασης του VEGF-A σε αυξανόμενους ιστούς τόσο σε φυσιολογικές όσο και παθολογικές διαδικασίες<sup>74</sup>. Η έκθεση σε υποξία επάγει γρήγορα και μη αναστρέψιμα την έκφραση του VEGF, διάμεσου, όχι μόνο της επαγωγής της μεταγραφής, αλλά της σταθεροποίησης του mRNA.

Η παραπάνω επαγωγή, παρέχει ένα συνεργιστικό μηχανισμό με τον οποίο οι ιστοί μπορούν να αυξήσουν την οξυγόνωση τους, μέσω της δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων. Τα φυσιολογικά επίπεδα οξυγόνου από την άλλη, ρυθμίζουν αρνητικά την παραγωγή VEGF και οδηγούν σε καταστολή συγκεκριμένων νεοσυντιθέμενων αιμοφόρων αγγείων.

### **1.2.2.3 Οι υποδοχείς του VEGF: δομή, συγγένεια πρόσδεσης, έκφραση και λειτουργία**

Οι βιολογικές λειτουργίες των πολυπεπτιδίων του VEGF απορρέουν από την πρόσδεση τους σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς με εγγενή δραστικότητα κινάσης σε κατάλοιπα τυροσίνης (Receptor Tyrosin Kinases, RTKs), όπως ο VEGFR1 (*fms*-like tyrosine kinase-1 or Flt-1), ο VEGFR2 (Kinase insert Domain-containing Receptor ή KDR/Flk-1) και ο VEGFR3 (*Fms*-Like Tyrosine kinase-4 ή Flt-4). Οι τρεις βασικοί υποδοχείς του VEGF με τη δραστικότητα τυροσινικών κινασών, σχετίζονται δομικά με την οικογένεια του PDGFR και περιέχουν επτά εξωκυτταρικές περιοχές με μορφή ανοσοσφαιρίνης (Ig). Το εξωκυτταρικό τμήμα ακολουθείται από μια μονή υδροφοβική διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane Domain, TMD), καθώς και μια συντηρημένη ενδοκυτταρική περιοχή τυροσινικής κινάσης, η οποία διακόπτεται από ένα μικρό πεπτίδιο, την περιοχή προσθήκης κινασών (Kinase Insert Domain, KID)<sup>19,75,76</sup>. Η παραπάνω περιοχή ακολουθείται από μια αλληλουχία διαφόρων τυροσινικών καταλοίπων (C-terminal domain) που συμμετέχει στην προσέλκυση καθοδικών σηματοδοτικών μορίων. Στον VEGFR3, η τρίτη Ig περιοχή έχει αντικατασταθεί από δισουλφιδική γέφυρα. Βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι η Ig περιοχή-3 του VEGFR2 είναι πολύ σημαντική για την ειδικότητα της πρόσδεσης των διαφορετικών προσδεμάτων<sup>77</sup>. Τα γονίδια του VEGFR1 και του VEGFR2 κωδικοποιούν δύο πολυπεπίδια: μια πλήρους μεγέθους μεμβρανική πρωτεΐνη (υποδοχέας VEGFR1) και μία μικρού μεγέθους «διαλυτή» VEGF-συνδεόμενη πρωτεΐνη («διαλυτή» μορφή του VEGFR1, -2)<sup>78</sup> (Εικόνα 1.8)

Οι υποδοχείς αυτοί εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια πολλών κυττάρων προερχόμενων από το μυελό των οστών, όπως τα αιμοποιητικά κύτταρα<sup>79</sup>, τα μακροφάγα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>32</sup>. Επίσης εκφράζονται σε καρκινικά κύτταρα και σε λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα. Ανάλυση με μεταλλάξεις της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR1 και -2 έδειξαν ότι η δεύτερη και η τρίτη Ig περιοχή απαρτίζουν μια

υψηλής συγγένειας περιοχή πρόσδεσης για τον VEGF, με την πρώτη και τέταρτη Ig περιοχή να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της πρόσδεσης και του διμερισμού του υποδοχέα, αντίστοιχα<sup>77,80,81</sup>.

Η πρόσδεση του VEGF πραγματοποιείται στο αμινοτελικό άκρο της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα. Αυτή η δέσμευση του VEGF στους υποδοχείς συντελείται στην *cis* μορφή του υποδοχέα, στις περιπτώσεις που ο VEGF βρίσκεται διάχυτος στο κυτταρόπλασμα και όταν ο VEGF δεσμεύεται αρχικά από συν-υποδοχείς, που εκφράζονται στο ίδιο κύτταρο με τον VEGFR (Εικόνα 1.9 Α). Όταν VEGF δεσμεύεται αρχικά στους υποδοχείς από συν-υποδοχείς που εκφράζονται σε γειτονικά κύτταρα, η δέσμευση γίνεται στην *trans* μορφή του υποδοχέα (Εικόνα 1.9 Β)<sup>82</sup>. Ο σχηματισμός ομο- και ετρο-διμερών του υποδοχέα<sup>83</sup> είναι απαραίτητος, αλλά όχι επαρκής για την ενεργοποίησή του<sup>84,85</sup>.

Κάποια μέλη της οικογένειας του VEGF αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς υποδοχείς και ενώ κάποια άλλα επιδεικνύουν πολύ εξειδικευμένες ιδιότητες πρόσδεσης ως προς τον υποδοχέα. Ο PlGF και ο VEGF-B εμφανίζουν εξειδίκευση για τον VEGFR1<sup>86,87</sup>, ο VEGF-E προσδένεται στον VEGFR2<sup>88</sup> και ο VEGFR3 και ο VEGFRD προσδένονται στον VEGFR2 και -3<sup>44</sup>. Ο VEGFRF προσδένεται στον VEGFR2, με συστατικά αποσύνθεσης παρόμοια με τον VEGF-A<sub>165</sub> αλλά όχι στον VEGFR2, VEGFR3 ή NRP-1<sup>89</sup>. Οι VEGF-A, -B και PlGF αποτελούν τις επικρατούσες ισομορφές για το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων, ενώ οι VEGF-C, -D είναι βασικές για το σχηματισμό λεμφαγγείων.

Επιπρόσθετα, τα εναλλακτικά μετάγραφα του VEGF-A επιδεικνύουν ευδιάκριτα σχήματα πρόσδεσης σε συν-υποδοχείς όπως οι πρωτεογλυκάνες θειικής ηπαρίνης και οι νευροπιλίνες. Οι VEGFs ισομορφές μπορούν να προσδεθούν συγχρόνως σε δύο ξεχωριστούς υποδοχείς, όπως VEGFR2 και νευροπιλίνες, ακόμα αν και αυτοί οι δύο υποδοχείς εκφράζονται ξεχωριστά σε δυο παρακείμενα κύτταρα<sup>90</sup>. Το υπόδειγμα εξειδίκευσης πρόσδεσης των ισομορφών του VEGF στους αντίστοιχους υποδοχείς φαίνεται στην εικόνα 1.8<sup>82</sup>.

#### 1.2.2.3.1 Ο ρόλος των συν-υποδοχέων στη σηματοδότηση του VEGF

Η σηματοδότηση από τον VEGF βασίζεται στην ενεργοποίηση των τριών RTKs : VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) και VEGFR3 (Flt-4). Επιπρόσθετα, οι λειτουργίες του VEGF-A

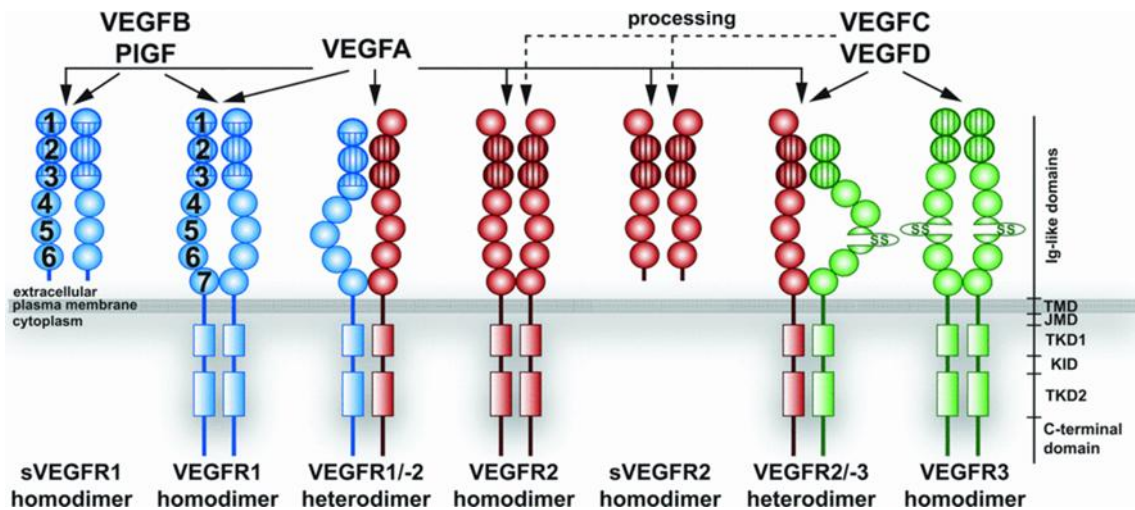
## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

διαμεσολαβούνται από δύο τύπους συν-υποδοχέων, τις νευροπιλίνες -1 και -2 (neuropilin-1 και -2) (NRP-1,-2)<sup>91</sup> και τις πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (Heparin Sulfate Proteoglycans) (HSPGs)<sup>92</sup>.

Η νευροπιλίνη-1 (NP-1) είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία υπολείπεται καταλυτικής δραστηριότητας. Η NP-1 είχε αρχικά αναγνωριστεί ως υποδοχέας της οικογένειας των σεμαφορινών, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κατάρρευση του κώνου ανάπτυξης, κατά τη νευρωνική ανάπτυξη<sup>93,94</sup>. Η νευροπιλίνη-2 (NP-2) είναι μια στενά συγγενική πρωτεΐνη, η οποία αναγνωρίστηκε μια δεκαετία αργότερα ως επιπρόσθετος υποδοχέας για τις σεμαφορίνες<sup>95</sup>. Η NP-1 προσδέεται στην καρβοξυτελική περιοχή του VEGF-A<sub>165</sub> με συγγένεια πρόσδεσης  $K_d=0,3$  nM, ενώ αναγνωρίζει επίσης τον VEGF-B, αλλά δεν αναγνωρίζει τον VEGF<sub>121</sub>. Αμφότερες οι δύο νευροπιλίνες-1 και -2, μοιράζονται μια μεγάλη ομολογία αλληλουχίας και ανεξάρτητα από το ρόλο τους στη νευρωνική καθοδήγηση, παίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στη σηματοδότηση από τον VEGF, αφού οδηγούν σε αυξημένη μετανάστευση και επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>96</sup> όσο και στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος, συντονίζοντας τη λειτουργία των δομικά μη συσχετιζόμενων προσδεμάτων της οικογένειας του VEGF<sup>95,97</sup>.

Οι πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (HSPGs) αποτελούν άφθονα συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας και της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας (ECM) και μπορούν να δράσουν ως μια πρόσθετη, χαμηλής συγγένειας θέση δέσμευσης για τον VEGF ικανή να τροποποιήσει την πρόσδεση του VEGF στους υποδοχείς του<sup>98</sup> (Εικόνα 1.9 A). Χαμηλές συγκεντρώσεις της ηπαρίνης (H) και θειϊκής ηπαρίνης (HS), έχουν αναφερθεί να αυξάνουν τη δέσμευση του VEGF σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs), ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις τη μειώνουν<sup>63</sup>. Επιπρόσθετα, η «παρουσίαση» του VEGF στον *trans* VEGFR2 από τις πρωτεογλυκάνες θειϊκής ηπαρίνης (HSPGs) που εκφράζονται στα γειτονικά κύτταρα όπως τα περικύτταρα, αυξάνει περαιτέρω την ένταση και τη διάρκεια του σήματος από τον VEGF (Εικόνα 1.9 B), πιο πιθανόν μπλοκάροντας την εσωτερίκευση του υποδοχέα<sup>99</sup>.



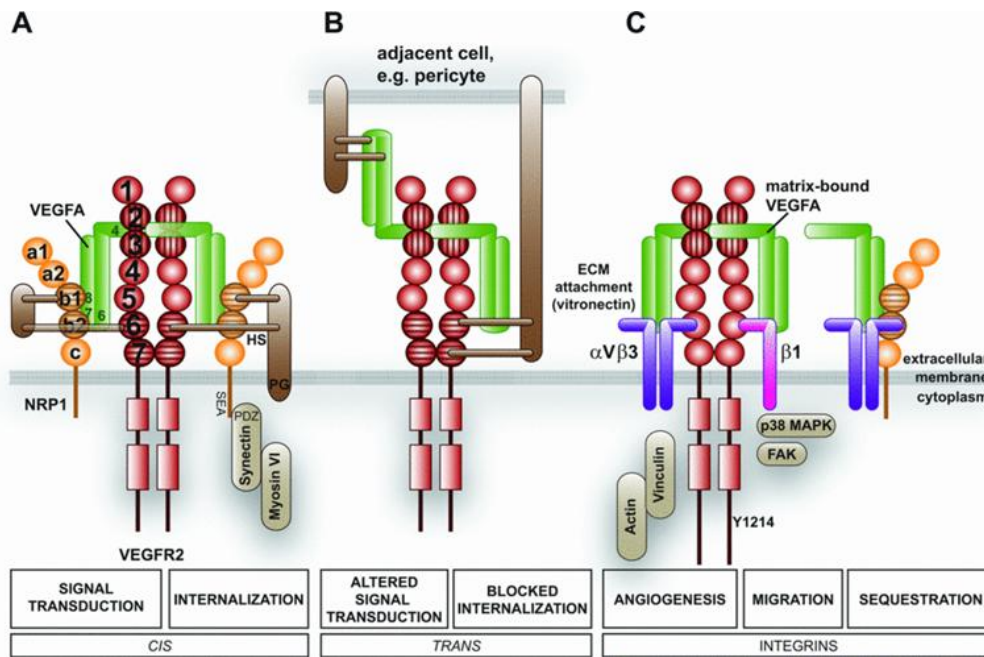
**Εικόνα 1.8:** Σχηματική αναπαράσταση των υποδοχέων του VEGF (VEGFR). Οι VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και PIGF, δεσμεύονται με διαφορετικές συγγένειες πρόσδεσης στους τρεις VEGFR, πυροδοτώντας το σχηματισμό όμο- και έτερο-διμερών. Πρωτεολυτική επεξεργασία των VEGF-C και VEGF-D επιτρέπει τη δέσμευση στον VEGFR2. Οι VEGFR Ig-ομοιάζουσες δομικές περιοχές εμφανίζονται με κύκλο. Οι διαλυτές μορφές του VEGFR (sVEGFR1 and sVEGFR2) υπολείπονται της έβδομης Ig-ομοιάζουσας δομικής περιοχής. Παραμένει άγνωστο αν οι διαλυτή μορφή του sVEGFR υπάρχει ως μονομερές, ομοδιμερές ή ετεροδιμερές με την πλήρους μήκους μορφή του VEGFR. JMD, juxtamembrane domain; KID, kinase insert domain; TMD, transmembrane domain; TKD1, ATP-binding domain; TKD2, phosphotransferase domain<sup>82</sup>.

#### 1.2.2.3.2 Η ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGF από μόρια προσκόλλησης

Είναι γνωστό ότι οι υποδοχείς του VEGF σχηματίζουν πολυπρωτεϊνικά συμπλέγματα αλληλεπιδρώντας με μόρια όπως οι ιντεργκρίνες (integrins) και οι καντχερίνες (cadherins). Οι ιντεργκρίνες είναι διαμεμβρανικές ετεροδιμερείς πρωτεΐνες, που διαμεσολαβούν την προσκόλληση των κυττάρων με τη θεμέλια ουσία. Αυτές, προσδέονται με εξειδίκευση στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία συστατικά όπως το κολλαγόνο, τη ινονεκτίνη, τη βιτρονεκτίνη και τη λαμίνη. Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική σηματοδότηση, καθώς συνδέουν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Συγκεκριμένες ιντεργκρίνες συνδέονται με την εξωκυτταρική περιοχή του VEGFR2 υποδοχέα, ενισχύοντας τη VEGF διαμεσολαβούμενη κυτταρική σηματοδότηση (Εικόνα 1.9 C)<sup>100</sup>. Η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της  $\beta_3$  υπομονάδας της ιντεργκρίνης και του VEGFR2 περιορίζεται στην  $\alpha_v\beta_3$  οικογένεια ιντεγρινών και εμπλέκεται είτε άμεσα είτε έμμεσα στη ρύθμιση των ενδοθηλιακών κυτταρικών λειτουργιών<sup>101</sup>. Η συνεργασία των VEGFR2- $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρίνης είναι σημαντική για την πλήρη δραστηριότητα του VEGFR, την ενεργοποίηση των MAP κινασών, p38 και FAK καθώς και την προσέλκυση της

βινκουλίνης. Η τελευταία, βοηθά στην προσέλκυση της ακτίνης, προκειμένου να ξεκινήσει η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>102,103</sup>. Η δέσμευση του VEGF στην εξωκυτταρική θεμέλια ουσία προωθεί, τον εξαρτώμενο από ιντεγκρίνη πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση και την επιβίωσή τους χωρίς να προϋποθέτουν τη μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς<sup>104</sup>. Ο VEGF όπως και ο FGF, ενδεχομένως να επάγουν την παραγωγή ιντεγκρίνων μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-AKT<sup>105</sup>. Επιπλέον, η VEGFR2 εξαρτώμενη αγγειογένεση ρυθμίζεται από τις ιντεγκρίνες όπως φαίνεται από έρευνες knock-out ποντικών, οι οποίοι υπολείπονται τις  $\beta_3$  ή  $\beta_5$  αλυσίδας<sup>106</sup>. Ο σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ VEGFR2/ $\beta_1$  ιντεγκρίνης επάγεται από το δεσμευμένο στη θεμέλια ουσία VEGF (Εικόνα 1.9C)<sup>107</sup>.

Οι καντχερίνες εμπλέκονται στο σχηματισμό συνδέσμων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά και στα επιθηλιακά κύτταρα και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη σηματοδότηση από τον VEGF<sup>12,108</sup>. Η αλληλεπίδραση του VEGF με την αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη (vascular endothelial (VE)-cadherin), ρυθμίζεται μέσω της  $\beta$ -κατενίνης ( $\beta$ -catenin). Σε περιπτώσεις υψηλής πυκνότητας κυττάρων, η φωσφατάση PPI/Dep1/CD148 αλληλεπιδρά με την VE-cadherin προκειμένου να ελαττώσει τη φωσφορυλίωση του VEGFR2, καταστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο τη σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού της PI3 κινάσης, των MAP κινασών και της PLC $\gamma$ 1<sup>109</sup>. Από την άλλη, σε χαμηλή πυκνότητα κυττάρων, όπως στην άκρη των αναπτυσσόμενων αγγείων, ο VEGFR2 συνεργάζεται με την ιντεγκρίνη  $\alpha_v\beta_3$ , αντί της VE-cadherin, με επακόλουθο την αύξηση της κυτταρικής μετανάστευσης και του μιτογενετικού σήματος<sup>108</sup>. Οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές, καθώς αποτελούν το μηχανισμό ρύθμισης της αγγειακής ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από μηχανικό στρες, το οποίο δημιουργείται λόγω αλλαγών στη ροή του αίματος<sup>110</sup>.



**Εικόνα 1.9:** Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων του VEGFR2 με τους συν-υποδοχείς HS/H, NRP1 και τις ιντεγκρίνες. (A) Ο VEGF-A (πράσινο) «γεφυρώνει» τους VEGFR2 (κόκκινο) και NRP1 (πορτοκαλί). Ο VEGF-A αλληλεπιδρά με τις πρωτεογλυκάνες (HS/HSPGs) (καφέ) μέσω της 6-κωδικοποιούσας περιοχής, ενώ οι περιοχές 1–5 συμμετέχουν στην πρόσδεση του VEGFR2. Οι πρωτεογλυκάνες (καφέ) μπορεί να είναι είτε διαλυτές είτε ακυροβολημένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Η ενδοκυτταρική περιοχή της NRP1 προσδένει την PDZ περιοχή της συνεκτίνης (synectin), η οποία διαμεσολαβεί την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα μέσω της μυοσίνης VI. (B) Εναλλακτικά ο VEGF-A μπορεί να «παρουσιαστεί» στην trans μορφή του VEGFR2, από πρωτεογλυκάνες που βρίσκονται στα γειτονικά κύτταρα, πιθανόν οδηγώντας σε καθήλωση του συμπλέγματος του υποδοχέα στην πλασματική μεμβράνη και σε μεταβολή της σηματοδότησης από τον υποδοχέα. (C) Η ιντεγκρίνη  $\alpha_V\beta_3$  (μπλε) μπορεί να δεσμεύσει τον VEGFR2 με έναν VEGF-A εξαρτώμενο τρόπο και να συμβάλει στην προσκόλληση του κυττάρου στην εξωκυττάρια ουσία (ECM) μέσω βινκουλίνης (vincullin). Ο δεσμευμένος στη θεμέλια ουσία VEGF-A, οδηγεί σε παρατεταμένη φωσφορυλίωση στη θέση Y1214, που έχει ως συνέπεια την ενεργοποίηση καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, όπως η p38 MAPK. Στη σηματοδότηση σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η  $\beta_1$  ιντεγκρίνη (ροζ)<sup>82</sup>.

### 1.2.3 Η ενεργοποίηση και η σηματοδότηση από τους υποδοχείς του VEGF

Όμοια με τους υπόλοιπους RTK υποδοχείς, η σηματοδότηση από τους υποδοχείς του VEGF, έχει ως έναυσμα την πρόσδεση στην εξωκυτταρική περιοχή του υποδοχέα ενός ομοιοπολικά συνδεδεμένου προσδέματος. Η αλληλεπίδραση αυτή προωθεί τον ομο- και ετεροδιμερισμό του υποδοχέα. Ο διμερισμός με τη σειρά του ενεργοποιεί και τη δραστηριότητα κινάσης, η οποία οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση οδηγεί σε ενεργοποίηση των καθοδικών μονοπατιών σηματοδότησης

του VEGF που περιλαμβάνουν ένα σύνολο αγγελιοφόρων μορίων, τα οποία οδηγούν σε βασικές βιολογικές αποκρίσεις όπως περιγράφεται στη συνέχεια.

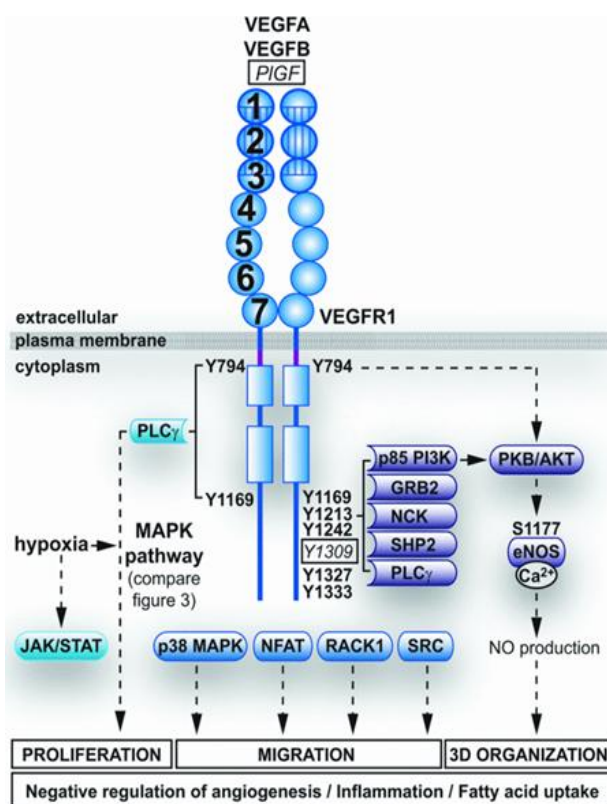
Η επακόλουθη αλληλεπίδραση μεταξύ των VEGFRs και των καθοδικών τελεστών της σηματοδότησης διαμεσολαβείται διαμέσου μιας σειράς φωσφορυλιωμένων τυροσινών και πρωτεϊνών που διαθέτουν περιοχές Src homology-2 (SH-2). Επιπρόσθετα, η αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων τυροσικής κινάσης εμφανίζεται σημαντική για τον περιορισμό των αποκρίσεων του κυττάρου-στόχου. Είναι γνωστό ότι η επαγωγή της δραστηριότητας κινάσης αντισταθμίζεται από την ταχύτατη αποφωσφορυλίωση των υποδοχέων από ειδικές τυροσινικές φωσφατάσες<sup>111,112</sup>. Τέλος, η δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης των υποδοχέων αναστέλλεται μέσω της αποικοδόμησης τους στο λυσόσωμα. Ειδικότερα, η ενδοκυττάρωση και αποδόμηση του VEGFR2 εξαρτάται από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Protein Kinase C, PKC) και την ακόλουθη φωσφορυλίωση του καρβουλυτελικού άκρου του υποδοχέα.

### **1.2.3.1 Η μεταγωγή του σήματος από τον VEGFR1**

Ο VEGFR1 δρα ως αρνητικός ρυθμιστής κατά την εμβρυογένεση και θετικός ρυθμιστής κατά τα ενήλικα στάδια της αγγειογένεσης. Μεταβιβάζει ασθενή σήματα που αφορούν στην επιβίωση και στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και περικυττάρων, καθώς και στην αναδιοργάνωση της ακτίνης και τη μετανάστευση των κυττάρων (Εικόνα1.10)<sup>113</sup>. Αρκετά τυροσινικά κατάλοιπα τα οποία βρίσκονται στην ενδοκυτταρική περιοχή του VEGFR1 (Y1169, Y1213, Y1242, Y1327, Y1333) έχουν αναγνωρισθεί ως θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης, χρησιμοποιώντας ποικίλες πειραματικές προσεγγίσεις<sup>114,115</sup>. Η φωσφορυλίωση στη θέση Y1169 επιτρέπει την πρόσδεση και ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C-γ1 (phospholipase C, PLCγ1, η φωσφολιπάση C-γ), ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό μέσω του μονοπατιού των MAP κινασών. Η διάρκεια της φωσφορυλίωσης σε αυτό το τυροσινικό κατάλοιπο, φαίνεται ωστόσο να είναι σχετικά μικρή<sup>115,116</sup>. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η πρόσδεση στην υπομονάδα p85 της PI3 κινάσης του VEGFR1, ενεργοποιεί τη φωσφορυλίωσή του<sup>117</sup>. Παρόλα αυτά, είναι δύσκολος ο συσχετισμός της ενεργοποίησης του VEGFR1 με τις δυναμικές βιολογικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>118</sup>. Επιπρόσθετα, είναι γνωστό ότι η επαγόμενη από τον VEGF-A αυτοφωσφορυλίωση του VEGFR1 δεν είναι ταυτόσημη με εκείνη που



επάγεται από τον PlGF<sup>119</sup>. Μολονότι, ο μηχανισμός της επαγωγής παραμένει ακόμη σχετικά άγνωστος αποτελέσματα ερευνών προτείνουν ότι οι δύο προσδέτες πιθανόν να επάγουν μια διαφορετική διαμόρφωση της ενδοκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα στον ενεργοποιημένο διμερή VEGFR1<sup>120</sup>. Μια άλλη εκδοχή πρόσδεσης, αναφέρεται σε διαφορετικές μεθόδους σύνδεσης μεταξύ του υποδοχέα και των βοηθητικών μορίων προσκόλλησης (όπως HSPGs και NPs) (βλέπε κεφ. 1.2.2.3.2), τα οποία επηρεάζουν τη διαθεσιμότητα των τυροσινικών καταλοίπων του VEGFR1<sup>121</sup>.



**Εικόνα 1.10: Οι θέσεις φωσφορυλίωσης της τυροσίνης και η μετάδοση του σήματος από τον VEGFR1.** Η σχηματική απεικόνιση του ενεργοποιημένου και διμερή VEGFR1 με θέσεις φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης (Y) (αναγράφονται με αριθμούς) (γαλάζιο) και τα καθοδικά σηματοδοτικά τους μονοπάτια. Οι περιοχές πρόσδεσης περιγράφονται με τη βοήθεια σκιασμένων κύκλων. Οι διαμεσολαβητές του σήματος του υποδοχέα VEGFR1 (σχήμα ρουκέτας) προσδένονται σε συγκεκριμένες θέσεις φωσφορυλίωσης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιεί καθοδικά μόρια (οβάλ σχήμα) και να οδηγεί σε συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις, που συνοψίζονται στα πλαίσια του κάτω μέρους της εικόνας. Η σηματοδότηση από ορισμένες θέσεις φωσφορυλίωσης του VEGFR1 δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (διακεκομμένα βέλη). JAK, Janus kinase; NFAT, nuclear factor of activated T-cells; PKB, protein kinase B; RACK1, receptor for activated C-

kinase 1; SHP2, SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2; STAT, signal transducer and activator of transcription<sup>82</sup>.

### 1.2.3.2 Η μεταγωγή του σήματος από τον VEGFR2

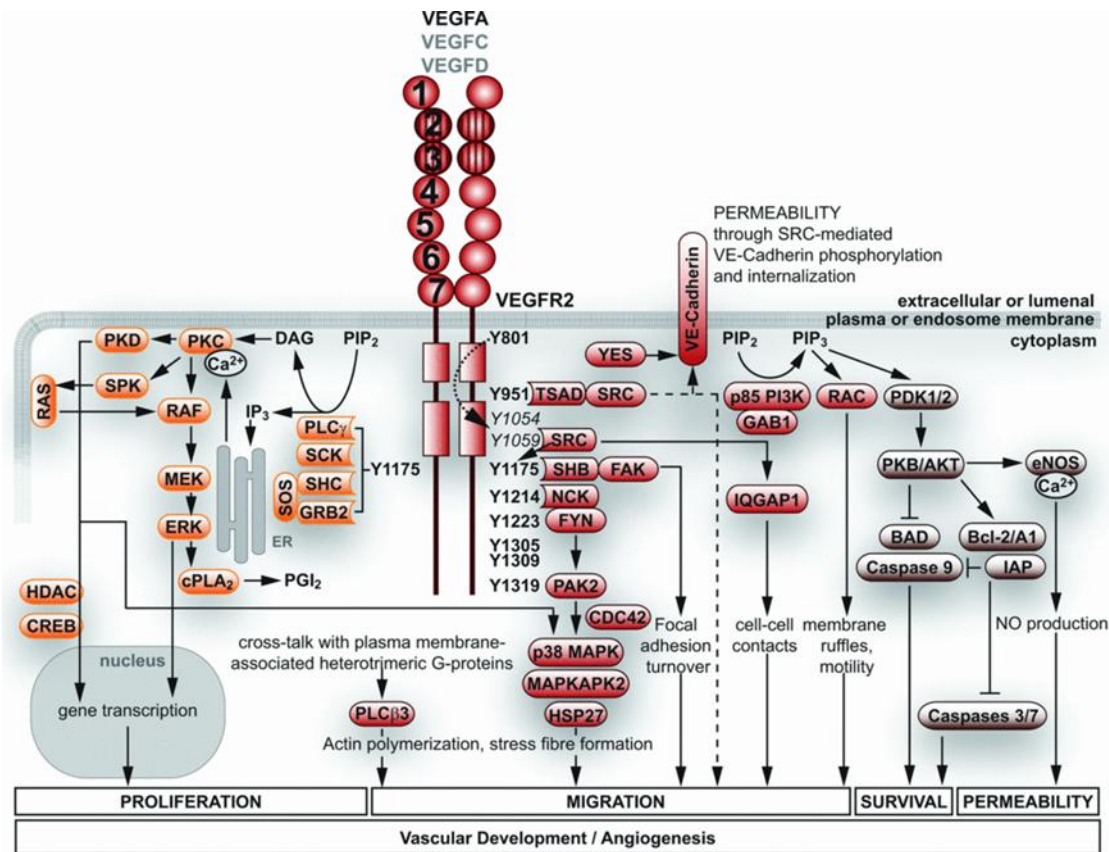
Είναι γνωστό ότι ο VEGFR2 ρυθμίζει το πλήρες φάσμα των ενδοθηλιακών αποκρίσεων που επάγονται από τον VEGF όπως είναι η επιβίωση, ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση των κυττάρων και ο σχηματισμός του αγγειακού αυλού. Επιπλέον, μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες που μεσολαβείται μέσω του VEGFR2 είναι και η προώθηση της αγγειογένεσης *in vivo*.

Τα τυροσινικά κατάλοιπα Y951, Y1054, Y1059, Y1175 και Y1214 του υποδοχέα αποτελούν εξέχουσες θέσεις φωσφορυλίωσης του hVEGFR2<sup>122</sup> (Εικόνα 1.11). Οι Y1054 και Y1059 έχουν αναγνωρισθεί ως θέσεις αυτοφωσφορυλίωσης, σημαντικές για την καταλυτική ενεργότητα κινάσης του υποδοχέα<sup>123</sup>. Πρόσθετες θέσεις φωσφορυλίωσης του VEGFR2 έχουν αναγνωρισθεί στα Y1123, Y1305, Y1309, και Y1319 τυροσινικά κατάλοιπα, όμως η λειτουργία τους παραμένει ακόμη άγνωστη<sup>122</sup>. Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση τυροσινικών θέσεων οδήγησε στην αναγνώριση των καταλοίπων Y801 και Y1175, ως θέσεων πρόσδεσης της φωσφολιπάσης C- $\gamma$  (PLC $\gamma$ )<sup>124</sup>. Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της PLC $\gamma$  προκαλεί την υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PIP2), σε τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP<sub>3</sub>) και διακυλογλυκερόλη (DAG) η οποία με τη σειρά της διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση C (PKC)<sup>125</sup>.

Το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο Y1175 δεσμεύει επίσης τις πρωτεΐνες-προσαρμοστές (protein-adaptors) SHB (SH2-domain-containing adaptor protein B) και Sck [SHC (Src Homology and Collagen homology)-related adaptor protein]<sup>126</sup>. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη SHB προσδέεται στην κινάση FAK (Focal Adhesion Kinase)<sup>126</sup> και συμβάλει στην προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετανάστευσή τους<sup>127</sup>. Το Y1175 έχει επίσης, περιγραφεί να προσδέει τις SHC ή GRB2 που προσελκύουν τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων του VEGFR2, SOS (Son of sevenless)<sup>128</sup>. Αυτό το μονοπάτι φαίνεται να είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση της Ras πρωτεΐνης σε ορισμένους τύπους κυττάρων, μέσω της οποίας ρυθμίζεται το μιτογόνο σήμα του VEGFR2 που διαμεσολαβείται από την PKC μέσω της καθοδικής ERK πρωτεϊνικής κινάσης<sup>129</sup>.

Η VEGF-επαγόμενη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεσολαβείται από την πρωτεΐνη-προσαρμοστή VRAP (VEGFR2-Associated Protein), επίσης γνωστή ως T Cell-Specific Adaptor (TSAD)<sup>130</sup>. Η δέσμευση της TSAD στο Y951 οδηγεί στη φωσφορυλίωση και επιστράτευση της Src κινάσης, η οποία προωθεί την αναδιοργάνωση της ακτίνης και τη μετανάστευση των κυττάρων<sup>122</sup>.

Μια ακόμη πρόσθετη λειτουργία του VEGF, είναι η σηματοδότηση για επιβίωση μέσω της PI3K και επακόλουθης φωσφορυλίωσης της Akt<sup>131</sup>. Η ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας πιθανόν να είναι και μια από τις κύριες *in vivo* λειτουργίες του VEGF, σε συνάφεια με τον αρχικό του προορισμό ως παράγοντας διαπερατότητας VPF.



**Εικόνα 1.11:** Οι τυροσινικές θέσεις φωσφορυλίωσης και η μετάδοση του σήματος από τον VEGFR2. Σχηματική απεικόνιση του διμερή και ενεργοποιημένου υποδοχέα VEGFR2. Μετά από δέσμευση του VEGF-A στις εξωκυτταρικές Ig-ομοιάζουσες 2 και 3 του VEGFR2 (σκιασμένοι κύκλοι), μόρια σηματοδότησης (σχήμα ρουκέτας) προσδένονται σε αντίστοιχες τυροσινικές θέσεις φωσφορυλίωσης (υποδεικνύονται με αριθμούς) στην ενδοκυτταρική περιοχή του VEGFR2 και ενεργοποιούν καθοδικούς μεσολαβητές (οβάλ σχήμα). Τα Y1054 και Y1059 είναι σημαντικά για την ενεργότητα κινάσης του VEGFR2 (*italics*). Το πολύπλοκο δίκτυο των μονοπατιών της ενδοκυτταρικής μετάβασης οδηγεί σε βιολογικές αποκρίσεις όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η κυτταρική διαπερατότητα (πλαίσια στο κάτω μέρος) τα οποία απαιτούνται για τη συντονισμένη διεύθυνση των ενδοθηλιακών κυττάρων, για το τρισδιάστατο σχηματισμό και συντήρηση των αγγειακών σωλήνων. Βλέπε κυρίως κείμενο για λεπτομέρειες. CDC42, *cell division cycle 42*; DAG, *diacylglycerol*; IP<sub>3</sub>, *inositol 1,4,5-trisphosphate*; MEK, *MAPK/ERK kinase*; PIP<sub>2</sub>, *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*; SOS, *Son of sevenless*<sup>82</sup>.

Τέλος, c-Src και το μονοξειδίο του αζώτου (NO)<sup>132</sup> έχουν αναγνωρισθεί ως οι ενδοκυτταρικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης από τον VEGF, ενώ η heparin sulfate καθώς και συστατικά της εξωκυτταρικής θεμέλιας ουσίας δρουν ως εξωκυτταρικοί ρυθμιστές του μιτογόνου σήματος<sup>10,133</sup>. Επιπρόσθετα, με το ρόλο του στην ρύθμιση και προώθηση της αγγειογένεσης και παρόλο που η μοριακή βάση για άλλες λειτουργίες που διαμεσολαβούνται από αυτόν δεν είναι πλήρως κατανοητή, υπάρχουν αυξανόμενες αποδείξεις ότι ο VEGF συμβάλει σε διαδικασίες ανεξάρτητες των αγγειογενετικών

λειτουργιών. Οι διαμεσολαβούμενες από τον VEGF κυτταρικές αποκρίσεις περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

### 1.2.4 Βιολογικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων στον VEGF

#### **1.2.4.1 Η σηματοδότηση μέσω του VEGFR2 είναι βασική για την κυτταρική επιβίωση**

Ο βασικός κυτταρικός μηχανισμός με τον οποίο ο VEGF προωθεί το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων, ενώ ταυτόχρονα διατηρεί την ακεραιότητά τους, είναι η ενεργοποίηση της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτή η ιδιότητά του ως παράγοντας επιβίωσης των κυττάρων, αποδόθηκε αρχικά στο VEGF μετά από μελέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς<sup>134</sup>. Οι μακροπρόθεσμες συνέπειες της επιβίωσης που διαμεσολαβείται μέσω VEGF, πιθανόν πραγματοποιούνται μέσω θετικής ρύθμισης της αντι-αποπτωτικής κυτταρικής μηχανής. Ο VEGF αναστέλλει την απόπτωση των HUVE κυττάρων εν μέρει ενεργοποιώντας την αντι-αποπτωτική κινάση Akt/PKB, μέσω ενός PI3K-εξαρτώμενου μονοπατιού<sup>131,135</sup>. Μέχρι σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί η τυροσινική θέση φωσφορυλίωσης του υποδοχέα του VEGF, που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της PI3-κινάσης και την επακόλουθη φωσφορυλίωση της Akt. Η Akt με τη σειρά της καταστέλλει αποπτωτικούς μηχανισμούς όπως την BAD, την κασπάση 9 και την κινάση p38 και επάγει μηχανισμούς επιβίωσης μέσω ενεργοποίησης του παράγοντα NFκappaB και μέσω μεταγραφής γονιδίων απαραίτητα για την επιβίωση των κυττάρων<sup>136</sup>. Παράλληλα, ο VEGF επάγει την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2 και A1<sup>137</sup>, οι οποίες αναστέλλουν την ενεργοποίηση των ανοδικών κασπασών καθώς και δύο μελών της IAP οικογένειας (αναστολέων της απόπτωσης)<sup>138</sup>.

Η τυροσινική κινάση FAK (Focal Adhesion Kinase) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μεσολαβούμενη, μέσω ιντεκρινών, σηματοδότηση καθώς ενέχεται ισχυρά στη διατήρηση σημάτων επιβίωσης σε αρκετούς τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων και των ενδοθηλιακών. Άλλα μονοπάτια σηματοδότησης τα οποία μπορεί επίσης να παίζουν ρόλο στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από τον VEGF, περιλαμβάνουν την ιντεργκρίνη  $\alpha_v\beta_3$  η οποία αποτελεί ένα σημαντικό σύστημα επιβίωσης για τα εν τη γενέσει αιμοφόρα αγγεία, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης<sup>139</sup>.

και το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), που έχει δείχθει να επάγει την επιβίωση των HUVEC και το σχηματισμό ενδοθηλιακών σωλήνων<sup>140</sup>.

#### **1.2.4.2 Ο VEGFR2 διαμεσολαβεί τη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού**

Ο VEGF, μέσω του VEGFR2 επάγει τη σύνθεση DNA και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυτταρικών. Είναι γνωστό ότι οι *VEGFR2*<sup>-/-</sup> ποντικοί πεθαίνουν εξαιτίας της μειωμένης ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της προβληματικής δημιουργίας αγγείων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο του VEGFR2 στη ρύθμιση του μιτογόνου σήματος του VEGF κατά την εμβρυογένεση.

Ειδικότερα, ο VEGF επάγει ισχυρά την ενεργοποίηση του μονοπατιού των κινασών ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases), το οποίο παίζει κεντρικό ρόλο στη διέγερση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>141,142</sup>. Συγκεκριμένα, το μονοπάτι των MAPKs που είναι υπεύθυνο για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνει την MAPKKK RAF-1, τις MAPKKs MEK1/2 και τις MAPKs ERK1/2<sup>101</sup>. Η επαγόμενη από VEGF μιτογένεση, η σύνθεση της cyclin D1 και η ενεργοποίηση της cyclin-dependent kinase 4, αναστέλλονται από μια μεταλλαγμένη ανενεργή μορφή της JNK-1 και τον PD98059, έναν εκλεκτικό αναστολέα της ενεργοποίησης των ERK1/2<sup>143</sup>. Ενώ για πολλούς αυξητικούς παράγοντες, έχει δείχθει ότι η Raf κινάση ενεργοποιείται από την GTPάση Ras, αντικρουόμενα πειραματικά δεδομένα έχουν δημοσιευτεί για τα μόρια που χρησιμοποιεί ο VEGF με σκοπό να διαδώσει το μιτογόνο του σήμα. Ευρήματα προτείνουν ότι ο VEGF, πιθανόν να είναι ο μοναδικός ανάμεσα στους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης που ενεργοποιεί τον καταρράκτη των ERK μέσω ενός Ras-ανεξάρτητου μονοπατιού, που μεσολαβείται από τη πρωτεΐνη PKC.

Επίσης, βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση της PLC $\gamma$  και την ενεργοποίησή της που οδηγεί στο σχηματισμό 1,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης και διακυλογλυκερόλης, η οποία στη συνέχεια ενεργοποιεί τον καταρράκτη των μορίων PKC-RAF-MEK-ERK1/2. Η επακόλουθη ενεργοποίηση της PKC έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενώ οδηγεί και σε αύξηση της κινητικότητας του Ca<sup>+</sup><sup>144</sup>. Συγκεκριμένα, η μιτογονική δράση του VEGF μεσολαβείται διαμέσου μιας συντονισμένης αύξησης της δραστηριότητας κάποιων ισομορφών της PKC

και μείωσης της ενεργότητας κάποιων άλλων. Συγκριτικές έρευνες μεταξύ των VEGF και FGF έδειξαν ότι η συμμετοχή των PLCγ και Ca<sup>2+</sup> στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ενεργοποιείται μόνο από τον VEGF και όχι από τον FGF<sup>145</sup>.

Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών ERK1/2 από τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης πραγματοποιείται επίσης, μέσω τυροσινικής φωσφορύλιωσης και αλληλεπίδρασης του υποδοχέα με την πρωτεΐνη-προσαρμοστή GRB-2. Ακολουθεί, η διέγερση της πρωτεΐνης SOS (nucleotide exchange factor) και τελικά η ενεργοποίηση του καταρράκτη των κινασών RAS-RAF-ERK<sup>146</sup>.

### **1.2.4.3 Ο ρόλος του υποδοχέα VEGFR2 στην οργάνωση του κυτταροσκελετού και τη μετανάστευση**

Ο εκφυλισμός της κυτταρικής μεμβράνης είναι απαραίτητος για τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων και αποτελεί ουσιαστικό πρώτο βήμα για την έναρξη της νεοαγγείωσης<sup>1</sup>. Όπως έχει προαναφερθεί, ο VEGF επάγει την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών ενζύμων υπεύθυνα για τη διάσπαση της θεμέλιας ουσίας. Τα ένζυμα αυτά είναι πολύ πιθανό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην VEGF-επαγόμενη μετανάστευση<sup>147</sup>.

Ένας μεγάλος όγκος ευρημάτων υποδεικνύουν ότι η FAK-εξαρτώμενη σηματοδότηση είναι ουσιαστική για τη ρύθμιση της ανανέωσης των εστιακών προσφύσεων (Focal Adhesion), την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>148</sup>. Ο VEGFR επάγει τυροσινική φωσφορύλιωση της FAK και της paxillin και προωθεί την προσέλκυση της FAK στις νέες εστιακές προσφύσεις των HUVE κυττάρων<sup>141</sup>. Έχει δειχτεί ότι η πρωτεΐνη θερμικού σοκ (heat shock protein) Hsp90, διευκολύνει τη φωσφορύλιωση της FAK και ότι αναστολή της με γελνταμυκίνη ανέστειλε την επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση<sup>149</sup>. Επιπλέον, μέσω ενός ανεξάρτητου μονοπατιού ο VEGF ενεργοποιεί την κινάση p38 στα HUVECs. Ο αναστολέας της p38 κινάσης SB203580, αναστέλλει την αναδιοργάνωση της ακτίνης και τη μετανάστευση των κυττάρων, ενώ ο αναστολέας της MEK, PD98059 δεν έχει καμία επίδραση σε κάποια από αυτές τις βιολογικές αποκρίσεις<sup>148,149</sup>.

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα, δείχνουν ότι η μετανάστευση των κυττάρων και ο σχηματισμός τριχοειδών αγγείων ρυθμίζονται από τον VEGF επίσης μέσω της GAB1, η

οποία δρα ως πρωτεΐνη-προσαρμοστής για την PI3 κινάση (PI3K) και την GAB (GRB2-Binding Protein), ενώ η καθοδική της πρωτεΐνη IQGAP1 εμπλέκεται στη ρύθμιση της επαφής των κυττάρων μεταξύ τους<sup>150,151</sup> (Εικόνα 1.11). Η επαγόμενη VEGF αναδιοργάνωση της ακτίνης, πυροδοτείται επίσης από την επακόλουθη ενεργοποίηση της μικρής GTPase Cdc42 και της ενεργοποιημένης από το στρες πρωτεϊνικής κινάσης (Stress Activated Protein Kinase, SAPK/p38), που ακολουθεί τη φωσφορυλίωση του Y1214<sup>105</sup>. Το γεγονός αυτό οδηγεί στη φωσφορυλίωση και απελευθέρωση της πρωτεΐνης HSP27. Πρώιμα μοριακά γεγονότα στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης περιλαμβάνουν την προσέλκυση της Nck πρωτεΐνης καθώς και της πρωτεΐνης Fyn, της οικογένειας των Src κινασών. Ταυτόχρονα, πυροδοτούν τη φωσφορυλίωση της PAK2 (p21-Activated Protein Kinase-2) και ενεργοποίηση των Cdc42 και p38 MAPK<sup>152</sup>.

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι και η παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) μπορεί να παίζει ρόλο στην VEGF επαγόμενη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το NO έχει αναφερθεί να ρυθμίζει την ακεραιότητα των εστιακών προσφύσεων<sup>153</sup>. Επιπλέον, η εξαρτώμενη από την Akt φωσφορυλίωση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) στη σερίνη 1177 απαιτείται για την επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση<sup>154</sup>. Τέλος, η πρωτεΐνη PLCγ φαίνεται να ενέχεται στη διατήρηση κυτταρικών αποκρίσεων που συνδέονται με την επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση.

#### **1.2.4.4 Ρύθμιση της διαπερατότητας των αγγείων μέσω του VEGFR2**

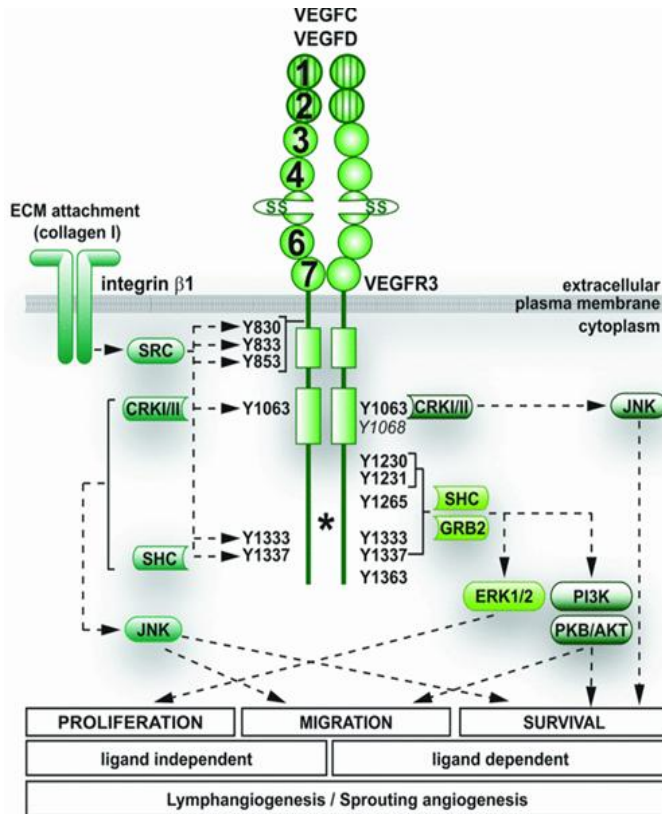
Αρχικά, όπως προαναφέρθηκε ο VEGF είχε αναγνωριστεί ως παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας (vascular permeability factor, VPF)<sup>44</sup>. Πράγματι, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα παρατηρείται σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα μετά από χορήγηση VEGF, σε συνδυασμό με σύντηξη ενδοθηλιακών κενοτοπίων (vesicular-vacuolar), VVOs καθώς και ανοιγμάτων (fenestrae), ειδικών περιοχών της πλασματικής μεμβράνης, τα οποία είναι πολύ διαπερατά σε μακρο-μόρια<sup>155-157</sup>. Ο μηχανισμός σχηματισμού αυτών των μεμβρανικών δομών παραμένει ακόμη άγνωστος και βασίζεται σε στοιχεία που έχουν προκύψει από μεταλλαγμένα ποντίκια, στα οποία λείπουν και οι δύο πρωτεΐνες c-Src και c-Yes. Τα ποντίκια αυτά εμφανίζουν μειωμένη αγγειακή διαπερατότητα μετά από χορήγηση VEGF<sup>112</sup>.

Σε ώριμα αγγεία, ο VEGF επίσης ρυθμίζει την αγγειακή διαπερατότητα, προκαλώντας τη χαλάρωση των σφικτών συνδέσεων μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, οδηγώντας με αυτό τον τρόπο στο σχηματισμό κενών μεταξύ τους. Η φωσφορυλίωση των βασικών συστατικών που απαιτούνται για σφιχτές, προσκολλημένες ή κενές συνδέσεις, όπως για παράδειγμα η φωσφορυλίωση της VE-cadherin<sup>158,159</sup>, της β-catenin, καθώς και των πρωτεϊνών occludin, zona occludin 1<sup>160</sup> και connexin 43<sup>161</sup>, φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα απόκρισης στην χορήγηση VEGF. Η διαστολή των αγγείων και η διαπερατότητα τους ρυθμίζεται επιπλέον και από το NO, το οποίο επάγεται μέσω Akt μετά από ενεργοποίηση της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS)<sup>133,162</sup>. Παρεμπόδιση της eNOS και της κυκλοοξυγενάσης (cyclooxygenase) με εξειδικευμένους αναστολείς, εμποδίζει την απελευθέρωση NO και PGI2 (prostacyclin) και μπλοκάρει την VEGF-επαγόμενη διαπερατότητα των αγγείων<sup>163</sup>.

### **1.2.4.5 Ο VEGFR3 είναι ο κύριος ρυθμιστής της λεμφαγγειογένεσης.**

Ο VEGFR3 εμπλέκεται στη ρύθμιση τόσο των αιμοφόρων αγγείων όσο και των λεμφαγγείων (Εικόνα 1.12). Η μελέτη της σηματοδότησης μέσω του VEGFR3 είναι περιορισμένη. Πέντε τυροσινικές θέσεις αυτόφωσφορυλίωσης Y1230, Y1231, Y1265, Y1337 και Y1363 έχουν αναγνωρισθεί στην καρβοξυτελική περιοχή του VEGFR3<sup>164</sup>. Από τις θέσεις αυτές, η Y1337 είναι γνωστό ότι προσδένει τις πρωτεΐνες Shc και Grb2, ενεργοποιώντας με αυτό τον τρόπο το μονοπάτι των MAP κινασών. Σε πρωτογενή ενδοθηλιακά κύτταρα, ο VEGF-C προωθεί το σχηματισμό VEGFR2/VEGFR3 ετεροδιμερών, στα οποία οι Y1337 και Y1363 αποτυγχάνουν να φωσφορυλιωθούν. Έτσι, ο ετεροδιμερισμός μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία λεμφαγγείων με τη διαδικασία της εκβλάστησης<sup>119</sup>. Εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του VEGFR3 δίνει δύο ισομορφές μια μικρότερη και μια μεγαλύτερου μήκους. Η μεγαλύτερου μήκους ισομορφή αποτελεί και την κυρίαρχη μορφή έκφρασης του VEGFR3.





**Εικόνα 1.12:** Οι τυροσινικές θέσεις φωσφορυλίωσης και η μετάδοση σήματος από τον VEGFR3. Σχηματική απεικόνιση του διμερή και ενεργοποιημένου υποδοχέα VEGFR3 με τις θέσεις τυροσινικής (Y) φωσφορυλίωσης (πράσινο) (αναγράφονται με αριθμούς) και τα καθοδικά σηματοδοτικά μονοπάτια τους. Το κατάλοιπο Y1068 (*italics*) είναι σημαντικό για την ενεργότητα κινάσης του VEGFR3. Ο VEGFR3 απαντάται σε δύο ισομορφές, μια μικρή και μια μεγαλύτερου μήκους. (η διαφορά μήκους σημειώνεται με \*). Ο VEGFR3 έχει δείχτει ότι συμβάλει στον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση καθώς και την επιβίωση λέμφοκυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων. ECM, extracellular matrix.

### 1.3 VEGF ΚΑΙ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ

#### 1.3.1 Ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας VEGF ενεργοποιεί γονίδια της UPR

Παρά τον όγκο των δεδομένων που έχει προκύψει τις τελευταίες δεκαετίες για το ρόλο του VEGF, πιθανόν να υπάρχουν ακόμα άγνωστες πτυχές όσον αφορά τη σηματοδότηση από τον υποδοχέα του. Το ερώτημα αυτό, αποτέλεσε τη βάση για προγενέστερες μελέτες του εργαστηρίου, προκειμένου να διερευνηθεί ο ευρύτερος ρόλος του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Για το λόγο αυτό, εξετάστηκαν με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών cDNA (microarrays cDNA), 22000 γονίδια όσον αφορά τη ρύθμιση της έκφρασής τους από τον VEGF (VEGF-A) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα.

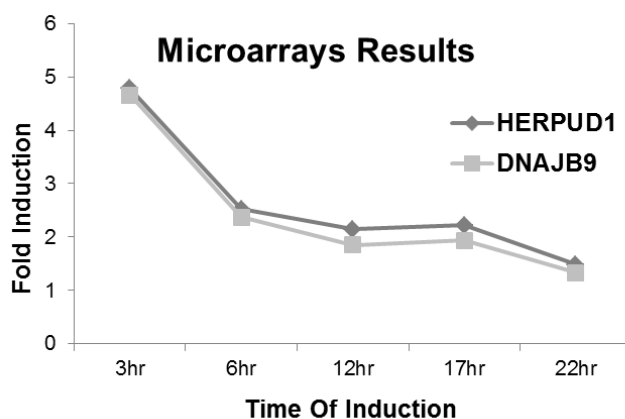
Η πρωτογενής ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από το πείραμα των μικροσυστοιχιών cDNA, έδειξε ότι 116 γονίδια ρυθμίζονται θετικά και 30 γονίδια ρυθμίζονται αρνητικά από τον VEGF. Από τα γονίδια που βρέθηκαν να επάγονται από τον VEGF, ήδη έχουν μελετηθεί από την ερευνητική μας ομάδα τα γονίδια *DUSP1* και *DUSP5*<sup>165</sup>. Από τα υπόλοιπα γονίδια που ρυθμίζονται από τον VEGF, το ενδιαφέρον μας

## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

προσέλκυσαν τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*. Τα γονίδια αυτά επάγονται από τον VEGF μετά από 3 ώρες, που ήταν και το συντομότερο χρονικό διάστημα που μελετήθηκε. Αναλυτικότερα, τα επίπεδα mRNA του *HERPUD1* αυξήθηκαν κατά 4,78 φορές, ενώ τα επίπεδα mRNA του *DNAJB9* αυξήθηκαν κατά 4,66 φορές μετά από τρίωρη επαγωγή με VEGF, σε σύγκριση με το δείγμα-μάρτυρα (Πίνακας 1.2 και Εικόνα 1.13). Αμφότερα τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στη διαδικασία της «απόκρισης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» (UPR), γεγονός που κέντρισε το ενδιαφέρον μας για τη διασύνδεση του VEGF με αυτή τη λειτουργία του ΕΔ.

**Πίνακας 1.2:** Η θετική και στατιστικά σημαντική ρύθμιση των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF μετά από 3ώρη επαγωγή

Gene Name	Gene Description	Induction at 3hr
<b>HERPUD1/HERP/MIF</b>	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress inducible, ubiquitin like domain member 1	4,7846
<b>DNAJB9/ERDJ4/MDG1</b>	DnaJ(Hsp40)homolog subfamily B, member 9	4,6626



**Εικόνα 1.13:** Γραφική απεικόνιση της θετικής μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών.

### 1.3.1.1 Οι πρωτεΐνες *DNAJB9/ERDJ4* και *HERPUD1*

Η πρωτεΐνη *DNAJB9/ERDJ4/MDG1* (Microvascular Differentiation Gene 1) ανήκει στην οικογένεια των HSP40 (*DnaJ*) πρωτεϊνών, καθώς χαρακτηρίζεται από την παρουσία μιας συντηρημένης περιοχής (J-domain) 70-αμινοξέων. Πρόκειται για μια συ-συνοδό πρωτεΐνη (co-chaperone) που δρα συνεργιστικά με τις Hsp70 (*DnaK*) πρωτεΐνες συνοδούς<sup>166</sup>. Η πρωτεΐνη *DNAJB9* διεγείρει την ενεργότητα ATPase της BiP προκειμένου να σταθεροποιήσει την αλληλεπίδρασή της με τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες-

υπόστρωματα. Με αυτόν τον τρόπο, δρα ανασταλτικά όσον προς τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται μετά από παρατεταμένο στρες του ΕΔ<sup>167-169</sup>. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως βασικό συστατικό διαφόρων κυτταρικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση, στη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στην ανάπτυξη και στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη DNAJB9 εντοπίζεται στον αυλό του ΕΔ και επάγεται από το μονοπάτι της πρωτεΐνης ATF6 κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ. Φαίνεται ότι το γονίδιο του *DNAJB9* παίζει σημαντικό ρόλο και στη διαδικασία της UPR, μιας και αποτελεί ένα από τα γονίδια στόχους της, όπως και στο μηχανισμό αποικοδόμησης ERAD, καθώς αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή με δράση ουβικιτίνης (N-terminal ubiquitin-like domain (ULD))<sup>167,170</sup>.

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η πρωτεΐνη DNAJB9 έχει βρεθεί να επάγεται από το στρες στο ΕΔ και κατά τη διάρκεια της *in vitro* αγγειογένεσης<sup>171</sup>. Τα διαφορετικά επίπεδα της συνοδού πρωτεΐνης DNAJB9 αντικατοπτρίζουν τα διαφορετικά λειτουργικά στάδια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα αυξημένα επίπεδα της DNAJB9 υποδεικνύουν ένα αυξημένο φορτίο πρωτεϊνών στο ΕΔ, το οποίο μπορεί να επιτευχθεί και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες όπως είναι η αγγειακή αναδιάρθρωση και η φλεγμονή, ενώ τα επαγόμενα επίπεδα της πρωτεΐνης DNAJB9 έχει αναφερθεί να βελτιώνουν τα ποσοστά επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων<sup>172</sup>.

Μια ακόμη πρωτεΐνη σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων κατά την UPR απόκριση, είναι η πρωτεΐνη HERPUD1 (Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της διαμεμβρανικής αυτής πρωτεΐνης είναι ότι τόσο η αμινοτελική όσο και η καρβοξυτελική της περιοχή αντικρίζουν την κυτταροπλασματική πλευρά του ΕΔ<sup>173,174</sup>. Η συγκέντρωση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ επάγει ισχυρά, σε μεταγραφικό επίπεδο, το γονίδιο του HERPUD1 μέσω συνεργασίας και των δύο υποκινητών ERSE-I και ERSE-II<sup>175</sup>. Ενδιαφέρον, παρουσιάζει το γεγονός ότι το γονίδιο του HERPUD1 επάγεται και από τους τρεις βραχίονες της UPR<sup>176</sup>. Σε μεταφραστικό επίπεδο, η πρωτεΐνη HERPUD1 επάγεται ισχυρά ως απόκριση στο στρες του ΕΔ, αλλά αποικοδομείται ταχύτατα από το πρωτεάσωμα<sup>174</sup>. Η τοπολογική διευθέτηση της πρωτεΐνης στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου καθιστά αδύνατο αυτή να δρα ως πρωτεΐνη συνοδός στο ΕΔ<sup>175</sup>. Παρόλο που η λειτουργία της πρωτεΐνης HERPUD1 δεν είναι πλήρως κατανοητή,

## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

δεδομένα υποδεικνύουν το ρόλο αυτής στο μηχανισμό αποικοδόμησης μέσω ERAD (ER-Associated Degradation) (βλέπε κεφ. 1.4.3.5)<sup>177</sup>. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί η παρουσία περιοχής με δράση ουβικιτίνης (ULD) στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης, μέσω της οποίας συμμετέχει στο σχηματισμό του πρωτεϊνικού συμπλέγματος με συστατικά του ERAD, όπως η E3 λιγάση HRD1<sup>178</sup>. Με τον τρόπο αυτό, η πρωτεΐνη HERPUD1 δρα ως συνδετικός κρίκος μεταξύ UPR και ERAD καθώς αναστέλλει την απόπτωση και προάγει την επιβίωση των κυττάρων, μειώνοντας αισθητά το πρωτεϊνικό φορτίο<sup>179</sup>. Ακόμη, η πρωτεΐνη HERPUD1 συμβάλλει στην επιβίωση των κυττάρων με ένα μηχανισμό σταθεροποίησης των επιπέδων  $Ca^{+2}$ <sup>180</sup>.

### 1.4 ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ ΚΑΙ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΟΜΟΙΟΣΤΑΣΙΑ

#### 1.4.1 Το ενδοπλασματικό δίκτυο και η φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου

Το *Ενδοπλασματικό Δίκτυο* (ΕΔ) (Endoplasmic Reticulum, ER) εντάσσεται στο ενδομεμβρανικό σύστημα του κυττάρου μαζί με τη συσκευή Golgi και τον πυρηνικό φάκελο. Πρόκειται για ένα σύνολο πεπλατυσμένων μεμβρανικών σάκων και σωληνοειδών διαμορφώσεων που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και συχνά εκτείνονται σε ολόκληρο το κύτταρο. Οι μεμβράνες του ΕΔ αποτελούν το 50% και πλέον των ενδοκυτταρικών μεμβρανών. Συνήθως, συνδέεται λειτουργικά και δομικά με την πλασματική μεμβράνη, τον πυρηνικό φάκελο και τις μεμβράνες άλλων οργανιδίων του κυττάρου. Το ΕΔ διακρίνεται σε *αδρό* και *λείο*. Το αδρό ΕΔ φέρει στην εξωτερική επιφάνεια των μεμβρανών του ριβοσώματα (οργανίδια που αποτελούνται από rRNA και πρωτεΐνες) όπου πραγματοποιείται η πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ είναι υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση και τη γλυκοσυλίωση εκκριτικών, μεμβρανικών και των περισσότερων λυσοσωμικών πρωτεϊνών. Το λείο ΕΔ παρουσιάζει περισσότερο τη μορφή σωληνοειδών διαμορφώσεων. Δεν φέρει ριβοσώματα και είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση των ουδέτερων λιπιδίων, των φωσφολιπιδίων και των στεροειδών ορμονών και το μεταβολισμό των υδατανθράκων.

Το ΕΔ αποτελεί το πρώτο διαμέρισμα ενός καλά οργανωμένου μεμβρανικού δικτύου, το οποίο απαρτίζει το εκκριτικό μονοπάτι του κύτταρου. Το μονοπάτι αυτό είναι υπεύθυνο για τη σύνθεση, την τροποποίηση και τη στοχευμένη μεταφορά των βιολογικά

ενεργών πρωτεϊνών στην κυτταρική μεμβράνη και σε άλλα οργανίδια του κυττάρου, καθώς και την έκκριση τους στον εξωκυτταρικό περιβάλλοντα χώρο (Εικόνα 1.14 c)<sup>181</sup>. Όπως συμβαίνει και με πολλά άλλα βιοχημικά μονοπάτια, η ροή διαμέσου του μονοπατιού έκκρισης ελέγχεται κυρίως κατά τα πρώιμα στάδια του. Η μετάβαση από το ΕΔ στη συσκευή Golgi, το οργανίδιο στο οποίο οι πρωτεΐνες υφίστανται την τελική επεξεργασία, τροποποίηση και πακετάρισμα σε κυστίδια μεταφοράς, αποτελεί ένα περιοριστικό βήμα για την έκκριση πολλών γλυκοπρωτεϊνών, καθώς το ΕΔ αποτελεί θέση εισόδου και ελέγχου για την πλειονότητα των πρωτεϊνών που ακολουθούν το εκκριτικό μονοπάτι.

#### 1.4.2 Η πρωτεϊνική αναδίπλωση και ο ποιοτικός έλεγχος των πρωτεϊνών στο ΕΔ

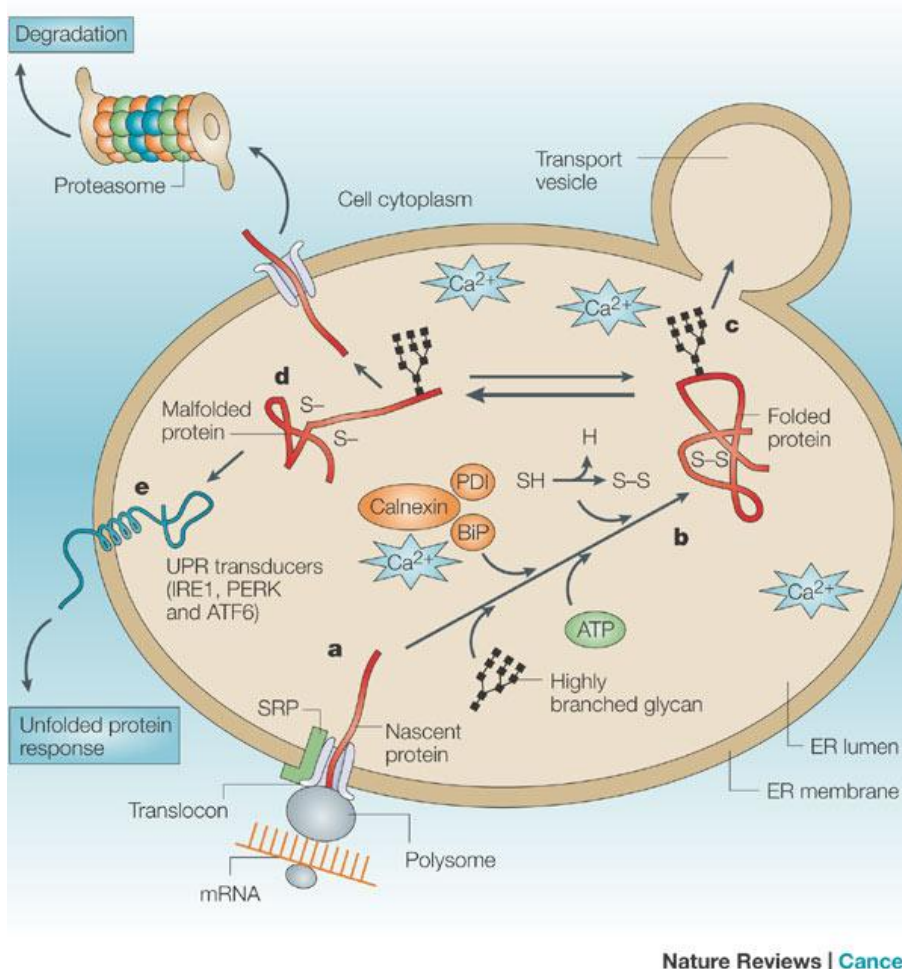
Οι νεοσυντιθέμενες πολυπεπτιδικές αλυσίδες εισέρχονται στο ΕΔ, μέσω ενός καναλιού μεταφοράς (translocon) που αποτελείται από τέσσερις πρωτεΐνες Sec61α,β,γ και Tram<sup>182</sup>. Κατόπιν εισόδου τους στο ΕΔ, αυτές οι «εν τω γεννάσθαι» (nascent) πρωτεΐνες συναντούν το πλούσιο σε ασβέστιο, οξειδωτικό περιβάλλον του αυλού του ΕΔ και συχνά υφίστανται μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις<sup>183</sup>. Στο κυτταρόπλασμα η πρωτεϊνική αναδίπλωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ηλεκτροστατικές δυνάμεις στον πυρήνα των αναδιπλωμένων πρωτεϊνών. Ωστόσο, η αναδίπλωση στο ΕΔ είναι πιο πολύπλοκη εξαιτίας των μετά-μεταφραστικών τροποποιήσεων, όπως είναι ο σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών και η προσθήκη ολιγοσακχαριτών (γλυκοσυλίωση). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η χρονική ρύθμιση της αναδίπλωσης ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης από 50ms<sup>184</sup> μέχρι και αρκετές ώρες<sup>185</sup>. Η ποιότητα αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στο ΕΔ πραγματοποιείται μέσω ενός συστήματος ποιοτικού ελέγχου, το οποίο διασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες εξέρχονται από το ΕΔ σε λειτουργική μορφή. Η ωρίμανση των «εν τω γεννάσθαι» πρωτεϊνών στο ΕΔ ρυθμίζεται από πρωτεΐνες συνοδούς όπως η BiP, η καλνεξίνη (Calnexin) και η καλρετικουλίνη (Calreticulin), καθώς και ένζυμα, όπως η δισουλφιδική ισομεράση PDI (Protein Disulphide Isomerase) και η οξειδοαναγωγή ERp57, που διευκολύνουν τη σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση (Εικόνα 1.14)<sup>186</sup>. Ένα εύρος φυσιολογικών αλλαγών στο περιβάλλον του ΕΔ μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς την ωρίμανση των πρωτεϊνών σε αυτό το οργανίδιο<sup>187</sup>. Η κυτταρική γλυκόζη απαιτείται τόσο για την N-συσχετιζόμενη γλυκοσυλίωση όσο και την παραγωγή

ενέργειας. Η προσθήκη υψηλά φορτισμένων N-συσχετιζόμενων σακχάρων θέτει περιορισμούς στον τρόπο με τον οποίο μπορεί να αναδιπλωθεί μια πρωτεΐνη, κατά συνέπεια εξασφαλίζει ότι αυτή παραμένει σε παραγωγικά μονοπάτια αναδίπλωσης. Το ATP είναι απαραίτητο για την πρόσδεση και απελευθέρωση των συνοδών πρωτεϊνών στις ανώριμες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Επίσης, το ΕΔ περιέχει αποθήκες ασβεστίου, το οποίο απελευθερώνεται ως απόκριση στην ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών, ενώ είναι απαραίτητο και για την ορθή ωρίμανση των πρωτεϊνών του εκκριτικού μονοπατιού.

### **1.4.3 Η απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR)**

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι περισσότερες εκκρινόμενες και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες αναδιπλώνονται και ωριμάζουν στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου. Οι πρωτεΐνες εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο με τη μορφή πολυπεπτιδικών αλυσίδων (Εικόνα 1.14 α). Η ροή των πρωτεϊνών μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ποικίλει εξαιτίας των ραγδαίων αλλαγών που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, των μεταβαλλόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών καθώς και της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου. Προκειμένου να διαχειριστούν αυτή τη δυναμική κατάσταση, τα κύτταρα προσαρμόζουν την ικανότητά τους για πρωτεϊνική αναδίπλωση μέσα στο ενδοπλασματικό δίκτυο ανάλογα με τις ανάγκες τους. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται με υψηλή ακρίβεια η ποιότητα των εκκρινόμενων πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών της επιφάνειας. Τέτοιοι ομοιοστατικοί έλεγχοι επιτυγχάνονται μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος, τα οποία διαθέτουν τόσο αισθητήριους μηχανισμούς στο εσωτερικό του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου όσο και τελεστές, οι οποίοι μεταφέρουν το μήνυμα σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα του κυττάρου. Η πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη τέτοιων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών γεγονότων προήλθε από την παρατήρηση ότι διάφοροι φαρμακευτικοί ή και γενετικοί χειρισμοί, αυξάνουν το φόρτο των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου και ενεργοποιούν, επιλεκτικά, την έκφραση ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες συνοδούς (chaperones) του ΕΔ. Το ενδοκυτταρικό σηματοδοτικό μονοπάτι που διαμεσολαβεί αυτή τη ρύθμιση ορίζεται ως **«απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» (Unfolded Protein Response, UPR)** (Εικόνα 1.15).

Πιο αναλυτικά, η διαταραχή της ισορροπίας στο φορτίο του ενδοπλασματικού δικτύου που προκαλείται από τη συσσώρευση στον αυλό του ΕΔ είτε μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, είτε πρωτεϊνών που εμφανίζουν λανθασμένη διαμόρφωση στο χώρο, χαρακτηρίζεται ως «στρες του ενδοπλασματικού δικτύου» (*ER stress*). Τα ευκαρυωτικά κύτταρα προκειμένου να ανταπεξέλθουν στο στρες της υπερφόρτωσης που προκαλείται στο εσωτερικό του ΕΔ έχουν αναπτύξει τρεις βασικούς μηχανισμούς. Καταρχήν, μειώνουν το πρωτεϊνικό φορτίο που εισέρχεται στο ΕΔ, μια παροδική προσαρμογή που επιτυγχάνεται με τη μείωση τόσο της πρωτεϊνοσύνθεσης, όσο και της μετακίνησης πρωτεϊνών στο ΕΔ<sup>188,189</sup>. Δεύτερον, αυξάνουν την ικανότητα χειρισμού του ΕΔ όσον αφορά τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Η απόκριση αυτή, περιλαμβάνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση ορισμένων γονιδίων που κωδικοποιούν βασικές πρωτεΐνες του ΕΔ (*UPR target genes*), συμπεριλαμβανομένου και εκείνων που λειτουργούν ως μέλη της μηχανής αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στο ΕΡ, όπως οι πρωτεΐνες συνοδοί BiP/GRP78 και GRP94. Αν η ομοιόσταση του κυττάρου δεν αποκατασταθεί, ένας τρίτος μηχανισμός λαμβάνει χώρα, η *ΕΔ-συνδεδεμένη αποικοδόμηση*, γνωστή ως *ERAD (ER-Associated Degradation)*. Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί σε μείωση του στρες, αποκαθιστώντας έτσι την ικανότητα αναδίπλωσης του ΕΔ. Αυτό επιτυγχάνεται οδηγώντας τις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες που εμφανίζουν λανθασμένη διαμόρφωση, από τον αυλό του ΕΔ στο κυτταρόπλασμα για αποικοδόμηση διαμέσου του πρωτεασώματος (στην 26S υπομονάδα του)<sup>190</sup> (Εικόνα 1.14 d και 1.15).



Nature Reviews | Cancer

**Εικόνα 1.14:** Σχηματική απεικόνιση των λειτουργιών του ενδοπλασματικού δικτύου κάτω από συνθήκες ηρεμίας (μη στρεσογόνες συνθήκες).

α) οι μεμβρανικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες του εκκριτικού μονοπατιού μετατοπίζονται στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) όπου υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις.

β) Στο εξαιρετικά φορτωμένο, πλούσιο σε ασβέστιο, οξειδωτικό περιβάλλον του αυλού του ΕΔ, βρίσκονται εγκατεστημένες πρωτεΐνες συνοδοί όπως η BiP, η καλνεξίνη (calnexin) και η δισουλφιδική ισομεράση PDI (Protein Disulphide Isomerase) που διευκολύνουν τη σωστή πρωτεϊνική αναδίπλωση. Το οργανίδιο αυτό είναι επίσης υπεύθυνο για τη βιοσύνθεση και τη γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών, καθώς και το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών.

γ) Μια σωστά αναδιπλωμένη και τροποποιημένη πρωτεΐνη, θα εξέλθει από το ΕΔ μέσω σχηματισμού κυστιδίων μεταφοράς και θα μετακινηθεί κατά μήκος του εκκριτικού μονοπατιού.

δ) Εάν το σύστημα ποιοτικού ελέγχου του ΕΔ εκτιμήσει ότι πρόκειται για πρωτεΐνη με λανθασμένη διαμόρφωση ή μη αναδιπλωμένη πρωτεΐνη, τότε αυτή μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα για αποικοδόμηση από την 26S υπομονάδα του πρωτεασώματος.

ε) Αλλαγές στο περιβάλλον του ΕΔ μετατοπίζουν την ισορροπία από τη φυσιολογική αναδίπλωση στη λανθασμένη αναδίπλωση (πλατύ βέλος) οδηγώντας σε συγκέντρωση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ. Πυροδοτώντας με τον τρόπο αυτό την έναρξη της «απόκρισης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» από τους τρεις μεσολαβητές της, τις πρωτεΐνες IRE1, PERK και ATF6.

SRP, signal-recognition particle<sup>191</sup>.



Τελικά, αν όλες οι παραπάνω προσαρμοστικές αποκρίσεις σταθούν ανεπαρκείς για να «ανακουφίσουν» τα κύτταρα από το στρες του ΕΔ (*ER-stress*), αυτά οδηγούνται σε απόπτωση. Στα θηλαστικά, η απόκριση του στρες του ΕΔ συντονίζει τους μεταγραφικούς αλλά και τους μεταφραστικούς ελέγχους κατά τη διάρκεια της επιβίωσης, της διαφοροποίησης, της φλεγμονής, της ανοσολογικής απόκρισης και της απόπτωσης.

Η απόκριση του ενδοπλασματικού δικτύου στο στρες (UPR, Unfolded Protein Response) διαμεσολαβείται από τρεις διαφορετικούς μεταγωγείς, καθένας από τους οποίους ορίζει έναν διακριτό βραχίονα της UPR. Πρόκειται για τρεις διαμεμβρανικούς υποδοχείς του ΕΔ: την πρωτεΐνη IRE1 (Inositol-Requiring protein-1/ERN1), την πρωτεΐνη ATF6 (Activating Transcription Factor-6) και την πρωτεΐνη PERK (Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase). Σε κάθε περίπτωση, ο υποδοχέας «αισθάνεται» το καθεστώς αναδίπλωσης των πρωτεϊνών που επικρατεί στον αυλό του ΕΔ και μεταβιβάζει την πληροφορία αυτή στο κυτταρόπλασμα με τρεις διαφορετικούς διακριτούς μηχανισμούς.

Ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων που έχουν προκύψει από πρόσφατες εργασίες προτείνουν ότι η απόκριση UPR, η οποία αρχικά θεωρήθηκε ως απόκριση του κυττάρου στο στρες του ΕΔ, είναι κατά βάση ένας κυτταροπροστατευτικός μηχανισμός, υπεύθυνος για τη διατήρηση της βασικής κυτταρικής ομοιοστασίας<sup>192</sup>.

#### **1.4.3.1 Η πρωτεΐνη BiP ως κύριος αρνητικός ρυθμιστής της UPR**

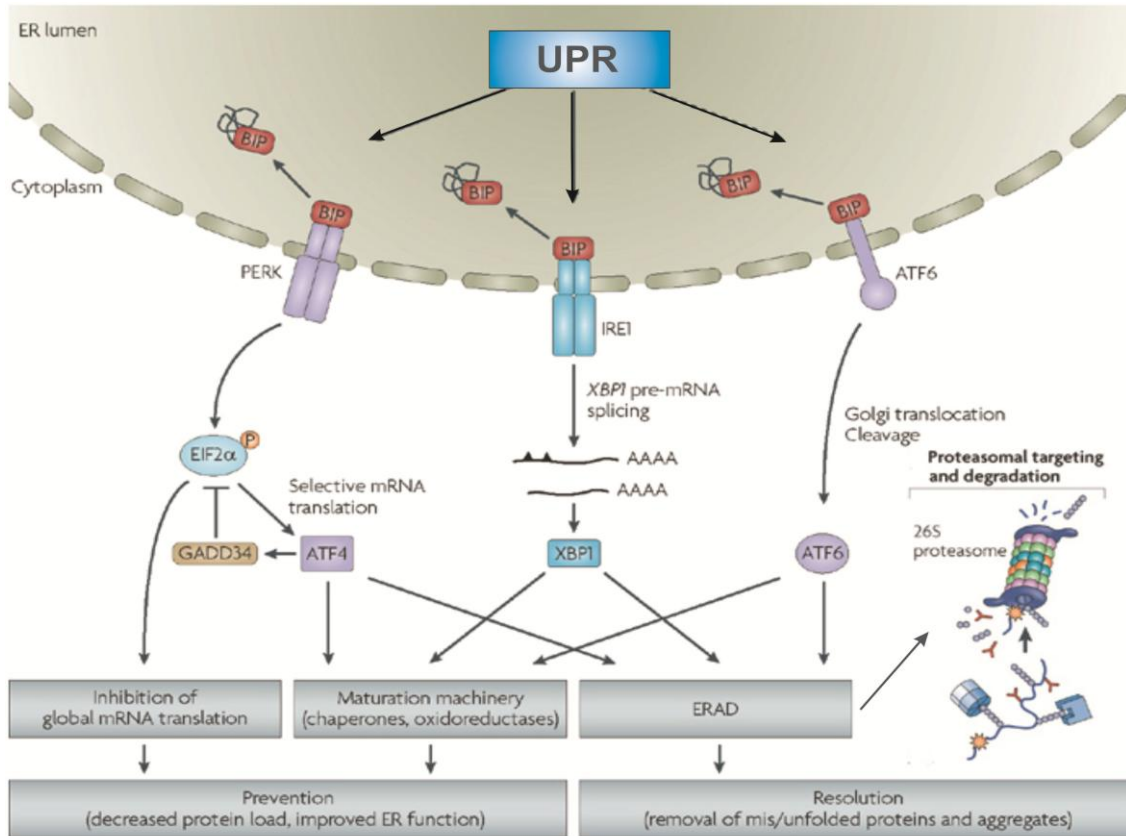
Η ενεργοποίηση και των τριών μεσολαβητών της UPR εξαρτάται από την αποδέσμευση τους από ένα σηματοδοτικό μόριο, την πρωτεΐνη BiP. Η πρωτεΐνη BiP (Binding immunoglobulin protein), επίσης γνωστή και ως GRP-78 (78 kDa glucose-regulated protein) ή πρωτεΐνη θερμικού σοκ HSPA5 (heat shock 70 kDa protein 5, HSP70) είναι μια μοριακή πρωτεΐνη συνοδός η οποία προσδένει  $Ca^{2+}$  (Εικόνα 1.14). Αποτελείται από μια αμινοτελική περιοχή με ενεργότητα ΑΤΡάσης και μια καρβοξυτελική περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος. Στην ADP μορφή, η πρωτεΐνη BiP χαρακτηρίζεται από υψηλή συγγένεια σύνδεσης για τα πρωτεϊνικά υποστρώματα. Κατόπιν πρόσδεσης τους στην πρωτεΐνη BiP, αυτά «κλειδώνουν» τη διαμόρφωσή τους και διεγείρουν την ενεργότητα ΑΤΡάσης της πρωτεΐνης<sup>193,194</sup>. Η επακόλουθη εναλλαγή από ADP σε ATP, οδηγεί σε απελευθέρωση του υποστρώματος από την BiP προκειμένου να ακολουθήσει στη συνέχεια το μονοπάτι της αναδίπλωσης. Η πρόσδεση της BiP στις μη αναδιπλωμένες

πρωτεΐνες, φαίνεται ότι δεν διευκολύνει αλλά μάλλον διατηρεί τις πρωτεΐνες σε ικανοποιητικό επίπεδο αναδίπλωσης<sup>195</sup>.

Σε κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, η πρωτεΐνη BiP είναι δεσμευμένη σε περιοχές των τριών υποδοχέων IRE1, ATF6 και PERK εσωτερικά του αυλού του ΕΔ. Η πρόσδεση αυτή διατηρεί τους τρεις υποδοχείς σε ανενεργή κατάσταση<sup>196-198</sup>. Όταν ένας αυξανόμενος αριθμός μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών συγκεντρωθούν στον αυλό του ΕΔ, τότε η BiP αποδεσμεύεται από τους τρεις παραπάνω «αισθητήρες» της UPR προκειμένου να βοηθήσει στην πρωτεϊνική αναδίπλωση. Επακόλουθο της αποδέσμευσης της BiP από τους τρεις διαμεσολαβητές της UPR, είναι η ενεργοποίησή τους και η έναρξη των καθοδικών τους μονοπατιών όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Οι δύο βραχίονες των PERK και ATF6 πρωτεϊνών, πιστεύεται ότι ενεργοποιούνται προγενεστέρα του βραχίονα της IRE1 πρωτεΐνης<sup>199</sup>. Αυτή η ιεράρχηση της έναρξης των μονοπατιών, βρίσκεται σε συμφωνία με τα σήματα που μετάγει ο κάθε βραχίονας. Τα δύο πρώτα μονοπάτια προάγουν ευρέως την προσαρμογή του ΕΔ στην κατάσταση των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που επικρατεί στον αυλό του, ενώ το μονοπάτι της IRE1 πρωτεΐνης εμφανίζει διττό ρόλο στην μεταγωγή τόσο σημάτων επιβίωσης όσο και προ-αποπτωτικών σημάτων<sup>186</sup>.

Συνεπώς η πρωτεΐνη BiP διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σηματοδότηση διαμέσου της UPR, καθώς συμβάλλει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ΕΔ και κατ' επέκταση στην καταστολή της απόπτωσης των κυττάρων. Πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη BiP, η οποία αποτελεί και η ίδια γονίδιο στόχο της UPR, επάγεται ευρέως και σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις όπως στην αγγειογένεση των όγκων<sup>200</sup>. Μάλιστα, ακόμα πιο πρόσφατα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι αυτή σχετίζεται με την VEGF-επαγόμενη αγγειογένεση<sup>201</sup>.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η πρωτεΐνη BiP λειτουργεί ως ο κύριος αρνητικός ρυθμιστής της UPR, παρέχοντας μια ενιαία υπόθεση που αιτιολογεί την αυθόρμητη ενεργοποίηση και των τριών υποδοχέων IRE1, ATF6 και PERK, μετά από συνθήκες στρες του ΕΔ (ER-stress).



Nature Reviews | Cancer

**Εικόνα 1.15:** Μηχανισμοί κυτταρικής επιβίωσης ως αποτέλεσμα απόκρισης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες στο ΕΔ (*Unfolded Protein Response, UPR*). Η συγκέντρωση ενός αυξανόμενου αριθμού μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ οδηγεί στην αποδέσμευση της συνοδοί πρωτεΐνης BiP, από τις τρεις πρωτεΐνες «αισθητήρες» της UPR, IRE1, ATF6 και PERK. Η αποδέσμευση πυροδοτεί την ενεργοποίησή των τριών πρωτεϊνών και την έναρξη των καθοδικών τους μονοπατιών. Η σηματοδότηση για επιβίωση ρυθμίζεται μέσω τριών κύριων μηχανισμών: 1) Τη μείωση τόσο της πρωτεϊνοσύνθεσης όσο και της μετακίνησης πρωτεϊνών στο ΕΔ, διαμέσου του PERK-eIF2α μονοπατιού 2) Τη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων της UPR, μέσω και των τριών μονοπατιών και 3) Την ΕΔ-συνδεδεμένη αποικοδόμηση, γνωστή ως ERAD (*ER-Associated Degradation*) μέσω και των τριών μονοπατιών, προκειμένου να αποκατασταθεί η ικανότητα αναδίπλωσης του ΕΔ<sup>202</sup>.

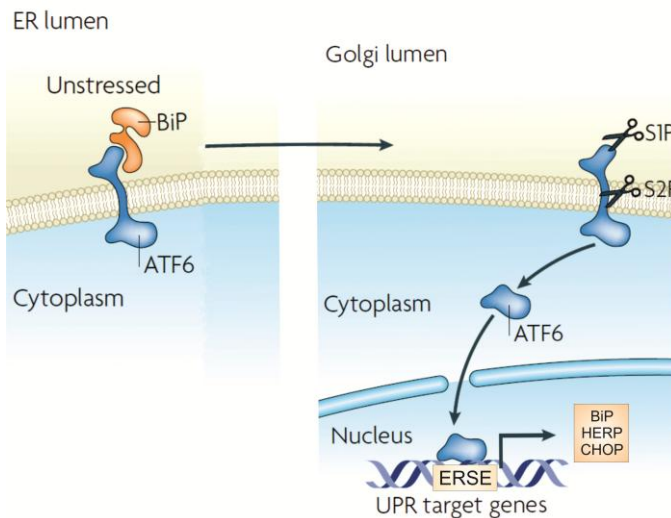
### **1.4.3.2 Μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων στόχων της UPR μέσω της πρωτεΐνης**

#### **ATF6**

Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο εσωτερικό του ΕΔ είναι μια διαδικασία αυστηρά ελεγχόμενη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη βοήθεια μιας ποικιλίας μορίων που εδράζονται στον αυλό του ΕΔ, όπως πρωτεΐνες συνοδοί BiP και GRP94<sup>189</sup>, διάφορα ένζυμα, όπως η PDI (*Protein Disulfide Isomerase*), καθώς και πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αποικοδόμηση μέσω ERAD<sup>202</sup>. Οι παραπάνω πρωτεΐνες επάγονται σε μεταγραφικό

επίπεδο από την απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, UPR (Unfolded Protein Response). Όπως προαναφέρθηκε, το έναυσμα για τη σηματοδότηση μέσω UPR δίνεται μέσω των τριών διαμεμβρανικών υποδοχέων του ΕΔ της IRE1, της ATF6 και της PERK<sup>203</sup>. Η πρωτεΐνη ATF6 αποτελεί βασικό μεταγραφικό διαμεσολαβητή της UPR, που επιτρέπει στα κύτταρα των θηλαστικών να διατηρήσουν την κυτταρική ομοιόσταση όταν αυτά υπόκεινται σε μια σειρά από περιβαλλοντικά αλλά και φυσιολογικά στρες που έχουν ως τελικό αποδέκτη το ΕΔ.

Στα θηλαστικά απαντώνται δύο ομόλογα της ATF6 πρωτεΐνης: η ATF6α (90kDa) και η ATF6β (110kDa, επίσης γνωστή και ως CREB-RP)<sup>204</sup>. Μολονότι, η πρωτεΐνη ATF6α συμμετέχει στην επαγωγή πολλών γονιδίων στόχων της UPR, η πρωτεΐνη ATF6β φαίνεται να μην διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την UPR απόκριση<sup>169,205</sup>. Η ATF6 είναι διαμεμβρανική τύπου II πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από μια αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή, καθώς και μια καρβοξυτελική περιοχή που εκτίθεται προς τον αυλό του ΕΔ. Η πρωτεΐνη ATF6 έχει μικρό χρόνο ημιζωής (short-lived), αφού κατόπιν ενεργοποίησης από το μηχανισμό της UPR, αυτή μετακινείται στη συσκευή Golgi όπου και υφίσταται μη αντιστρεπτή πρωτεολυτική επεξεργασία. Η παραπάνω διαδικασία επιτελείται με τη βοήθεια δυο πρωτεασών της συσκευής Golgi, της S1P (Site-1 Protease) και της S2P (Site-2 metalloprotease)<sup>206</sup> και έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή και απελευθέρωση της 50kDa κυτταροπλασματικής περιοχής της ATF6 (p50ATF6) (Εικόνα 1.16). Στη συνέχεια η περιοχή αυτή, η οποία περιέχει ένα bZIP μεταγραφικό παράγοντα, μετακινείται στον πυρήνα όπου και προσδένεται στα ERSE-I, ERSE-II (*cis*-acting ER Stress Response Element)<sup>175</sup>. Η πρόσδεση της p50ATF6 απαιτεί την παρουσία του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF- $\gamma$  (Nuclear Factor- $\gamma$ )<sup>207,208</sup> και οδηγεί στην επαγωγή των γονιδίων στόχων της UPR, όπως για παράδειγμα τα γονίδια των πρωτεϊνών BiP, XBP1, CHOP/GADD153 και HERPUD1<sup>175,206,209</sup>. Η επαγόμενη από την πρωτεΐνη ATF6 έκφραση γονιδίων στόχων της UPR είναι ένας μηχανισμός κυρίως κυτταροπροστατευτικός, ενώ η σηματοδότηση μέσω αυτού του μονοπατιού φαίνεται να είναι υπεύθυνη για επιπρόσθετες λειτουργίες του κυττάρου, όπως η διαφοροποίηση. Έχει δειχτεί ότι, σε knockout ποντικούς η απουσία και των δυο ισομορφών ATF6α/β οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα<sup>210,211</sup> (Πίνακας 1.3).



**Εικόνα 1.16: Η σηματοδότηση από τον μεταγραφικό παράγοντα ATF6.** Η ATF6 (Activating transcription factor-6) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από μια αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή καθώς και μια καρβοξυτελική περιοχή που εκτίθεται προς τον αυλό του ΕΔ. Σε εφesusχασμένα κύτταρα η μετακίνηση της πρωτεΐνης ATF6, παρεμποδίζεται από την πρόσδεση της στην πρωτεΐνη συνοδό BiP. Κατόπιν ενεργοποίησης της UPR, η καρβοξυτελική περιοχή της ATF6 που βρίσκεται προς το κυτταρόπλασμα μετακινείται στη συσκευή Golgi, όπου υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία.

Η παραπάνω διαδικασία επιτελείται με τη βοήθεια δυο πρωτεϊνών της συσκευής Golgi, την S1P (Site-1 Protease) και την S2P (Site-2 metalloprotease)<sup>206</sup> και έχει ως αποτέλεσμα την αποκοπή της κυτταροπλασματικής περιοχής των 50kDa της ATF6 (p50ATF6). Η p50ATF6 αποτελεί και την ενεργή μορφή της ATF6, που στη συνέχεια μετακινείται στον πυρήνα επάγοντας κύτταρα στόχους της UPR<sup>212</sup>.

#### **1.4.3.3 Η πρωτεΐνη IRE1: Ο συντηρημένος πυρήνας της UPR**

Το μονοπάτι που διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη IRE1 αποτελεί το παλαιότερο και το πιο συντηρημένο μονοπάτι μεταγωγής σήματος από το ΕΔ. Πρόκειται για ένα μονοπάτι, που σε αντίθεση με τα άλλα δύο, είναι παρόν σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και διακρίνεται από μοναδικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα όσον αφορά τη μεταγωγή σήματος μετά από απόκριση στο στρες του ΕΔ<sup>177</sup>.

Η IRE1 είναι μια τυπική τύπου I διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ΕΔ με διπλή ενεργότητα, κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης (RNase), στην κυτταροπλασματική της περιοχή<sup>213,214</sup>. Υπάρχουν δύο ισομορφές της πρωτεΐνης IRE1, η IRE1α που εκφράζεται ευρέως και η IRE1β που εκφράζεται μόνο στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου<sup>215</sup>. Η αποδέσμευση της πρωτεΐνης BiP από την αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης IRE1, εσωτερικά του αυλού του ΕΔ, οδηγεί στην άμεση ενεργοποίησή της IRE1. Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει αρχικά το διμερισμό της πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί και τη δραστηριότητα RNάσης με αυτοφωσφορυλίωση<sup>216,217</sup>. Υπάρχουν ενδείξεις, ότι η πρωτεΐνη IRE1 μπορεί να «αισθάνεται» το καθεστώς αναδίπλωσης και με ένα μηχανισμό ανεξάρτητο από την πρωτεΐνη BiP<sup>197</sup>. Το μόνο γνωστό υπόστρωμα για την ενεργότητα κινάσης της IRE1 είναι ο εαυτός της<sup>216</sup>. Με ένα μηχανισμό που δεν είναι

πλήρως κατανοητός ύστερα από την *trans*-αυτοφωσφορυλίωση της, η IRE1 λειτουργεί ως ενδοριβονουκλεάση έχοντας ως μοναδικό υπόστρωμα το mRNA του bZIP (basic leucine-zipper-containing) μεταγραφικού παράγοντα HAC1 (ομόλογο του ATF/CREB1) στη ζύμη ή του XBP1 (X-box binding protein 1) στα θηλαστικά<sup>208,218</sup> (Εικόνα 1.17).

Συνοπτικά, ο μηχανισμός ματίσματος του mRNA του XBP1 μπορεί να προσομοιαστεί με εκείνον του pre-tRNA ματίσματος<sup>219</sup>. Κατά τη διαδικασία του ματίσματος η πρωτεΐνη IRE1, αφαιρεί από το mRNA του μεταγραφικού παράγοντα XBP1u (unspliced) ένα ιντρόνιο 26-νουκλεοτιδικών βάσεων δημιουργώντας ένα ανοιχτό μεταγραφικό πλαίσιο ανάγνωσης<sup>218,220,221</sup>. Η μορφή του XBP1s (spliced), που προκύπτει κατόπιν εναλλακτικού ματίσματος από την πρωτεΐνη IRE1, προσδένεται απευθείας στους υποκινητές με αλληλουχίες UPRE (Unfolded Protein Response Element) και ERSE (*cis*-acting ER Stress Response Element) επάγοντας ορισμένα γονίδια στόχους της UPR. Συγκεκριμένα, η ενεργή μορφή του XBP1s επάγει ισχυρά έναν αριθμό UPR γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένου και των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες συνοδούς του ΕΔ οι οποίες λαμβάνουν μέρος στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, πρωτεΐνες συστατικά του μηχανισμού του ERAD<sup>222</sup>, πρωτεΐνες για τη βιοσύνθεση<sup>223</sup>, καθώς και το γονίδιο P85<sup>IPK</sup>/DNAJB1 μέλος της οικογένειας των HSP40 πρωτεϊνών<sup>169</sup>. Αν και ο πλήρης προσδιορισμός των γονιδίων που ενεργοποιούνται ως απόκριση στο μάτισμα του XBP1 δεν έχει διευκρινιστεί, μια από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες που συμπεριλαμβάνεται στις πρωτεΐνες συστατικά του μηχανισμού του ERAD είναι η πρωτεΐνη EDEM (ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein). Πρόκειται για μια διαμεμβρανική τύπου II πρωτεΐνη του ΕΔ, που προσδένεται στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αποικοδόμησή τους<sup>223,224</sup>. Κατά συνέπεια, ο IRE1/XBP1 βραχίονας εμπλέκεται όχι μόνο στην επαγωγή γονιδίων, όπως οι πρωτεΐνες συνοδοί του ΕΔ που θα βοηθήσουν στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών αλλά και στον έλεγχο της αποικοδόμησής τους μέσω ERAD.

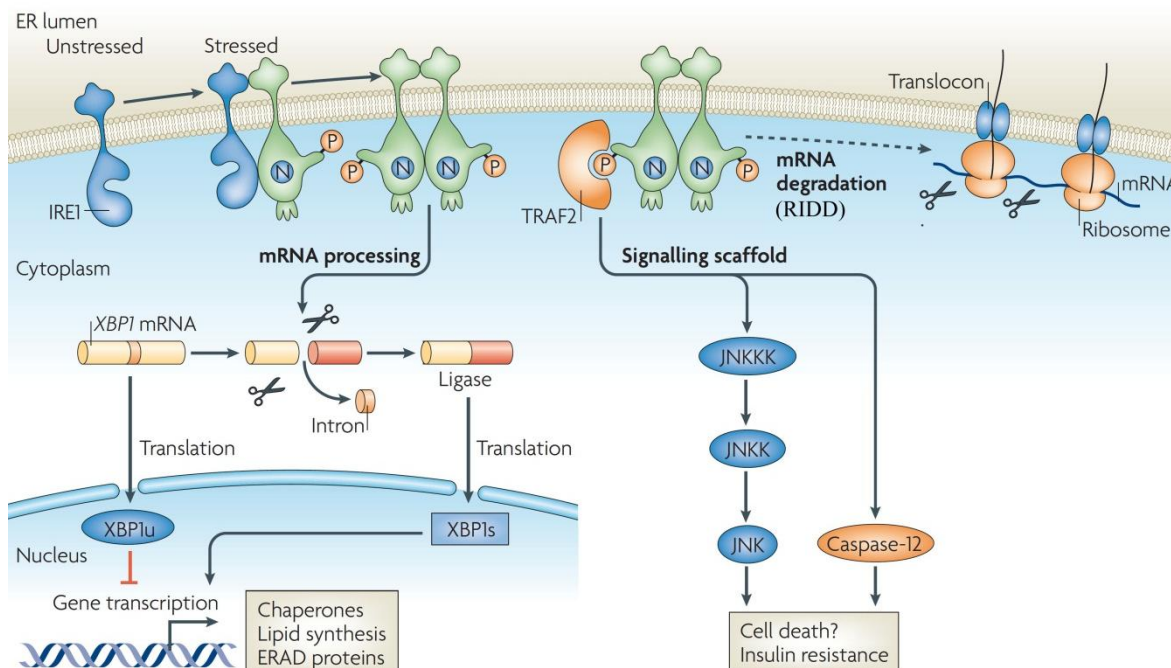
Επιπρόσθετα, το μονοπάτι της πρωτεΐνης IRE1 είναι υπεύθυνο για την αποικοδόμηση συγκεκριμένων mRNA που εντοπίζονται στο ΕΔ, μια διαδικασία που γνωστή ως IRE1-εξαρτώμενη αποσύνθεση (IRE1-Dependent Decay, RIDD)<sup>225-227</sup>. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε μείωση του πρωτεϊνικού φορτίου στον αυλό του υπό κατάσταση στρες ΕΔ και πιθανόν να υποβοηθά το μηχανισμό της ΕΔ-συνδεδεμένης

αποικοδόμησης, ERAD. Συνεπώς, η διέγερση τόσο της αποικοδόμησης συγκεκριμένων mRNA του ΕΔ, όσο και της πρωτεϊνικής αποικοδόμησης αποτελεί το τρίτο βήμα της UPR ακολουθώντας τη μεταφραστική αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και την ταυτόχρονη αυξημένη σύνθεση πρωτεϊνών του ΕΔ.

Σε συνθήκες παρατεταμένου στρες στο ΕΔ, η κυτταροπλασματική περιοχή της ενεργής πρωτεΐνης IRE1 αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη προσαρμοστή (adaptor protein) TRAF2 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor-2). Το σύμπλεγμα IRE1-TRAF2 που δημιουργείται κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ, αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ASK1 (Apoptosis-Signal-Regulating Kinase), η οποία είναι μια MAPKKK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase) και οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των καθοδικών MAPKs, JNK (cJUN NH<sub>2</sub>-terminal kinase) και p38<sup>228</sup>. Παράλληλα, η πρωτεΐνη IRE1 ρυθμίζει την ενεργοποίηση των μονοπατιών και άλλων κινασών, όπως οι ERKs (Extracellular Signal Regulated Kinases) καθώς και του παράγοντα NF-κB (Nuclear Factor κB<sup>229</sup>). Η ενεργοποίηση της κινάσης JNK, αποτελεί μια συνηθισμένη απόκριση σε πολλές μορφές στρες και είναι γνωστό ότι επηρεάζει το μηχανισμό κυτταρικού θανάτου, μέσω ρύθμισης καθοδικών στόχων όπως η οικογένεια των BCL2 πρωτεϊνών<sup>230</sup>. Τέλος μια άλλη πρωτεΐνη, η JAB1 (Jun Activation Domain-Binding Protein 1), προσδένεται στην IRE1 όταν στο κύτταρο επικρατούν συνθήκες στρες. Εάν το στρες είναι ήπιο, η αλληλεπίδραση αυτή ενισχύεται, ενώ όταν το στρες επιμένει τότε αυτή σχεδόν εξαλείφεται.

Φαίνεται λοιπόν, ότι η πρωτεΐνη IRE1 έχει τόσο προ-επιβιωτικό (pro-survival) όσο και προ-αποπτωτικό (pro-apoptotic) ρόλο κατά το μηχανισμό του στρες του ΕΔ. Απαλοιφή του γονιδίου της IRE1 σε ποντίκια προκαλεί εμβρυική θνησιμότητα κατά την 10.5 εμβρυική μέρα<sup>215,231</sup>. Σε συμφωνία με την αντίληψη ότι ο παράγοντας XBP1 ενεργοποιείται από την πρωτεΐνη IRE1 είναι το γεγονός ότι η απαλοιφή του οδηγεί επίσης σε εμβρυική θνησιμότητα<sup>232</sup> (Πίνακας 1.3).





**Εικόνα 1.17: Σηματοδότηση από την πρωτεΐνη IRE1.** Η πρωτεΐνη IRE1 ολιγομερίζεται στο επίπεδο της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου και αυτοφωσφορυλιώνεται όταν τα κύτταρα βρεθούν σε κατάσταση στρες του ΕΔ. Η τρανς-αυτόφωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής πλευράς της IRE1, αυξάνει τη συγγένεια για νουκλεοτίδια (N), τα οποία ενεργοποιούν την IRE1, ξεδιπλώνοντας την ενεργότητα ενδοριβονουκλεάσης. Στα ανώτερα ευκαρυωτικά, η πρωτεΐνη IRE1 αφαιρεί από το mRNA του μεταγραφικού παράγοντα XBP1 (X-box binding protein 1) ένα μικρό ιντρόνιο 26-νουκλεοτιδικών βάσεων δημιουργώντας ένα ανοιχτό μεταγραφικό πλαίσιο ανάγνωσης. Το επεξεργασμένο mRNA του XBP1 κωδικοποιεί έναν ισχυρό μεταγραφικό ενεργοποιητή (XBP1s), ενώ το XBP1 mRNA που δεν έχει υποστεί επεξεργασία κωδικοποιεί έναν αναστολέα της UPR (XBP1u). Η ενεργή μορφή του XBP1 επάγει ισχυρά έναν αριθμό UPR γονιδίων στόχων<sup>212</sup> τα οποία εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αναδίπλωση, στο μηχανισμό του ERAD, στον ποιοτικό έλεγχο των πρωτεϊνών και τη βιοσύνθεση<sup>223</sup>. Το μονοπάτι της πρωτεΐνης IRE1 μπορεί να δράσει και εναλλακτικά, προάγοντας την αποικοδόμηση συγκεκριμένων mRNA που εντοπίζονται στο ΕΔ, μια διαδικασία που ονομάζεται IRE1-εξαρτώμενη αποσύνθεση (IRE1-Dependent Decay, RIDD)<sup>225-227</sup>. Η διαδικασία αυτή μειώνει το πρωτεϊνικό φορτίο στο υπό κατάσταση στρες ΕΔ και πιθανόν να υποβοηθά το μηχανισμό της ΕΔ-συνδεδεμένης αποικοδόμησης, ERAD. Σε συνθήκες παρατεταμένου στρες στο ΕΔ, η προσέλευση του παράγοντα TRAF2 (Tumour Necrosis Factor Receptor (TNFR)-Associated Factor-2) από τη φωσφορυλιωμένη IRE1 οδηγεί σε ενεργοποίηση του καταρράκτη σηματοδότησης της JNK κινάσης (Jun N-terminal kinase) και μεταβάλλει την ενδοκυτταρική σηματοδότηση. Το σύμπλοκο των πρωτεϊνών IRE1-TRAF2 αλληλεπιδρά με συστατικά του μηχανισμού απόπτωσης όπως η κασπάση 12 (caspase-12) και οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση<sup>233</sup>. JNKK, JNK kinase, JNKKK, JNKK kinase.

**1.4.3.4 Το μονοπάτι της πρωτεΐνης PERK και ο μεταφραστικός έλεγχος της UPR**

Η πρωτεΐνη PERK, όπως και η πρωτεΐνη IRE1, είναι μια διαμεμβρανική τύπου I πρωτεΐνη που εδράζεται στη μεμβράνη του ΕΔ. Οι δύο πρωτεΐνες αποτελούνται από μια κοινή περιοχή εσωτερικά προς τον αυλό του ΕΔ και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Η κοινή



αυτή περιοχή, χαρακτηρίζεται από μεγάλη φυλογενετική συγγένεια, παρόμοια δομή αλλά και λειτουργία μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Παρά τη δομική ομοιότητα των δύο πρωτεϊνών, αυτές εμφανίζουν μεγάλες διαφορές όσον αφορά τη σηματοδότηση τους, καθώς και τη διάρκεια του σήματος<sup>234</sup>.

Σε αντίθεση με την πρωτεΐνη IRE1, η οποία έχει ως μοναδικό υπόστρωμα τον εαυτό της η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PERK, ως αποτέλεσμα απελευθέρωσης της πρωτεΐνης BiP, ακολουθείται από διμερισμό και *trans*-αυτοφωσφορυλίωση της PERK καθώς και επακόλουθη φωσφορυλίωση της  $\alpha$  υπομονάδας του μεταφραστικού παράγοντα eIF2 $\alpha$  (eukaryotic translation initiation factor-2) στη σερίνη 51 (Ser51)<sup>196</sup>. Η φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2 $\alpha$  αναστέλλει τη συγκρότηση του 80S ριβοσώματος και επομένως, τη σύνθεση των πρωτεϊνών<sup>188</sup> (Εικόνα 1.18). Σε *PERK*<sup>-/-</sup> κύτταρα, η φωσφορυλίωση του eIF2 $\alpha$  και η εξασθένηση της μεταφραστικής λειτουργίας, ως αποτέλεσμα απόκρισης στο στρες του ΕΔ αναστέλλεται πλήρως, με συνέπεια να χάνουν την ικανότητα τους για επιβίωση<sup>235</sup>. Επιπλέον, εμβρυϊκοί ινοβλάστες ποντικού (mouse embryonic fibroblasts (MEFs)) που παρουσιάζουν μια ομόζυγη μετάλλαξη στη σερίνη 51 του eIF2 $\alpha$  (*eIF2\_S51A/S51A*) βρέθηκαν να είναι ευαίσθητοι στην επαγόμενη από το στρες του ΕΔ απόπτωση<sup>236</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση του eIF2 $\alpha$  από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη PERK είναι απαραίτητη για την πρόληψη της απόπτωσης που προκαλείται από το στρες του ΕΔ.

Ωστόσο, η επιβίωση των κυττάρων διαμέσου του μονοπατιού της πρωτεΐνης PERK είναι αποτέλεσμα, όχι μόνο της εξασθένησης της μεταφραστικής λειτουργίας του κυττάρου αλλά και της επαγωγής ενός αριθμού γονιδίων στόχων της UPR<sup>236</sup>. Ο πιο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη PERK επάγει τα γονίδια της UPR, φαίνεται να είναι μέσω μεταγραφικής ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα ATF4<sup>235-237</sup>. Η επιλεκτική ενεργοποίηση του mRNA του ATF4, οδηγεί τελικά στην επαγωγή της έκφρασης ορισμένων γονιδίων ικανών να αποκαταστήσουν την ομοιόσταση στο ΕΔ, ενώ παράλληλα ενεργοποιείται μετα-μεταγραφικά και ο πυρηνικός παράγοντας NF $\kappa$ B<sup>238</sup>. Ο παράγοντας ATF4 ενεργοποιεί γονίδια που κωδικοποιούν μεταφορείς αμινοξέων και γονίδια για αντιοξειδωτική προστασία, ενώ παράλληλα συνεισφέρει στη μεταγραφική ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων XBP1<sup>235</sup> και CHOP (C/EBP homologous protein). Στα γονίδια στόχους του παράγοντα ATF4 περιλαμβάνεται και η πρωτεΐνη

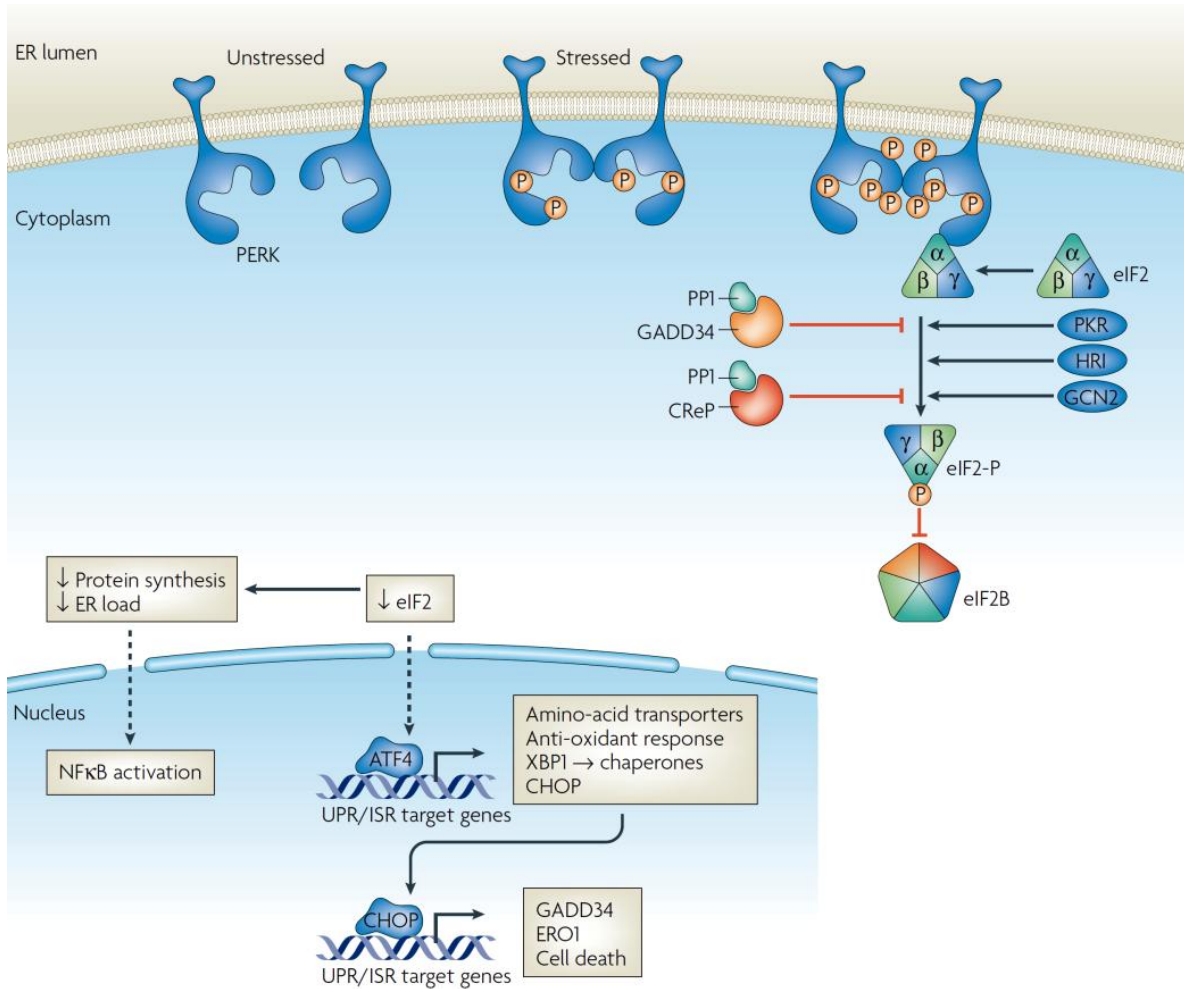
## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34), η ρυθμιστική υπομονάδα PP1 της οποίας αποφωσφορυλιώνει τον eIF2α αποκαθιστώντας την πρωτεϊνοσύνθεση. Γονίδιο στόχο του ATF4 αποτελεί και η οξειδάση του ΕΔ, ERO1 (ER oxidase-1), η οποία είναι απαραίτητη για το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού κατά την πρωτεϊνική αναδίπλωση. Ακόμη, η φωσφατάση CReP (αναστολέας της φωσφορυλίωσης του eIF2α) ενεργεί βοηθητικά στη δράση της πρωτεΐνης GADD34<sup>212,239</sup> (Εικόνα 1.18).

Είναι γνωστό ότι και αρκετά άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια μη συσχετιζόμενα με το στρες του ΕΔ, καθένα από τα οποία ενεργοποιείται από διαφορετικά ερεθίσματα<sup>240</sup>, όπως από στέρηση αμινοξέων μέσω κινάσης GCN2 (General Control Nonrepressed-2), μέσω του αναστολέα της αίμης HRI (haem-regulated inhibitor) καθώς και μέσω της κινάσης PKR, επίσης συγκλίνουν στην ενεργοποίηση του παράγοντα eIF2α, μέσω φωσφορυλίωσης και ενεργοποίηση ενός κοινού αριθμού γονιδίων στόχων (ενιαία απόκριση στο στρες, Integrated Stress Response (ISR))<sup>212,241</sup> (Εικόνα 1.18).

Το μονοπάτι PERK/p-eIF2a αποτελεί σημαντικό παράγοντα του διακόπτη από προ-επιβιωτική σε προ-αποπτωτική σηματοδότηση κατά τη διάρκεια χρόνιου ή παρατεταμένου στρες. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης PERK λαμβάνει χώρα και κάτω από ήπιες μορφές στρες που δημιουργούνται κατά την ανάπτυξη των όγκων. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν αναπτύξει μεταφραστικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς για την προσαρμογή στο στρες, προκειμένου να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν<sup>191</sup>. Ωστόσο, η προσαρμογή αυτή είναι ανεπαρκής σε περιπτώσεις παρατεταμένου στρες<sup>199,212</sup> και οδηγεί το κύτταρο σε προ-αποπτωτικό πρόγραμμα το οποίο περιλαμβάνει όχι μόνο την παρατεταμένη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PERK αλλά και την απενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt<sup>242,229,243</sup>.



**Εικόνα 1.18:** Σηματοδότηση από την πρωτεΐνη PERK στη μεταφραστική μηχανή του κυττάρου. Ως απόκριση στο στρες του ΕΔ, η πρωτεΐνη PERK (Protein Kinase RNA (PKR)-like ER kinase), όμοια με την πρωτεΐνη IRE1, ολιγομερίζεται στο επίπεδο της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου και ενεργοποιείται από την *trans*-αυτόφωσφορυλίωση της θηλιάς ενεργοποίησης της. Περαιτέρω εκτενής φωσφορυλίωση διευκολύνει την πρόσδεση υπόστρωματων. Η φωσφορυλίωση ενός μόνο γνωστού υποστρώματος, της α υπομονάδας του μεταφραστικού παράγοντα eIF2α (eukaryotic translation initiation factor-2) στη σερίνη 51 (Ser51), παρεμποδίζει την ανακύκλωση του πενταμερούς συμπλέγματος του παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων (guanine nucleotide exchange factor, GEF) eIF2B, από την ανενεργή στην ενεργή GTP μορφή του. Είναι γνωστό ότι και αρκετά άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια άσχετα με το στρες του ΕΔ (PKR, HRI, GCN2) μπορούν να ενεργοποιήσουν αυτό το μονοπάτι ανεξάρτητα από την UPR απόκριση. Η επακόλουθη μειωμένη πρωτεϊνική σύνθεση, μειώνει το φόρτο των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ, ενώ παράλληλα επάγει και τη μεταγραφή των UPR γονιδίων στόχων μέσω επιλεκτικής ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα ATF4 (activating transcription factor-4). Παράλληλα ενεργοποιείται μετα-μεταγραφικά και ο πυρηνικός παράγοντας NFκB. Στα γονίδια στόχους του παράγοντα ATF4, περιλαμβάνεται και η πρωτεΐνη GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein-34), η ρυθμιστική υπομονάδα PP1 της οποίας αποφωσφορυλιώνει τον eIF2α αποκαθιστώντας την πρωτεϊνοσύνθεση<sup>212</sup>.

### **1.4.3.5 Ο μηχανισμός της ΕΔ-συνδεδεμένης αποικοδόμησης, ERAD**

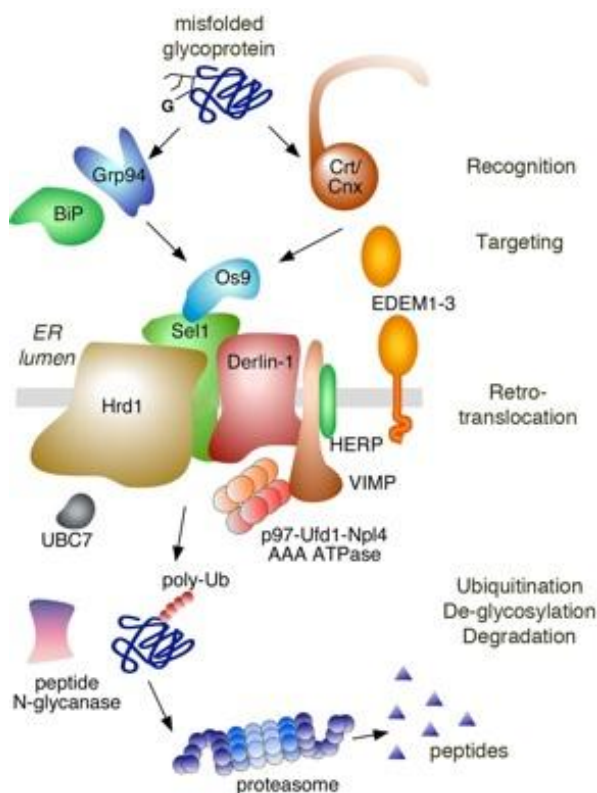
Ο μηχανισμός της ΕΔ-συνδεδεμένης αποικοδόμησης, ERAD (ER-Associated Degradation) είναι μια διαδικασία κατά την οποία οι μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες αναγνωρίζονται και αποκλείονται από το εκκριτικό μονοπάτι, ενώ παράλληλα, με τη βοήθεια ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που αποτελούν ένα κανάλι μεταφοράς (translocon,) μετακινούνται πίσω στο κυτταρόπλασμα. Εκεί, υποβάλλονται σε πρωτεασωματική αποικοδόμηση, που εξαρτάται από την τροποποίηση με την πρωτεΐνη ουβικιτίνη (proteasome- and ubiquitin- dependent)<sup>244</sup>.

Ο μεγάλος αριθμός των συστατικών που απαιτούνται για τον μηχανισμό του ERAD έχει αναγνωριστεί διαμέσου γενετικών αλλά και βιοχημικών προσεγγίσεων<sup>245</sup>. Η αναγνώριση των πρωτεϊνών με λανθασμένη διαμόρφωση και μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών βασίζεται, κατά κύριο λόγο στον εντοπισμό δομών εντός των πρωτεϊνών, όπως είναι εκτεθειμένες υδροφοβικές περιοχές και περιοχές με αταίριαστα κυστεϊνικά κατάλοιπα και ανώριμες γλυκάνες.

Στα κύτταρα των θηλαστικών υπάρχει ένας μηχανισμός (glycan processing) επεξεργασίας των γλυκανών κατά τον οποίο δύο συνοδές πρωτεΐνες με εξειδίκευση λεκτίνης, οι καλνεξίνη/καλρετικουλίνη (calnexin/calreticulin, CNX/CRT) παρέχουν στις ανώριμες γλυκοπρωτεΐνες τη δυνατότητα να αποκτήσουν τη φυσική τους διαμόρφωση. Οι πρωτεΐνες με λανθασμένη διαμόρφωση, τελικά, απομακρύνονται από τις CNX/CRT με τη βοήθεια της πρωτεΐνης EDEM και ενός συμπλέγματος με υψηλό μοριακό βάρος που περιλαμβάνει πρωτεΐνες, όπως η E3 λιγάση HRD1 και η κυτταροπλασματική συνοδός πρωτεΐνη p97 (VPC στη ζύμη)<sup>246</sup>. Το σύμπλεγμα αυτό προάγει την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που έχουν σημανθεί με ουβικιτίνη από τη μεμβράνη<sup>246</sup> και τις οδηγεί σε αποικοδόμηση, μέσω της 26S υπομονάδας του πρωτεασώματος (Εικόνα 1.19).

Μια εννοιολογικά όμοια και συμπληρωματική διαδικασία παρατηρείται όταν μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και αθροίσματα πρωτεϊνών είναι δύσκολο να διαχωριστούν και να αποικοδομηθούν μέσω της παραπάνω διαδικασίας. Πρόκειται για έναν εναλλακτικό μηχανισμό αποικοδόμησης που ενεργοποιείται από το στρες του ΕΔ, την αυτοφαγία. Κατά τη διαδικασία αυτή, είναι δυνατή η αποικοδόμηση οργανιδίων από το λυσόσωμα ανεξάρτητα από το μέγεθος και την κατάσταση αναδίπλωσης των πρωτεϊνών που τις απαρτίζουν. Πολλά από τα συστατικά που μεσολαβούν για το μηχανισμό της

αυτοφαγίας έχουν αναγνωρισθεί ως πρωτεΐνες στόχοι της UPR και είναι απαραίτητα προκειμένου το κύτταρο να επιβιώσει από οξύ στρες του ΕΔ<sup>247,248</sup>. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως κατά τη διάρκεια της UPR-επαγόμενης αυτοφαγίας, οι μεμβράνες του ΕΔ απομακρύνονται επιλεκτικά και πακετάρονται σε αυτοφαγοσωμάτια. Για το λόγο αυτό, η παραπάνω διαδικασία ονομάζεται και ΕΔ-φαγία (ER-phagy ή ER eating), ορισμός που αντιπροσωπεύει ένα νέο εξαρτώμενο από τα οργανίδια βραχίονα της αυτοφαγίας<sup>249</sup>. Τα τελευταία χρόνια πολλές φυσιολογικές, αλλά και παθολογικές καταστάσεις, έχουν αποδοθεί στην αδυναμία του μηχανισμού αναδίπλωσης των πρωτεϊνών στο ΕΔ να υπερβεί την ικανότητα αναδίπλωσης του, όπως παράδειγμα κατά τη διαφοροποίηση<sup>177</sup>.



**Εικόνα 1.19: Ο μηχανισμός του ERAD.** Τα βασικά βήματα του μηχανισμού του ERAD κατόπιν αποτυχίας αναδίπλωσης μιας γλυκοπρωτεΐνης στο ΕΔ, περιλαμβάνουν την αρχική αναγνώριση της μη αναδιπλωμένης πρωτεΐνης με τη βοήθεια της πρωτεΐνης EDEM και την απομάκρυνση της από τις πρωτεΐνες συνοδούς BiP (GRP78), GRP94 και τις CNX/CRT (calnexin/calreticulin) προς το κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια ενός καναλιού μεταφοράς (translocon). Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που περιλαμβάνει πρωτεΐνες όπως η E3 λιγάση HRD1 και η κυτταροπλασματική συνοδός πρωτεΐνη p97<sup>246</sup>, τα υποστρώματα σημαίνονται με ουβικιτίνη και οδηγούνται στο πρωτεάσωμα προς αποικοδόμηση.

[http://biochem17.med.utoronto.ca/~david\\_williams/lab/PDI\\_PPI\\_ERAD.html](http://biochem17.med.utoronto.ca/~david_williams/lab/PDI_PPI_ERAD.html)

#### **1.4.3.6 Διασταυρώσεις μεταξύ των βραχιόνων της UPR**

Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεΐνες IRE1, PERK και ATF6 μετά την ενεργοποίησή τους δρουν ανεξάρτητα, οι τρεις βραχίονες της UPR επικοινωνούν μεταξύ τους εκτενώς. Είναι προφανές ότι υπάρχει ένας λειτουργικός πλεονασμός μεταξύ του IRE1/XBP1 και του ATF6 βραχίονα της UPR. Αυτό προκύπτει, από την παρατήρηση ότι μεταλλάξεις σε βασικές πρωτεΐνες των δύο μονοπατιών είναι αποδεκτές από το κύτταρο, ενώ

συνδυασμός μεταλλάξεων μεταξύ δύο μονοπατιών οδηγεί σε μη αναστρέψιμες αλλαγές, που τελικά οδηγούν το κύτταρο σε απόπτωση. Ωστόσο, δεν έχει διευκρινιστεί αν αυτή η γενετική αλληλοσυμπλήρωση αντανακλά την αυξημένη ενεργοποίηση ενός κοινού αριθμού γονιδίων ή το λειτουργικό πλεονασμό μεταξύ ενός ευδιάκριτου αριθμού γονιδίων στόχων του IRE1/XBP1 και του ATF6 μονοπατιού.

Ταυτόχρονα, οι μεταγραφικές επιπτώσεις των τριών γνωστών βραχιόνων της UPR επικαλύπτονται σημαντικά, αποτέλεσμα εν μέρει της από κοινού ενδυνάμωσης των μονοπατιών λόγω στρες. Είναι γνωστό ότι οι ATF6α και XBP1s μεταγραφικοί παράγοντες επιδεικνύουν μεγάλη ομοιότητα όσον αφορά στις DNA αλληλουχίες στόχους<sup>250</sup>, το οποίο συμβάλλει στην υπόθεση, για διπλή εξάρτηση συγκεκριμένων UPR γονιδίων. Η εξάρτηση συγκεκριμένων UPR γονιδίων από και τα δύο μονοπάτια της ATF6 και του XBP1, θα μπορούσε εν μέρει να εξηγηθεί από πρόσφατα ευρήματα ότι οι δύο πρωτεΐνες συνανασκοκατακρημνίζονται, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι αυτές ίσως σχηματίζουν ετεροδιμερή *in vivo*<sup>223</sup>. Επιπλέον, η σηματοδότηση μέσω ATF6 και IRE1 οδηγεί στην μεταγραφική επαγωγή του XBP1 και στην ενεργοποίηση του mRNA του XBP1 μέσω ματίσματος, αντίστοιχα. Η πρωτεόλυση του ATF6 είναι προγενέστερη της παραγωγής του XBP1s από το IRE1 μονοπάτι, υποδηλώνοντας ότι τα δύο μεταγραφικά μονοπάτια της UPR διαφέρουν όσον αφορά το χρόνο ενεργοποίησης τους<sup>218</sup>. Οι παραπάνω διαφορές, φαίνεται να είναι σημαντικές για τη ρύθμιση της «μοίρας» των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και κατά επέκταση του κυττάρου.

#### **1.4.4 Παρατεταμένο στρες του ΕΔ και απόπτωση**

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι "αισθητήρες" της UPR παρουσιάζουν βασικές διαφορές όσον αφορά το χρόνο σηματοδότησης και την απόκριση σε συγκεκριμένα ερεθίσματα. Είναι πλέον ξεκάθαρο, πως η ικανότητα του κυττάρου να προσαρμοστεί στο στρες του ΕΔ και η φύση των προσαρμοστικών στρατηγικών, μπορούν να καθορίσουν την τελική έκβαση της UPR. Φυσιολογικές διαδικασίες που απαιτούν υψηλό ποσοστό πρωτεϊνοσύνθεσης μπορούν να οδηγήσουν σε παρατεταμένη ενεργοποίηση της UPR. Ωστόσο, πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο το συνεχιζόμενο στρες του ΕΔ μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση. Οι μηχανισμοί που σημαίνουν την έναρξη της απόπτωσης, μετά

από μη αντιστρεπτές βλάβες στο ΕΔ είναι ως σήμερα εν μέρει κατανοητοί και είναι πιθανό να προϋποθέτουν και τη συμμετοχή και άλλων μονοπατιών<sup>251</sup>.

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, η UPR-επαγόμενη απόπτωση μπορεί να θεωρηθεί ως ένας τρόπος απομάκρυνσης μερικών κυττάρων τα οποία δεν κατάφεραν να ανακτήσουν τη φυσιολογική λειτουργία του ΕΔ παρά τη δράση του UPR μηχανισμού. Σε αντίθεση με το παραπάνω σενάριο για περιορισμένη και εκλεκτική απόπτωση, η παρουσία παρατεταμένου στρες μπορεί να επάγει εκτεταμένη παθολογική απόπτωση<sup>252</sup>. Το παρατεταμένο στρες μπορεί να ενεργοποιήσει το μηχανισμό της απόπτωσης τόσο με εξαρτώμενο, όσο και ανεξάρτητο μονοπάτι από αυτό των μιτοχονδρίων<sup>253</sup>. Βασικοί διαμεσολαβητές της UPR-επαγόμενης απόπτωσης, είναι η πρωτεΐνη CHOP (GADD153), μαζί με τα μέλη της οικογένειας των BCL-2 πρωτεϊνών BAK και BAX, η κασπάση 12 (caspase-12) και η κινάση JNK (c-jun NH<sub>2</sub> terminal kinase)<sup>254</sup> (Εικόνα 1.20).

Το μονοπάτι της πρωτεΐνης IRE1 εμπλέκεται στο συντονισμό της UPR-επαγόμενης απόπτωσης, χωρίς όμως να είναι ξεκάθαρο με ποιό μηχανισμό και κάτω από ποιές συνθήκες οδηγεί τελικά το κύτταρο σε επιβίωση ή κυτταρικό θάνατο. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης IRE1 έχει ως αποτέλεσμα και την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη προσαρμοστή TRAF2 και στη συνέχεια την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών ASK1 και JNK (Εικόνες 1.17 και 1.19). Η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης JNK οδηγεί στην απενεργοποίηση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2, καθώς και στην ενεργοποίηση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης Bim<sup>255,256</sup>. Το σύμπλεγμα IRE1-TRAF2 ενεργοποιεί τη προ-κασπάση 12 σε κασπάση<sup>233</sup>. Οι κασπάσες είναι κυστεϊνικές πρωτεάσες που ενεργοποιούνται κατόπιν διάσπασης από άλλες κασπάσες, δημιουργώντας ένα καταρράκτη αντιδράσεων που έχει ως τελική απόρροια τον κυτταρικό θάνατο<sup>257</sup>.

Παράλληλα, όπως συμβαίνει και με πολλά άλλα μονοπάτια, η ενεργοποίηση της UPR αυξάνει τόσο το κυτταροπλασματικό όσο και το μιτοχονδριακό επίπεδο του ασβεστίου<sup>258</sup>. Η αύξηση του κυτταροπλασματικού ασβεστίου έχει ως αποτέλεσμα τη θετική ρύθμιση της καλπαΐνης (calpain), η οποία επίσης διασπά την προ-κασπάση 12 σε κασπάση<sup>259</sup>. Συνεχιζόμενη απελευθέρωση του ασβεστίου από το ΕΔ και ταυτόχρονη συσσώρευση του στο μιτοχόνδριο, ακολουθείται από αύξηση της μιτοχονδριακής διαπερατότητας και απελευθέρωση πρωτεϊνών, όπως οι πρωτεΐνες BAK και BAX. Οι πρωτεΐνες αυτές οδηγούν σε απελευθέρωση του κυτοχρώματος C και τελικά σε

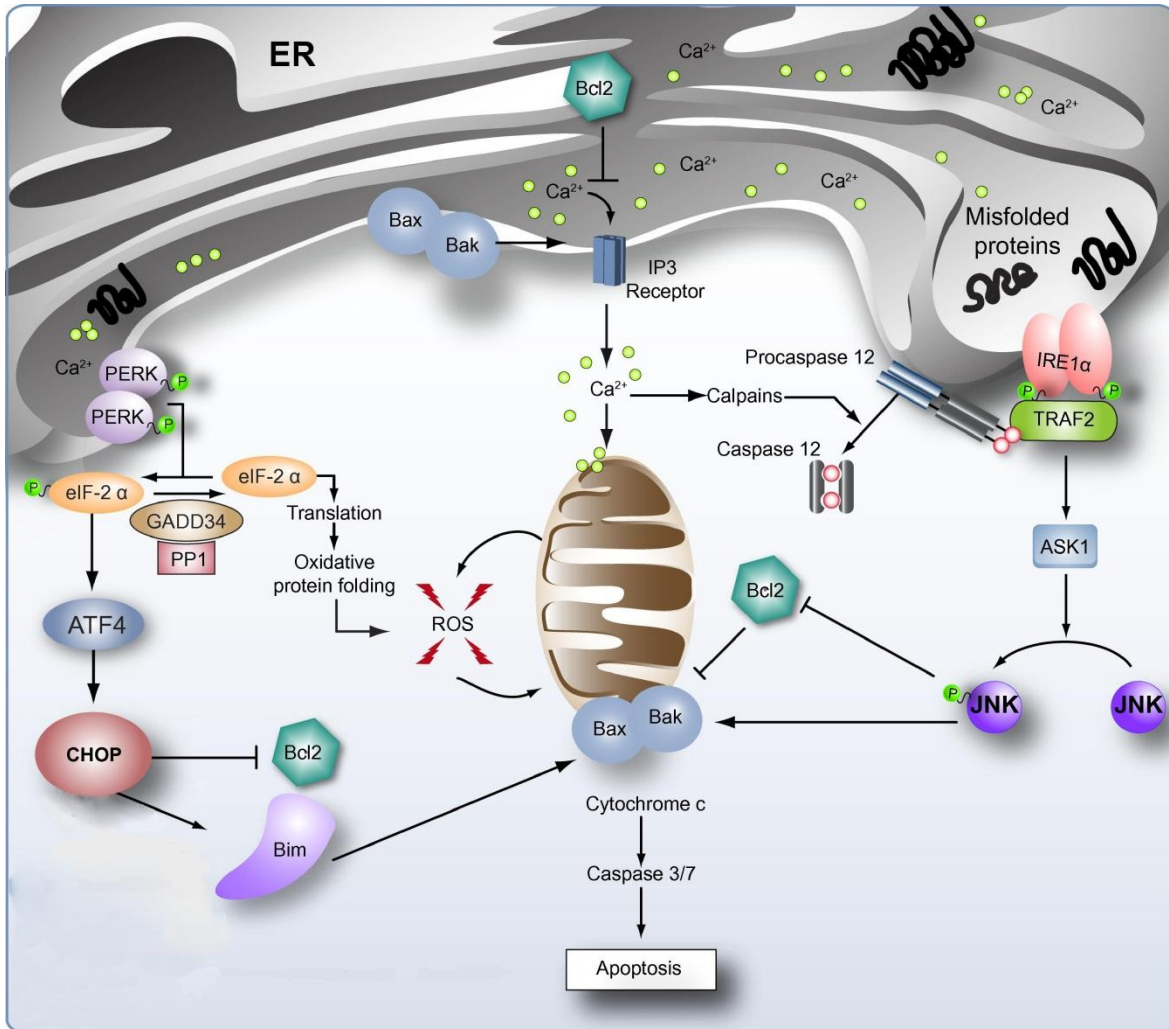
## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

απόπτωση μέσω ενεργοποίησης των κασπασών 3/7<sup>260</sup>. Το μονοπάτι του μεταγραφικού παράγοντα CHOP είναι το πιο καλά χαρακτηρισμένο μονοπάτι της διαμεσολαβούμενης από το στρες του ΕΔ απόπτωσης. Η μεταγραφή του γονιδίου της CHOP ενεργοποιείται κατά κύριο λόγο από τον παράγοντα ATF4, μέσω του PERK-eIF2a μονοπατιού, ενώ έχει βρεθεί ότι το γονίδιο αυτό ενεργοποιείται και από τα άλλα δύο μονοπάτια της UPR<sup>261</sup>.

Η πρωτεΐνη CHOP, δρα ως μεταγραφικός παράγοντας επάγοντας έναν αριθμό γονιδίων, όπως το γονίδιο του *GADD34* το οποίο αποκαθιστά την πρωτεϊνοσύνθεση αποφωσφορυλιώνοντας τον eIF2a και το γονίδιο της οξειδάσης του ΕΔ, ERO1 που έχει ως στόχο την ενίσχυση της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη CHOP διεγείρει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου, ROS (Reactive Oxygen Species) προκαλώντας οξειδωτικό στρες το οποίο, αν είναι πολύ ισχυρό, μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο<sup>262,263</sup>. Αυτή η ικανότητα της πρωτεΐνης CHOP, να προάγει ανάκτηση της φυσιολογικής λειτουργίας του κυττάρου ή τον κυτταρικό θάνατο<sup>264</sup> υποδεικνύει την ύπαρξη μιας λεπτής ισορροπίας που καθορίζει την έκβαση του στρες του ΕΔ<sup>265</sup>. Ένας από τους πιο καλά μελετημένους μηχανισμούς απόπτωσης που επάγεται από την πρωτεΐνη CHOP είναι η καταστολή της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2 και η επαγωγή αποπτωτικών πρωτεϊνών που τα μέλη που διαθέτουν μια μόνο BH3 περιοχή, όπως η πρωτεΐνη Bim (Εικόνα 1.20).





**Εικόνα 1.20:** Το παρατεταμένο στρες του ΕΔ οδηγεί σε αποπτωτική σηματοδότηση. Στην παραπάνω εικόνα απεικονίζονται τα μονοπάτια της καθοδηγούμενης από το στρες του ΕΔ απόπτωσης<sup>266</sup>.

#### 1.4.5 Η δυναμική ρύθμιση των μονοπατιών της UPR μέσω ανατροφοδοτικής ρύθμισης (Feedback regulation)

Όμοια με κάθε μονοπάτι κυτταρικής σηματοδότησης, η UPR απόκριση απαιτεί μηχανισμούς ανατροφοδοτικής ρύθμισης για να εξασφαλίσει ότι η απόκριση αυτή δεν θα υπερενεργοποιηθεί αλλά ούτε θα απενεργοποιηθεί μόνιμα. Αρκετοί μηχανισμοί είναι γνωστό ή πιθανολογείται, ότι προκαλούν ανατροφοδοτική ρύθμιση της UPR. Ο πιο άμεσος μηχανισμός, απορρέει από την ίδια τη λειτουργία της UPR. Κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε κατάσταση στρες εξαιτίας των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ, επάγουν τους μηχανισμούς της UPR ώστε να διαχειριστούν το πρωτεϊνικό φορτίο και να μειώσουν με τον τρόπο αυτό το στρες του ΕΔ.

Έχουν βρεθεί ανατροφοδοτικοί μηχανισμοί οι οποίοι μπορεί να δράσουν αντιστρεπτά στη μετάβαση του κυττάρου, μέσω του PERK μονοπατιού, προς κυτταρικό θάνατο. Όπως για παράδειγμα η αποφωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α από την πρωτεΐνη GADD34 (protein growth-arrest DNA damage gene 34), η οποία επάγεται από το ίδιο το μονοπάτι της πρωτεΐνης PERK, μέσω του μεταγραφικού παράγοντα ATF4<sup>237</sup>. Η αποφωσφορυλίωση επιτρέπει την επανέναρξη της πρωτεϊνσύνθεσης και την αποκατάσταση της ομοιόστασης του κυττάρου.

Από την άλλη, το μονοπάτι της πρωτεΐνης IRE1 μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης P85<sup>IPK</sup>, ρυθμίζει αρνητικά το μονοπάτι της πρωτεΐνης PERK, παρέχοντας με αυτό τον τρόπο ένα μηχανισμό ρύθμισης, με σκοπό να μειώσει τις συνέπειες στο κύτταρο από την PERK διαμεσολαβούμενη αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης<sup>267</sup>. Η θετική ρύθμιση του P85<sup>IPK</sup> γονιδίου δεν αποτελεί άμεσο γεγονός, καθώς επάγεται αρκετές ώρες μετά από την ενεργοποίηση του PERK μονοπατιού. Είναι πιθανό, ο τερματισμός της αναστολή της πρωτεϊνσύνθεσης, μέσω επαγωγής του P85<sup>IPK</sup> γονιδίου να αντιπροσωπεύει και τον τερματισμό της UPR. Σε αυτό το σημείο, το κύτταρο είτε επιστρέφει στη φυσιολογική του λειτουργία είτε σε περίπτωση που το στρες επιμένει, η IRE1 δίνει το έναυσμα για απόπτωση μέσω ενεργοποίησης ενός διαφορετικού καταρράκτη κινασών (Εικόνα 1.17 και 1.20).

Λίγα είναι γνωστά για την απενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης ATF6. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι υπάρχουν κάποια επαγόμενα από το στρες του ΕΔ γονίδια τα οποία εμπλέκονται στη ρύθμιση της UPR. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι και η πρωτεΐνη Nucleobindin 1 (NUCB1, NUC), η οποία ρυθμίζει αρνητικά το παραπάνω μονοπάτι, καταστέλλοντας την S1P-διαμεσολαβούμενη πρωτεολυτική επεξεργασία στη συσκευή Golgi και κατά συνέπεια την παραγωγή της ενεργής p50ATF6<sup>268</sup>. Ακόμα πιο πρόσφατα, έχει βρεθεί ότι και το τμήμα του μεταγραφικού παράγοντα XBP1 που δεν υφίσταται μάτισμα, XBP1u, λειτουργεί επίσης ως αρνητικός ρυθμιστής του σήματος της πρωτεΐνης ATF6<sup>269</sup>.

### 1.4.6 Ο ρόλος της UPR στη φυσιολογική ενδοκυτταρική σηματοδότηση

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η απόκριση που περιγράφεται από τον όρο στρες του ΕΔ πυροδοτείται ως μέρος της φυσιολογικής ανάπτυξης διαφορετικών συστημάτων

οργάνων και ιστών. Αυτό μπορεί να αντικατοπτρίζεται με ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των βραχιόνων της UPR και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών<sup>226</sup>. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης διαφορετικοί τύποι κυττάρων συνθέτουν και εκκρίνουν ένζυμα, αντισώματα, πρωτεΐνες του ορού και συστατικά της ενδοκυτταρικής ουσίας, επιβαρύνοντας με αυτό τον τρόπο του ΕΔ δίκτυο με πρωτεϊνικό φορτίο. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το κύτταρο οδηγείται σε μια μορφή φυσιολογικού στρες του ΕΔ. Είναι προφανές, ότι η UPR πρέπει να διαθέτει κάποιο μηχανισμό ικανό να διακρίνει μεταξύ των ποικίλων ερεθισμάτων που ενεργοποιούν και σημαίνουν την έναρξη των κατάλληλων αποκρίσεων<sup>192</sup>.

Μέσω της UPR, το κύτταρο αντιμετωπίζει το στρες και επανεδραιώνει την κυτταρική ομοιόσταση. Για παράδειγμα, συμμετέχει στη μεταγραφική ρύθμιση πολλών πρωτεϊνών του εκκριτικού μονοπατιού, πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην αναδίπλωση, στη γλυκοσυλίωση και στη μεταφορά των πρωτεϊνών μεταξύ ΕΔ και συσκευής Golgi καθώς και την έκκριση από την trans Golgi συσκευή<sup>222</sup>. Σε συνθήκες μη λειτουργικής UPR η μεταφορά των πρωτεϊνών κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης εν μέρει εξασθενεί<sup>270</sup>. Ακόμη, πρωτεΐνες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των λιπιδίων και στη βιοσύνθεση της αίμης ρυθμίζονται από την UPR<sup>222</sup>. Η UPR επίσης αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στην G1 φάση μέσω αναστολής της μετάφρασης της κυκλίνης D1 από το PERK/eIF2a βραχίονα<sup>271,272</sup>.

Αρκετές από τις αποκρίσεις που συνθέτουν την UPR είναι αναγκαίες για τη σωστή ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό ενισχύεται και από την παρατήρηση ότι η μόνιμη απάλειψη από το κύτταρο βασικών πρωτεϊνών της UPR οδηγεί σε πρώιμη εμβρυική θνησιμότητα<sup>192</sup>. Η πρωτεΐνη IRE1 είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του πλακούντα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη<sup>273</sup>. Ο βραχίονας IRE1-XBP1 είναι αναγκαίος για την διαφοροποίηση των παγκρεατικών πλασματοκυττάρων<sup>274,275</sup>, ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση της ινσουλίνης και στο μεταβολισμό της γλυκόζης<sup>276</sup>. Μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα τη λειτουργική δυσλειτουργία της πρωτεΐνης PERK οδηγούν σε συμπτώματα του συνδρόμου Wolcott-Rallison τόσο στα ποντίκια και όσο και στον άνθρωπο, όπως παγκρεατική και σκελετική δυσπλασία<sup>277</sup>. Ακόμη, ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ενεργοποίηση της UPR, λαμβάνει χώρα σε διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα καθώς και σε βλαστοκύτταρα<sup>278,279</sup>.

## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Παράλληλα, διαφορετικοί τύποι στρες έχει βρεθεί να αλληλεπιδρούν με την UPR κατά την ανάπτυξη. Για παράδειγμα, ο επαγόμενος από την υποξία παράγοντας 1α (Hypoxia-inducible factor 1α, HIF1α) δρα συνεργιστικά με την UPR, για τη διατήρηση της σωστής ανάπτυξης του αυξητικού χόνδρου κατά τη χονδρογενή οστεογένεση<sup>280</sup>. Συγκεκριμένα, τόσο η υποξία όσο και το στρες του ΕΔ ρυθμίζουν θετικά συστατικά της UPR, όπως την πρωτεΐνη ATF4, κατά τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων<sup>281</sup>. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η έκφραση της πρωτεΐνης ATF4 στους οστεοβλάστες συνδέεται επίσης και με την έκκριση της ινσουλίνης, καθώς ρυθμίζει την έκφραση της εξειδικευμένης ορμόνης των οστών οστεοκαλσίνης (osteocalcin)<sup>282</sup>.

**Πίνακας 1.3 : Διακριτοί φαινότυποι ποντικών μετά από εξάλειψη βασικών γονιδίων της UPR**<sup>226</sup>

Phenotype	IRE1α	XBP1	ATF6α	PERK	ATF4
<i>Full knockout</i>					
Embryonic lethal	Yes	Yes	No*	No	No <sup>‡</sup>
Postnatal death	–	–	No	Yes	No
<i>Tissue-specific effects</i>					
Decreased Ig secretion by B cells	Yes	Yes	–	No	–
Exocrine pancreas alteration	Mild	Yes	–	Yes	–
Endocrine pancreas and insulin secretion alteration	Yes	Yes	Yes <sup>§</sup>	Yes	Yes
Lipid abnormalities in liver <sup>  </sup>	Yes	Yes	Yes	Yes	–
Altered bond formation	–	–	–	Yes	Yes
Blind, altered eye lens	No	No	No	No	Yes
Impaired glucose metabolism	Mild	Yes	–	Yes	Yes

\*Η διπλή αποσιώπηση των γονιδίων ATF6α και ATF6β οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα. ‡ Τα ποντίκια που υπολείπονται της ATF4 εμφανίζουν ελαττώματα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. § Βασισμένο σε συγκεντρωτικές μελέτες ατόμων με διαβήτη

Άλλες μελέτες, υποστηρίζουν ότι οι βραχίονες σηματοδότησης της UPR συντονίζουν φυσιολογικές διαδικασίες που δεν είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη λανθασμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Για παράδειγμα, μεταγραφικός παράγοντας XBP1s είναι απαραίτητος για το θετικό έλεγχο της ηπατικής λιπογένεσης σε βασικά επίπεδα, επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της χοληστερίνης και των τριγλυκεριδίων, πιθανόν με απευθείας ρύθμιση των γονιδίων που συμμετέχουν σε αυτό το μεταβολικό μονοπάτι<sup>283</sup>. Όμοια, οι πρωτεΐνες ATF6 και IRE1α συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπιδίων στο ήπαρ<sup>284-286</sup>. Επίσης, ο XBP1s αλληλεπιδρά και ρυθμίζει

αρνητικά τα επίπεδα ενός μεταγραφικού παράγοντα (FOXO1), που εμπλέκεται στην ενεργειακή ρύθμιση του κυττάρου<sup>287</sup>. Τέλος, ο νευροτροφικός παράγοντας BDNF (Brain – Derived Neurotrophic Factor), ενεργοποιεί το μάτισμα του mRNA του γονιδίου *XBP1* στους νευρώνες προκειμένου να ενισχύσει την αύξηση των νευριτών και την κυτταρική διαφοροποίηση<sup>288</sup>.

#### 1.4.7 Ο ρόλος της UPR στην παθολόγηση και τον καρκίνο

Αν και η UPR έχει ως κύριο ρόλο την προστασία των κυττάρων από τις φυσιολογικές μεταβολές που συμβαίνουν στο κυτταρικό περιβάλλον, είναι ξεκάθαρο ότι ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων μπορεί επίσης να ενεργοποιήσει την απόκριση αυτή. Η διαταραχή της ομοιόστασης του ΕΔ, που προκαλείται από γήρανση, γενετικές μεταλλάξεις και περιβαλλοντικούς παράγοντες, εκφράζεται μέσω της UPR και φαίνεται να εμπλέκεται σε ένα φάσμα ασθενειών (Πίνακας 1.4) που περιλαμβάνει ασθένειες όπως ο διαβήτης<sup>262,289</sup>, η αρτηριοσκλήρυνση<sup>290</sup>, οι ηπατικές νόσοι<sup>291,292</sup>, οι καρδιακές νόσοι<sup>293-295</sup>, οι φλεγμονές<sup>296</sup> αλλά κυρίως νευροεκφυλιστικές διαταραχές<sup>297,298</sup> όπως το Alzheimer<sup>299</sup>, το Parkinson<sup>300</sup> και η εγκεφαλική ισχαιμία<sup>202,301</sup>. Η UPR επάγεται επίσης και ως απόκριση σε ιική μόλυνση<sup>302</sup>, προφανώς εξαιτίας το υψηλού φορτίου ιικών πρωτεϊνών που συντίθενται στο ΕΔ. Το στρες του ΕΔ δικτύου που δημιουργείται από την ιική μόλυνση πιστεύεται πως προκαλεί ποικίλα παθογενετικά αποτελέσματα όπως νευροεκφυλισμό, τραυματισμό του ήπατος και καρκινογένεση αναλόγως με τον τύπο των κυττάρων<sup>291</sup>.

Υπάρχουν αυξανόμενες αναφορές ότι το στρες του ΕΔ και η UPR έχουν παρατηρηθεί και στους όγκους<sup>191</sup>. Δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί πως η ενεργοποίηση της UPR συμβάλλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, η UPR φαίνεται να έχει διττό ρόλο αφού επηρεάζει όχι μόνο την επιβίωση κατά τη διάρκεια του στρες του ΕΔ, αλλά και τον κυτταρικό θάνατο μέσω ρύθμισης των αποπτωτικών και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών<sup>191</sup>. Πρόσφατα δεδομένα, προτείνουν ότι η UPR μπορεί να δράσει ως περιοριστικό σύνορο ενάντια στη δημιουργία όγκων επάγοντας ένα μηχανισμό πρόωμης γήρανσης μετά από ενεργοποίηση από ογκογονίδια<sup>303</sup>. Ενεργοποίηση της κινάσης p38 σχετίζεται με την PERK-eIF2α διαμεσολαβούμενη αναστολή της μετάφρασης, οδηγώντας το κύτταρο σε μια λανθάνουσα κατάσταση και

## ΕΝΟΤΗΤΑ 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

αναστολή της ανάπτυξης, προάγοντας αντίσταση απέναντι στις συμβατικές χημειοθεραπείες<sup>304</sup>. Η UPR επίσης επάγεται από την υποξία, προάγοντας κατά αυτόν τον τρόπο την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων κάτω από υποξικές συνθήκες<sup>203,305</sup>. Η υποξία επάγει την μεταγραφή του XBP1 και είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία όγκων<sup>306</sup>. Ακόμη, η πρωτεΐνη BiP διαδραματίζει σημαντικό ρόλο κατά την καρκινογένεση<sup>307</sup>. Αν και τα δεδομένα μέχρι σήμερα είναι περιορισμένα, όλο και περισσότερες πληροφορίες για τις σχετικές με τον καρκίνο αλλαγές που αφορούν τις πρωτεΐνες IRE1, ATF6 και PERK προκύπτουν κατά τη διάρκεια νέων μελετών. Συνεπώς, περαιτέρω διερεύνηση των μηχανισμών ενεργοποίησης των τριών μονοπατιών της UPR μπορούν να οδηγήσουν στην ανακάλυψη νέων θεραπευτικών στόχων.

**Πίνακας 1.4 : Ασθένειες συσχετιζόμενες με το στρες του ΕΔ**<sup>308</sup>

Disease	Role of ER stress
Alzheimer's disease	Mutant presenilin 1 induces CHOP
Parkinson's disease	Accumulation of a substrate of Parkin in the ER activates ER stress
Amyotrophic lateral sclerosis	Mutant SOD1 aggregates and activates ER stress
Type 2 diabetes	Obesity induces ER stress ATF6 interferes with gluconeogenesis Free fatty acids and hyperglycemia induce beta cell death through CHOP
Atherosclerosis	Atherosclerosis-relevant stimuli induce macrophage death via CHOP Oxidized phospholipids, hyperhomocysteinemia, and cholesterol loading induce endothelial and smooth muscle cell death via CHOP
Nonalcoholic fatty liver disease	ER stress induces SREBP-1c
HCV and HBV infection	HCV suppresses IRE1-XBP1 pathway HBV induces Grp78 and Grp94
Alcoholic liver disease	Alcohol induces Grp78 and CHOP
Cancer	Many cancers induce Grp78 and XBP1

### 1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Ο αγγειακός αυξητικός παράγοντας VEGF αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή τόσο της φυσιολογικής όσο και της παθολογικής αγγειογένεσης. Η ιδιότητα του αυτή τον καθιστά ελκυστικό, όχι μόνο ως θεραπευτικό στόχο για την ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων, αλλά και ως αγγειογενετική κυτταροκίνη για τη θεραπεία των ισχαιμικών καρδιακών νόσων. Ο VEGF χαρακτηρίζεται από την πολυπλοκότητα τόσο της δομής του όσο και των αλληλεπιδράσεων με τους υποδοχείς του, ενώ η ενεργοποίηση του οδηγεί σε πληθώρα καθοδικών μονοπατιών. Παρά την εντατική έρευνα, για σχεδόν δύο δεκαετίες, το πλήρες φάσμα των δράσεων του VEGF και των μοριακών μηχανισμών τους δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί.

Για το λόγο αυτό, σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου αναλύθηκε με τη χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών DNA, το μεταγραφικό προφίλ του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Από τα γονίδια που βρέθηκε να επάγονται από τον VEGF, το ενδιαφέρον μας προσέλκυσε τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*. Τα γονίδια αυτά εμφανίζουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, καθώς συμμετέχουν σε μια διαδικασία γνωστή ως «απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» (Unfolded protein Response, UPR) ενός μηχανισμού που λαμβάνει χώρα στο ΕΔ. Επιπρόσθετα, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η μεταγραφή των γονιδίων αυτών επάγεται από τον VEGF, 4-5 φορές εντός 3 ωρών. Συνεπώς, η παρούσα διατριβή σχεδιάστηκε για να διερευνήσει την πιθανότητα ύπαρξης λειτουργικής αλληλεπίδρασης του VEGF με το ΕΔ. Συγκεκριμένα, σκοπός της μελέτης αυτής είναι:

- η επιβεβαίωση της μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF
- η διερεύνηση της συμμετοχής και άλλων γονιδίων της UPR στη ρύθμιση αυτή
- η μελέτη των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους ο VEGF ρυθμίζει μεταγραφικά τα γονίδια της UPR, και
- η διαλεύκανση της λειτουργικής σκοπιμότητας της ρύθμισης αυτής, στη δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα.





## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1 Αντισώματα και αυξητικοί παράγοντες

Ο ανθρώπινος αγγειακός αυξητικός παράγοντας VEGF165 καθώς και ο βασικός ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας FGF2 ή bFGF (Basic fibroblast growth factor) που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, αγοράστηκαν από την εταιρεία ImmunoTools GmbH (Friesoythe, Germany). Τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι των των πρωτεϊνών α- φωσφο-IRE1 και α- φωσφο-eIF2α (Ser51) είναι των εταιριών Abcam (ab48187) και Cell Signalling Technology, αντίστοιχα. Τα αντίσωμα της ολικών πρωτεϊνών α-IRE1, α-eIF2α και α-PLCγ1 αγοράστηκαν επίσης από την εταιρία Cell Signalling Technology. Το μονοκλωνικό αντίσωμα για την α-HERPUD1 πρωτεΐνη προέρχεται από την Abnova Corporation, ενώ το πολυκλωνικό αντισωμα για την α-GRP78/BIP (ab21685) και την GADD153 (CHOP) αγοράστηκε από την εταιρία Abcam. Το μονοκλωνικό αντίσωμα της α-ATF6 είναι της εταιρίας Cosmo Bio Co., Ltd. Το πολυκλωνικό αντίσωμα για την α-BiP/GRP78 αγοράστηκε από την εταιρία Abcam.

Τα πολυκλωνικά αντισώματα των α-φωσφο-Akt (Ser473), α-Akt, α-φωσφο-ERK, α-ERK, είναι όλα από την Cell Signaling Technology. Τα αντισώματα α-actin της εταιρίας Chemicon και α-tubulin της εταιρείας DSHB, χρησιμοποιήθηκαν για ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων σε δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες ανοσοαποτύπωσης ή τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθιανική φλουερεσκεΐνη ή ισοθιανική ροδαμίνη (FITC ή TRITC) που χρησιμοποιήθηκαν στις δοκιμασίες του ανοσοφθορισμού αγοράστηκαν από την εταιρία Jackson-Dianova (GmbH, Hamburg, Germany). Το μονοκλωνικό αντίσωμα της αντι- βρωμοδεόξυ ουριδίνη (α-BRDU) προήλθε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (MO, USA).

Όλα τα μέσα καλλιέργειας των κυττάρων ήταν από την Invitrogen (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Germany). Το εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell

Growth Supplement, ECGS) απομονώθηκε από εγκέφαλο βοός και ήταν ελεύθερο από ενδοτοξίνες.

### 2.1.2 Πλασμίδια και ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNAs

Το πλασμίδιο pGL3-pro-3xERSEII που χρησιμοποιήθηκε για τις δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με λουσιφεράση, ήταν προσφορά του κ. Ron Prywes (Columbia University), ενώ ο πλασμιδιακός φορέας Renilla pRL-TK Vector, προέρχεται από την εταιρία Promega (Promega Corporation, Madison, USA).

Τα ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών προέρχονται από την εταιρία Ambion, Applied Biosystems και απεικονίζονται στον πίνακα 2.1. Ως ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχου (SCRAMBLED, SCR) χρησιμοποιήθηκε, σε κάθε πείραμα, ολιγονουκλεοτίδιο με τυχαία αλληλουχία που δεν έχει συμπληρωματική και δεν υβριδίζεται με αντίστοιχο mRNA του κυττάρου.

**Πίνακας 2.1: siRNA**

Γονίδιο	siRNA ID	
	siRNA1	siRNA2
<b>ATF6</b>	115887	115888
<b>DNAJB9</b>	144290	144291
<b>EIF2a</b>	14269	14088
<b>HERPUD1</b>	138333	138334
<b>IRE1</b>	s200430	s200432
<b>PLCγ1</b>	143823	12065
<b>SCR</b>	14642	

### 2.1.3 Χημικές ουσίες και αναστολείς

Οι χημικές ουσίες Tunicamycin (T7765) (Tm) και Thapsigargin (T9033) (Tg) που χρησιμοποιήθηκαν ως επαγωγείς της απόκρισης των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών (UPR) προήλθαν από την εταιρία Sigma. Η Tunicamycin είναι αναστολέας της N-συσχετιζόμενης γλυκοσυλίωσης και κατά συνέπεια των N-γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων κατά το σχηματισμό των γλυκοπρωτεϊνών<sup>309</sup>. Η Tm χρησιμοποιείται ευρέως σε πειραματικές διαδικασίες για την επαγωγή της UPR απόκρισης, καθώς η χορήγησή της έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη

αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ. Η χημική ένωση Thapsigargin (Tg), δρα ως αναστολέας της αντλίας ιόντων  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -ATPase) στον αυλό του ΕΔ και επάγει την UPR απόκριση<sup>181</sup>.

Οι ειδικοί μοριακοί αναστολείς βασικών μονοπατιών του VEGF, ο SB203580 (S-8302) αναστολέας του μονοπατιού της p38 MAPK, ο U73122 (U6756) αναστολέας του μονοπατιού της PLCγ και η Wortmannin (W1628) αναστολέας του μονοπατιού της PI3K, αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma. Ο αναστολέας της MEK1/2, PD98059 (αναστέλλει και την επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση των ERK1/2 καθώς και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων) ανήκει στην εταιρία Cell Signaling. Ο KN-93 (K1385) ειδικός αναστολέας της εξαρτώμενης από το σύμπλεγμα  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνης κινάσης (type II  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase, CaM kinase) και ο αναστολέας της  $IP_3R$ -διαμεσολαβούμενης απελευθέρωσης του  $Ca^{2+}$ , 2-APB (42810) προήλθαν από την εταιρία Sigma. Ο χηλικός παράγοντας BAPTA-AM (A1026) είναι της εταιρίας ENZO Life Sciences. Ο αναστολέας του πρωτεασώματος λακτακυστίνη (Lactacystin) (L6785), καθώς και ο αναστολέας της πρωτεϊνοσύνθεσης κυκλοεξιμίδιο (Cycloheximide, CHX) (C7698) είναι της εταιρίας Sigma.

## 2.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

### 2.2.1 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου

Η απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells) πραγματοποιήθηκε από φλέβα ομφάλιου λώρου νεογνών σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Jaffe *et al.*<sup>310</sup>. Συνοπτικά, μετά από ψηλάφηση εντοπίστηκε η φλέβα του λώρου και πλύθηκε με 50 ml διαλύματος φωσφορικών PBS (Phosphate buffer saline). Τα άκρα της φλέβας του λώρου κλείστηκαν ερμητικά με τη βοήθεια βαλβίδων τριών σημείων (three way stop cocks) και ακολούθησε διαποτισμός της φλέβας με 0.1% διαλύματος κολλαγενάσης (Collagenase type IA, Sigma) σε PBS και επώαση του λώρου στους 37°C, για 12 min. Έπειτα από συλλογή του παραπάνω διαλύματος και των αποκολλημένων κυττάρων, ακολούθησε απενεργοποίηση της κολλαγενάσης με θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% ορό βοός (FCS, Fetal calf serum). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά, στις 1000 rpm, σε θερμοκρασία

δωματίου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε 10 ml θρεπτικού υλικού M199, εμπλουτισμένο με 20% FCS (Fetal calf serum), 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial cell growth supplement) και 0,05 U/ml ηπαρίνης.

### 2.2.2 Καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών

Ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου HUVEC, καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία, τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I και στη συνέχεια πλυθεί με PBS. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο 20% με εμβρυικό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS, Invitrogen), 0,05 mg/ml ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement), 0,05 IU ηπαρίνης/ml και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη διάρκεια των πειραμάτων ήταν μικρής γενιάς (από 2-5).

Καρκινικά κύτταρα HeLa καλλιεργήθηκαν σε Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FCS και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 4. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες ήταν ελεύθερα ενδοτοξίνης. Ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο, με σταθερή θερμοκρασία 37°C, σε συνθήκες υγρασίας και ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3 Διαμόλυνση κυττάρων με DNA και siRNA

Για τη διαμόλυνση κυττάρων HUVE με DNA χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontex Laboratories GmbH, Germany). Τα κύτταρα, πριν τη διαμόλυνση βρίσκονταν σε οπτική πυκνότητα 60-70% και είχαν ομοιόμορφη κατανομή στο τρυβλίο. Στο μίγμα της διαμόλυνσης το λιπίδιο METAFECTENE Pro χρησιμοποιήθηκε σε αναλογία 3:1 με το DNA σε διάλυμα M199, ενώ πριν την προσθήκη στα κύτταρα το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, αυτό προστέθηκε στα κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού σε υλικό καλλιέργειας M199, εμπλουτισμένο με 5% FCS. Το μίγμα διαμόλυνσης αντικαταστάθηκε μετά από 4 ώρες με πλήρες μέσο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες μετά από 48 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε

5% CO<sub>2</sub>. Η διαμόλυνση των κυττάρων HeLa για δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς λουσιφεράσης, πραγματοποιήθηκε με το λιπίδιο Effectene (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Οι διαμολύνσεις με siRNAs πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE με το λιπίδιο RNAiMax (Invitrogen) και σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αραιώση των αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε το χαμηλής περιεκτικότητας σε ορό θρεπτικό υλικό OptiMEM I (Invitrogen). Η τελική συγκέντρωση του κάθε siRNA ήταν είτε 20 nM είτε 50 nM, ενώ διαδοχικές διαμολύνσεις πραγματοποιήθηκαν όπου ήταν απαραίτητο για να επιτευχθεί το βέλτιστο ποσοστό αποσιώπησης των γονιδίων. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν, στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες, μετά από 48-72 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Όλα τα siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρίας Ambion.

#### **2.2.4 Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVE με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης**

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm που είχαν προ-επωαστεί με κολλαγόνο και σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα υπέστησαν διαμόλυνση με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNAs. Μετά το πέρας 48 ωρών υπέστησαν στέρωση ορού για 18h και ακολούθησε επαγωγή με VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Τις τελευταίες 6 ώρες προστέθηκε βρωμοδεόξυ ουριδίνη (BrdU) σε τελική συγκέντρωση 100μM. Στο τέλος της 6ωρης επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3,7% και η εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεΐδης πραγματοποιήθηκε με 50mM χλωριούχο αμμώνιο (NH<sub>4</sub>Cl). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με 1.5M υδροχλωρικό οξύ (HCl) με σκοπό την αποδιάταξη του DNA, ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών, με PBS. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0.1% για 4 λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Η δέσμευση των μη ειδικών θέσεων έγινε με ορό 10% (10% FCS) για 30 λεπτά και ακολούθησε μια ώρα επώαση με το αντίσωμα α-BRDU (βρωμοδεόξυ ουριδίνη) σε αραιώση 1:200. Έπειτα από πλύση με PBS, έγινε επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) σε

αραίωση 1:200 και για μια ώρα. Τέλος, οι πυρήνες των κυττάρων σημάνθηκαν με χρώση με ουσίες οι οποίες φθορίζουν μετά την πρόσδεσή τους στο DNA (Hoechst, Propidium Iodide). Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen) και οι παρατηρήσεις των δειγμάτων έγιναν σε συνεστιακό μικροσκόπιο Leica SP1 (Βιολογική Χημεία, Ιατρική Σχολή, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Leica TCS, ή Leica SP5 (Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών/ΙΒΕ-ΙΤΕ, Ιωάννινα), εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite.

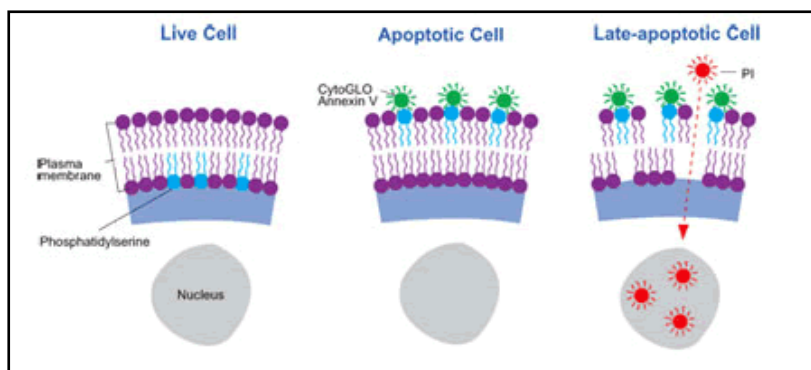
### **2.2.5 Δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων HUVE**

Κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 6 φρεατίων και σε συγκέντρωση 150.00/φρεάτιο, την επόμενη μέρα διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNAs. Ύστερα από 48 ή 72 ώρες, ανάλογα με το χρόνο ημιζωής των πρωτεϊνών που απαλήφθηκαν τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία 35mm έτσι ώστε να καλύπτουν όλη την επιφάνεια του φρεατίου. Μετά το πέρας 24 ωρών, η μονοστιβάδα των κυττάρων τραυματίστηκε με τη χρήση ενός πλαστικού και αποστειρωμένου ακροφυσίου, πλύθηκε δύο φορές με PBS και καλλιεργήθηκε σε πλήρες θρεπτικό μέσο απουσία ή παρουσία VEGF (50ng/ml) σε θάλαμο 5% CO<sub>2</sub> και 37<sup>0</sup>C. Εικόνες της τραυματισμένης περιοχής ελήφθησαν κάθε 10 λεπτά και για 16h με τη χρήση του μικροσκοπίου Leica DM IBRE, εξοπλισμένο με την κάμερα HRD060-NIK CCD (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) και το λογισμικό Metamorph. Τα κύτταρα που μετακινήθηκαν προς την τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά cm τραυματισμένης περιοχής.

### **2.2.6 Δοκιμασία επιβίωσης των κυττάρων HUVE με κυτταρομετρία ροής, Flow cytometry (FACS) Assay: Σήμανση με Αννεξίνη και Ιωδιούχο προπίδιο**

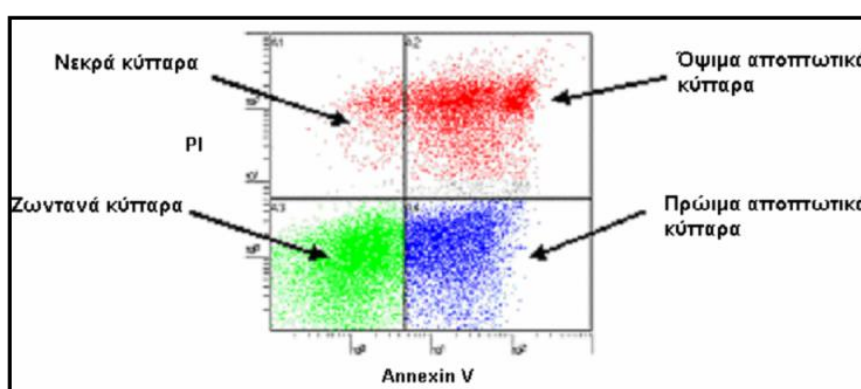
Η απώλεια της ασυμμετρίας των φωσφολιπιδίων και η έκθεση της φωσφατιδυλοσερίνης (phosphatidyloserine, PS) στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης, αντί της εσωτερικής που βρίσκεται σε φυσιολογικές συνθήκες, αποτελεί ένα βασικό δείκτη αναγνώρισης των πρώιμων αποπτωτικών κυττάρων<sup>311</sup>. Η αννεξίνη, η οποία είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 35-36 kDa, μπορεί και συνδέεται πάνω στην

φωσφατιδυλοσερίνη με ιδιαίτερα υψηλή εξειδίκευση όταν η φωσφατιδυλοσερίνη εκτίθεται στην εξωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 2.1). Η σύνδεση αυτή εξαρτάται από την παρουσία ιόντων  $Ca^{2+}$ .



**Εικόνα 2.1:** Σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο.

Κατά συνέπεια, η σήμανση των κυττάρων με αννεξίνη συνδεδεμένη με φλουορεσκεΐνη (Annexin-FITC) αποτελεί ένα δείκτη πρώιμου αποπτωτικού θανάτου. Λόγω του γεγονότος ότι η φωσφατιδυλοσερίνη γίνεται προσβάσιμη και στην περίπτωση της νέκρωσης, χρησιμοποιήθηκε και ένας δεύτερος δείκτης, το ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide, PI), το οποίο δένεται πάνω σε νουκλεϊκά οξέα μόνο όταν η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης έχει χαθεί. Με αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτός ο διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες. Ζωντανά κύτταρα, πρώιμα αποπτωτικά κύτταρα, όψιμα αποπτωτικά κύτταρα και νεκρά κύτταρα (Εικόνα 2.2).



**Εικόνα 2.2:** Διαχωρισμός των κυττάρων σε 4 κατηγορίες με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής.

Κύτταρα HUVΕ τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων σε συγκέντρωση 150.000 κύτταρα/φρεάτιο ή 300.000/φρεάτιο στην περίπτωση που ακολουθούσε διαμόλυνση

(για 48 ώρες) με siRNA ή όχι πριν από τις αντίστοιχες επώσεις με αναστολείς παρουσία ή απουσία VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Τα κύτταρα τρυψινοποιήθηκαν, συλλέχθηκαν και καταμετρήθηκαν. Σε κάθε δείγμα  $1 \times 10^5$  κύτταρα επανεωρήθηκαν σε 0,1ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου (0,1M HEPES / NaOH pH=7.4, 140mM NaCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>) και επώστηκαν με 1.0μg/ml Annexin-V-FITC και 5.0μg/ml ιωδιούχο προπίδιο (Propidium Iodide) για 20min, στους 4°C, στο σκοτάδι<sup>312</sup>. Ακολούθησε προσθήκη 0,9ml ρυθμιστικού διαλύματος ασβεστίου και ανάλυση σε κυτταρομετρητή ροής (CyFlow ML, Partec).

### **2.2.7 Ασβεστο- εξαρτώμενη δοκιμασία φθορισμού, Fluo-4 NW Calcium Assay**

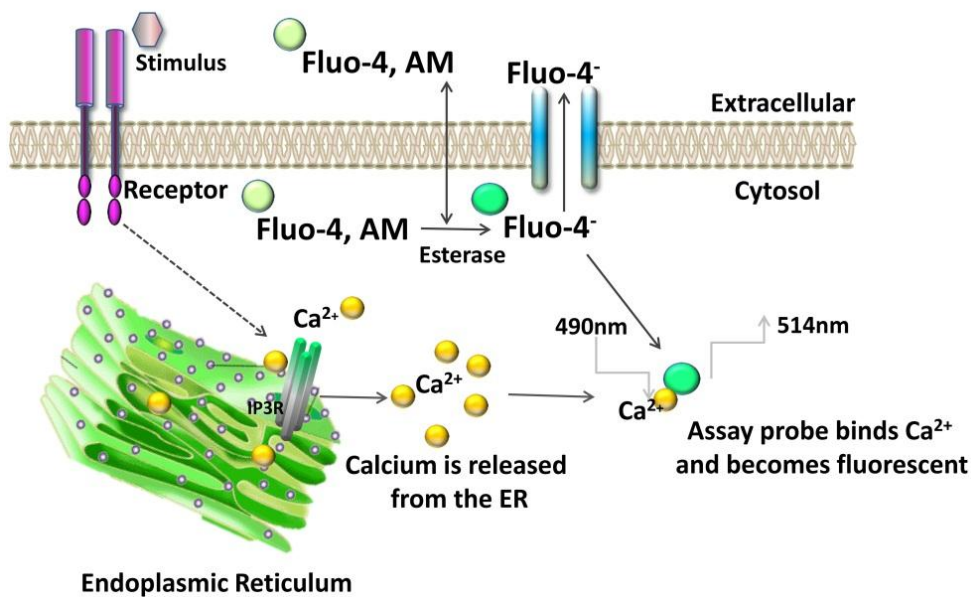
Ο φθορισμός του ελεύθερου Ca<sup>2+</sup> προσμετρήθηκε με τη χρήση της εμπορικής δοκιμασίας του Fluo-4 NW Calcium Assay Kit (F36206) της Molecular Probes, Invitrogen. Πρόκειται, για μια μεγάλης ευκρίνειας δοκιμασία καταμέτρησης του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup> με τη βοήθεια της χρωστικής Fluo-4, η οποία φθορίζει κατόπιν πρόσδεσής της στο Ca<sup>2+</sup>. Με τη βοήθεια του δείκτη Fluo-4 NW (No Wash), είναι δυνατή η παρακολούθηση πολύ μικρών συγκενρώσεων της τάξης μεγέθους των 100nM με 1μM, αλλά και γρήγορων αλλαγών στην εισροή Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα, μετά από διέγερση ή και αναστολή της απελευθέρωσής του από το ΕΔ. Επιπρόσθετα, η τεχνική αυτή εμφανίζεται σε πλεονεκτική θέση σε σχέση με χρησιμοποιούμενες μεθόδους, διότι δεν απαιτείται η απομάκρυνσή της χρωστικής από το τρυβλίο με πλύση.

Κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 35mm και σε συγκέντρωση 300.000/τρυβλίο. Την επόμενη μέρα αφαιρέθηκε από τα κύτταρα το μέσο καλλιέργειας προκειμένου να εξαλειφθούν τυχόν πηγές βασικού φθορισμού και το μέσο καλλιέργειας αντικαταστάθηκε από διάλυμα 1X Hank's balanced salt solution (HBSS) (παρέχεται από την εταιρεία), στο οποίο έχει προστεθεί το διάλυμα με τη χρωστική, εμπλουτισμένο με 20% με εμβρυικό ορό βοός (FCS) και 0,05 IU ηπαρίνης/ml. Κατόπιν, το τρυβλίο επώστηκε για 30 λεπτά σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Στη συνέχεια, σε ζωντανά κύτταρα και σε θάλαμο 37°C, καταγράφηκαν οι αλλαγές στο σήμα του φθορισμού απουσία ή παρουσία VEGF (50ng/ml) ως διεγέρτη. Όπου ήταν απαραίτητο προηγήθηκε επώαση με ειδικούς αναστολείς πριν από τη διέγερση με VEGF. Ως θετικός μάρτυρας για την απελευθέρωση του Ca<sup>2+</sup> χρησιμοποιήθηκε 1 U/ml θρομβίνης<sup>313</sup>. Οι εικόνες



ελήφθησαν κάθε 10 δευτερόλεπτα με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης Laser (Argon 488nm) Leica SP5. Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Image J.

Στην περίπτωση που τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNAs, κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 35mm και σε συγκέντρωση 150.00/τρυβλίο και την επόμενη μέρα ακολούθησε διαμόλυνση. Ύστερα από 48 ώρες, το μέσο καλλιέργειας των κυττάρων αφαιρέθηκε ακολούθησε η διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω.



**Εικόνα 2. :** Σχηματική απεικόνιση της σήμανσης του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup> με τη χρωστική Fluo-. Η χρωστική Fluo-4 εισέρχεται στο κύτταρο διαπερνώντας την κυτταρική μεμβράνη ως ακετοξυμεθυλικός εστέρας. Μόλις εισέλθει στο κυτταρόπλασμα υδρολύεται από ενδοκυτταρικές εστεράσες στην Fluo-4<sup>-</sup> μορφή που είναι ικανή να δεσμεύσει το ελεύθερο Ca<sup>2+</sup>.

## 2.3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.3.1 Απομόνωση, ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA

#### 2.3.1.1 Απομόνωση RNA

Για τη διαδικασία των μικροσυστοιχιών, στα πλαίσια προηγούμενης ερευνητικής μελέτης του εργαστηρίου, κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν για 6 ώρες σε θρεπτικό υλικό

μειωμένου ορού (M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS) και επώαστηκαν με VEGF (30ng/ml) για τα χρονικά διαστήματα των 3, 6, 12, 17 και 22 ωρών, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης μετά από ενεργοποίηση του αυξητικό παράγοντα. Ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του τυποποιημένου εμπορικού προϊόντος Rneasy Midi kit (QIAGEN). Η συγκέντρωση και η ποιότητα του RNA καθορίστηκαν και τα δείγματα σταλθήκαν για ανάλυση στις εγκαταστάσεις της maf VIB MicroArray Facility στο Βέλγιο.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό (M199 εμπλουτισμένο με 20% FCS). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα με VEGF (50ng/ml). Ακολούθησε συλλογή των κυττάρων κατόπιν τρυψινοποίησης και απομόνωση ολικού RNA από το κάθε δείγμα με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος Rneasy Mini kit (QIAGEN). Τέλος, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και υπολογισμός της συγκέντρωσης του RNA, όπως περιγράφεται παρακάτω.

### **2.3.1.2 Ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA και DNA**

Ο ποσοτικός και ποιοτικός έλεγχος του RNA πραγματοποιήθηκε με τον βιοαναλυτή RNA, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη εμπορική συσκευασία Agilent RNA 6000 Nano Kit, το οποίο περιλάμβανε τα ειδικά RNA Nano Chips, το Ladder που περιέχει τα πρότυπα μεγέθη αναφοράς, τη χρωστική RNA Nano Dye, τον ιχνηθέτη (σημαντήρας) RNA Nano Marker, καθώς και το μίγμα του πήγματος ηλεκτροφόρησης του RNA, Nano Gel Matrix. Η διαδικασία περιληπτικά περιλαμβάνει, τη φόρτωση του μίγματος τζελ-χρωστικής στη βάση του κάθε πηγαδιού του nano chip, τη φόρτωση του ιχνηθέτη σε όλα τα πηγάδια, και τέλος την προσθήκη του Ladder και του προς μέτρηση RNA, μετά από αποδιάταξή του, στους 70<sup>0</sup>C για 2 λεπτά. Τα αποτελέσματα όπως η συγκέντρωση, αλλά και ο συντελεστής καθαρότητας (RIN, RNA Integrity Number) του κάθε δείγματος, υπολογίζονται αυτόματα μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, με τη βοήθεια του λογισμικού Bioanalyzer 2100 Expert Software.

Η συγκέντρωσή του DNA υπολογίσθηκε φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm καθαρότητα και η καθαρότητα με βάση το λόγο  $A_{260}/A_{280}$ . Η συγκέντρωση του DNA υπολογίσθηκε με βάση τη σχέση: οπτική πυκνότητα ( $OD_{260} = 1$ ) αντιστοιχεί σε 50  $\mu\text{g}$  δίκλωνου DNA/ml διαλύματος από τον τύπο: Συγκέντρωση DNA =  $50 \times A_{260} \times \text{συντελεστή αραιώσης}$ . Καθαρό DNA θεωρήθηκε εκείνο που ο λόγος  $A_{260}/A_{280}$  ήταν μεταξύ 1.8-2.1. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (1.2% αγαρόζη, 0.02M MOPS, 6% Φορμαλδεΐδη) και σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0.02M MOPS, 6% Φορμαλδεΐδη).

### **2.3.2 Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης- qRT-PCR**

Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR). Η μέθοδος της qRT-PCR επιτυγχάνει υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας δοκιμασίας (kit) QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) ενός σταδίου. Κατά τη διάρκεια του πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιούνται οι παρακάτω αντιδράσεις:

1<sup>ο</sup> Στάδιο: Αντίστροφη μεταγραφή. Σε αυτό το πρώτο στάδιο, παράγεται το συμπληρωματικό DNA (cDNA) από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA) με την παρουσία ενός μίγματος ανάστροφων μεταγραφασών (Omniscript & Sensiscript).

2<sup>ο</sup> Στάδιο: Παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA που συγκεκριμένου γονιδίου με τη χρήση των κατάλληλων εκκινητών σύμφωνα με τις αρχές της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης με HotStarTaq DNA πολυμεράση. Η συγκεκριμένη DNA πολυμεράση έχει την ιδιότητα να παραμένει ανενεργή χωρίς καμιά ενζυματική δράση στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ένζυμο ενεργοποιείται από ένα βήμα 15 λεπτών επώασης στους 95<sup>ο</sup>C, το οποίο προστίθεται πριν από το κλασικό πρόγραμμα της PCR. Η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία της ασύμμετρης κυανικής χρωστικής SYBR Green I, η οποία έχει την ιδιότητα να δένεται στο δίκλωνο DNA και

εκπέμπει φθορίζον σήμα. Με τον τρόπο αυτό, πραγματοποιείται η ποσοτικοποίηση διαφορετικών στόχων χωρίς να χρειάζεται ανιχνευτής (probe) με ειδική αλληλουχία. Η χρωστική SYBR Green I εμφανίζει μήκος διέγερσης στα 494nm και εκπομπής 521nm. Η αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας του κάθε στόχου εξαρτάται από τον κύκλο στον οποίο παρατηρείται αύξηση του φθορισμού πέρα του βασικού φθορισμού (threshold cycle, Ct). Συνεπώς, με την qRT-PCR είναι δυνατή η ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση των δειγμάτων RNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, με τη χρήση γνωστών συγκεντρώσεων αρχικού RNA που χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό πρότυπης λογαριθμικής καμπύλης φθορισμού,  $Ct = \alpha \cdot \log(\text{συγκέντρωσης})$ .

Η παραπάνω διαδικασία της qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των μικροσυστοιχιών DNA όσον αφορά τα γονίδια του ενδιαφέροντός μας, ενώ παράλληλα μελετήθηκε περεταίρω και η γονιδιακή έκφραση, μετά από επαγωγή με VEGF και άλλων γονιδίων που συμμετέχουν στο μονοπάτι της UPR απόκρισης. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού (DnaStar) και η σύνθεσή τους πραγματοποιήθηκε στην MWG (Γερμανία). Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2.

Η προετοιμασία του μίγματος της αντίδρασης έγινε σε τελικό όγκο 10 ή 20 μl αναλόγως με το γονίδιο. Για τη σύνθεση του βασικού μίγματος χρησιμοποιήθηκε περίσσεια εκκινητών (0,3-1μM για τον κάθε εκκινητή), ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο παρείχε κατάλληλο μίγμα δεόξυριβονουκλεοτιδίων και  $MgCl_2$ , SYBR Green I ενώ προστέθηκε μίγμα δύο RNA πολυμερασών (Omniscrypt & Sensiscrypt), HotStarTaq DNA πολυμεράσης και τελικά το εκμαγείο. Τα δείγματα φορτώθηκαν σε ειδικά τριχοειδή (LightCycler® Capillaries) και η qRT-PCR έλαβε χώρα στο θερμικό κυκλοποιητή LightCycler 2.0 της εταιρίας O (Roche). Στον παρακάτω πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια του UPR.

**Πίνακας 2.2: Αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια του UPR**

Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία Εκκινητών	
	Πρόσθιος (Forward)	Αντίστροφος (Reverse)
<b>ATF6</b>	CCG-CAG-AAG-GGG-AGA-CAC-A	TCG-GAG-GTA-AGG-AGG-AAC-TGA-CG
<b>CHOP</b>	TCG-CCG-AGC-TCT-GAT-TGA-C	CCC-TGC-GTA-TGT-GGG-ATT-GAG
<b>DNAJB9</b>	GCA-TCA-GAG-CGC-CAA-ATC-A	CTG-CTC-AAA-ACA-ACT-TCC-ACT-ACC
<b>DTR</b>	GCT-CAA-GGA-ATC-GGC-TGG-GGA-CTG	TAG-ACG-GCA-ACT-GCG-GAC-GAA-CGA
<b>EDEM</b>	CTG-AGC-CTG-GCC-CAT-CTT-CCT-AT	AAC-CCT-CCC-TTG-CAC-CTA-TGA-T
<b>EIF2a</b>	TGC-CAC-GTT-GCC-AGG-ACA-GTA-T	CCT-TGG-GGC-AAT-GGA-GAA-AAA-G
<b>GADD34</b>	TTG-CCC-AGG-GGA-GGA-AGA-GAA-T	CCT-GGG-GTC-GGA-GCC-TGA-AGA-T
<b>GAPDH</b>	CGC-GCC-CCC-GGT-TTC-TAT	CCT-TCC-CCA-TGG-TGT-CTG-AGC
<b>GRP78</b>	GTG-GGG-TGA-GGG-GAG-GGA-GTA-T	AAG-CCG-AGC-ATG-GTG-GTA-ACA-AG
<b>HERPUD1</b>	AGC-AGA-CCA-GCC-CCT-CCT-TTA-TG	ACC-AAT-TTG-TAT-CAC-CGC-TTC-ACG
<b>HRD1</b>	AGT-GAG-AAC-CCC-TGG-GAC-AAC-AAG	CCT-CTG-GGG-TGG-ACT-CTG-GA
<b>NUCB1</b>	ACC-AAT-TTG-TAT-CAC-CGC-TTC-ACG	AGG-GGG-CGG-GCT-TCT-CTA-A
<b>XBP1</b>	ACA-GCG-CTT-GGG-GAT-CAT-GGA-TG	CTG-GGC-CTG-CAC-GTA-GTC-TGA-GT
<b>XBP1s</b>	CAG-GAT-TCT-GGC-GGA-TTG-ACT-C	CTG-GGG-AAG-GGC-ATT-TCA-AGA-A

#### 2.3.4 Σάρωση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR), RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Assay

Με τη βοήθεια της τυποποιημένης εμπορικής δοκιμασίας, RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array της εταιρίας SABiosciences πραγματοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας σάρωση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR). Με την τεχνολογία του συστήματος RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array είναι εφικτή η δημιουργία προφίλ γονιδιακής έκφρασης, εστιασμένο σε συγκεκριμένα μονοπάτια σηματοδότησης του κυττάρου χρησιμοποιώντας την μέθοδο της qRT-PCR. Πρόκειται για μια διευρυμένη qRT-PCR με προκαθορισμένους εκκινητές επιλεγμένων γονιδίων, χαρακτηριστικά για ένα μοριακό μονοπάτι, στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκαν γονίδια της UPR απόκρισης (Unfolded Protein Response) (Πίνακας 2.4). Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, κύτταρα HUVE που βρισκόταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό, ενεργοποιήθηκαν με τη προσθήκη VEGF (50 ng/ml) για 30 λεπτά και 1 ώρα. Ολικό RNA απομονώθηκε και μετατράπηκε σε πρώτη φάση σε cDNA με τη χρήση της εμπορικής συσκευασίας RT<sup>2</sup> First Strand kit, η οποία παρέχεται από τον κατασκευαστή. Κατόπιν, το cDNA προστέθηκε στο μίγμα RT<sup>2</sup> qPCR Master Mix το οποίο περιλαμβάνεται στη συσκευασία, σε όλα τα πηγάδια κατά μήκος PCR Array τρυβλίου, που περιείχαν τους προκαθορισμένους εκκινητές για τα γονίδια του ενδιαφέροντος. Το τελικό πείραμα της

## ΕΝΟΤΗΤΑ 2- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

---

qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή iCycler της Biorad. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε PCR Array τρυβλίο στο οποίο απουσίαζε μόνο το cDNA εκμαγείο. Με την παραπάνω μέθοδο, ελέγχθηκαν 84 γονίδια το προφίλ των οποίων είναι χαρακτηριστικό για την απόκριση των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά.

**Πίνακας 2.4 : Κατηγοριοποίηση των γονιδίων της UPR απόκρισης βάση της λειτουργίας τους**  
**Unfolded Protein Binding:** CALR, CANX, CCT4, CCT7, DNAJB2, DNAJB9, DNAJC10, DNAJC4, ERO1LB, HSPA1B, HSPA2, HTRA2, PFDN2, PFDN5, PPIA, SCAP, SEC63, SIL1, TCP1, TOR1A, UGCGL1.

**ER Protein Folding Quality Control:** EDEM1, EDEM3, GANAB, GANC, PRKCSH, RPN1, SERP1, ERP44, UGCGL1, UGCGL2.

**Regulation of Cholesterol Metabolism:** INSIG1, INSIG2, MBTPS1, MBTPS2, SCAP, SREBF1, SREBF2.

**Regulation of Translation:** EIF2A, EIF2AK3, PPP1R15A, SERP1.

**ER Associated Degradation (ERAD):** AMFR, DERL1, DERL2, EDEM1, FBXO6, HERPUD1, HTRA2, HTRA4, MBTPS1, MBTPS2, NPLOC4, NUCB1, OS9, SEL1L, SELS, SYVN1, SEC62, UBXLN4, VCP.

**Ubiquitination:** AMFR, EDEM3, HERPUD1, RNF139, RNF5, SEL1L, SEC62, UBE2G2, UBE2J2, UBXLN4, UFD1L, USP14, VCP.

**Transcription Factors:** ATF4, ATF6, ATXN3, CALR, CEBPB, CREB3, CREB3L3, ATF6B, DDIT3, ERN1, ERN2, MBTPS1, PFDN5, SCAP, SREBF1, SREBF2, XBP1.

**Protein Folding:** CALR, CANX, CCT4, CCT7, DNAJB2, DNAJB9, DNAJC10, DNAJC4, ERO1L, HSPA4L, PFDN2, PFDN5, PPIA, SEC63, SIL1, TCP1, TOR1A, ERP44, UGCGL1.

**Protein Disulfide Isomerization:** DDIT3, DNAJC10, ERO1L, ERO1LB, PDIA3, SELS, SREBF1, ERP44.

**Heat Shock Proteins:** DNAJB2, DNAJB9, DNAJC10, DNAJC3, DNAJC4, HSPA1L, HSPA4, HSPA5, HSPH1, SEC63.

**Apoptosis:** ARMET, ATXN3, BAX, CALR, CEBPB, DDIT3, EIF2AK3, ERN1, ERN2, HSPA1B, HTRA2, MAPK10, MAPK8, MAPK9, PDIA3, PPP1R15A, SELS, VCP.

### 2.3.5 Δοκιμασίες μεταγραφικής ενεργότητας με γονίδια αναφοράς

Κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο 12 φρεάτιων σε συγκέντρωση 100.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη μέρα διαμολύνθηκαν για 24 ώρες με το 5xATF6 γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης (luciferase report gene) ή pGL3-pro-5xERSE καθώς και το φορέα της Renilla, pRL-TK Renilla για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων των τιμών. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro σε πλήρες θρεπτικό μέσο, ενώ 24 ώρες αργότερα τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με 50 ng/ml VEGF ή 10μg/ml Tm για 2 και 6 ώρες. Η Tm χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας διότι είναι γνωστό ότι επάγει ισχυρά το 5xATF6 γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης<sup>207</sup>. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί καμία ενεργοποίηση χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος για την ικανότητα μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου αναφοράς και την ισχύ έκφρασης της firefly (*Photinus pyralis*) και Renilla (*Renilla*

*reniformis* or sea pansy) λουσιφεράσης διαδοχικά για το ίδιο δείγμα, με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος μέτρησης λουσιφεράσης (Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System) της Promega (Promega Corporation, Madison, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, σε λουμινόμετρο Berthold (junior EG G, Berthold).

Παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα κύτταρα HeLa τα οποία τοποθετήθηκαν σε 24-θέσεων φρεάτιο σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/φρεάτιο. Τα κύτταρα HeLa εκφράζουν στην επιφάνεια τους τον υποδοχέα του VEGF, VEGFR-2<sup>314</sup>, ενώ παράλληλα είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν το πλεονέκτημα του αυξημένου ποσοστού θετικής διαμόλυνσης συγκριτικά με τα HUVE. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής (siRNA) 20nM, έναντι της πρωτεΐνης IRE1 και ενός siRNA-μάρτυρα (SCR). Μετά το πέρας των 48 ωρών, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν για 24 ώρες με το 5xATF6 γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης (luciferase report gene), pGL3-pro-5xERSE καθώς και το φορέα της Renilla, pRL-TK Renilla χρησιμοποιώντας το λιπίδιο Effectene (Qiagen). Ακολούθησε, η επαγωγή των κυττάρων με 50 ng/ml VEGF ή 10μg/ml Tm για χρονικό διάστημα 2 ωρών και η μέτρηση της ενεργότητας της λουσιφεράσης έγινε όπως και προηγουμένως με το εμπορικό προϊόν της Promega

### **2.3.6 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση κατά Western**

Ολικά κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχτηκαν με τη χρήση διαλύματος φωσφορικών pH 7.0 (PBS) που περιείχε 1% SDS καθώς και 100μM αναστολέα πρωτεασών (phenylmethanesulphonylfluoride, PMSF). Στη συνέχεια, τα δείγματα επεξεργάστηκαν με τη βοήθεια υπέρηχων (Branson Digital Sonifier), 2 φορές για 10 δευτερόλεπτα και ακολούθησε βρασμός για 15 λεπτά, φυγοκέντρηση στα 11.200g για 20 λεπτά συλλογή του υπερκλειμένου.

Τα κυτταρικά εκχυλίσματα, μετά από κατάλληλη προετοιμασία και μέτρηση των συγκεντρώσεων της περιεχόμενης πρωτεΐνης με τη μέθοδο BCA, ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% ή 10%. Έπειτα, ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Schleicher and Schuell, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που περιγράφονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Για τον έλεγχο της

αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης, οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βιάφτηκαν με διάλυμα 0,1% Ponceau S για 1 λεπτό και ξεβιάφτηκαν μετά από πλύσεις με διπλά αποσταγμένο νερό.

Οι μεμβράνες επώαστηκαν για 20 λεπτά με 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα πλύσεων (Western: 10mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1% Tween-20, και 150 mM NaCl) για τη δέσμευση των μη ειδικών θέσεων πριν από την επώαση των μεμβρανών με τα πρώτα αντισώματα. Η παραπάνω επώαση πραγματοποιήθηκε, είτε για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, είτε στους 4 °C ολονυχτίως, σε 5% άπαχο γάλα ή 2% διαλύματος ζελατίνης σε διάλυμα πλύσεων, σύμφωνα με το εκάστοτε πρωτόκολλο της κάθε εταιρίας. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο σύντομες πλύσεις σε διάλυμα Western και τρεις πλύσεις των 10 λεπτών στο ίδιο διάλυμα. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) διαλυμένα σε 5% άπαχο γάλα σε διάλυμα Western, για μια ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως αναφέρεται παραπάνω. Για την εμφάνιση του σήματος χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) ή της εταιρείας Pierce.

### **2.3.6.1 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης**

Για τη μέτρηση συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (bikinchromic acid, βικινχρωμικό οξύ, PIERCE). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA (2μg/μl). Μετά από επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 37°C, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562nm. Ο χημικός μηχανισμός της μεθόδου στηρίζεται στην αντίδραση Biuret, σύμφωνα με την οποία ενώσεις, όπως οι πρωτεΐνες, που περιέχουν δύο ή περισσότερους πεπτιδικούς δεσμούς, σε αλκαλικές συνθήκες δημιουργούν σύμπλοκα με ιόντα  $\text{Cu}^{+2}$ . Στο αλκαλικό αυτό περιβάλλον τα ιόντα  $\text{Cu}^{+2}$  ανάγονται σε  $\text{Cu}^{+1}$ . Τα ανηγμένα κατιόντα χαλκού αντιδρούν με το βικινχρωμικό οξύ, με συνέπεια να παράγουν ένα έντονο μπλε-πράσινο χρώμα.



#### **2.4 Συνεστιακή μικροσκοπία**

Για τα πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο Leica TCS SP5, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite.

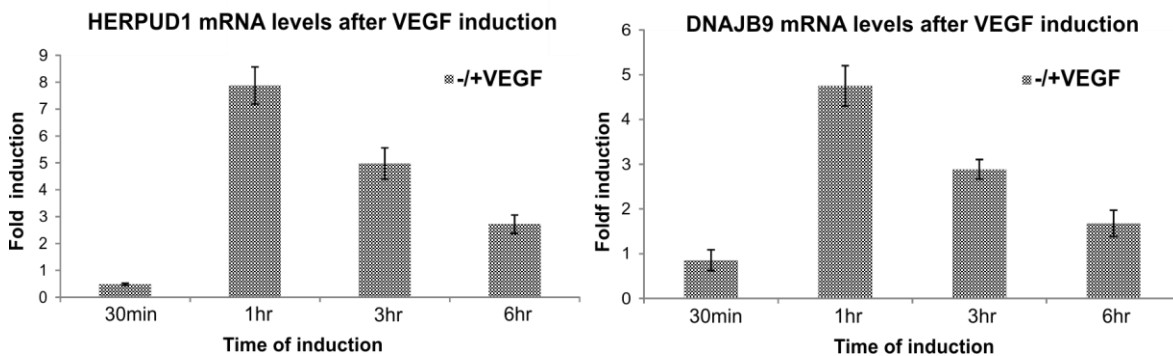


### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΤΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ *HERPUD1* ΚΑΙ *DNAJB9*

##### 3.1.1 Επιβεβαίωση της θετικής μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF με τη μέθοδο της qRT-PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην εισαγωγή (κεφάλαιο 1.4.1), η ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα με τη χρήση με μικροσυστοιχιών cDNA, έδειξε ότι τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9* επάγονται από τον VEGF (**VEGF-A**), ήδη από το πρώτο σημείο της κινητικής που μελετήθηκε (3 ώρες). Θελήσαμε λοιπόν, καταρχήν να επιβεβαιώσουμε τη θετική ρύθμιση των επιπέδων mRNA των δύο γονιδίων από τον VEGF και κατά δεύτερον, να ελέγξουμε αν αυτή η ρύθμιση παρατηρείται σε νωρίτερα χρονικά διαστήματα από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη μελέτη των μικροσυστοιχιών DNA. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε εκ νέου απομόνωση RNA από ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE, μετά από επαγωγή με VEGF για χρονικά διαστήματα των 30 λεπτών, 1 ώρας και 3 και 6 ωρών. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων με χρήση της μεθόδου της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1:** Επιβεβαίωση των πειραμάτων των μικροσυστοιχιών με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR) για τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*. Κύτταρα HUVE επώαστηκαν με VEGF (50 ng/ml), σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό, παρουσία ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες). Ολικό RNA, απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των δύο γονιδίων με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τέσσερις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

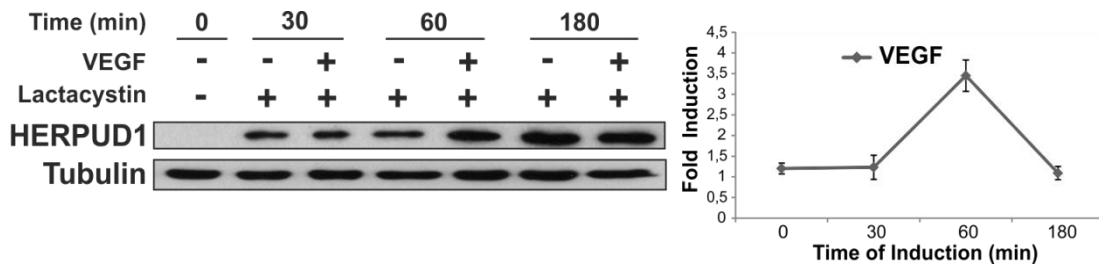
Μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων της qRT-PCR προκύπτει ότι τα επίπεδα του mRNA των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* αυξάνονται σχεδόν 6 με 7-φορές, μετά από μόλις 1 ώρα επαγωγής με VEGF (Εικόνα 3.1). Η επαγωγή αυτή συνεχίζει να υφίσταται μέχρι και τις 3 ώρες, ενώ εξασθενεί αισθητά μετά από 6 ώρες.

### 3.1.2 Ο VEGF αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης HERPUD1

Σε μεταφραστικό επίπεδο, έχει βρεθεί ότι η πρωτεΐνη HERPUD1 επάγεται ισχυρά ως απόκριση στο στρες του ΕΔ. Η πρωτεΐνη αυτή χαρακτηρίζεται από πολύ σύντομο χρόνο ημιζωής, περίπου 2.5 ώρες, καθώς αποικοδομείται ταχύτατα από το πρωτεάσωμα<sup>174</sup>. Το πρωτεάσωμα είναι ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα και αποτελεί κύριο μηχανισμό αποικοδόμησης των πρωτεϊνών που έχουν σημανθεί με αλυσίδες ουβικιτίνης (poly-ubiquitin chains). Προκειμένου, να εντοπιστούν οι πιθανές διαφορές στα πρωτεϊνικά επίπεδα της HERPUD1, κύτταρα HUVE προ-επώαστηκαν για χρονικό διάστημα 1 ώρας με 10μM λακτακυστίνη (Lactacystin), ενός ειδικού αναστολέα του πρωτεασώματος. Η λακτακυστίνη είναι μια ουσία που προσδένεται ομοιοπολικά και μη αντιστρεπτά στη β-υπομονάδα του πρωτεασώματος, εμποδίζοντας τη λειτουργία του<sup>315</sup>. Ο αναστολέας αυτός, έχει δειχτεί σε προηγούμενες μελέτες ότι επιβραδύνει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης HERPUD1<sup>174</sup>. Μετά το χρονικό διάστημα της 1 ώρας, τα κύτταρα επώαστηκαν με VEGF (50 ng/ml) για χρονικά διαστήματα 30 λεπτών, 1 ώρας, 3 και 6 ωρών. Ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, προκειμένου να ελεγχθεί η πρωτεϊνική έκφραση της πρωτεΐνης HERPUD1. Ο προσδιορισμός των ενδογενών πρωτεϊνικών επιπέδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης HERPUD1. Όσον αφορά την πρωτεΐνη DNAJB9, δεν ήταν εφικτή η καταμέτρηση ενδογενών πρωτεϊνικών επιπέδων της, καθώς τόσο το εμπορικό όσο και το αντίσωμα που κατασκευάστηκε στο εργαστήριο δεν ήταν ειδικό έναντι της πρωτεΐνης DNAJB9.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξε ότι η επαγωγή με VEGF προκαλεί αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της HERPUD1. Συγκεκριμένα, ο VEGF προκαλεί την αύξηση της πρωτεΐνης κατά 3.5 φορές μετά από χρονικό διάστημα μιας ώρας, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (κύτταρα που δεν έχουν επωαστεί με VEGF) (Εικόνα 3.2). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με

τη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου του *HERPUD1*. Πραγματοποιήθηκε πυκνομέτρηση κάθε ζώνης που προέκυψε από το αντίσωμα έναντι της *HERPUD1* και οι τιμές ομαλοποιήθηκαν με τη μέτρηση της έντασης των ζωνών της τουμπουλίνης (*Tubulin*), της οποίας η έκφραση δεν επηρεάζεται από τον VEGF και ο χρόνος ημιζωής της είναι μεγαλύτερος από 4 ώρες. (Εικόνα 3.2 δεξιά).



**Εικόνα 3.2:** Αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης *HERPUD1* μετά από επαγωγή με VEGF. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό, παρουσία ECGS. Στη συνέχεια, προεπώαστηκαν για 1 ώρα με 10μM λακτακυστίνη (*Lactacystin*) και ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για χρονικά διαστήματα των 30 λεπτών, 1 ώρας και 3 ωρών. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών *HERPUD1* και τουμπουλίνης (*Tubulin*). Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *Quantity One*. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

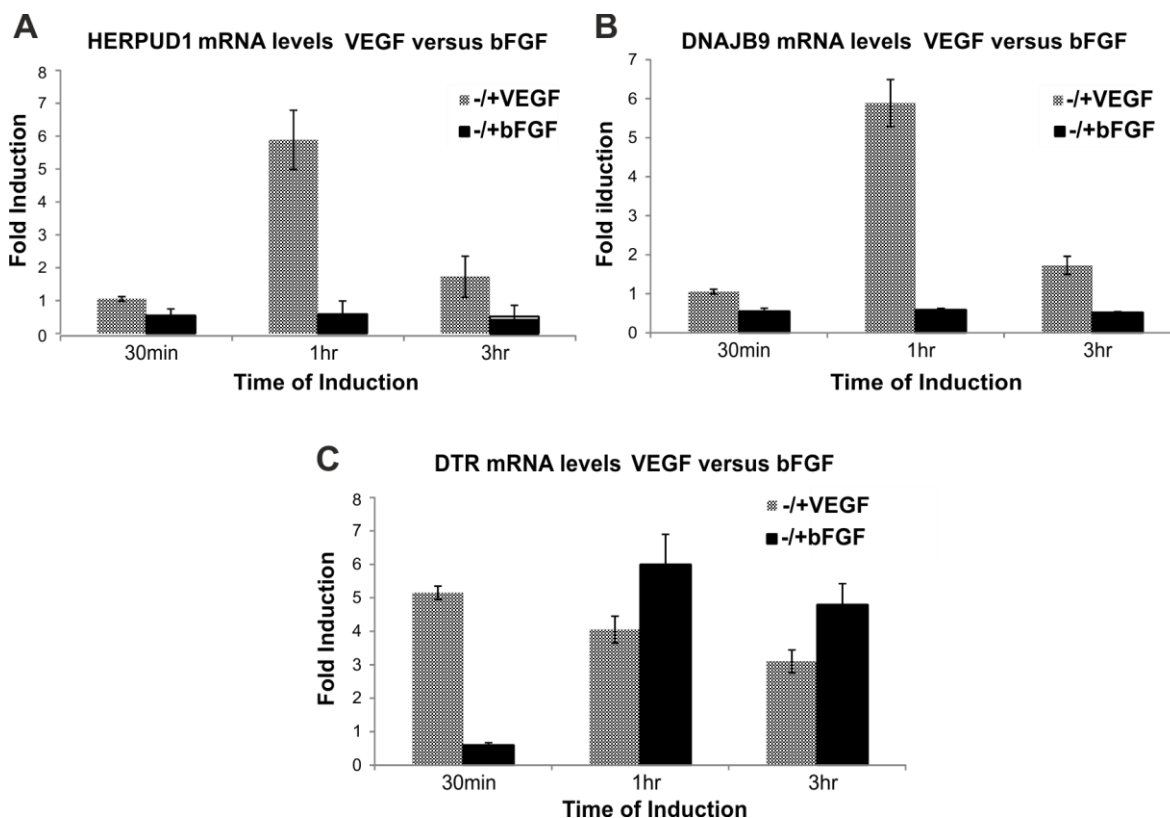
### 3.1.3 Η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF είναι ειδική

Η θετική ρύθμιση των δύο γονιδίων της UPR από τον VEGF, έθεσε το ερώτημα για το αν πρόκειται για μια εξειδικευμένη επαγωγή από τον VEGF ή για μια γενικευμένη απόκριση του ΕΔ και σε άλλους αυξητικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό, όμοια πειράματα όπως προηγουμένως πραγματοποιήθηκαν σε ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE παρουσία του βασικού ινοβλαστικού αυξητικού παράγοντα FGF2 ή bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor). Ολικό RNA απομονώθηκε, με βάση τις μεθόδους που περιγράφονται παραπάνω και ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων έγινε με τη βοήθεια της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR).

Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο *DTR* (*Diphtheria Toxin Receptor*), το mRNA του οποίου είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι επάγεται από τον FGF2<sup>316</sup>. Παράλληλα, το γονίδιο αυτό ρυθμίζεται θετικά και στατιστικά σημαντικά μετά από ενεργοποίηση με VEGF στο πείραμα των μικροσυστοιχιών DNA, στο πιο σύντομο

## ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

χρονικό διάστημα που μελετήθηκε (3 ώρες). Από τα αποτελέσματα της qRT-PCR φαίνεται ότι σε αντίθεση με τον VEGF, ο FGF2 δεν επάγει το mRNA των δύο γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* (Εικόνα 3.3 Α και Β). Αντίθετα, το γονίδιο του *DTR* επάγεται σημαντικά και από τους δύο αυξητικούς παράγοντες (Εικόνα 3.3 C).



**Εικόνα 3.3:** Η ρύθμιση των επιπέδων του mRNA των γονιδίων *HERPUD1*, *DNAJB9* και *DTR* από τον αυξητικό παράγοντα *FGF2*, σε σύγκριση με τον *VEGF*. Κύτταρα *HUVE* επώαστηκαν με *VEGF* (50 ng/ml) ή *FGF2* (10 ng/ml), σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και *ECGS*, για διάφορα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα, 3 ώρες). Ολικό RNA απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των τριών γονιδίων *HERPUD1*, *DNAJB9* και *DTR* με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

### 3.2 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΣΕ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΚΡΙΣΗΣ ΤΟΥ ΕΔ ΣΤΙΣ ΜΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον αυξητικό παράγοντα *VEGF* δημιούργησε νέα ερωτήματα όσον αφορά το μηχανισμό της επαγωγής αυτής. Είναι γνωστό ότι τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9* ενεργοποιούνται στα πλαίσια της απόκρισης στην παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ (UPR). Επόμενο

λοιπόν στόχο, της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση του ερωτήματος, αν ο VEGF ενεργοποιεί επιλεκτικά τη μεταγραφή των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* ή η επαγωγή της μεταγραφής τους είναι αποτέλεσμα δημιουργίας μιας γενικευμένης απόκρισης του ΕΔ από τον VEGF.

### 3.2.1 Ο VEGF επάγει ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων της UPR στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Προκειμένου, να δοθεί απάντηση στο παραπάνω κρίσιμο ερώτημα, πραγματοποιήθηκε σάρωση της μεταγραφικής έκφρασης των γονιδίων της UPR με qRT-PCR. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η τυποποιημένη εμπορική δοκιμασία RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array της εταιρίας SABiosciences. Πρόκειται, για μια qRT-PCR με προκαθορισμένους εκκινητές επιλεγμένων γονιδίων, χαρακτηριστικά για ένα συγκεκριμένο μοριακό μονοπάτι, στην προκειμένη περίπτωση αυτό της UPR (UPR, Unfolded Protein Response) (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι πίνακας 2.4). Το τελικό πείραμα της qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του θερμικού κυκλοποιητή iCycler της Biorad. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε PCR Array τρυβλίο στο οποίο απουσίαζε μόνο το εκμαγείο. Με την παραπάνω μέθοδο, ελέγχθηκαν 84 γονίδια. Μετά από στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, 41 γονίδια από τα συνολικά 84 βρέθηκαν να ρυθμίζονται θετικά από τον VEGF, 25 εκ των οποίων επάγονται ισχυρά (>10) ενώ 13 εμφανίζουν μικρότερο βαθμό επαγωγής (2<x<10) (Πίνακας 3.1).

Μια πρώτη επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της σάρωσης αποτελεί το γεγονός ότι τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9* βρέθηκαν, όπως ήταν αναμενόμενο, να επάγονται σε μεγάλο βαθμό από τον παράγοντα VEGF. Η ταξινόμηση των γονιδίων της UPR που επάγονται από τον VEGF, βάση της λειτουργίας τους (Πίνακας 3.2) έδειξε ότι αυτά κατανέμονται σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών, που περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς, μεταγραφικούς παράγοντες, γονίδια που συμμετέχουν στο ERAD, γονίδια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του Ca<sup>2+</sup> κ.τ.λ. Επιπρόσθετα, η κατανομή των γονιδίων της UPR που επάγονται από τον VEGF, σύμφωνα με το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης (Πίνακας 3.3), έδειξε ότι ο VEGF επάγει γονίδια «στόχους της UPR» (UPR target genes) που βρίσκονται καθοδικά και των τριών μονοπατιών της (IRE1, ATF6 και PERK). Ένας μεγάλος αριθμός των γονιδίων που επάγονται από τον VEGF ρυθμίζεται από

## ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

περισσότερα του ενός μονοπατιών της UPR, ενώ υπάρχουν γονίδια τα οποία επάγονται με συνεργιστική ρύθμιση και των τριών μονοπατιών (Πίνακας 3.3 και εικόνα 3.4).

**Πίνακας 3.1: Γονίδια της UPR που επάγονται (ρυθμίζονται) από τον VEGF σε 30 λεπτά**

Ισχυρά ρυθμιζόμενα (>10)	Ρυθμιζόμενα (2<x<10)
AGE-R2/G19P1 (Protein kinase C substrate 80K-H)	ARP/MANF (Arginine-rich, mutated in early stage tumors)
CCT-alpha/CCT1 (T-complex 1)	ATF6A (Activating transcription factor 6)
CCT-ETA/CctH (Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta))	BIP/GRP78(Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa))
CDA02/EIF-2A (Eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa)	C1orf22/EDEM3 (ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3)
CEBPZ/CHOP (DNA-damage-inducible transcript 3)	CREB-2/CREB2 (Activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67))
DANJC4/HSPF2 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 4)	CYPA/CYPH (Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A))
DKFZp564F1862/ERdj4 (DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9)	ERO1LB (ERO1-like beta)
DKFZp686A15286/NUC (Nucleobindin 1)	HSP70-1L/HSP70-HOM(Heat shock 70kDa protein 1-like)
DKFZp686B16177/OST1 (Ribophorin)	IRE1/IRE1P (Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1)
DQ2/DYT1 (Torsin family 1, member A (torsin A))	MGC26273 (Insulin induced gene 2)
ER60/ERp57/PDI3 (Protein disulfide isomerase family A, member 3)	PCSK8/S1P (PCSK8/S1P) (Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1)
G2AN/GluI (Glucosidase, alpha; neutral AB)	PDIA10/TXNDC4 (Endoplasmic reticulum protein 44)
GADD34 ((Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A))	TREB5/XBP2 (X-box binding protein 1)
HERP/Mif1(Homocysteine-inducible, ER stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1)	
HRCA1/RCA1 (Ring finger protein 139)	
HSP70-1B/HSP70-2 (Heat shock 70kDa protein 1B)	
IBD2/PRO1063 (Sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans))	
JNK/JNK1 (Mitogen-activated protein kinase 8)	
JNK-55/JNK2 (Mitogen-activated protein kinase9)	
MM-1/MM1 (Prefoldin subunit 5)	
NCUBE2/PRO2121 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast))	
OS-9 (Osteosarcoma amplified 9, endoplasmic reticulum associated protein)	
RING5/RMA1 (Ring finger protein 5)	
UBXD2/UBXDC1 (UBX domain protein 4)	
UFD1 (Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast))	



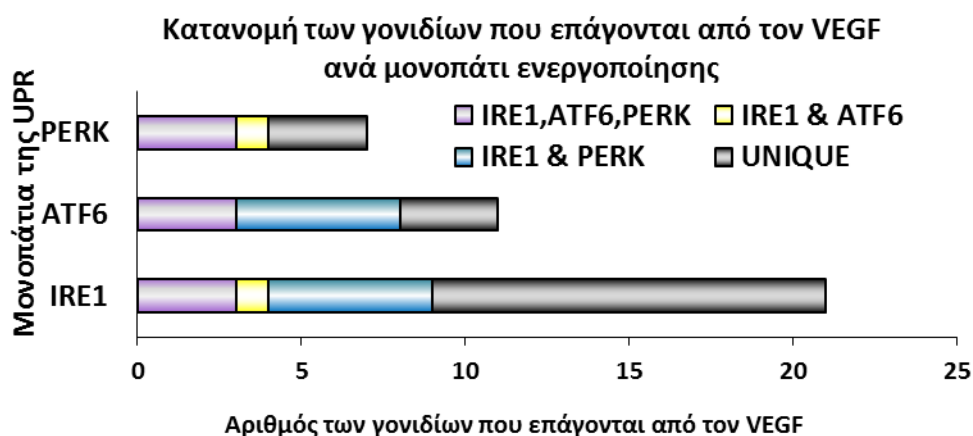
**Πίνακας 3.2: Ταξινόμηση των γονιδίων της UPR που επάγονται από τον VEGF με βάση τη λειτουργία τους**

<b>Πρωτεΐνες συνοδοί (Chaperones)</b>	
Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	CCT-ETA/Ccth
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	DNAJB9/ERdj4
Prefoldin subunit 5	MM-1/MM1
Protein disulfide isomerase family A, member 3	ER60/ERp57
T-complex 1	CCT-alpha/CCT1
Torsin family 1, member A (torsin A)	DQ2/DYT1
<b>Πρωτεΐνες του ERAD</b>	
Ataxin 3	AT3/ATX3
ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	C1orf22/EDEM3
Homocysteine-inducible, EP stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	HERP/Mif1
Osteosarcoma amplified 9,ER associated protein	OS-9
Ribophorin I	DKFZp686B16177/OST1
Ring finger protein 139	HRCA1/RCA1
Ring finger protein 5	RING5/RMA1
Ubiquitin fusion degradation 1 like (yeast)	UFD1
Ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	NCUBE2/PRO2121
UBX domain protein 4	UBXD2/UBXDC1
Sel-1 suppressor of lin-12-like	IBD2/PRO1063
<b>Πρωτεΐνες ρυθμιστές του Ca<sup>2+</sup></b>	
Endoplasmic reticulum protein 44	PDIA10/TXNDC4
Nucleobindin 1	DKFZp686A15286/NUC
<b>Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSP70)</b>	
Heat shock 70kDa protein 1B	HSP70-1B/HSP70-2
Heat shock 70kDa protein 1-like	HSP70-1L/HSP70-HOM
<b>Κινάσες</b>	
Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1	IRE1/IRE1P
Mitogen-activated protein kinase 8	JNK/JNK1
Mitogen-activated protein kinase 9	JNK-55/JNK2
Protein kinase C substrate 80K-H	AGE-R2/G19P1
<b>Μεταγραφικοί παράγοντες</b>	
Activating transcription factor 4	CREB-2/CREB2
Activating transcription factor 6	ATF6A
CAMP responsive element binding protein 3	LUMAN/LZIP
DNA-damage-inducible transcript 3	CEBPZ/CHOP
X-box binding protein 1	TREB5/XBP1
<b>Άλλες λειτουργίες</b>	
Arginine-rich, mutated in early stage tumors	ARP/MANF
ERO1-like beta	ERO1LB
Eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa	CDA02/EIF-2A
Glucosidase, alpha; neutral AB	G2AN/GluII
Insulin induced gene 2	MGC26273
Membrane-bound transcription factor peptidase, site 1)	PCSK8/S1P (PCSK8/S1P)
Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	CYPA/CYPH
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	GADD34

### ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

**Πίνακας 3.3:** Κατανομή των γονιδίων που επάγονται από τον VEGF ανά UPR μονοπάτι ενεργοποίησης

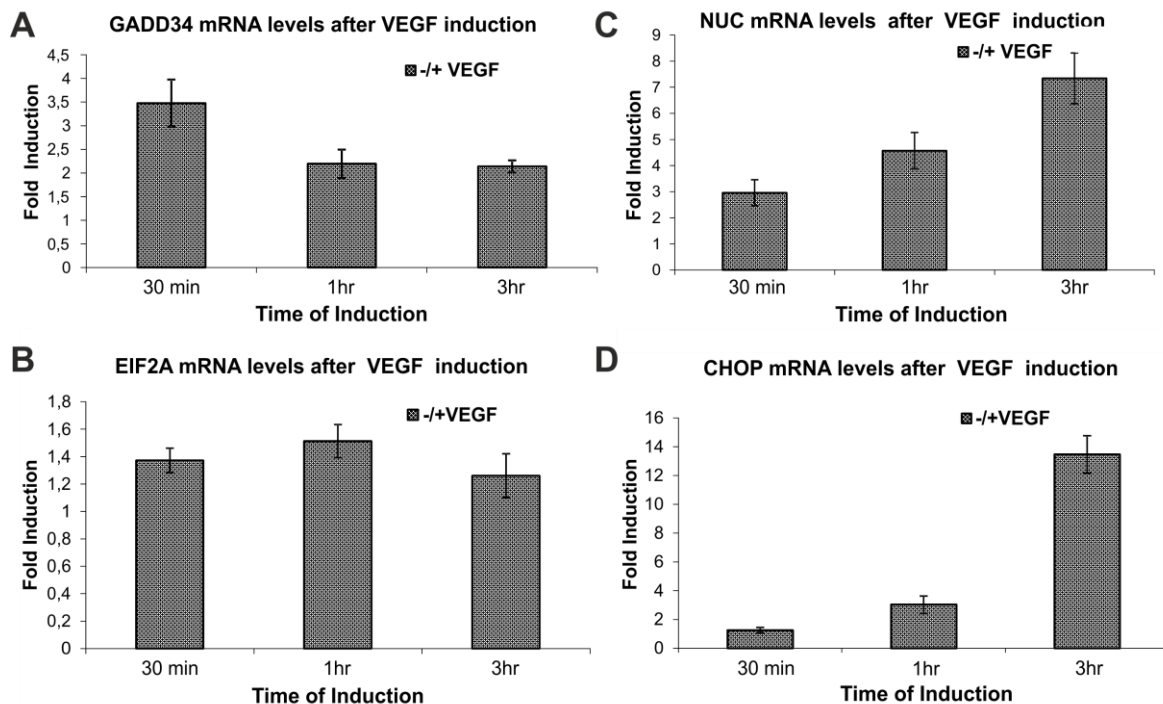
IRE1	ATF6	PERK	Μη ταξινομημένα
CEBPZ/CHOP	CEBPZ/CHOP	CEBPZ/CHOP	AGE-R2/G19P1
LUMAN/LZIP	LUMAN/LZIP	LUMAN/LZIP	DKFZp686B16177/O ST1
HERP/Mif1	HERP/Mif1	HERP/Mif1	G2AN/GluI1
ERO1LB		ERO1LB	MM-1/MM1
ARP/MANF	ARP/MANF	CREB-2/CREB2	OS-9
NCUBE2/PRO2121	1 NCUBE2/PRO212	GADD34	PCSK8/S1P (PCSK8/S1P)
HRCA1/RCA1	HRCA1/RCA1	CDA02/EIF-2A	UBXD2/UBXDC1
RING5/RMA1	RING5/RMA1		UFD1
TREB5/XBP2	TREB5/XBP2		
HSJ1/HSPF3	ATF6A		
DANJC4/HSPF2	HSP70-1L/HSP70- HOM		
DKFZp564F1862/E Rdj4	HSP70- 1B/HSP70-2		
IRE1/IRE1P			
C1orf22/EDEM3			
PDIA10/TXNDC4			
JNK/JNK1			
JNK-55/JNK2			
ER60/ERp57/PDI3			
CCT-ETA/Ccth			
CCT-alpha/CCT1			



**Εικόνα 3.4:** Γραφική αναπαράσταση της κατανομής, των γονιδίων που επάγονται VEGF, στα τρία μονοπάτια της UPR που διαμεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες IRE1, ATF6 και PERK.

### 3.2.2 Επιβεβαίωση της επαγωγής των γονιδίων της UPR από τον VEGF

Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της σάρωσης πραγματικού χρόνου RT-PCR, πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές qRT-PCR με εκκινητές έναντι συγκεκριμένων γονιδίων. Έτσι επιλέχθηκε προς μελέτη ένας αριθμός χαρακτηριστικών για την UPR γονιδίων που εμφανίζουν ενδιαφέρον. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ολικό RNA που απομονώθηκε για το πείραμα της σάρωσης. Τα αποτελέσματα των qRT-PCR επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα της σάρωσης. Όπως είναι εμφανές και από την παρακάτω εικόνα 3.5, ο VEGF σε συμφωνία με τα προηγούμενα αποτελέσματα, ρυθμίζει τα μεταγραφικά επίπεδα σημαντικών γονιδίων όπως *CHOP* και *NUC*, ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά τα επίπεδα mRNA των γονιδίων του *eIF2a* και *GADD34*.



**Εικόνα 3.5:** Επιβεβαίωση της ρύθμισης του mRNA των γονιδίων της UPR από τον VEGF. Κύτταρα HUVE επώστηκαν με VEGF (50 ng/ml) σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα, 3 ώρες). Ολικό RNA, απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των τριών γονιδίων *GADD34*, *CHOP*, *NUC* και *EIF2a* με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

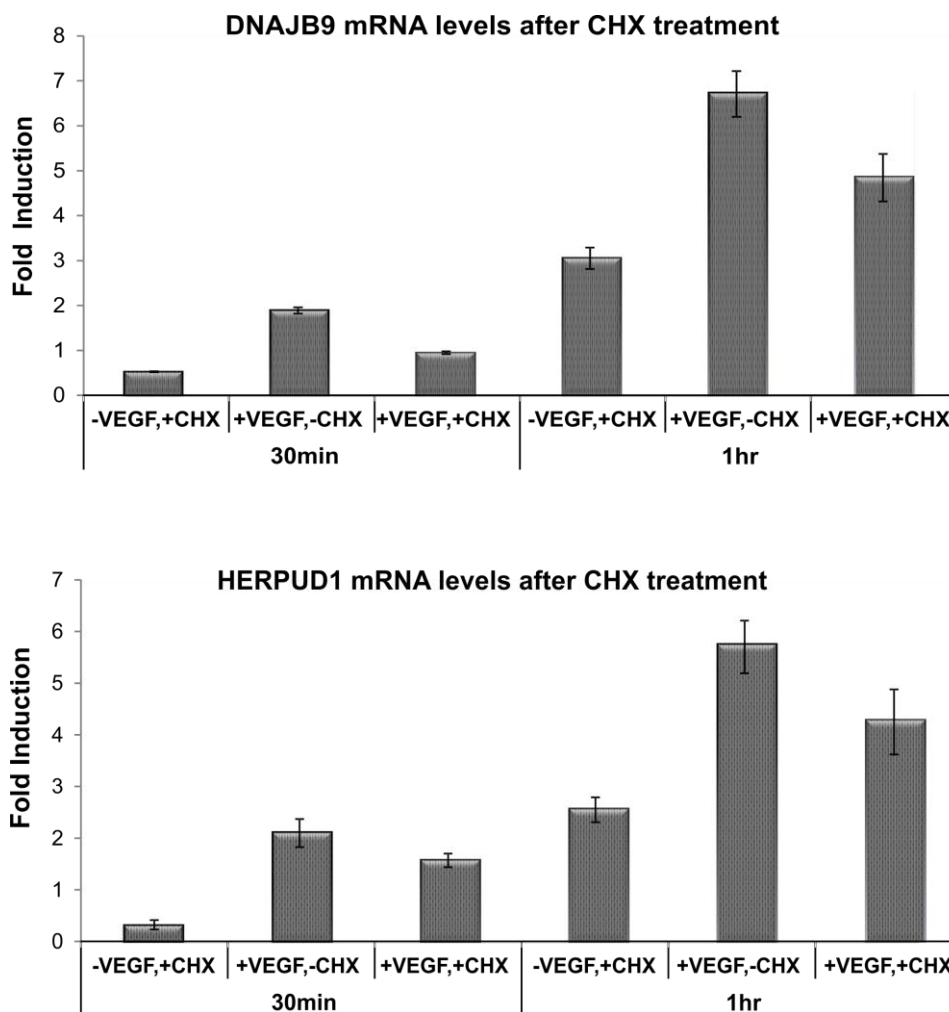
### **3.3 Ο VEGF ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΕΙ ΤΗΝ UPR ΔΙΑΜΕΣΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΟΧΙ ΥΠΕΡΦΟΡΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΕΔ ΜΕ ΜΗ ΑΝΑΔΙΠΛΩΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν, για πρώτη φορά, ότι ο VEGF αποτελεί παράγοντα μεταγραφικής ρύθμισης των γονιδίων της UPR. Ταυτόχρονα, δεν υπάρχει αμφιβολία ότι η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF αποτελεί μέρος μιας γενικευμένης απόκρισης του ΕΔ. Δημιουργείται επομένως το ερώτημα, για το μηχανισμό με τον οποίο ο VEGF προκαλεί την UPR στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι γνωστό ότι ο VEGF είναι ένας εκκριντικός παράγοντας, παρουσία του οποίου αυξάνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει, πως αυτή η υπερφόρτωση του ΕΔ με πρωτεΐνες προκαλεί στρες στο ΕΔ και ενεργοποιεί την UPR. Από τα μέχρι τώρα πειράματα είναι σαφές ότι η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων της UPR από τον VEGF κορυφώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, εντός 30-60 λεπτών. Από την άλλη, είναι γνωστό ότι η διατάραξη της ομοιοστασίας του ΕΔ, κατόπιν προσθήκης στα κύτταρα δύο χημικών παραγόντων που χρησιμοποιούνται ευρέως ως επαγωγείς της UPR, της Tunicamycin και της Thapsigargin, δίνει εντελώς διαφορετική εικόνα επαγωγής. Η φαρμακευτικά προκαλούμενη UPR αυξάνει τη μεταγραφή των γονιδίων μετά από αρκετές ώρες (3 ως 8 ώρες)<sup>317</sup>. Με βάση τις πρώτες αυτές παρατηρήσεις, θελήσαμε να εξετάσουμε κατά πόσο η απόκριση του ΕΔ στον VEGF είναι άμεση, μέσω των σηματοδοτικών του μονοπατιών και όχι αποτέλεσμα υπερφόρτωσης του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες.

#### **3.3.1 Η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης δεν εξαλείφει τη μεταγραφική επαγωγή των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* από τον VEGF**

Προκειμένου να δοθεί απάντηση στο παραπάνω ερώτημα, κύτταρα στα οποία είχε ανασταλεί η πρωτεϊνοσύνθεση μετά από χορήγηση κυκλοεξιμίδιου (Cycloheximide, CHX) ενεργοποιήθηκαν με VEGF και στη συνέχεια μελετήθηκε η ενεργοποίηση των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9*. Συγκεκριμένα, κύτταρα HUVE προ-επωάστηκαν για 1 ώρα με CHX (50μg/ml) και στη συνέχεια έγινε επαγωγή με VEGF (50ng/ml) για 30 λεπτά και για 1 ώρα. Ακολούθησε, η απομόνωση ολικού RNA και ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια της qRT-PCR όπως περιγράφεται παραπάνω.

Παρά την παρουσία CHX, η οποία αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση μειώνοντας τον αριθμό των πρωτεϊνών στο ΕΔ, η προσθήκη VEGF συνεχίζει να επάγει σε μεταγραφικό επίπεδο, αν και σε μικρότερο βαθμό, τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9* (Εικόνα 3.6). Τα δεδομένα αυτά αποτελούν μια πρώτη ένδειξη, υπέρ της υπόθεσης ότι η μεταγραφική ρύθμιση από τον VEGF είναι άμεση, χωρίς να είναι απαραίτητη προϋπόθεση η συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ.



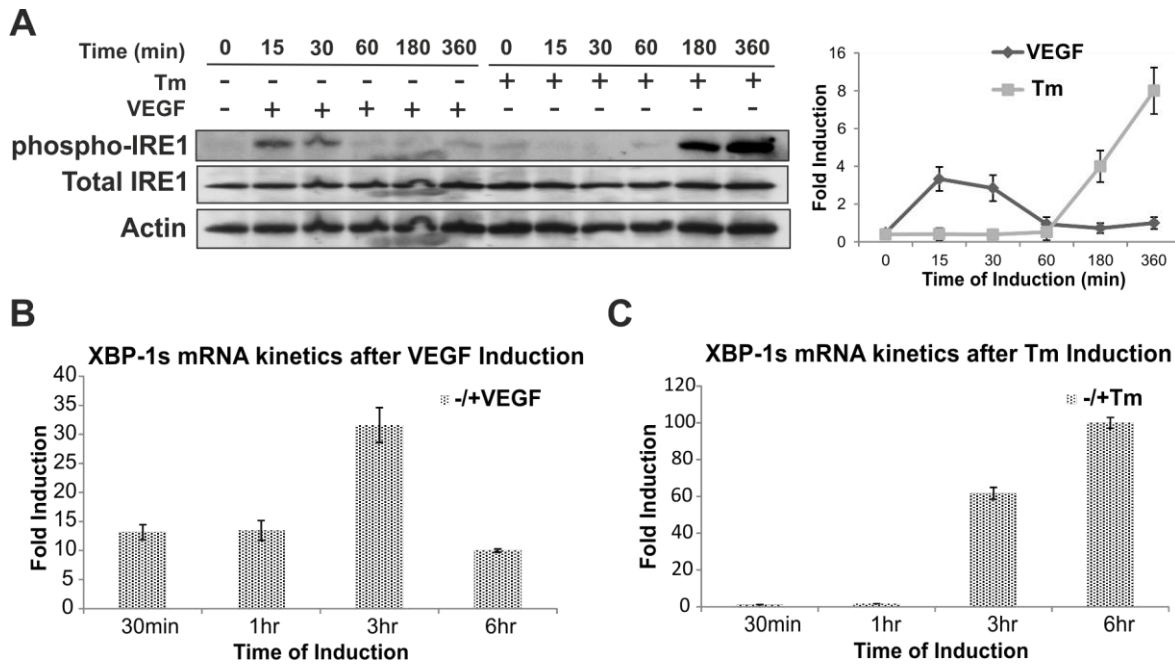
**Εικόνα 3.6:** Η κινητική των επιπέδων mRNA των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* μετά από επαγωγή με VEGF, απουσία ή παρουσία CHX. Κύτταρα HUVE προ-επωάστηκαν με τον αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης CHX (50μg/ml) για 1 ώρα και ακολούθησε προσθήκη VEGF (50 ng/ml) σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% ορού και ECGS, για 30 λεπτά και για 1 ώρα. Ολικό RNA απομονώθηκε, ποσοτικοποιήθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των δύο γονιδίων, *HERPUD1* και *DNAJB9* με τη μέθοδο της qRT-PCR. Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει τις φορές της επαγωγής των τιμών του άξονα χ ως προς την τιμή -VEGF, -CHX. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

### 3.3.2 Ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης IRE1 από τον VEGF εντός 15 λεπτών

Η πρωτεΐνη IRE1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη του ΕΔ με διπλή ενεργότητα, κινάσης και ενδοριβονουκλεάσης (RNase) στην κυτταροπλασματική της περιοχή<sup>318,319</sup>. Η ενεργοποίησή της, κατόπιν αποδέσμευσής της από την συνοδό πρωτεΐνη BIP, περιλαμβάνει το διμερισμό της πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα ενεργοποιεί και τη δραστικότητα RNάσης με αυτοφωσφορυλίωση<sup>216,217</sup>. Μετά από την *trans*-αυτοφωσφορυλίωση της η IRE1 λειτουργεί ως ενδοριβονουκλεάση έχοντας ως μοναδικό υπόστρωμα το mRNA του bZIP (basic leucine-zipper-containing) μεταγραφικού παράγοντα XBP1 (x-binding protein 1). Με τη σειρά του, ο ενεργοποιημένος μεταγραφικός παράγοντας XBP1 (XBP1s) επάγει ισχυρά έναν αριθμό UPR γονιδίων «στόχων», όπως το γονίδιο του *DNAJB9*.

Αρχικά, ερευνήσαμε την κινητική της φωσφορυλίωσης της IRE1 μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF και τη συγκρίναμε με αυτή που προκαλείται παρουσία της Tunicamycin. Η Tunicamycin (Tm) παράγεται από βακτήρια του γένους *Streptomyces* και λειτουργεί ως αναστολέας της N-συσχετιζόμενης γλυκοσυλίωσης και κατά συνέπεια των N-γλυκοσιδικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και υδατανθράκων<sup>309</sup>. Η χορήγησή της έχει ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ, για αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως σε πειραματικές διαδικασίες για την επαγωγή της UPR. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό, παρουσία ECGS, στα οποία προστέθηκε VEGF (50ng/ml) ή Tunicamycin (Tm) (10μg/ml) για χρονικά διαστήματα 15, 30 λεπτών, 1 ώρας, 3 και 6 ωρών. Κατόπιν ενεργοποίησης των κυττάρων, κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με τη μέθοδο που περιγράφεται αναλυτικά παραπάνω και τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IRE1 ελέγχθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης IRE1.

Παρατηρούμε ότι ο VEGF επάγει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1 εντός 15 λεπτών, ενώ η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1 από την Tm είναι εμφανής μετά από 3 ώρες (Εικόνα 3.7 A). Η ίδια εικόνα παρατηρείται και στην περίπτωση του γονιδίου *XBP1*, καθώς το μάτισμα του mRNA του από τη φωσφορυλιωμένη πρωτεΐνη IRE1, αρχίζει μετά από 30 λεπτά υπό την παρουσία VEGF (Εικόνα 3.7 B) και μετά από 3 ώρες επαγωγής με Tm (Εικόνα 3.7 C).



**Εικόνα 3.7:** (A) Ο VEGF επάγει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1 άμεσα και με διαφορετικό μοτίβο ενεργοποίησης από την Tunicamycin (Tm). Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και ECGS. Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) ή Tunicamycin (Tm) (10μg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες). Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης IRE1, της ολικής IRE1 και της πρωτεΐνης ακτίνης (Actin). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τέσσερις ανεξάρτητες φορές.

(B) Ο VEGF ενεργοποιεί το μάτισμα του μεταφραφικού παράγοντα XBP1. (C) Η Tm ενεργοποιεί το μάτισμα του μεταφραφικού παράγοντα XBP1 πολύ αργότερα από τον VEGF. Όμοια, μετά από επαγωγή (30 λεπτών, 1 ώρας, 3 και 6 ωρών). Ολικό RNA, απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των δύο γονιδίων με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

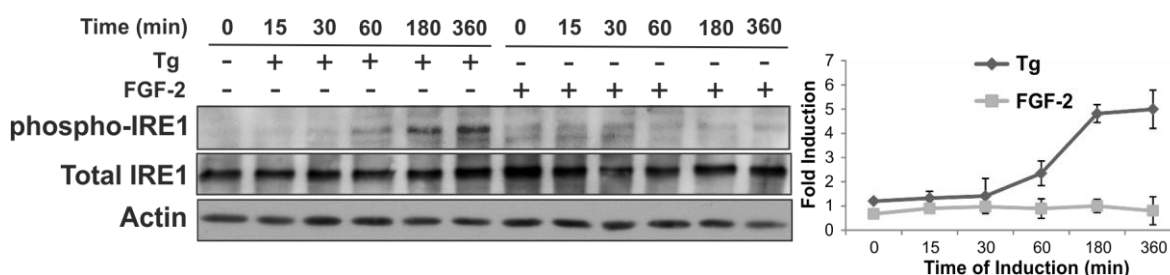
Η ταχύτατη, εντός 15min, φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1 από τον VEGF αποκλείει την ενεργοποίηση της εξαιτίας υπερφόρτωση του ΕΔ λόγω αυξημένης πρωτεϊνοσύνθεσης. Πράγματι, η χρήση Tm η οποία οδηγεί σε υπερφόρτωση του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, απαιτεί 3 ώρες για να φωσφορυλιώσει την πρωτεΐνη IRE1. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1 από τον VEGF εξαφανίζεται σε χρονικό διάστημα μεταξύ 30 και 60 λεπτών, ως αποτέλεσμα σηματοδοτικής ενεργοποίησης, ενώ αντίθετα η φωσφορυλίωση παρουσία Tm είναι ακόμη ισχυρότερη στις 6 ώρες. Αυτό συμβαίνει διότι, συσσωρευμένες μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες συνεχίζουν να



## ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ενεργοποιούν, για μεγάλο χρονικό διάστημα την UPR δημιουργώντας ένα παρατεταμένο, μη αντιστρεπτό στρες στο ΕΔ.

Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με τον αυξητικό παράγοντα FGF2 (10 ng/ml) ή Thrapisgargin (Tg) (10 μM) αντί για VEGF ή Tm, αντίστοιχα. Η χημική ένωση Thrapisgargin (Tg) είναι γνωστή για την επαγωγή της UPR, μέσω της δράσης της ως αναστολέας της αντλίας ιόντων  $Ca^{2+}$  ( $Ca^{2+}$ -ATPase) στον αυλό του ΕΔ<sup>181</sup>. Είναι ξεκάθαρο ότι ο FGF2 δεν προκαλεί φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1, ενώ η χρήση Tg προκαλεί σαφή φωσφορυλίωση στις 3 ώρες (Εικόνα 3.8). Η αδυναμία ενεργοποίησης του μονοπατιού της πρωτεΐνης IRE1 από τον FGF2 αποτελεί μια ακόμη ισχυρή απόδειξη ότι η επαγωγή της UPR από τον VEGF είναι ειδική.



**Εικόνα 3.8:** Ο FGF2 σε αντίθεση με την Thrapisgargin (Tg), δεν επάγει τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό ηπαρίνης και ECGS. Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) ή Thrapisgargin (Tg) (10 μM) για διάφορα χρονικά διαστήματα (15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες). Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης IRE1, της ολικής IRE1 και της πρωτεΐνης ακτίνης (Actin). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

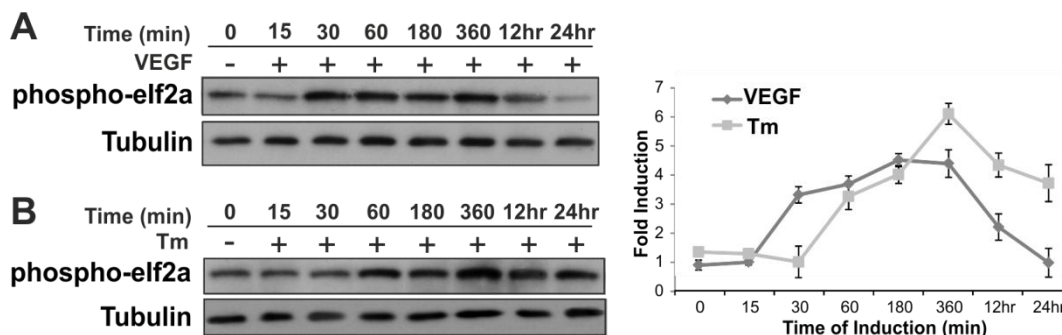
### 3.3.3 Ο VEGF ενεργοποιεί το μονοπάτι καθοδικά της πρωτεΐνης PERK εντός 30 λεπτών

Η πρωτεΐνη PERK χαρακτηρίζεται από μεγάλη φυλογενετική συγγένεια με την πρωτεΐνη IRE1. Αμφότερες οι IRE1 και PERK, είναι διαμεμβρανικές τύπου I πρωτεΐνες που εδράζονται στη μεμβράνη του ΕΔ και αποτελούνται από μια όμοια περιοχή εσωτερικά προς τον αυλό του ΕΔ και ένα κυτταροπλασματικό τμήμα. Η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης PERK, ως αποτέλεσμα απελευθέρωσης της πρωτεΐνης BiP, σε αντίθεση με την πρωτεΐνη IRE1 η οποία έχει ως μοναδικό υπόστρωμα τον εαυτό της, ακολουθείται από ολιγοδιμερισμό και *trans*-αυτοφωσφορυλίωση. Η φωσφορυλιωμένη PERK με τη σειρά



της, φωσφορυλιώνει την α-υπομονάδα του μεταφραστικού παράγοντα eIF2α (eukaryotic translation initiation factor-2) στη σερίνη 51 (Ser51)<sup>196</sup>. Η φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α αναστέλλει τη συγκρότηση του 80S ριβοσώματος και επομένως και τη σύνθεση των πρωτεϊνών<sup>188</sup>.

Η προσπάθεια άμεσης ανίχνευσης της φωσφορυλίωσης της PERK από τον VEGF δεν κατέστη δυνατή, λόγω της κακής ποιότητας των εμπορικά διαθέσιμων αντισωμάτων. Αντίθετα, η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης μορφής του μεταφραστικού παράγοντα eIF2α, καθοδικού στόχου της ενεργοποιημένης πρωτεΐνης PERK, ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Τα ολικά επίπεδα των πρωτεϊνών ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέτρηση της έντασης των ζωνών της πρωτεΐνης τουμπουλίνης (Tubulin). Ο VEGF επάγει τη φωσφορυλίωση του eIF2α σε 30 λεπτά και τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης παραμένουν ανιχνεύσιμα μέχρι τις 6 ώρες όποτε και αρχίζουν να μειώνονται για να εξαφανιστούν μετά από 24 ώρες (Εικόνα 3.9 Α). Η παράλληλη χρονικά επαγωγή με Tm δίνει διαφορετικό πρότυπο ενεργοποίησης αφού ξεκινά μετά από 1 ώρα, μειώνεται αλλά παραμένει και μετά από 24 ώρες (Εικόνα 3.9 Β).



**Εικόνα 3.9:** Η επαγωγή της φωσφορυλίωσης του eIF2α (A) από τον VEGF και (B) την Tm. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και ECGS. Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) ή Tupicamycin (Tm) (10μg/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες). Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης της ολικής eIF2α και της πρωτεΐνης τουμπουλίνης (Tubulin). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τέσσερις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

Όπως και στην περίπτωση του μονοπατιού της πρωτεΐνης IRE1, το μονοπάτι καθοδικά της πρωτεΐνης PERK ενεργοποιείται από τον VEGF εντός 30 λεπτών. Η γρήγορη

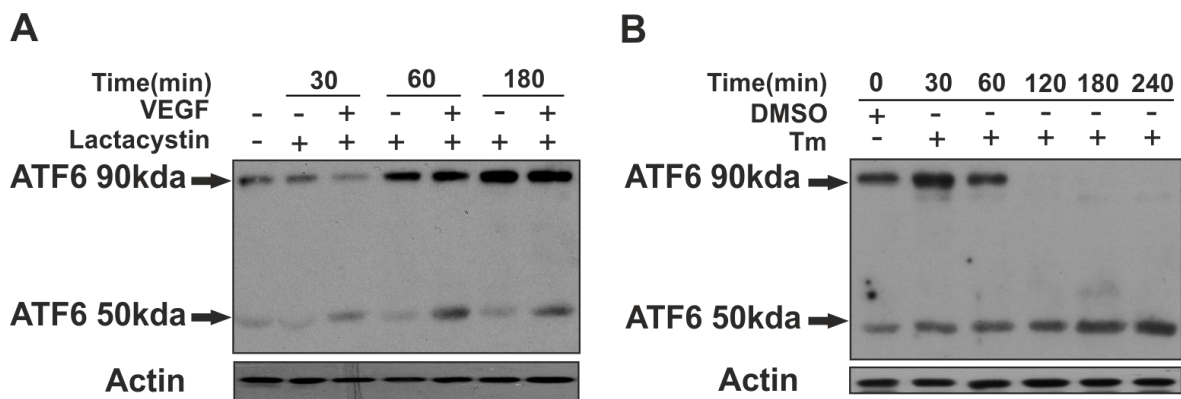
αυτή επαγωγή, αποκλείει την περίπτωση ενεργοποίησης λόγω υπερφόρτωσης του αυλού του ΕΔ με πρωτεΐνες, των οποίων τη σύνθεση ενεργοποίησε η παρουσία του VEGF. Στα πλαίσια αυτά, είναι φανερό ότι η φωσφορυλίωση του eIF2α από τον VEGF, δεν έχει ως σκοπό την αναστολή της μεταφραστικής λειτουργίας του κυττάρου, προκειμένου να μειωθεί το φορτίο των μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ. Εξάλλου, είναι γνωστό ότι η PERK-επαγόμενη φωσφορυλίωση του eIF2α είναι υπεύθυνη για τη μεταγραφική ενεργοποίηση του ενός τρίτου των γονιδίων στόχων της UPR<sup>236</sup>. Πράγματι, τα αποτελέσματα της σάρωσης με qRT-PCR έδειξαν ότι ο VEGF επάγει μεταγραφικά γονίδια που βρίσκονται καθοδικά του μονοπατιού αυτού, όπως *CREB2/ATF4*, *CHOP* κ.ά.

### **3.3.4 Ο VEGF ενεργοποιεί το μονοπάτι της πρωτεΐνης ATF6 εντός 30 λεπτών.**

Η ATF6 είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 90kDa και αποτελείται από μια αμινοτελική κυτταροπλασματική περιοχή καθώς και μια καρβοξυτελική περιοχή που εκτίθεται προς τον αυλό του ΕΔ. Ο μηχανισμός ενεργοποίησής της περιλαμβάνει, τη μεταφορά της στη συσκευή Golgi, όπου και υφίσταται μη αντιστρεπτή πρωτεολυτική επεξεργασία με τη βοήθεια δυο πρωτεασών της συσκευής Golgi, την S1P (Site-1 Protease) και την S2P (Site-2 metalloprotease)<sup>206,320</sup>. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως τελικό στόχο τη δημιουργία της ενεργής μορφής των 50kDa της ATF6 (p50ATF6) που δρα ως μεταγραφικός παράγοντας (basic leucine zipper, bZIP), επάγοντας μια σειρά από γονίδια στόχους της UPR.

Η μελέτη της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης ATF6 ως αποτέλεσμα απόκρισης σε συνθήκες στρες του ΕΔ περιλαμβάνει, τον εντοπισμό, τόσο της ολικής πρωτεΐνης των 90kDa (p90ATF6), όσο και της ενεργής μορφής των 50kDa (p50ATF6). Κατά την πειραματική διαδικασία, κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν από κύτταρα HUVE, μετά από επαγωγή με VEGF (50ng/ml) για χρονικά διαστήματα 30 λεπτών, 1 ώρας, 3 και 6 ωρών. Ακολούθησε η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Προκειμένου να εκτιμηθούν τα πρωτεϊνικά επίπεδα και των δύο μορφών, του ενεργοποιημένου τμήματος των 50 kDa, καθώς και της ολικής πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα έναντι και των δύο μορφών. Πριν από την επαγωγή με τον VEGF, τα κύτταρα προ-επωάστηκαν για 2 ώρες με τον αναστολέα του πρωτεασώματος λακτακυστίνη (10μM), μιας και η πρωτεΐνη ATF6 αποτελεί άμεσο στόχο του πρωτεασώματος και αποικοδομείται ταχύτατα,

έχοντας χρόνο ημιζωής μόνο 2 ώρες<sup>321,322</sup>. Σε κύτταρα που δεν έχει χορηγηθεί αναστολέας, τα βασικά επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης ATF6 (p90ATF6) είναι χαμηλά, ενώ μετά από αναστολή της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης με λακτακυστίνη το ποσό της p90ATF6 αυξάνεται. Η παρουσία του VEGF ενισχύει καθαρά την ενεργή μορφή της πρωτεΐνης από τα 30 λεπτά, ενώ παραμένει ενεργή ως και τις 3 ώρες (Εικόνα 3.10 Α). Από την άλλη, παρατεταμένη αναστολή της αποικοδόμησης με λακτακυστίνη έχει αντίθετα αποτελέσματα, καθώς οδηγεί σε συσσώρευση της p90ATF6 και διατηρεί τα βασικά επίπεδα της πρωτεΐνης πολύ υψηλά, όπως έχει διαπιστωθεί και σε προηγούμενες μελέτες<sup>322</sup>.



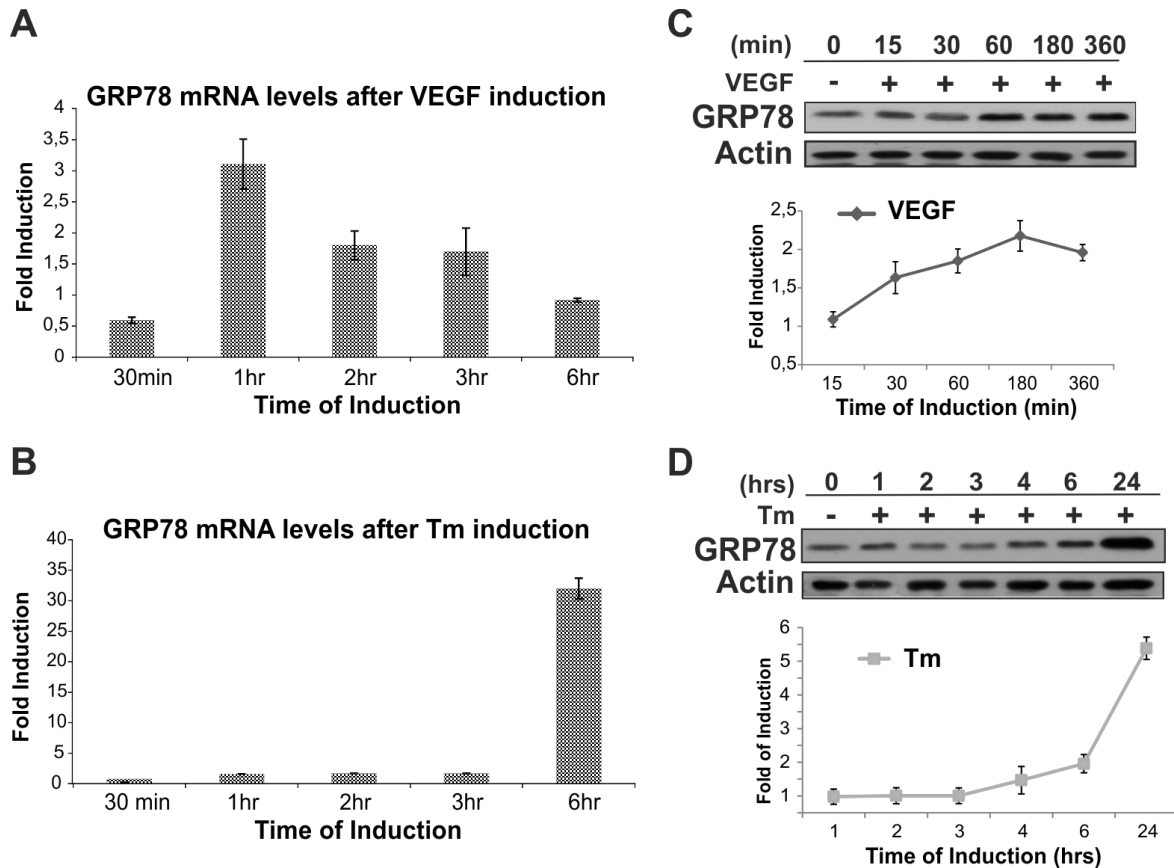
**Εικόνα 3.10:** (A) Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης ATF6 από τον VEGF. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και ECGS. Στη συνέχεια, τα κύτταρα προ-επώαστηκαν για 2 ώρες με τον αναστολέα του πρωτεασώματος Lactacystin (10μM). Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα και 3 ώρες). (B) Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης ATF6 από την Tm. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με Tunicamycin (Tm) (10μg/ml) για χρονικά διαστήματα 30 λεπτών, 1 ώρας, 2, 3 και 4 ωρών. Κυτταρικά εκχυλίσματα και στους δύο περιπτώσεις συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα έναντι της ολικής αλλά και της ενεργοποιημένης μορφής της πρωτεΐνης ATF6. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές

Τα αποτελέσματα είναι εντελώς διαφορετικά στην περίπτωση επαγωγής της UPR, και κατ' επέκταση του βραχίονα της πρωτεΐνης ATF6, μετά από δημιουργία συνθηκών στρες του ΕΔ με τον αναστολέα της N-γλυκοσυλίωσης, Tunicamycin. Στα κύτταρα χορηγήθηκε Tm (10μg/ml) για χρονικά διαστήματα 30 λεπτών, 1 ώρας, 2, 3 και 4 ωρών. Από την εικόνα 3.9 Β φαίνεται ότι, η ολική πρωτεΐνη των 90kDa (p90 ATF6) εξαφανίζεται

τελείως μεταξύ χρονικού διαστήματος των 2 έως και 4 ωρών ενώ παράλληλα αυξάνεται η ενεργή μορφή των p50ATF6<sup>322</sup>. Το ίδιο συμβαίνει, και στην περίπτωση της ενεργοποίησης του μονοπατιού της ATF6 από τον VEGF η γρήγορη, εντός 30 λεπτών, ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ATF6 αποκλείει αυτή να είναι δευτερογενής, από υπερφόρτωση του ΕΔ εξαιτίας αυξημένης πρωτεϊνοσύνθεσης που προκαλεί ο εν λόγω αυξητικός παράγοντας.

### **3.3.4.1 Ο VEGF επάγει γρήγορα τη μεταγραφή και μετάφραση γονιδίων-στόχων του μονοπατιού της πρωτεΐνης ATF6**

Με δεδομένο το γεγονός ότι ο VEGF ενεργοποιεί την πρωτεΐνη ATF6, θελήσαμε να ελέγξουμε την έκφραση του γονιδίου της *BiP* που είναι γνωστό ότι ενεργοποιείται μεταγραφικά μέσω του μονοπατιού αυτού<sup>206</sup>. Η BiP (GRP78) είναι μια συνοδός πρωτεΐνη, ευρέως εκφραζόμενη στο ΕΔ όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων και χρησιμοποιείται εκτενώς ως δείκτης έναρξης της UPR. Στο ΕΔ, η πρωτεΐνη BiP συμμετέχει στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών και κατά επέκταση στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών IRE1, ATF6 και PERK<sup>323</sup>. Για τη μέτρηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *BiP*, ολικό RNA απομονώθηκε από ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE, μετά από επαγωγή με VEGF (50 ng/ml) ή Tm (10μg/ml) για χρονικά διαστήματα 30 λεπτών, 1 ώρας, 2, 3 και 6 ωρών. Τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου *BiP* ποσοτικοποιήθηκαν με τη μέθοδο qRT-PCR. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR έδειξε ότι τα επίπεδα του mRNA της BiP ενεργοποιούνται σε στατιστικά σημαντικό βαθμό από τον VEGF (περίπου 3 φορές) μέσα σε 1 ώρα (Εικόνα 3.11 A). Από την άλλη πλευρά, η επαγωγή με Tm αυξάνει τα επίπεδα mRNA της BiP μετά από 6 ώρες (Εικόνα 3.11 B).

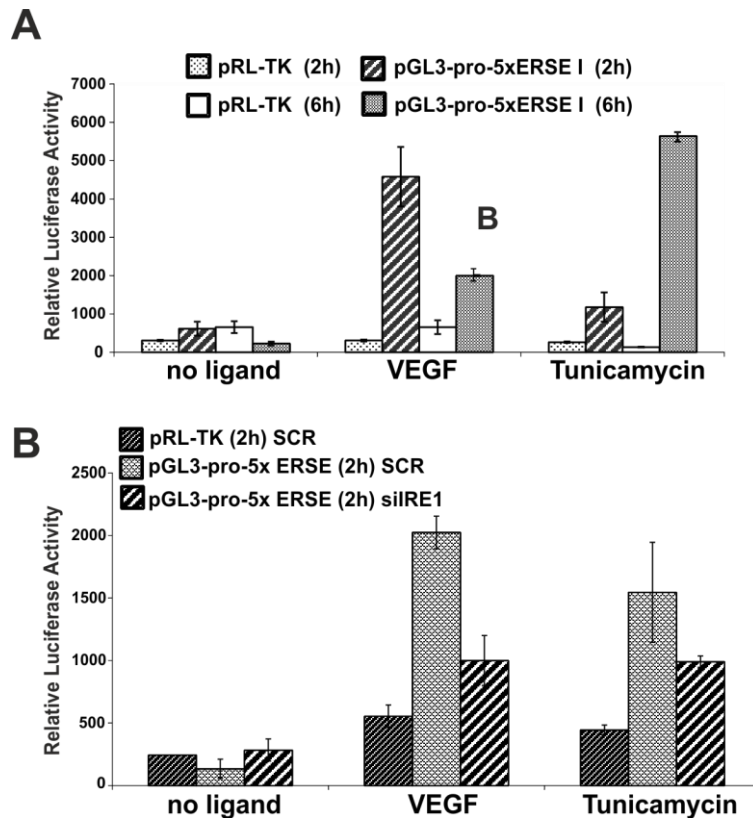


**Εικόνα 3.11:** (A) Η επαγωγή του mRNA του γονιδίου της BiP (GRP78) από τον VEGF και (B) την Tm. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και ECGS. Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) ή Tunicamycin (Tm) (10μg/ml) για 30 λεπτά, 1 ώρα, 2, 3 και 6 ώρες. Ολικό RNA, απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της BIP με τη μέθοδο της qRT-PCR. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. (C) Η επαγωγή των πρωτεϊνικών επιπέδων της BIP (GRP78) από τον VEGF και (D) την Tm. Όμοια, μετά από επαγωγή με VEGF (50 ng/ml) για 15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες ή Tunicamycin (Tm) (10μg/ml) για 1 ώρα, 2, 3, 4, 6 και 24 ώρες. Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης BIP και της πρωτεΐνης ακτίνης (Actin). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

Ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος και των πρωτεϊνικών επιπέδων της BiP μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF (50 ng/ml) για 15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες ή Tm (10μg/ml) για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, 1 ώρα, 2, 3, 4, 6 και 24 ώρες. Τα πρωτεϊνικά επίπεδα μετρήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι της πρωτεΐνης BiP. Μετά από πυκνομέτρηση κάθε ζώνης, οι τιμές ομαλοποιήθηκαν με τη μέτρηση της έντασης των ζωνών της ακτίνης (Actin). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης BiP επάγονται από τον VEGF, στο σύντομο χρονικό διάστημα των 30 λεπτών και συνεχίζουν να αυξάνονται μέχρι και το πέρας των 3 ωρών, οπότε και εμφανίζεται η μέγιστη επαγωγή κατά 2,5 φορές (Εικόνα 3.11 C). Η επαγωγή της πρωτεΐνης BiP από τον VEGF έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη μελέτη, όπου αποδίδεται στην πρωτεΐνη BiP ένας προστατευτικός ρόλος απέναντι στους όγκους όπως επίσης και στα ενδοθηλιακά κύτταρα που σχετίζονται με το μικροπεριβάλλον των όγκων<sup>201</sup>. Από την άλλη μεριά, η χορήγηση Tm στα κύτταρα οδηγεί στην αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων σε πολύ μεταγενέστερο χρονικό σημείο, που ξεκινά αμυδρά στις 4 ώρες, ενώ η αύξηση διαρκεί έως και τις 24 ώρες όπου είναι και μέγιστη (Εικόνα 3.11 D). Τα αποτελέσματα της επαγωγής με τη χρήση της Tm, εμφανίζουν πανομοιότυπο πρότυπο με αυτό που έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες επιστημονικές μελέτες που αναφέρονται στην πρωτεΐνη BiP<sup>322</sup>.

### **3.3.4.2 Η μέγιστη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων-στόχων της UPR από τον VEGF απαιτεί ενεργοποίηση περισσότερων του ενός μονοπατιού του ΕΔ**

Κατόπιν ενεργοποίησης της πρωτεΐνης ATF6, ο μεταγραφικός παράγοντας ATF6 (p50ATF6) μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου και προσδένεται σε υποκινητές με αλληλουχίες ERSE-I, ERSE-II (*cis*-acting ER Stress Response Element) ρυθμίζοντας την έκφρασή τους<sup>175</sup>. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι, οι υποκινητές που φέρουν ERSE αλληλουχίες ενεργοποιούνται επίσης από την πρωτεΐνη IRE1<sup>210</sup>. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η δυνατότητα ο VEGF να ρυθμίζει αθροιστικά/συνεργιστικά τη μεταγραφή γονιδίων της UPR, που φέρουν υποκινητές ERSE, διαμέσου περισσότερων του ενός μονοπατιών του ΕΔ.



**Εικόνα 3.12:** Η ενεργοποίηση του υποκινητή 5xERSE (*cis-acting ER Stress Response Element*) από τον αυξητικό παράγοντα VEGF και την Tm. **(A)** Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν για 24 ώρες με το 5xATF6 γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης (*luciferase report gene*) ή pGL3-pro-5xERSE καθώς και το φορέα της Renilla, pRL-TK Renilla για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων των τιμών. Κατόπιν, έγινε επαγωγή με VEGF (50 ng/ml) ή Tm (10μg/ml) για 2 και 6 ώρες. Η Tm χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας. Κύτταρα που δεν έχουν υποστεί καμία ενεργοποίηση χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας. **(B)** Κύτταρα HeLa διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής (siRNA) 20nM, έναντι της πρωτεΐνης IRE1 και ενός siRNA-μάρτυρα (SCR), στη συνέχεια HUVE διαμολύνθηκαν για 24 ώρες με το 5xATF6 γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης (pGL3-pro-5xERSE) καθώς και το φορέα της Renilla, pRL-TK Renilla για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων. Κατόπιν, έγινε επαγωγή με VEGF (50 ng/ml) ή Tm (2μg/ml) για το χρονικό διάστημα των 2 ωρών. Ο έλεγχος για την ικανότητα μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου αναφοράς και την ισχύ έκφρασης της λουσιφεράσης firefly και Renilla πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος μέτρησης λουσιφεράσης (*Dual Luciferase Activity Kit*) της Promega. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε πέντε ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, *Standard deviation*).

Για τον παραπάνω σκοπό, κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν για 24 ώρες με το 5xATF6 γονίδιο αναφοράς λουσιφεράσης (pGL3-pro-5xERSE) καθώς και το φορέα της Renilla, pRL-TK Renilla για την ομαλοποίηση των αποτελεσμάτων. Κατόπιν έγινε επαγωγή με (50 ng/ml) VEGF ή Tm (10μg/ml) για χρονικό διάστημα 2 ωρών και 6 ωρών. Η Tm χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας, διότι είναι γνωστό ότι επάγει ισχυρά το 5xATF6

γονίδιο αναφοράς της λουσιφεράσης<sup>207</sup>. Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος για την ικανότητα μεταγραφικής επαγωγής του γονιδίου αναφοράς και την έκφραση της λουσιφεράσης firefly και *Renilla* με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος μέτρησης λουσιφεράσης (Dual Luciferase Activity Kit) της Promega. Είναι εμφανές πως ο VEGF ενεργοποιεί το γονίδιο αναφοράς 5xERSE εντός 2 ωρών μέσω ενός ATF6-εξατρώμενου μηχανισμού. Η ενεργοποίηση από την Tm εμφανίζεται μετά από χρονικό διάστημα 6 ωρών (Εικόνα 3.12 A). Επίσης παρατηρούμε ότι, μετά από αποσιώπηση του γονιδίου *IRE1* ή Tm, αλλά και ο VEGF, επάγει στατιστικά σημαντικά το γονίδιο αναφοράς 5xERSE, αν και σε μικρότερο βαθμό σε σχέση με τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το siRNA-μάρτυρα (Εικόνα 3.12 B). Συμπεραίνουμε επομένως ότι ο VEGF μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεΐνης ATF6 επάγει μεν την έκφραση γονιδίων με αλληλουχίες ERSE στους υποκινητές τους, αλλά η μέγιστη μεταγραφική έκφραση των γονιδίων αυτών επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη ενεργοποίηση δύο μονοπατιών της UPR, των *IRE1* και ATF6 στην προκειμένη περίπτωση.

### **3.4 Ο VEGF ΕΠΑΓΕΙ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΤΗΣ UPR ΜΕΣΩ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PLCγ**

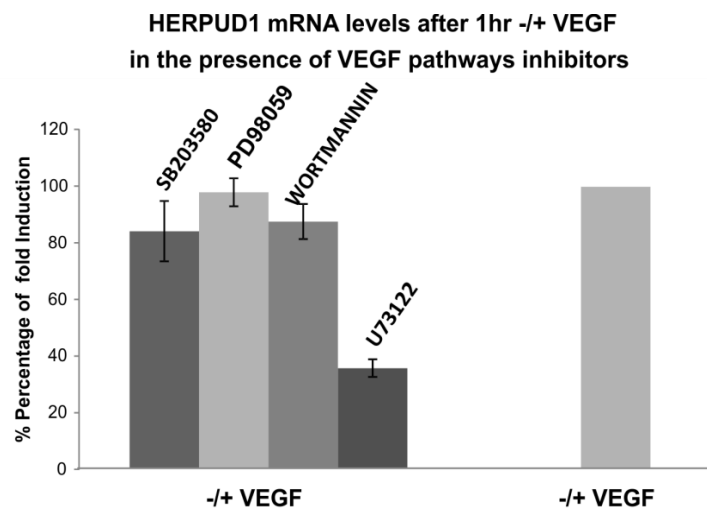
Με βάση τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, είναι ξεκάθαρο ότι ο VEGF επάγει μια απόκριση όμοια με την απόκριση του στρες του ΕΔ (ER-like response), όχι όμως ως αποτέλεσμα υπερφόρτωσης του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, αλλά σαν αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των τριών διαμεσολαβητών της UPR (*IRE1*, ATF6 και PERK) διαμέσου κάποιου (ων) από τα σηματοδοτικά μονοπάτια του. Συνεπώς, επόμενος στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξακριβωθεί το μονοπάτι του VEGFR που είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση της UPR. Στην προσπάθεια μας να εξερευνήσουμε τα σηματοδοτικά μονοπάτια του VEGF, χρησιμοποιήθηκαν καθιερωμένοι φαρμακολογικοί αναστολείς των γνωστών μονοπατιών του.

#### **3.4.1 Ο αναστολέας της PLCγ (U73122) μειώνει δραστικά την επαγωγή του γονιδίου *HERPUD1* από τον VEGF**

Για τον παραπάνω σκοπό, κύτταρα HUVE προ-επωάστηκαν για μικρό χρονικό διάστημα, με καθένα από τους παρακάτω αναστολείς όπως έχει περιγραφεί σε προγενέστερες μελέτες<sup>165</sup>, κατόπιν ακολούθησε επαγωγή με VEGF (50 ng/ml). Συγκεκριμένα,



χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς i) της p38 MAPK (SB203580, 20 $\mu$ M), ii) της MEK (PD98059, 20 $\mu$ M), iii) της PI3K (Wortmannin, 100 $\mu$ M) και iv) της PLC $\gamma$  (U73122, 10 $\mu$ M). Ο χρόνος επώασης ήταν 20 λεπτά για τους SB, PD και U73122, και 30 λεπτά για την Wortmannin. Ο έλεγχος της έκφρασης του γονιδίου *HERPUD1* έγινε με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της qRT-PCR έδειξε ότι η παρουσία των αναστολέων SB203580, PD98059 και Wortmannin δεν είχε κάποια επίδραση στην VEGF-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση του γονιδίου *HERPUD1*. Αντίθετα, ο αναστολέας του μονοπατιού της PLC $\gamma$  (U73122), μείωσε δραστικά (κατά 65%) την επαγωγή του γονιδίου του *HERPUD1* από τον VEGF (Εικόνα 3.13).



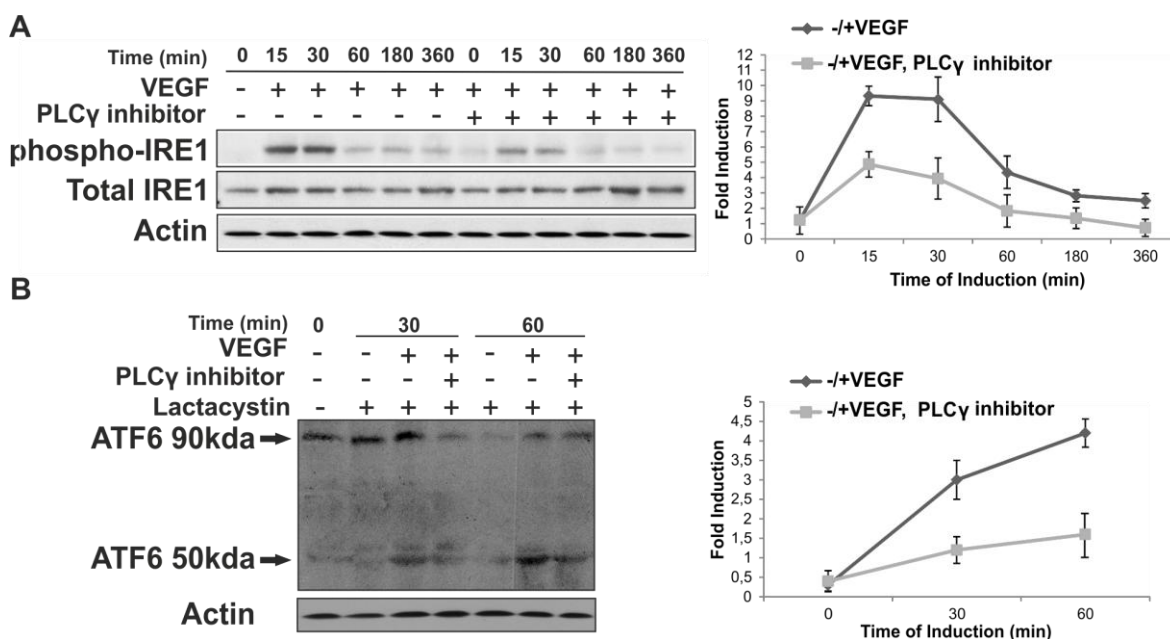
**Εικόνα 3.13:** Το ποσοστό αναστολής της επαγωγής του mRNA του γονιδίου *HERPUD1* από τον VEGF, παρουσία ειδικών αναστολέων των γνωστών μονοπατιών του. Κύτταρα HUVE προ-επώαστηκαν με τους SB (SB203580, 20 $\mu$ M), PD (PD98059, 20 $\mu$ M) και U73122 (10 $\mu$ M) αναστολείς και 30 λεπτά με τον αναστολέα Wortmannin (100 $\mu$ M). Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) για 1 ώρα. Ολικό RNA, απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA του γονιδίου *HERPUD1* με τη μέθοδο της qRT-PCR. Στον άξονα y του γραφήματος φαίνεται το % ποσοστό, των φορές (fold) της επαγωγής του γονιδίου του *HERPUD1* από τον VEGF (-/+VEGF). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

### 3.4.2 Η αναστολή της PLC $\gamma$ μειώνει δραστικά την ενεργοποίηση των μονοπατιών των πρωτεϊνών IRE1, ATF6 και PERK από τον VEGF

Το παραπάνω αποτέλεσμα αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη, ότι η ενεργοποίηση της PLC $\gamma$  από τον VEGF είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση των γονιδίων της UPR. Στη συνέχεια

### ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

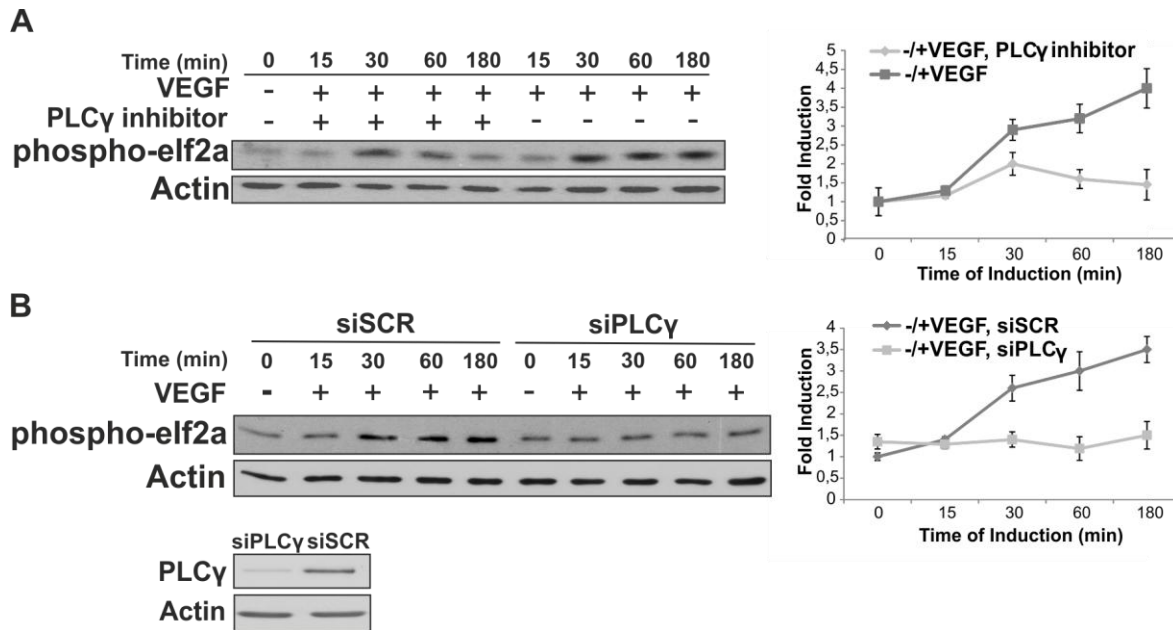
ελέγξαμε αν η αναστολή της PLCγ επηρεάζει την ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών της UPR από τον VEGF, χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία όπως στο κεφάλαιο 3.3. Πράγματι, ο αναστολέας U73122 μειώνει δραστικά, αλλά δεν εξαλείφει, τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης IRE1 από τον VEGF (Εικόνα 3.14 A). Ταυτόχρονα, τα αυξημένα, από την προσθήκη του VEGF, επίπεδα του ενεργοποιημένου τμήματος των 50 kDa της πρωτεΐνης ATF6 παρουσιάζουν αξιοσημείωτη μείωση παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ (U73122) (Εικόνα 3.14 B).



**Εικόνα 3.14:** (A) Αναστολή της επαγωγής της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης IRE1 από τον VEGF παρουσία του αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ (U73122). Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό και ECGS. Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) παρουσία ή όχι του U73122 (10μM) για χρονικά διαστήματα (15, 30 λεπτά, 1 ώρα, 3 και 6 ώρες). (B) Μείωση της επαγωγής των επιπέδων ενεργοποίησης της πρωτεΐνης ATF6 (p50ATF6) από τον VEGF. Όμοια, κύτταρα HUVE προ-επώαστηκαν για 2 ώρες με Lactacystin (10μM). Ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) παρουσία ή όχι του U73122 (10μM) για 30 λεπτά και 1 ώρα. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης IRE1, της ολικής IRE1 και με αντίσωμα έναντι της ολικής και της ενεργοποιημένης μορφής της πρωτεΐνης ATF6 και της πρωτεΐνης ακτίνης (Actin). Τα κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

Στην περίπτωση του μονοπατιού καθοδικά της πρωτεΐνης PERK, τόσο ο U73122 αναστολέας όσο και η αποσιώπηση του γονιδίου PLCγ μείωσαν δραστικά τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης eIF2α από τον VEGF (Εικόνα 3.15 A και B). Η ικανότητα

αποσιώπησης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western και ήταν σχεδόν πλήρης (Εικόνα 3.15 Β). Κατά συνέπεια, συμπεραίνουμε ότι το μονοπάτι της πρωτεΐνης PLCγ είναι το κύριο υπεύθυνο για τη μεταγωγή του σήματος από τον VEGF και στα τρία βασικά μονοπάτια του ΕΔ που ρυθμίζουν την UPR.



**Εικόνα 3.15:** Αναστολή της επαγωγής της φωσφορυλίωσης του μεταφραστικού παράγοντα *eIF2α* από τον VEGF (A) παρουσία τόσο του αναστολέα του μονοπατιού (*U73122*) όσο (B) και του *siRNA* της PLCγ. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό (A) προ-επώαστηκαν με τον αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ, *U73122* (B) διαμολύνθηκαν διαδοχικά (δύο φορές) με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής (*siRNA*) 50nM<sup>145</sup> έναντι της πρωτεΐνης PLCγ (*siPLCγ*) καθώς και ενός *siRNA*-μάρτυρα (*siSCR*). Στη συνέχεια, ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) για χρονικά διαστήματα 15, 30 λεπτών, 1 ώρα και 3 ωρών. Κυτταρικά εκχυλίσματα και στις δύο περιπτώσεις συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής του μεταφραστικού παράγοντα *eIF2α* και της πρωτεΐνης ακτίνης. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *Quantity One*, ενώ η ικανότητα αποσιώπησης ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της ολικής πρωτεΐνης PLCγ. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

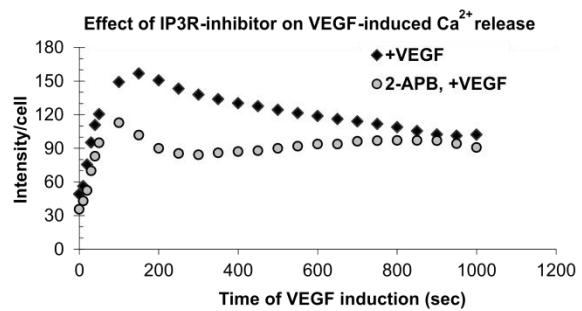
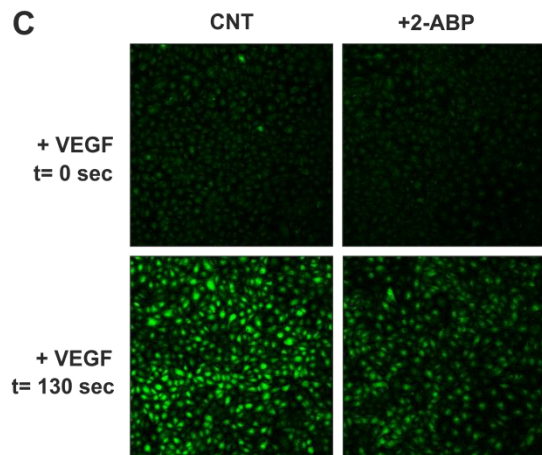
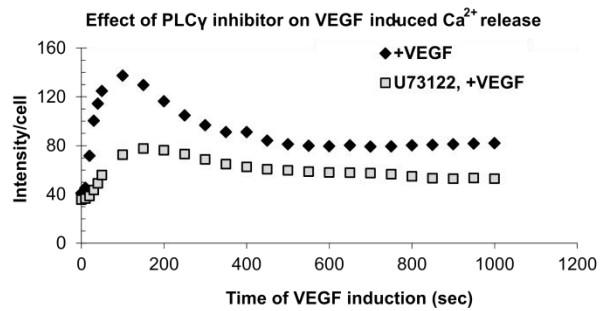
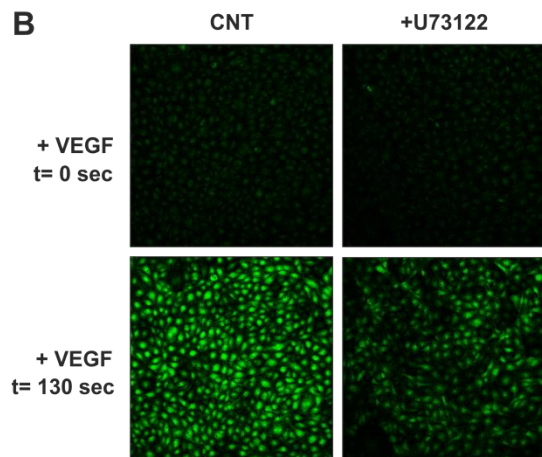
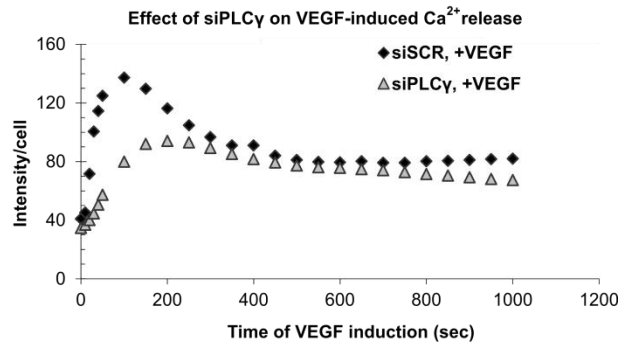
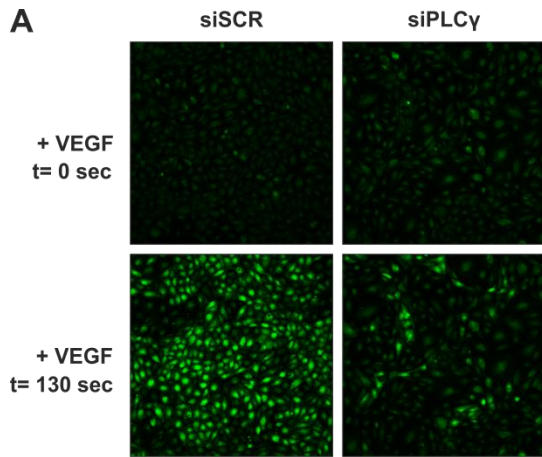
### 3.4.3 Ο VEGF ενεργοποιεί την UPR, μέσω του μονοπατιού της PLCγ, με μηχανισμό ανεξάρτητο του ασβεστίου ( $Ca^{2+}$ )

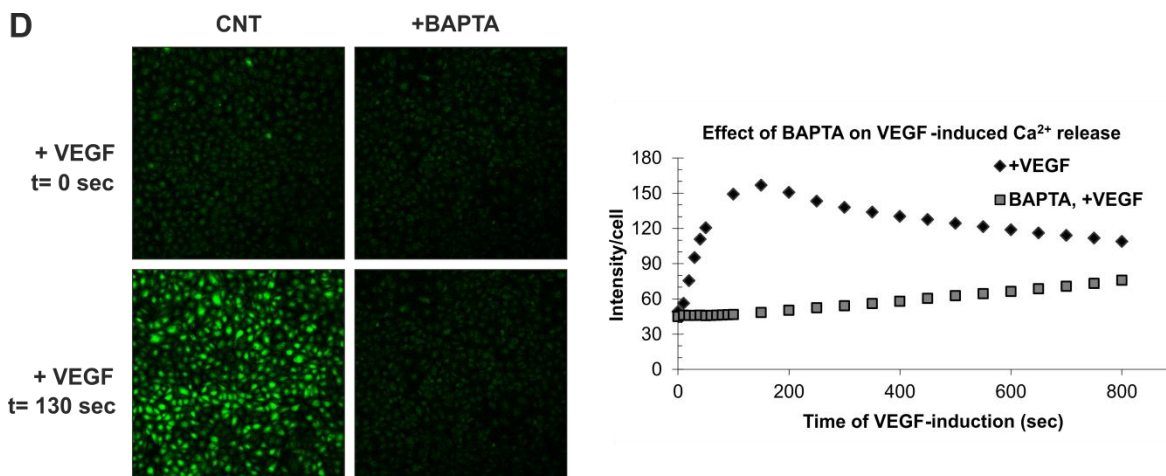
Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της πρωτεΐνης PLCγ και η φωσφορυλίωσή της από τον VEGF οδηγεί στην υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PIP2) και την παραγωγή διακυλογλυκερόλης (DAG) και 1,4,5 τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP<sub>3</sub>). Η

τριφωσφορική ινοσιτόλη στη συνέχεια συνδέεται στους υποδοχείς της IP<sub>3</sub>R-διαύλους ασβεστίου και οδηγεί στην απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το ΕΔ. Γνωρίζουμε ότι η συνοδός πρωτεΐνη BiP, η οποία αποτελεί και αρνητικό ρυθμιστή των IRE1, ATF6 και PERK σηματοδοτικών μονοπατιών, είναι η κύρια συνοδός πρωτεΐνη που συνδέεται με το Ca<sup>2+</sup> και παίζει άμεσο και σημαντικό ρόλο στην αποθήκευση και την ανταλλαγή αποθεμάτων Ca<sup>2+</sup> στο ΕΔ<sup>324</sup>. Θελήσαμε επομένως, να διερευνήσουμε την πιθανότητα η απελευθέρωση Ca<sup>2+</sup> από το ΕΔ μετά από προσθήκη VEGF, να είναι υπεύθυνη για την αποσύνδεση της BiP από τις πρωτεΐνες IRE1, ATF6 και PERK και την επακόλουθη ενεργοποίησή τους.

Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκε η συγκέντρωση του ελεύθερου Ca<sup>2+</sup> σε κύτταρα HUVE με τη χρήση της εμπορικής δοκιμασίας Fluo-4 NW Calcium Assay Kit. Πρόκειται, για μια μεγάλης ευκρίνειας δοκιμασία καταμέτρησης του ενδοκυττάρου Ca<sup>2+</sup> με τη βοήθεια της χρωστικής Fluo-4, η οποία φθορίζει κατόπιν πρόσδεσής της στο Ca<sup>2+</sup>. Με τη βοήθεια του δείκτη αυτού, είναι δυνατή η παρακολούθηση πολύ μικρών συγκεντρώσεων Ca<sup>2+</sup>, της τάξης μεγέθους των 100nM με 1μM, αλλά και γρήγορων αλλαγών στην εισροή Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα, μετά από διέγερση ή και αναστολή της απελευθέρωσής του από το ΕΔ (βλέπε αναλυτικά κεφ.2.4.1). Κατά τη διέγερση με προσθήκη VEGF αρχικά, παρατηρείται μια παροδική μέγιστη τιμή (κορυφή), αποτέλεσμα της απελευθέρωσης Ca<sup>2+</sup> από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες, η οποία ακολουθείται από ένα χαμηλότερο παρατεταμένο στάδιο (plateau) αυξημένου Ca<sup>2+</sup>, το οποίο εξαρτάται από το εξωκυτταρικό Ca<sup>2+</sup> και διαρκεί για τουλάχιστον 1 ώρα.

Από τα αποτελέσματά μας παρατηρούμε ότι πράγματι τόσο ο αναστολέας του μονοπατιού της πρωτεΐνης PLCγ, U73122 (10μM) όσο και η απάλειψη της ίδιας της πρωτεΐνης με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής, siRNA (siPLCγ, 50nM), οδήγησαν σε ισχυρή αναστολή του φθορισμού του ελεύθερου Ca<sup>2+</sup> (Εικόνα 3.16 A και B). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα και μετά τη χρήση της χημικής ένωσης 2-APB (75μM), που αναστέλλει την IP<sub>3</sub>R-διαμεσολαβούμενη απελευθέρωση του Ca<sup>2+</sup> (Εικόνα 3.16 C). Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε ο χηλικός παράγοντας BAPTA (20μM), ο οποίος δεσμεύει ισχυρά το ελεύθερο Ca<sup>2+</sup>, η αναστολή είναι ακόμα πιο ισχυρή όπως είναι εμφανές και από την εικόνα 3.16 D.

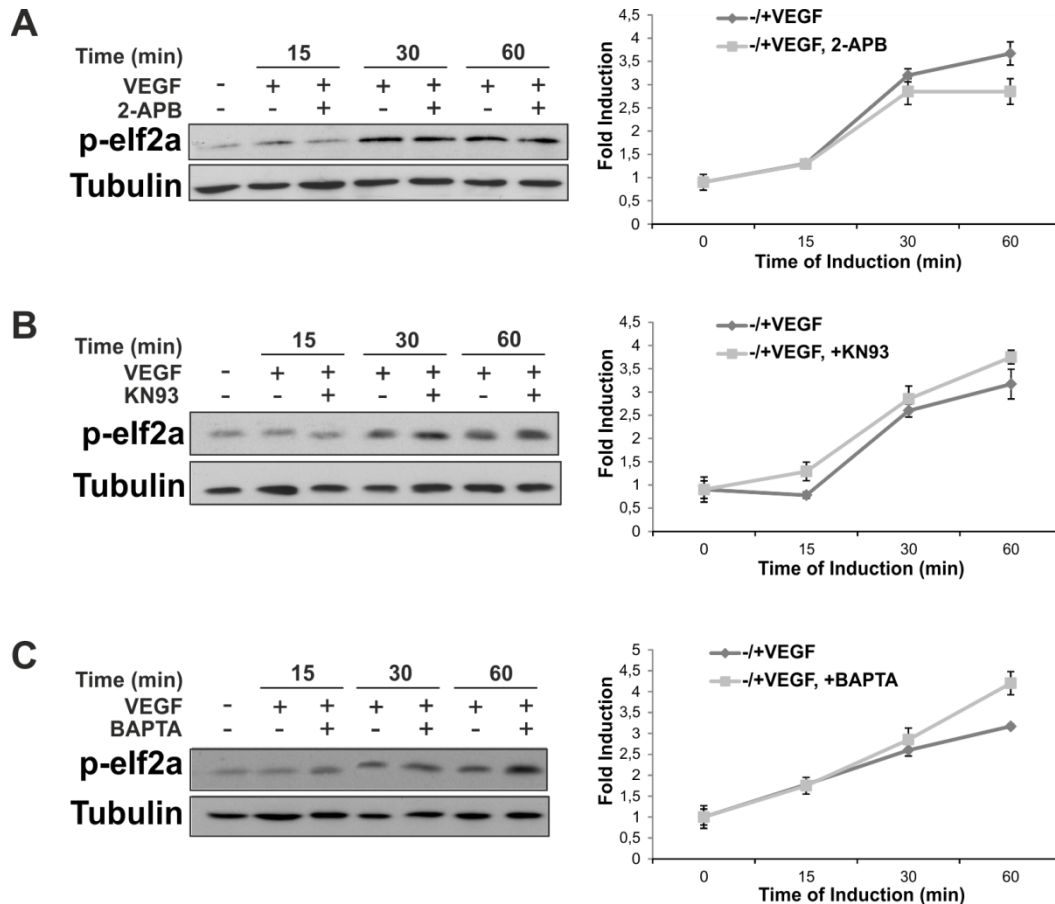




**Εικόνα 3.16:** Η διέγερση της απελευθέρωσης του ασβεστίου μετά από την προσθήκη VEGF και η αναστολή της (A) κατόπιν απάλειψης της πρωτεΐνης PLCγ (siPLCγ) καθώς και παρουσία (B) του αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ, U73122 (C) του αναστολέα της IP<sub>3</sub>R-διαμεσολαβούμενης απελευθέρωσης του Ca<sup>2+</sup>, 2-APB και (D) του χηλικού παράγοντα BAPTA. (A) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής έναντι της πρωτεΐνης PLCγ και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR). Κύτταρα HUVE προεπεώσθησαν με (B) τον αναστολέα U73122 (10μM), (C) τον αναστολέα 2-APB (75μM) και (D) την ένωση BAPTA (20μM) για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε σε όλες τις περιπτώσεις επώαση με τη χρωστική Fluo-4, για 30 λεπτά σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καταγραφή των αλλαγών του σήματος του φθορισμού, απουσία ή παρουσία VEGF (50ng/ml) ως διεγέρτη, με τη βοήθεια συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης Laser (Argon 488nm) Leica SP5. Η φωτογραφίες ελήφθησαν κάθε 10 δευτερόλεπτα. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.

Κατόπιν, μελετήσαμε κατά πόσο η αναστολή του ελεύθερου Ca<sup>2+</sup> επιδρά στη ρύθμιση της UPR από τον VEGF. Ως δείκτη ενεργοποίησης της UPR από τον VEGF, μελετήσαμε τη φωσφορυλίωση του μεταφραστικού παράγοντα eIF2α. Παρά την αναστολή της εξόδου του Ca<sup>2+</sup> από το ΕΔ με τη χρήση του αναστολέα 2-APB, η χορήγηση του VEGF οδηγεί σε φωσφορυλίωση του eIF2α ακριβώς όπως και απουσία του αναστολέα (Εικόνα 3.17 A). Επιπλέον, ούτε η χρήση της χημικής ένωσης KN93 που αναστέλλει τις CAM II κινάσες, οι οποίες διαμεσολαβούν τη δράση του άσβεστο-εξαρτώμενου μονοπατιού της καλμοδουλίνης, αλλά ούτε η δέσμευση του Ca<sup>2+</sup> από τον παράγοντα BAPTA, φαίνεται να μειώνουν τη φωσφορυλίωση του eIF2α από τον VEGF (Εικόνα 3.17 B και C). Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματά μας, η ενεργοποίηση των μονοπατιών των IRE1, ATF6 και PERK, μέσω του μονοπατιού της PLCγ κατόπιν διέγερσης από τον VEGF δεν εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης του Ca<sup>2+</sup> στο ΕΔ.





**Εικόνα 3.17:** Η αναστολή της απελευθέρωσης του  $Ca^{2+}$  από το ΕΔ, κατόπιν διέγερσης από τον VEGF παρουσία (A) του αναστολέα της εξόδου του  $Ca^{2+}$  από τους  $IP_3R$ , 2-APB (B) του αναστολέα των CaM II κινασών, KN93 (C) του χηλικού παράγοντα BAPTA, δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση του PERK μονοπατιού της UPR. Κύτταρα HUVE προεπεωάστηκαν με τις χημικές ενώσεις (A) 2-APB (75 $\mu$ M) (B) KN93 (10 $\mu$ M) και (C) BAPTA (20 $\mu$ M) για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για χρονικά διαστήματα 15, 30 λεπτών και 1 ώρας. Κυτταρικά εκχυλίσματα συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής του μεταφραστικού παράγοντα eIF2a και της πρωτεΐνης τουμπουλίνης. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

### 3.5 Η ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΗΣ UPR ΔΙΑΔΡΑΜΜΑΤΙΖΕΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ ΡΟΛΟ ΣΤΗΝ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗ ΑΠΟ ΤΟΝ VEGF ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Από τη μέχρι τώρα πειραματική διαδικασία προκύπτει ότι ο VEGF, διαμέσου του μονοπατιού της PLC $\gamma$ , ενεργοποιεί άμεσα τα τρία σηματοδοτικά μονοπάτια του ΕΔ (IRE1, ATF6 και PERK) που επάγουν σειρά γονιδίων στόχων της UPR. Η απόκριση αυτή όπως αποδείχτηκε, δεν είναι αποτέλεσμα της υπερφόρτωσης του ΕΔ από μη αναδιπλωμένες

πρωτεΐνες, αλλά άμεσης σηματοδοτικής ενεργοποίησης του ΕΔ από τον VEGF. Επομένως, θεωρούμε ότι ο όρος Unfolded Protein Response (UPR) (απόκριση στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες) δεν είναι δόκιμος στη συγκεκριμένη περίπτωση. Προτείνουμε τον όρο Extracellular Signalling Response of ER (ESR) και Απόκριση του ΕΔ σε Εξωκυτταρικά Σήματα, στα αγγλικά και ελληνικά, αντίστοιχα. Έτσι, η ESR του ΕΔ αναφέρεται στην άμεση ενεργοποίηση των μονοπατιών IRE1, ATF6 και PERK από σηματοδοτικά μονοπάτια όπως αυτό του VEGF, συμμετέχοντας στη δράση των μονοπατιών αυτών στη λειτουργία των κυττάρων.

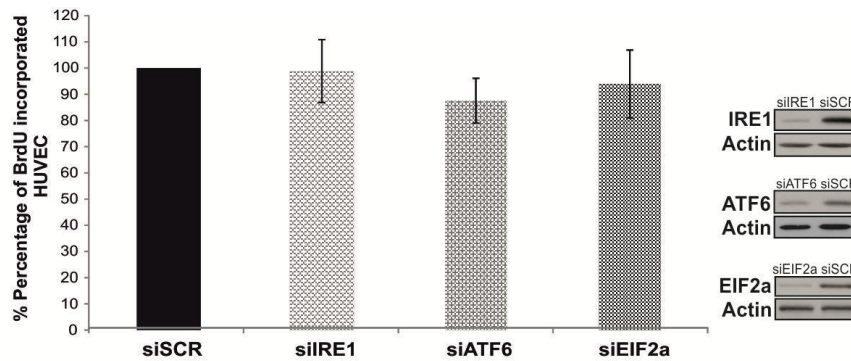
Για να προσεγγίσουμε το λειτουργικό ρόλο της ESR του ΕΔ στις φαινοτυπικές και λειτουργικές αλλαγές που προκαλεί ο VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μελετήσαμε την επίπτωση της αναστολής/απάλειψης, καθενός από τους τρεις βραχίονες της ESR του ΕΔ, σε βασικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων στον VEGF.

### **3.5.1 Η αναστολή των τριών βραχιόνων της ESR του ΕΔ δεν επηρεάζει την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF**

Για να μελετήσουμε, τον πιθανό ρόλο της ESR του ΕΔ στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (HUVE) από τον VEGF, απαλείψαμε καθένα από τους τρεις βασικούς διαμεσολαβητές της ESR του ΕΔ ξεχωριστά. Η αποσιώπηση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ολιγονουκλεοτιδίων παρεμβολής, siRNA (20nM) έναντι των γονιδίων *IRE1* (siIRE1), *ATF6* (siATF6), *eIF2a* (siEIF2a) και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR) όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφ.2.2.3. Η εκτίμηση της επαγωγής του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF έγινε με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης βρωμοδεόξυ-ουριδίνης (BrdU).

Τα αποτελέσματα είναι σαφή. Η αποσιώπηση καθενός από τα γονίδια που διαμεσολαβούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων της ESR του ΕΔ δεν επηρεάζει την δυνατότητα του VEGF να επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 3.18).





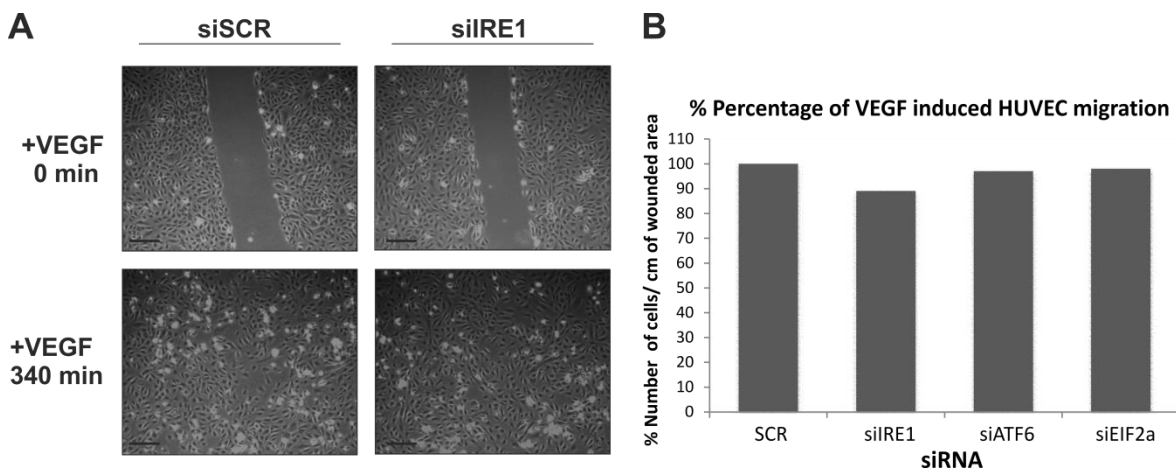
**Εικόνα 3.18:** Η απάλειψη των τριών πρωτεϊνών-διαμεσολαβητών της ESR του ΕΔ, δεν προκαλεί καμία σημαντική αλλαγή στα επίπεδα του επαγόμενου από τον VEGF πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής έναντι των τριών πρωτεϊνών-διαμεσολαβητών των μονοπατιών της ESR του ΕΔ. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα siRNA (20nM) των πρωτεϊνών IRE1 (siIRE1), ATF6 (siATF6), eIF2a (siEIF2a) και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR). Μετά το πέρας 48 ωρών, υπέστησαν στέρηση ορού για 18 ώρες και ακολούθησε επαγωγή με VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες και επώαση για 6 ώρες με βρωμοδεόξυ ουριδίνη, BrdU (100μM). Η δοκιμασία πολλαπλασιασμού των κυττάρων HUVE με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης, BrdU περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2.4. Στο γράφημα αντιπροσωπεύεται το % ποσοστό του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (κύτταρα που έχουν ενσωματώσει BrdU) μετά από επαγωγή με VEGF (-/+VEGF). Ο έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων μετά την απάλειψη των πρωτεϊνών (δεξιά) πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα έναντι των ολικών πρωτεϊνών. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τέσσερις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).

### 3.5.2 Η αναστολή των τριών βραχιόνων της ESR του ΕΔ δεν επηρεάζει την επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF

Προκειμένου να μελετήσουμε, τον πιθανό ρόλο της ESR του ΕΔ στην ενεργοποίηση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF, απαλείψαμε καθένα από τους τρεις βασικούς διαμεσολαβητές της UPR του ΕΔ ξεχωριστά χρησιμοποιώντας siRNA (20nM) έναντι των γονιδίων IRE1 (siIRE1), ATF6 (siATF6), eIF2a (siEIF2a) και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR). Η παρατήρηση της μεταναστευτικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με βιντεοσκόπηση μετά από τραυματισμό της μονοστιβάδας των ενδοθηλιακών κυττάρων (video microscopy). Τα αποτελέσματα και στην περίπτωση αυτή ήταν σαφή. Η αναστολή καθενός από τους τρεις βραχίονες που διαμεσολαβούν τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων της ESR του ΕΔ, δεν επηρεάζει τη δυνατότητα του VEGF να επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην εικόνα 3.19 Α παρουσιάζεται ενδεικτικά, η απεικόνιση των αποτελεσμάτων που αφορούν τη μεταναστευτική ικανότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από απάλειψη της πρωτεΐνης IRE1 σε

## ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

σύγκριση με το siRNA-μάρτυρα. Η εικόνα 3.19 Β παρουσιάζει το % ποσοστό της VEGF-επαγόμενης μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, σε σχέση με το μάρτυρα, μετά από απάλειψη των IRE1, ATF6 και eIF2a βραχιόνων της ESR του ΕΔ.



**Εικόνα 3.19:** Η απάλειψη τριών βραχιόνων της ESR του ΕΔ δεν επηρεάζει την επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής siRNA (20nM) των πρωτεϊνών IRE1 (siIRE1), ATF6 (siATF6), eIF2a (siEIF2a) και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR). Ακολούθησε τραυματισμός της μονοστιβάδας των ενδοθηλιακών κυττάρων όπως περιγράφεται στο κεφ. 2.2.5 και βιντεοσκόπηση. **(Α)** Στην εικόνα παρουσιάζονται οι φωτογραφίες που ελήφθησαν στα χρονικά διαστήματα 0 και 340 λεπτά απουσία ή παρουσία VEGF μετά από αποσιώπηση του γονιδίου IRE1. **(Β)** Το γράφημα αντιπροσωπεύει το % ποσοστό της VEGF-επαγόμενης μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, σε σχέση με το δείγμα μάρτυρα. Τα κύτταρα που μετακινήθηκαν προς την τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά cm τραυματισμένης περιοχής. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 100 μm.

### 3.5.3 Τα μονοπάτια των πρωτεϊνών ATF6 και PERK διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF

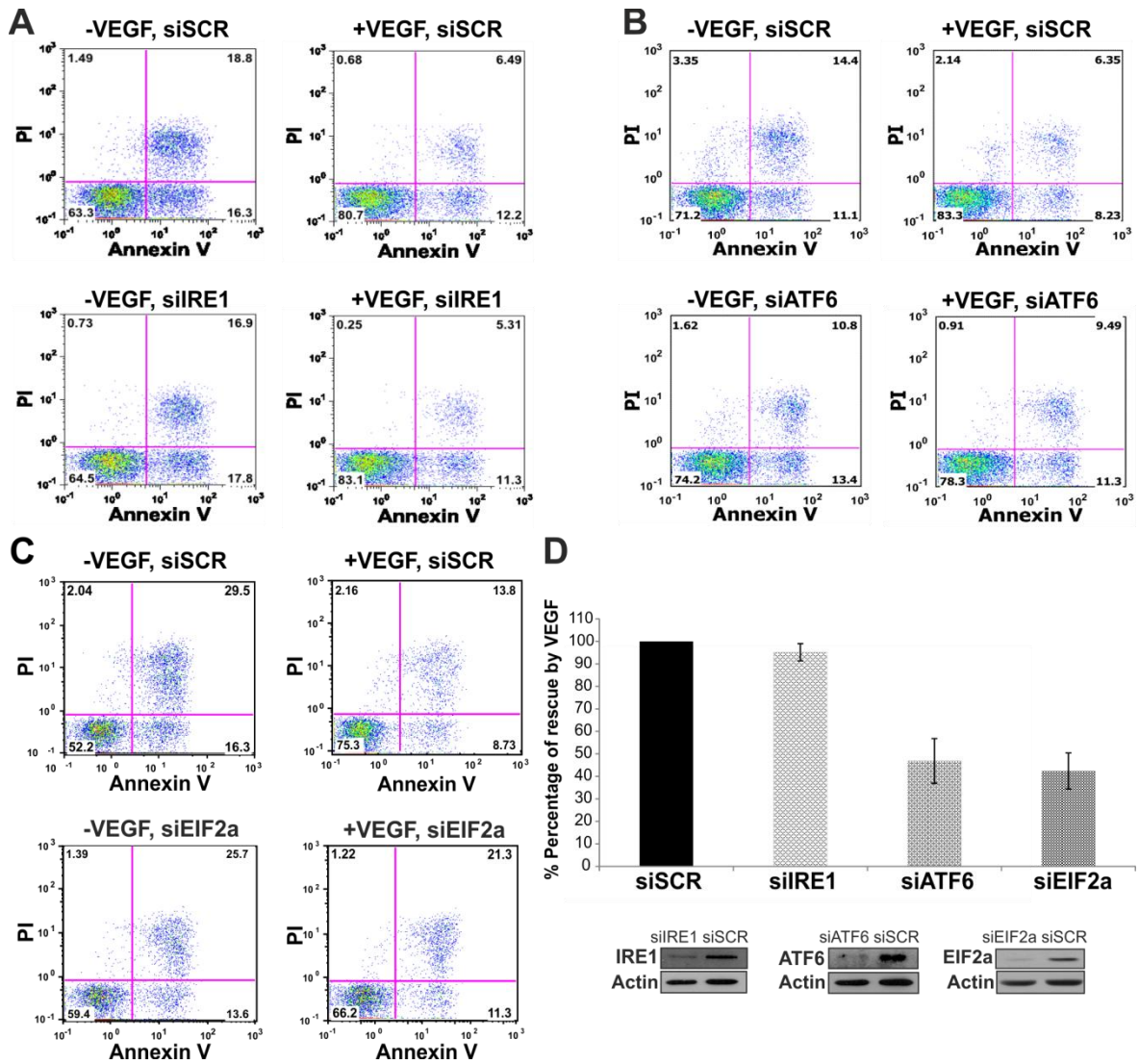
Η προσέγγιση για τη μελέτη, της πιθανής εμπλοκής της ESR του ΕΔ στην επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF ήταν όπως και παραπάνω. Απαλείψαμε καθένα από τους τρεις βασικούς διαμεσολαβητές της UPR ξεχωριστά με τη βοήθεια των siRNA (20nM) έναντι των γονιδίων IRE1 (siIRE1), ATF6 (siATF6), eIF2a (siEIF2a) και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR). Στη συνέχεια, ποσοτικοποιήσαμε την ικανότητα του VEGF να δρα ως παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry Assay, FACS), μετά από σήμανση με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο. Οι αρχές της δοκιμασίας περιγράφονται στο κεφ. 2.2.6.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι τα μονοπάτια της UPR που διαμεσολαβούνται από τις πρωτεΐνες ATF6 και eIF2a διαδραματίζουν αξιοσημείωτο ρόλο στην επαγόμενη από τον VEGF επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στο γράφημα της εικόνας 3.19 παρουσιάζεται ο αριθμός των ζωντανών κυττάρων μετά από προσθήκη του αυξητικού παράγοντα ως ποσοστό του αριθμού των ζωντανών κυττάρων απουσία VEGF, μετά από 24 ώρες σε συνθήκες στέρησης ορού. Ο ρόλος των δύο μονοπατιών, όσον αφορά τη συγκεκριμένη βασική αγγειογενετική απόκριση του VEGF, είναι αδιαμφισβήτητα σημαντικός, καθώς η απάλειψη τόσο της πρωτεΐνης ATF6 όσο και της eIF2a αναστέλλουν το ποσοστό της επιβίωσης παρουσία VEGF πάνω από 50%. Πιο αναλυτικά, απάλειψη της πρωτεΐνης ATF6 μειώνει την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF κατά 53%, ενώ η απάλειψη της πρωτεΐνης eIF2a κατά περίπου 60% (Εικόνα 3.20).

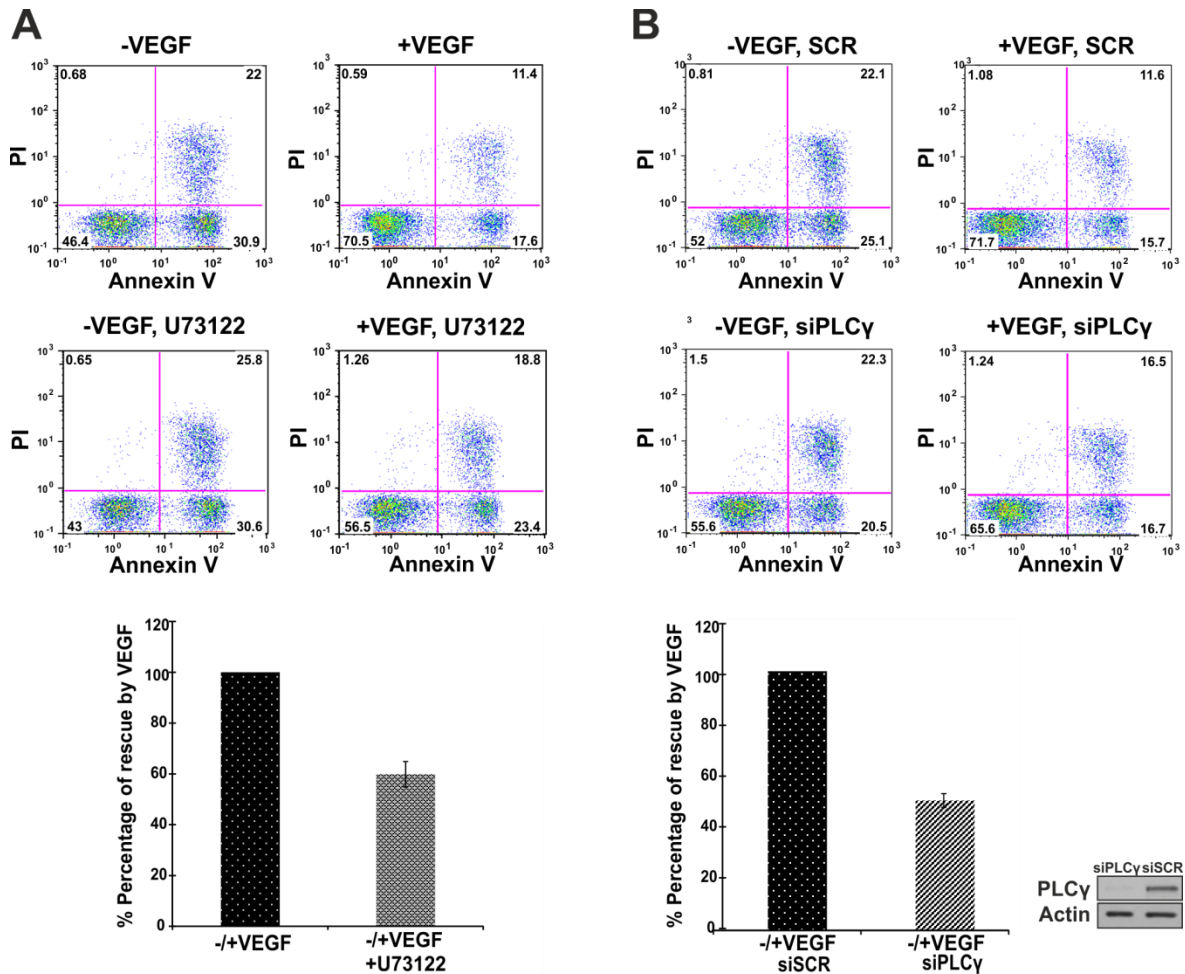
Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, το μονοπάτι του VEGF υπεύθυνο για την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών είναι αυτό της PI3K/Akt<sup>131,135</sup>. Από την άλλη, όπως αποδείξαμε, η απάλειψη των μεσολαβητών δύο εκ των τριών μονοπατιών της UPR, των πρωτεϊνών ATF6 και eIF2a, οδηγεί σε μείωση της επαγόμενης επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με δεδομένο το γεγονός ότι, όπως δείξαμε, το μονοπάτι της PLCγ είναι υπεύθυνο για την ενεργοποίηση των τριών βραχιόνων της UPR (IRE1, ATF6 και PERK) από τον VEGF, θελήσαμε να εξετάσουμε τη συμμετοχή του μονοπατιού της PLCγ στην αντι-αποπτωτική δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν όμοια πειράματα μελέτης της VEGF-επαγόμενης επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων με κυτταρομετρία ροής (FACS), μετά από αναστολή του μονοπατιού της πρωτεΐνης PLCγ. Για την αναστολή του μονοπατιού της PLCγ χρησιμοποιήθηκε τόσο ο αναστολέας του μονοπατιού U73122 όσο και το siRNA της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η απάλειψη της ολικής πρωτεΐνης με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής αλλά και παρουσία του αναστολέα U73122 του μονοπατιού μειώνει σημαντικά, περίπου 50% το ποσοστό επιβίωσης των κυττάρων HUVE (Εικόνα 3.21 A,B). Μπορούμε επομένως να συμπεράνουμε ότι το μονοπάτι της πρωτεΐνης PLCγ αποτελεί μια ακόμα σημαντική συνιστώσα του αντι-αποπτωτικού ρόλου του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

### ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 3.20:** Η αποσιώπηση των γονιδίων *ATF6* και *eIF2a* αναστέλλει, σε σημαντικό ποσοστό, την επαγόμενη από τον VEGF επιβίωση των κυττάρων HUVE. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής έναντι των τριών πρωτεϊνών-διαμεσολαβητών των μονοπατιών της UPR. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα siRNA (20nM) των πρωτεϊνών (A) IRE1 (*siIRE1*), (B) ATF6 (*siATF6*), (C) *eIF2a* (*siEIF2a*) και ενός siRNA-μάρτυρα (*siSCR*). Μετά από 48 ώρες, πραγματοποιήθηκε στέρηση ορού για 2 ώρες και τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με την προσθήκη VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων που επιβίωσαν μετά από προσθήκη ή όχι VEGF με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (Flow cytometry Assay, FACS), ύστερα από σήμανση των κυττάρων με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο (PI) όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2.6. (D) Στο γράφημα αντιπροσωπεύεται το % ποσοστό της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από επαγωγή με VEGF (-/+VEGF). Ο έλεγχος των πρωτεϊνικών επιπέδων μετά την αποσιώπηση των γονιδίων, πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των ολικών πρωτεϊνών (δεξιά). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε πέντε ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).



**Εικόνα 3.21:** Η αναστολή του μονοπατιού της PLCγ μειώνει το ποσοστό της επαγόμενης από τον VEGF επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. (A) Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια προεπεβάστηκαν με τον αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ, U73122 (10μM) για 20 λεπτά. (B) Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής έναντι της πρωτεΐνης PLCγ και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR), ακολούθησε στέρηση ορού για 2 ώρες και τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν και στις δύο περιπτώσεις με την προσθήκη VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Όπως και προηγουμένως, ακολούθησε καταμέτρηση του αριθμού των κυττάρων που επιβίωσαν μετά από προσθήκη ή όχι VEGF με τη μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής (FACS), ύστερα από σήμανση των κυττάρων με αννεξίνη και ιωδιούχο προπίδιο όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2.6. Σε κάθε γράφημα αντιπροσωπεύεται το % ποσοστό της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από επαγωγή με VEGF (-/+VEGF). Ο έλεγχος των επιπέδων μετά την απάλειψη της πρωτεΐνης PLCγ, πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα έναντι της ολικής πρωτεΐνης. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation).



### 3.5.4 Η ενεργοποίηση της PLCγ και των μονοπατιών ATF6 και PERK από τον VEGF συμμετέχει στην ενεργοποίηση του αντι-αποπτωτικού του μονοπατιού PI3K/Akt

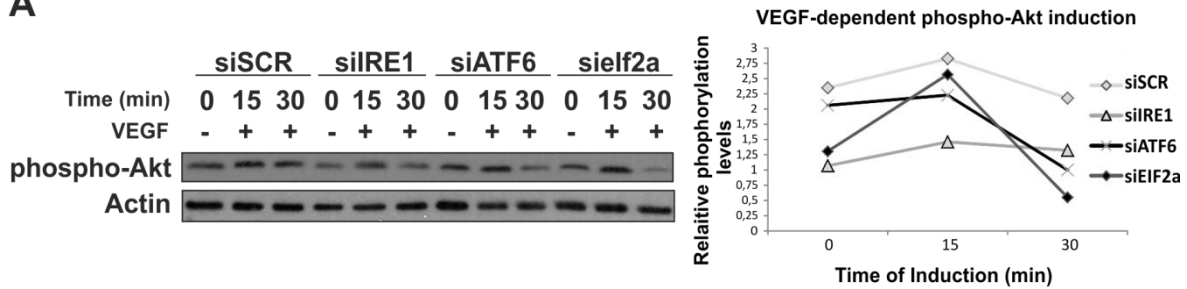
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο VEGF αναστέλλει την απόπτωση των HUVE κυττάρων ενεργοποιώντας την αντι-αποπτωτική κινάση Akt/PKB, μέσω ενός PI3K-εξαρτώμενου μονοπατιού<sup>131,135</sup>. Στηριζόμενοι στα παραπάνω αποτελέσματά μας, όπου η αποσιώπηση των γονιδίων *PLCγ*, *ATF6* και *eIF2a* ανέστειλε σημαντικά την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF, θελήσαμε να ελέγξουμε αν η απάλειψη των πρωτεϊνών PLCγ, ATF6 και eIF2a επηρεάζει την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης Akt από τον VEGF.

Ως εκ τούτου, μελετήσαμε την επαγωγή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt από τον VEGF, μετά από αποσιώπηση των γονιδίων που διαμεσολαβούν τα τρία μονοπάτια της ESR του ΕΔ. Φαίνεται πως, η απάλειψη των πρωτεϊνών IRE1, ATF6 και eIF2a μειώνει σε σημαντικό βαθμό τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt μετά από 30 λεπτά επαγωγής με VEGF σε σύγκριση με το δείγμα μάρτυρα (κύτταρα δηλαδή που έχουν υποστεί διαμόλυνση με scrambled siRNA (siSCR)) (Εικόνα 3.22 Α). Όμοια ήταν τα αποτελέσματα και μετά από την αναστολή του μονοπατιού της PLCγ με τον αναστολέα U73122 (10μM). Η παρουσία του U73122 αναστέλλει ισχυρά τη φωσφορυλίωση της Akt στα 15, αλλά και στα 30 λεπτά (Εικόνα 3.22 Β).

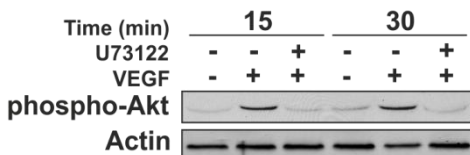
Ο ρόλος της PLCγ και της ESR του ΕΔ στην φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF συμπληρώθηκε με τη μελέτη του ρόλου των ιόντων  $Ca^{2+}$  που απελευθερώνονται από το ΕΔ, μετά από την ενεργοποίηση της PLCγ και παραγωγή  $IP_3$ . Στα πλαίσια αυτά, μελετήθηκε το άσβεστο-εξαρτώμενο μονοπάτι της καλμοδουλίνης που διαμεσολαβείται από τις CAM II κινάσες, χρησιμοποιώντας τον αναστολέα των CAM II κινασών, KN93. Η παρουσία του KN93, έχει επίσης ως αποτέλεσμα την ισχυρή αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt από τον VEGF, στα 15 και 30 λεπτά (Εικόνα 3.22 C).

Συμπερασματικά, η φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF μέσω της ενεργοποίησης του αντι-αποπτωτικού μονοπατιού PI3K/Akt εξαρτάται από την ταυτόχρονη ενεργοποίηση της PLCγ, καθώς και τη δράση της τελευταίας στο ΕΔ. Η δράση αυτή περιλαμβάνει τη σηματοδότηση που συνεπάγεται η εισροή ιόντων  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα και την ενεργοποίηση των μονοπατιών ATF6 και PERK της ESR του ΕΔ.

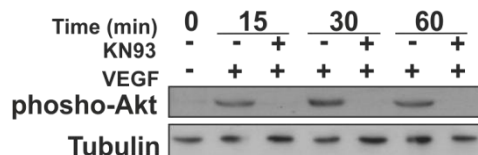
**A**



**B**



**C**



**Εικόνα 3.22:** (A) Η επαγωγή της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt από τον VEGF μετά από απάλειψη των πρωτεϊνών IRE1, ATF6 και eIF2a. Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με ολιγονουκλεοτίδια παρεμβολής έναντι των τριών πρωτεϊνών-διαμεσολαβητών των μονοπατιών της UPR. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα διαμολύνθηκαν με τα siRNA (20nM) των πρωτεϊνών IRE1 (siIRE1), ATF6 (siATF6), eIF2a (siEIF2a) και ενός siRNA-μάρτυρα (siSCR). Μετά από 48 ώρες, πραγματοποιήθηκε στέρηση ορού για 2 ώρες και τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με την προσθήκη VEGF (50ng/ml) για 15 και 30 λεπτά. Αναστολή της επαγόμενης από τον VEGF φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt παρουσία (B) του αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ, U73122 και (C) του αναστολέα της CaM II κινάσης, KN93. (A) Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια προεπεβάστηκαν με τον (B) αναστολέα του μονοπατιού της PLCγ, U73122 (10μM) για 20 λεπτά και (C) αναστολέα των CaM II κινασών, KN93. Κυτταρικά εκχυλίσματα σε όλες τις περιπτώσεις συλλέχθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης Akt και της πρωτεΐνης ακτίνης ή τουμπουλίνης. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες φορές.

### 3.5.5 Ο VEGF δεν αυξάνει τα επίπεδα της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP παρά τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της

Η μεταγραφή του γονιδίου της CHOP ενεργοποιείται κατά κύριο λόγο από τον παράγοντα ATF4, μέσω του PERK- eIF2a μονοπατιού, ενώ έχει βρεθεί ότι το γονίδιο αυτό ενεργοποιείται και από τα άλλα δύο μονοπάτια της UPR<sup>261</sup>. Η προ-αποπτωτική πρωτεΐνη CHOP (μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων C/EBP, επίσης γνωστή και ως GADD153) καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης BCL-2<sup>261</sup> και επάγει την έκφραση του γονιδίου της DR5, μέλους της οικογένειας των υποδοχέων θανάτου<sup>325</sup>. Η αποπτωτική της δράση περιλαμβάνει την επαγωγή ενός αριθμού γονιδίων, όπως το γονίδιο του GADD34 που αποκαθιστά την πρωτεϊνοσύνθεση

### ΕΝΟΤΗΤΑ 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

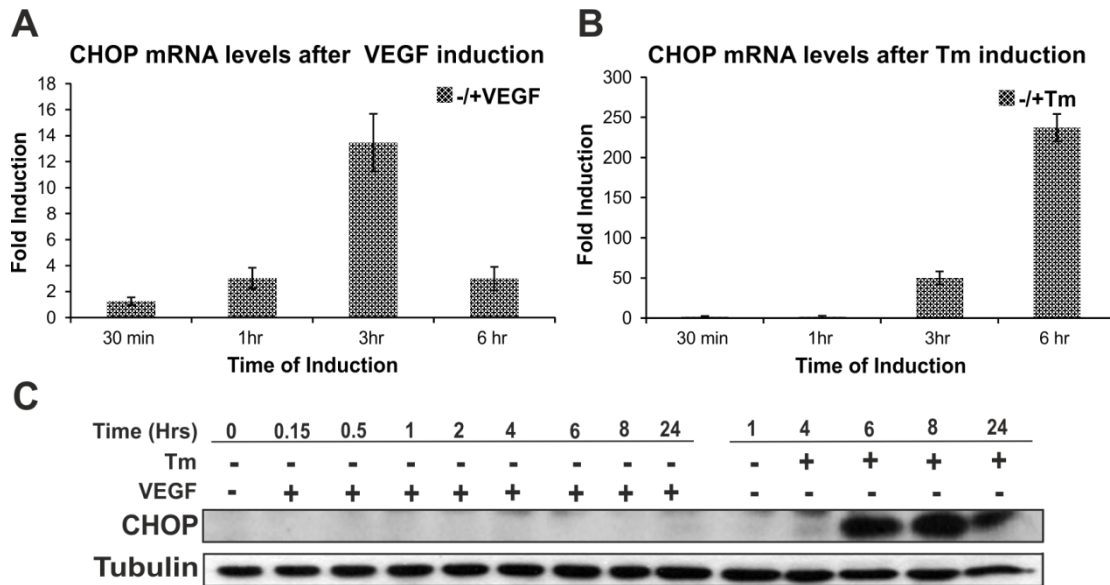
---

αποφωσφορυλιώνοντας τον παράγοντα eIF2a<sup>237</sup>. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έκβαση του στρες του ΕΔ<sup>265</sup>. Το mRNA και η πρωτεΐνη CHOP είναι ασταθή σε συνθήκες ήπιας UPR, με αποτέλεσμα τα επίπεδα της CHOP να διατηρούνται χαμηλά και ως εκ τούτου να μην υφίσταται η αποπτωτική της δράση και τα κύτταρα να επιβιώνουν. Αντίθετα, η έντονη και παρατεταμένη UPR, με άγνωστο ως τώρα μηχανισμό σταθεροποιεί το mRNA αλλά και την πρωτεΐνη της CHOP επιτρέποντας την αύξηση της συγκέντρωσής της και οδηγώντας σε απόπτωση.

Πράγματι, ο VEGF επάγει το mRNA του γονιδίου *CHOP* (Εικόνα 3.23 A), ενώ δεν επηρεάζει τα πρωτεϊνικά επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP (Εικόνα 3.23 C). Από την άλλη, η προσθήκη Tm αυξάνει κατά πολύ τόσο τα επίπεδα του mRNA μετά από 6 ώρες (Εικόνα 3.23 B) όσο και τα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP, τα οποία παραμένουν αυξημένα μέχρι και 24 ώρες (Εικόνα 3.23 C), όποτε και το κύτταρο οδηγείται σε παρατεταμένο στρες του ΕΔ και τελικά σε απόπτωση (βλέπε κεφ. 1.3.4 και εικόνα 1.20).

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η ESR που ενεργοποιείται από τον VEGF συνοδεύεται από αστάθεια του mRNA και της πρωτεΐνης της CHOP, όπως και συμβαίνει και στην περίπτωση που UPR είναι ήπια. Και στις δύο περιπτώσεις, τα επίπεδα της CHOP δεν είναι ανιχνεύσιμα και επομένως δεν υφίσταται η προ-αποπτωτική της δράση. Με τον τρόπο αυτό, μεγιστοποιείται η αντι-αποπτωτική δράση της ESR του ΕΔ, μέσω της συμμετοχής των ATF6 και PERK βραχιόνων στη φωσφορυλίωση της Akt και την ενίσχυση του αντι-αποπτωτικού μονοπατιού του VEGF.





**Εικόνα 3.23:** (A) Ρύθμιση των επιπέδων mRNA του γονιδίου CHOP από τον VEG και (B) την Tm. Κύτταρα HUVE επώαστηκαν με VEGF (50 ng/ml), σε πλήρες θρεπτικό υλικό περιεκτικότητας 20% σε ορό, παρουσία ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (30 λεπτά, 1 ώρα και 6 ώρες). Ολικό RNA, απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς την έκφραση των επιπέδων mRNA των δύο γονιδίων με τη μέθοδο της qRT-PCR. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τις τιμές της τυπικής απόκλισης από τη μέση τιμή (SD, Standard deviation). (C) Αδυναμία επαγωγής των πρωτεϊνικών επιπέδων της πρωτεΐνης CHOP από τον VEGF. Όμοια μετά από ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) για 15 λεπτά, 1 ώρα, 2, 4, 6, 8 και 24 ώρες ή Tunicamycin (Tm) (10μg/ml) για 1 ώρα, 4, 6, 8 και 24 ώρες μελετήθηκαν τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης CHOP με ανοσοαποτύπωση κατά Western, με αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης της ολικής CHOP, και της πρωτεΐνης τουμπουλίνης (Tubulin). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο VEGF είναι μια σημαντική πρωτεΐνη που ρυθμίζει ένα μεγάλο εύρος λειτουργιών του φυσιολογικού ενδοθηλίου<sup>326</sup>. Επιπλέον, ο VEGF παίζει κεντρικό ρόλο στη παθογένεση σειράς νοσημάτων, τα οποία χαρακτηρίζονται από παθολογική αγγειογένεση. Η υπερέκφρασή του στα καρκινικά κύτταρα, είτε λόγω ισχαιμίας είτε σαν αποτέλεσμα της δράσης ογκογονιδίων ή ογκοκατασταλτικών γονιδίων, δημιουργεί νεοαγγείωση (νεοπλασματική αγγειογένεση) συμμετέχοντας στην αύξηση και μετάσταση των όγκων. Η υπερέκφραση του VEGF στον αμφιβληστροειδή των διαβητικών, λόγω ισχαιμίας, δημιουργεί υπερβολική αγγειογένεση με αποτέλεσμα την απώλεια της όρασης. Έτσι, η αναστολή της δράσης του VEGF χρησιμοποιείται σήμερα για την αντιμετώπιση της νεοπλασματικής και της οφθαλμικής νεοαγγείωσης. Η σωστή στόχευση του VEGF με σκοπό τη θεραπευτική αναστολή της δράσης του προϋποθέτει καλή γνώση των σηματοδοτικών μονοπατιών του VEGF και των επιπτώσεων τους στη γονιδιακή ρύθμιση.

Παρά το γεγονός ότι τις τελευταίες δεκαετίες ο ρόλος του VEGF έχει μελετηθεί εκτενώς, παραμένουν πολλά κενά στις γνώσεις μας αναφορικά με τους μοριακούς μηχανισμούς της δράσης του. Με σκοπό την καλύτερη κατανόηση των σηματοδοτικών και μεταγραφικών κυκλωμάτων πάνω στα οποία βασίζεται η δράση του VEGF, αναλύσαμε τη γονιδιακή έκφραση του VEGF σε κύτταρα HUVE με μικροσυστοιχίες cDNA. Η πρωτογενής ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι ο VEGF επάγει στατιστικά σημαντικά 116 γονίδια. Ανάμεσα στα γονίδια αυτά, ήταν τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9* τα οποία έχουν βρεθεί να ρυθμίζονται θετικά και να συμμετέχουν στη διαδικασία της «απόκρισης στις μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες» (UPR) του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ)<sup>167,175</sup>.

Η παρατήρηση αυτή κέντρισε το ενδιαφέρον μας, διότι ελάχιστα είναι γνωστά για τη διασύνδεση της λειτουργίας του ΕΔ με τη δράση του VEGF. Για αυτό το λόγο, τα αποτελέσματα από την ανάλυση με μικροσυστοιχίες cDNA ελέγχθηκαν με qRT-PCR. Πράγματι, η qRT-PCR επιβεβαίωσε την επαγωγή της μεταγραφής του mRNA των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* εντός 1 ώρας από την προσθήκη VEGF. Επίσης, το επίπεδο της πρωτεΐνης *HERPUD1* αυξήθηκε κατά 3.5 φορές εντός 1 ώρας, ενώ το ίδιο δεν ήταν εφικτό να ελεγχθεί για την πρωτεΐνη *DNAB9* λόγω απουσίας κατάλληλου

αντισώματος. Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* παρατηρήθηκε μόνο μετά από χορήγηση VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ η προσθήκη FGF2, ενός άλλου γνωστού αγγειογενετικού παράγοντα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν οδήγησε σε επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων αυτών. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων *HERPUD1* και *DNAJB9* είναι ειδική για τον VEGF και δεν συνιστά μια γενική απόκριση του ενδοθηλιακού κυττάρου όταν ενεργοποιείται ο αγγειογενετικός φαινότυπός του.

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων με μικροσυστοιχίες cDNA δεν ανιχνεύτηκε μεταγραφική ενεργοποίηση άλλων γονιδίων της UPR. Αυτό οφείλεται, καταρχήν στο γεγονός ότι στο πλακάκι των μικροσυστοιχιών δεν υπήρχαν όλα τα ανθρώπινα γονίδια, κατά συνέπεια, ο αριθμός των γονιδίων που ενεργοποιούνται κατά την UPR ήταν περιορισμένος και κατά δεύτερον στα προχωρημένα χρονικά διαστήματα που επιλέχθηκαν προς μελέτη. Προκειμένου να αποσαφηνίσουμε αν πρόκειται για μια επιλεκτική μεταγραφή μόνο των *HERPUD1* και *DNAJB9* γονιδίων, πραγματοποιήθηκε σάρωση της μεταγραφικής έκφρασης ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων (84 γονίδια) της UPR με qRT-PCR (Πίνακας 2.4). Η σάρωση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τυποποιημένη εμπορική δοκιμασία RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array και η μεταγραφική ρύθμιση των γονιδίων εξετάστηκε μετά από 30 λεπτά και 1 ώρα επαγωγής με VEGF. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι 41 γονίδια από τα συνολικά 84 ρυθμίζονται θετικά από τον VEGF, 25 εκ των οποίων επάγονται ισχυρά (>10), ενώ 13 εμφανίζουν μικρότερο βαθμό επαγωγής (2<x<10). Ανάμεσα στα γονίδια που βρέθηκαν να ρυθμίζονται ισχυρά από τον VEGF ήταν και τα *HERPUD1* και *DNAJB9*, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της σάρωσης με μικροσυστοιχίες cDNA. Η ταξινόμηση των γονιδίων της UPR που επάγονται από τον VEGF με βάση το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης τους από την UPR, κατέστησε εμφανές ότι ο VEGF επάγει γονίδια «στόχους» της UPR που βρίσκονται καθοδικά και των τριών μονοπατιών της (IRE1, ATF6 και PERK). Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε αβίαστα το συμπέρασμα ότι ο VEGF προκαλεί ουσιαστικά μια γενικευμένη απόκριση του ΕΔ (UPR) στα πλαίσια της οποίας ενεργοποιήθηκαν μεταγραφικά τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*.

Με δεδομένο το γεγονός ότι η ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF επάγει ένα σημαντικό αριθμό γονιδίων στόχων της UPR, υποθέσαμε ότι η

παρουσία του VEGF, πιθανόν να οδηγεί σε αυξημένη πρωτεϊνοσύνθεση εξαιτίας της ενεργοποίησης του εκκριτικού μονοπατιού του και κατ' επέκταση, σε μεγαλύτερο φορτίο πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ, που υπερβαίνει την ικανότητα αναδίπλωσής του και θα μπορούσε να πυροδοτήσει την UPR. Για τη διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης, αναστείλαμε την πρωτεϊνοσύνθεση με χορήγηση κυκλοεξιμίδιου (CHX) πριν από τη χορήγηση VEGF. Παρατηρούμε ότι παρά την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, η προσθήκη VEGF συνεχίζει να επάγει σε μεταγραφικό επίπεδο, αν και σε μικρότερο βαθμό, τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*. Το αποτέλεσμα αυτό ουσιαστικά υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση της UPR από τον VEGF, δεν είναι απόρροια συσσώρευσης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ, αλλά πρόκειται πιθανά για μια άμεση ρύθμιση των γονιδίων αυτών από τον VEGF. Προς την κατεύθυνση της άμεσης ρύθμισης συνάδει το γεγονός ότι η επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων της UPR από τον VEGF είναι ταχύτατη και κορυφώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, εντός 30-60 λεπτών. Αντίθετα, η χορήγηση των γνωστών χημικών επαγωγέων του κλασικού στρες του ΕΔ, όπως η Tunicamycin (Tm)<sup>309</sup> και η Thapsigargin (Tg)<sup>181</sup>, προκαλεί τη μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων της UPR σε πολύ αργότερο χρονικό διάστημα, ενώ το στρες που προκαλείται είναι παρατεταμένο και μη αντιστρεπτό και μπορεί να οδηγήσει το κύτταρο σε απόπτωση.

Στην προσπάθειά μας να διερευνήσουμε περαιτέρω κατά πόσο πρόκειται για μια άμεση ρύθμιση της UPR από τον VEGF, μελετήσαμε την ενεργοποίηση των τριών μονοπατιών της UPR (IRE1, ATF6 και PERK) και την κινητική της ενεργοποίησης τους μετά από προσθήκη VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματα μελετήθηκαν σε σύγκριση με την κινητική που προκαλεί η προσθήκη του αναστολέα της Ν-γλυκοσυλίωσης, Tunicamycin, η οποία προάγει τη δημιουργία πρωτεϊνών με λανθασμένη διαμόρφωση λόγω ελαττωματικής γλυκοσυλίωσης. Με τον τρόπο αυτό, η Tunicamycin ενεργοποιεί την UPR υπερφορτώνοντας το ΕΔ με πρωτεΐνες που εμφανίζουν λανθασμένη διαμόρφωση στο χώρο. Οι λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες, εν συνεχεία, δεσμεύουν τη συνοδό πρωτεΐνη BiP απελευθερώνοντας τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες IRE1, ATF6 και PERK από την ανασταλτική δράση της πρώτης. Όπως είναι εμφανές, ο χρόνος ενεργοποίησης των IRE1, ATF6 και PERK από την Tm είναι συνάρτηση της υπερφόρτωσης του ΕΔ με λανθασμένα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες και αποτελεί κατά

συνέπεια ένα καλό μετρό σύγκρισης με το χρόνο ενεργοποίησης μετά από την προσθήκη VEGF.

Η μελέτη της ενεργοποίησης των τριών μονοπατιών έδωσε σαφή αποτελέσματα. Μετά από την προσθήκη VEGF, η φωσφορυλίωση της IRE1 ήταν εμφανής εντός 15 λεπτών και το μάτισμα του καθοδικού XBP1 ήταν ανιχνεύσιμο σε 30 λεπτά. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της IRE1 από τον VEGF ήταν παροδική και εξασθένησε περίπου 1 ώρα αργότερα. Αντίθετα, η κινητική της ενεργοποίησης μετά από χορήγηση της Tm ήταν πολύ μεταγενέστερη και με μεγαλύτερη διάρκεια, καθώς η φωσφορυλίωση της IRE1 ανιχνεύτηκε μετά από 3 ώρες και συνέχισε να υφίσταται για 6 ώρες. Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα αναφορικά με την ενεργοποίηση των μονοπατιών των πρωτεϊνών ATF6 και PERK. Μετά από χορήγηση VEGF, η παρουσία της ενεργής p50ATF6 ήταν εμφανής εντός 30 λεπτών με κορύφωση τα 60 λεπτά, ενώ μετά από χορήγηση Tm, η ενεργή p50ATF6 εμφανίστηκε σε 3-4 ώρες. Η ίδια εικόνα προέκυψε και από τον προσδιορισμό του χρόνου εμφάνισης του mRNA του γονιδίου της BiP, που ρυθμίζεται από το μονοπάτι της ATF6<sup>206</sup>. Η προσθήκη VEGF οδήγησε σε μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της BiP εντός μιας ώρας, ενώ η προσθήκη Tm χρειάστηκε τουλάχιστον 6 ώρες. Παρομοίως, η φωσφορυλίωση του μεταγραφικού παράγοντα eIF2α καθοδικά της PERK είναι εμφανής εντός 30 λεπτών και εξασθενεί εντός 6 ωρών μετά από επαγωγή με VEGF, ενώ κατόπιν επαγωγής με Tm αυτή εμφανίζεται μετά από 1 ώρα και παραμένει ανιχνεύσιμη πέραν των 24 ωρών. Είναι λοιπόν πρόδηλο ότι ο VEGF επάγει τα τρία μονοπάτια της UPR μέσα σε 15 με 30 λεπτά, χρόνος αρκετά σύντομος ώστε η επαγωγή αυτή να είναι αποτέλεσμα υπερφόρτωσης του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Άλλωστε, η Tm που οδηγεί σε συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών, εμφανίζει σαφώς αργότερη κινητική ενεργοποίησης των τριών μονοπατιών της UPR. Αυτό συμβαίνει προφανώς, λόγω του χρόνου που απαιτείται για να υπερκεραστεί η επιδιορθωτική, της αναδίπλωσης των πρωτεϊνών χωρητικότητα του ΕΔ.

Επιπλέον, η ενεργοποίηση μετά από χορήγηση Tm είναι παρατεταμένη και μη αντιστρεπτή και σηματοδοτεί την ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών, που οδηγούν τελικά το κύτταρο σε απόπτωση. Αντιθέτως, η κινητική της ενεργοποίησης των IRE1, ATF6 και PERK βραχιόνων από τον VEGF είχε τα χαρακτηριστικά σηματοδοτικής ενεργοποίησης, δηλαδή ταχεία ενεργοποίηση ακολουθούμενη από ταχεία

απενεργοποίηση. Υποθέσαμε λοιπόν ότι πιθανότατα κάποιο από τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος του VEGF ήταν υπεύθυνο για την άμεση ενεργοποίηση των τριών αυτών μονοπατιών του ΕΔ, χωρίς να είναι απαραίτητη η συσσώρευση μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του. Με οδηγό τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου *HERPUD1* και τη χρήση καθιερωμένων φαρμακολογικών αναστολέων των γνωστών μονοπατιών του VEGF, προσπαθήσαμε να ταυτοποιήσουμε το σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF το οποίο ενεργοποιεί τα τρία μονοπάτια της UPR. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς i) της p38 MAPK (SB203580, 20μM), ii) της MEK (PD98059, 20μM), iii) της PI3K (Wortmannin, 100μM) και iv) της PLCγ (U73122, 10μM). Πράγματι, η αναστολή της PLCγ μείωσε δραστικά την επαγωγή της μεταγραφής του *HERPUD1* από τον VEGF. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε με την αναστολή της ενεργοποίησης των τριών μονοπατιών της UPR, IRE1, ATF6 και PERK από τον VEGF είτε με τον αναστολέα U73122, είτε με αποσιώπηση του γονιδίου της PLCγ. Φαίνεται λοιπόν ότι ο VEGF διαμέσου του μονοπατιού της PLCγ, ενεργοποιεί άμεσα τους τρεις βραχίονες του ΕΔ που είναι υπεύθυνοι για την UPR.

Η ενεργοποίηση της PLCγ από τον VEGF με υδρόλυση της PIP2 παράγει 1,4,5 τριφωσφορική ινοσιτόλη ( $IP_3$ ), η οποία προσδένεται στους  $IP_3R$ -διαύλους ασβεστίου του ΕΔ απελευθερώνοντας ιόντα ασβεστίου από αυτό. Γνωρίζοντας ότι η συνοδός πρωτεΐνη BiP που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες IRE1, ATF6 και PERK είναι επίσης συνδεδεμένη με  $Ca^{2+}$ , εξετάσαμε το ενδεχόμενο μεταβολές στη συγκέντρωση του  $Ca^{2+}$  λόγω προσθήκης VEGF, να είναι υπεύθυνες για την αποδέσμευση της BiP από τους τρεις διαμεσολαβητές της UPR (IRE1, ATF6 και PERK) οδηγώντας στην ενεργοποίησή τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τη χημική ένωση 2-APB, η οποία αναστέλλει την  $IP_3R$ -διαμεσολαβούμενη απελευθέρωση του  $Ca^{2+}$  από το ΕΔ. Όπως παρατηρήσαμε από τα αποτελέσματά μας, παρά την παρουσία της 2-APB ο VEGF ήταν σε θέση να φωσφορυλιώσει το μεταγραφικό παράγοντα eIF2α. Ως εκ τούτου, αποκλείσαμε την πιθανότητα οι μεταβολές της συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$  εντός του ΕΔ, να είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση των μονοπατιών της UPR από τον VEGF. Την ίδια εικόνα παρουσίασαν τα αποτελέσματά μας, όσον αφορά τις μεταβολές της συγκέντρωσης του  $Ca^{2+}$  στο κυτταρόπλασμα. Τόσο η δέσμευση του  $Ca^{2+}$  που απελευθερώνεται κατόπιν επαγωγής με VEGF από το ΕΔ με τον χηλικό παράγοντα ΒΑΡΤΑ, όσο και η αναστολή των

CAM II κινασών, που διαμεσολαβούν τη δράση του άσβεστο-εξαρτώμενου μονοπατιού της καλμοδουλίνης με τον αναστολέα KN93, δεν επηρέασαν τη φωσφορυλίωση του eIF2α από τον VEGF. Συμπεραίνουμε λοιπόν πως ο VEGF, επάγει τα μονοπάτια καθοδικά των πρωτεϊνών IRE1, ATF6 και PERK της UPR, μέσω του μονοπατιού της PLCγ χωρίς όμως ο μηχανισμός ενεργοποίησης να εξαρτάται από τις μεταβολές της συγκέντρωσης του Ca<sup>2+</sup> στο ΕΔ ή το κυτταρόπλασμα όπως αρχικά υποθέσαμε.

Προκειμένου να προσεγγίσουμε, το λειτουργικό ρόλο που διαδραματίζει η ενεργοποίηση της UPR στη δράση του VEGF, αναστείλαμε τα τρία μονοπάτια που διαμεσολαβούν την απόκριση αυτή του ΕΔ, με αποσιώπηση των γονιδίων *IRE1*, *ATF6* και *eIF2α* και στη συνέχεια μελετήσαμε μερικές από τις πιο βασικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κύτταρων στον VEGF όπως ο πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση και η επιβίωση. Από τα αποτελέσματά μας καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση της UPR από τον VEGF εμφανίζει ενεργό ρόλο στην επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αποσιώπηση των γονιδίων *ATF6* και *eIF2α* μείωσε την VEGF-επαγόμενη επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά 53% και 60%, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική. Επίσης, η μελέτη του μονοπατιού της PLCγ που είναι υπεύθυνο για την επαγωγή των μονοπατιών της UPR από τον VEGF έδωσε όμοια αποτελέσματα. Τόσο η αναστολή της δραστηριότητας της PLCγ, με τον αναστολέα U73122 όσο και η αποσιώπηση του γονιδίου της PLCγ μείωσαν στατιστικά σημαντικά την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF κατά 50%.

Σύμφωνα με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα, η ενεργοποίηση της PLCγ από τον VEGF θεωρείται ότι επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω του PLCγ-DAG-PKC-ERK1/2 μονοπατιού, αλλά και την εκκριτική λειτουργία των Weibel-Pallade σωματιδίων, μέσω του PLCγ-IP3-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-CAMKII μονοπατιού<sup>327</sup>. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης αποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της PLCγ χαρακτηρίζεται και από μια επιπρόσθετη δράση, την επαγωγή της UPR στο ΕΔ μέσω της οποίας συμμετέχει στον αντι-αποπτωτικό ρόλο του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ως σήμερα η αντι-αποπτωτική δράση του VEGF θεωρείται ότι διαμεσολαβείται κατά κύριο λόγο διαμέσου του PI3K/Akt μονοπατιού<sup>131,135</sup>, θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα η ενεργοποίηση της PLCγ να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στη δραστηριότητα της πρωτεΐνης Akt. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από την



παρουσία στη βιβλιογραφία δύο μελετών, οι οποίες αποδεικνύουν την ύπαρξη μιας αμφίδρομης ρύθμισης μεταξύ PLCγ και Akt<sup>328 329</sup>. Προς επιβεβαίωση της υπόθεσής μας, είδαμε πως τόσο ο αναστολέας U73122 της PLCγ όσο και η αποσιώπηση του γονιδίου της PLCγ αναστέλλουν δραματικά τη φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF.

Φαίνεται λοιπόν ότι η ενεργοποίηση του μονοπατιού της PLCγ από τον VEGF αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Akt από τον ίδιο αυξητικό παράγοντα. Συνεπώς, το ερώτημα που δημιουργείται είναι με πιο μηχανισμό επιτυγχάνεται αυτό. Ένα ενδεχόμενο αποτελεί η άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών PLCγ και Akt. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι η SH3 περιοχή της PLCγ1 προσδένεται σε πλούσια σε προλίνη μοτίβα της Akt, με αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση της PLCγ1 στη θέση S1248 από την Akt<sup>328</sup>. Ωστόσο, δεν υπάρχει καμία ένδειξη ότι η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να λειτουργήσει και αντίστροφα, αναστέλλοντας τη δραστικότητα της Akt. Πρόσφατα, προτάθηκε ότι η PLCγ-διαμεσολαβούμενη απελευθέρωση του Ca<sup>2+</sup> από το ΕΔ και η επακόλουθη ενεργοποίηση των CaMKII, παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ενεργοποίηση της Akt από τον VEGF, σε βόεια ενδοθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδή<sup>330</sup>. Στην παρούσα εργασία στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα από φλέβα ομφαλίου λώρου, δείξαμε ότι η αναστολή των CaMKII με τον αναστολέα KN93 αναστέλλουν δραματικά τη φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF. Τα αποτελέσματα αυτά αναδεικνύουν τη σημασία του PLCγ-IP<sub>3</sub>-ER-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-CaMKII μονοπατιού στην ενεργοποίηση της Akt.

Τα παραπάνω δεδομένα στοιχειοθετούν σαφώς, το σημαντικό ρόλο που παίζει η ενεργοποίηση της PLCγ για τη φωσφορυλίωση της Akt και κατ' επέκταση στον αντι-αποπτωτικό ρόλο του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Δεν εξηγούν όμως, τη στατιστικά σημαντική μείωση του αντι-αποπτωτικού δυναμικού του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μετά από αποσιώπηση των γονιδίων *ATF6* και *eIF2α*. Υποθέσαμε λοιπόν ότι ενδεχομένως και τα μονοπάτια αυτά να είναι απαραίτητα για τη φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF. Όντως, η αποσιώπηση των γονιδίων *ATF6* και *eIF2α* μείωσε στατιστικά σημαντικά τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Akt μετά από 30 λεπτά επαγωγής με VEGF. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ενεργοποίηση των μονοπατιών του ΕΔ από τον VEGF έχει θετική επίδραση στην VEGF-επαγόμενη επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η

ενεργοποίηση του μονοπατιού της PI3K/Akt απαιτεί την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης από το φωσφορυλιωμένο eIF2α. Συγκεκριμένα, έχει προταθεί ότι η ενεργοποίηση του παράγοντα eIF2α, από την κινάση PERK, οδηγεί στη μεταγραφική αναστολή μιας άγνωστης πρωτεΐνης (X), που δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της PI3K ενεργότητας<sup>331,332,333</sup>. Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί πως η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης ATF6 διαδραματίζει καίριο ρόλο στην ενεργοποίηση του μονοπατιού επιβίωσης της πρωτεΐνης Akt μετά από επιλεκτική αδρανοποίηση της συνοδού πρωτεΐνης BiP<sup>334</sup>.

Τα αποτελέσματα αυτά προσθέτουν καινούργια δεδομένα, τόσο στη μεταγωγή του σήματος από τον VEGF, όσο και στο ρόλο του ΕΔ στην ομοιοστασία του κυττάρου. Κύρια λειτουργία του ΕΔ είναι η εξασφάλιση της ποιότητας των εκκρινόμενων και μεμβρανικών πρωτεϊνών του κυττάρου. Διαταραχή της ισορροπίας στο φορτίο του ΕΔ, που προκαλείται από τη συσσώρευση στον αυλό του ΕΔ μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών ή πρωτεϊνών με λανθασμένη διαμόρφωση στο χώρο, οδηγούν σε «στρες του ενδοπλασματικού δικτύου» (*ER stress*). Το ΕΔ είναι σε θέση να ανιχνεύει την κατάσταση αυτή και μέσω ενεργοποίησης τριών μονοπατιών (IRE1, ATF6 και PERK), να ρυθμίζει μεταγραφικά μια πλειάδα γονιδίων. Τα γονίδια αυτά εφορεύουν την έκφραση μιας σειράς πρωτεϊνών, που προσπαθούν να επαναφέρουν την ισορροπία στο μηχανισμό αναδίπλωσης του ΕΔ (Unfolded Protein Response, UPR). Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι οι βασικές συνιστώσες που απαρτίζουν την UPR και κατ' επέκταση η διαδικασία της UPR, μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα από σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτό του VEGF, χωρίς να απαιτείται υπερφόρτωση του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες. Με άλλα λόγια, το σύστημα της UPR χρησιμοποιείται σαν καθοδικός κρίκος της μεταγωγής του σήματος προσδεμάτων, που αναγνωρίζονται από μεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων αποτελώντας μέρος της απαρτιωμένης απόκρισης του κυττάρου στη παρουσία των προσδεμάτων αυτών. Με βάση τα παραπάνω, ο σηματοδοτικός ρόλος των τριών μονοπατιών του ΕΔ (IRE1, ATF6 και PERK) και τα λειτουργικά επακόλουθα των γονιδιακών ρυθμίσεων τους στην απόκριση των κυττάρων σε σηματοδοτικές πρωτεΐνες δεν καλύπτονται πλέον από τον όρο UPR. Για τον λόγο αυτό, προτείνουμε για τη σηματοδοτική ενεργοποίηση και λειτουργία της UPR να χρησιμοποιείται ο όρος Extracellular Signaling Response of ER (ESR).

Η κατανόηση του σηματοδοτικού ρόλου της ESR προσφέρει νέα σημαντικά στοιχεία στη μεταγωγή του σήματος του VEGF και ειδικότερα στους μηχανισμούς ελέγχου της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μια από τις πιο βασικές λειτουργίες του VEGF είναι η επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κύτταρων μέσω ενεργοποίησης αντι-αποπτωτικών μηχανισμών. Η επικρατούσα άποψη, για την αλληλουχία των μοριακών γεγονότων της μεταγωγής του σήματος του VEGF, που είναι υπεύθυνη για τη επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων συνοψίζεται ως ακολούθως. Το ενεργό σύμπλεγμα VEGF/VEGFR2 πρωτεϊνών προσελκύει τις PI3K και GAB1 πρωτεΐνες, διαδικασία που οδηγεί στη μετατροπή της PIP2 σε PIP3. Οι αλλαγές αυτές, μέσω της ενεργοποίησης των πρωτεϊνών PDK1/2 οδηγούν στη φωσφορυλίωση της PKB/Akt. Αυτή με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες BAD και κασπάση 9 αναστέλλοντας την αποπτωτική τους δράση. Παράλληλα, ο VEGF επάγει την έκφραση των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών BCL-2, A1, IAP και survivin αναστέλλοντας την αποπτωτική δράση των κασπασών 3 και 7 (Βλέπε Κεφ1.2.2.1).

Η παρούσα εργασία εμπλέκει ενεργά το ΕΔ και την ESR στην ενεργοποίηση του PI3K-GAB1-PDK1/2-Akt σηματοδοτικού μονοπατιού. Το σύμπλεγμα VEGF/VEGFR2 φωσφορυλιώνει την Y1175 ενδοκυτταρική περιοχή του VEGFR2, γεγονός που προσελκύει την πρωτεΐνη PLCγ, η οποία υδρολύει την PIP2 σε IP<sub>3</sub> και DAG. Η IP<sub>3</sub> ανοίγει τους IP<sub>3</sub> διαύλους του ΕΔ απελευθερώνοντας Ca<sup>2+</sup>, το οποίο με τη σειρά του δεσμεύεται από την καλμοδουλίνη και ενεργοποιεί τις CaMKII κινάσες. Η ενεργοποίηση των τελευταίων, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη φωσφορυλίωση της Akt από το PI3K-GAB1-PDK1/2-Akt μονοπάτι. Ταυτόχρονα και η ενεργοποίηση της ESR από την PLCγ, αποτελεί προϋπόθεση για τη φωσφορυλίωση της Akt, όπως έδειξε η αποσιώπηση των γονιδίων *ATF6* και *eIF2a*. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η αποσιώπηση των ίδιων γονιδίων αναστέλλει την αντι-αποπτωτική δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα, δείχνει πως ο μηχανισμός μεταγωγής του σήματος με τον οποίο ο VEGF επάγει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, είναι η συνισταμένη τριών μονοπατιών (Εικόνα 4.1). Μετά από τη δημιουργία του συμπλέγματος VEGF/VEGFR2 ενεργοποιείται το αντι-αποπτωτικό PI3K-GAB1-PDK1/2-Akt μονοπάτι, το οποίο καταλήγει στις αντι-αποπτωτικές δράσεις της φωσφορυλιωμένης Akt. Φαίνεται όμως πως η φωσφορυλίωση της Akt έχει ως προϋπόθεση τη σύγχρονη λήψη σημάτων από άλλα δύο μονοπάτια του VEGF, στα οποία

συμμετέχει το ΕΔ. Συγκεκριμένα, απαιτείται η ενεργοποίηση των CaMKII κινασών από το PLCγ-IP3-ER-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-CaMKII μονοπάτι, καθώς και η ενεργοποίηση των ATF6 και PERK βραχιόνων (ESR) μέσω του PLCγ-ER/ESR-ATF6/PERK μονοπατιού. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ενεργοποίηση της PLCγ, όχι μόνο ρυθμίζει την επιβίωση διαμέσου του ΕΔ, αλλά συγχρόνως είναι υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου του PLCγ-DAG-PKC-RAF-ERK1/2 μονοπατιού εξασφαλίζοντας το συντονισμό επιβίωσης και πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η ανάγκη σύγχρονης λήψης μηνυμάτων από πολλά μονοπάτια για τη φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF και την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Πράγματι, η αντι-αποπτωτική δράση του VEGF μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού της Akt εξαρτάται από την παρουσία επικουρικών υποδοχέων (βλέπε κεφ.1.2.4.1), όπως η αγγειακή ενδοθηλιακή καντχερίνη (vascular endothelial (VE)-cadherin)<sup>12</sup>. Η VE-καντχερίνη σχηματίζει σύμπλεγμα με τον VEGFR2, τη β-κατενίνη (β-catenin) και την PI3K, η συντονισμένη δράση του οποίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενεργοποίηση της Akt<sup>17</sup>. Απαλοιφή του γονιδίου της VE-καντχερίνης ή της β-κατενίνης σε knockout ποντικούς οδηγεί σε εμβρυική θνησιμότητα κατά την 9.5 εμβρυική μέρα<sup>12</sup>, λόγω μειωμένης επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και υποστροφή των αγγείων<sup>17</sup>. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η ενεργοποίηση των ATF6 και PERK μονοπατιών επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της Akt και την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων, δεν είναι ακόμη γνωστός.

Η διάκριση αυτή όχι μόνο δικαιολογείται από το διαφορετικό τρόπο ενεργοποίησης, αλλά επιπλέον είναι συνυφασμένη με διαφορετικά επακόλουθα στη λειτουργία των κυττάρων. Ο VEGF είναι ο σημαντικότερος παράγοντας επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων και η δράση του διαμέσου της ESR έχει σαφώς αντι-αποπτωτικό ρόλο και ουδέποτε προκαλεί απόπτωση σε αυτά. Αντίθετα, η απόπτωση είναι αναπόσπαστο συστατικό της UPR το οποίο δυνητικά μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε θάνατο. Πράγματι, η απάλειψη των πρωτεϊνών ATF6 και eIF2α αναστέλλει την αντι-αποπτωτική δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα διότι η ενεργοποίηση του PLCγ-ER/ESR-ATF6/PERK μονοπατιού από τον VEGF είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση της Akt, του βασικού τελεστή του κύριου αντι-αποπτωτικού μονοπατιού (PI3K-GAB1-

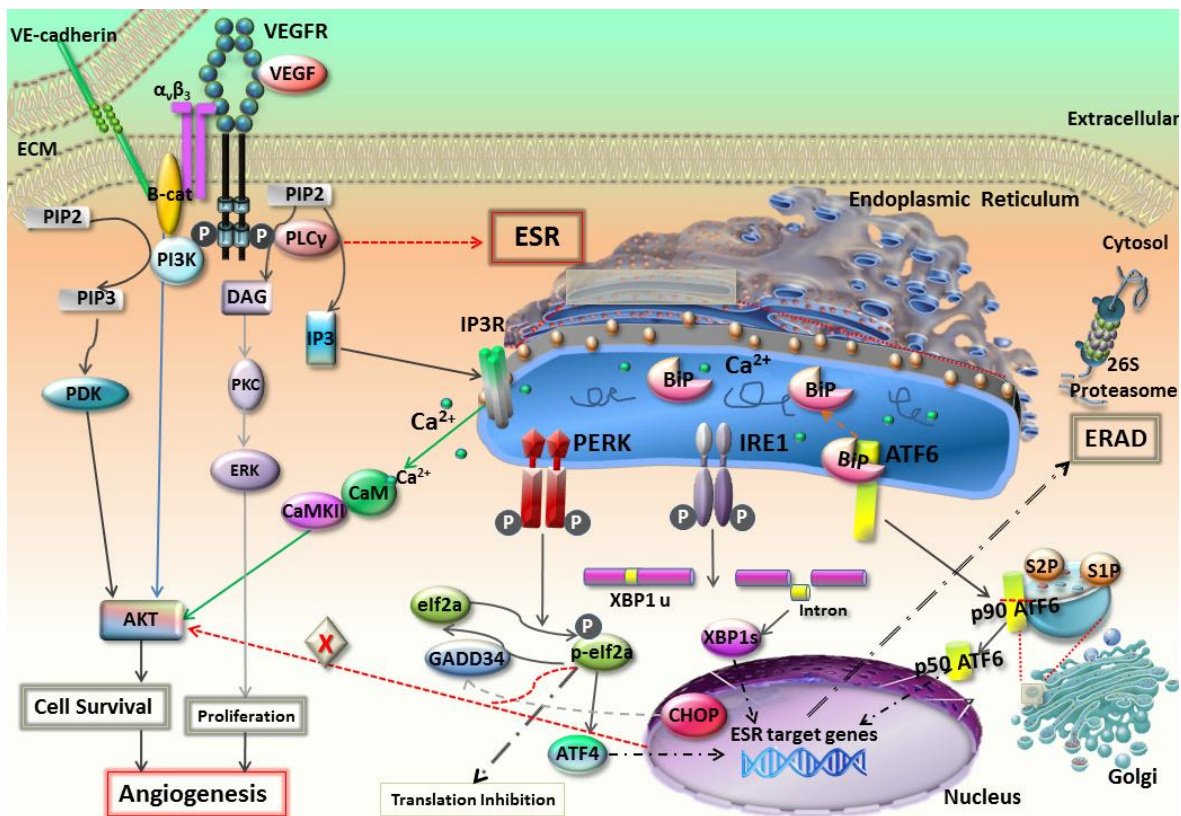
PDK1/2-Akt) του ίδιου αυξητικού παράγοντα. Παράλληλα, στη φωσφορυλίωση της Akt και την αντι-αποπτωτική της δράση συμμετέχει και το άσβεστο-εξαρτώμενο μονοπάτι PLCγ-IP3-ER-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-CaMKII του ΕΔ, κατόπιν ενεργοποίησης από τον VEGF. Αντίθετα, σε καταστάσεις στρες του ΕΔ, η ενεργοποίηση της UPR συνοδεύεται από αποφωσφορυλίωση της Akt και απόπτωση, όπως αναφέρεται σε σειρά πρόσφατων μελετών<sup>335-338</sup>. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση της Akt και κατ' επέκταση η αντι-αποπτωτική της δράση επηρεάζονται διαφορετικά από την ESR σε σύγκριση με την UPR.

Τα διαμετρικά αντίθετα επακόλουθα της ενεργοποίησης των ίδιων μονοπατιών του ΕΔ (IRE1, ATF6 και PERK) του ΕΔ δεν αποτελούν έκπληξη. Είναι σαφές ότι μόνο η έντονη και παρατεταμένη ενεργοποίηση της UPR οδηγεί σε απόπτωση, ενώ η ήπια UPR οδηγεί σε προσαρμογή και επιβίωση του κυττάρου (adaptive UPR)<sup>339</sup>. Συνεπώς, η επιλογή μεταξύ επιβίωσης και απόπτωσης είναι εγγενής ιδιότητα της λειτουργίας του ΕΔ. Η συγκέντρωση της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP, το γονίδιο της οποίας ανήκει σε αυτά που ενεργοποιούνται μεταγραφικά κατά την UPR, φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλογή μεταξύ επιβίωσης και απόπτωσης στην UPR. Το γονίδιο της CHOP ενεργοποιείται μεταγραφικά σε κάθε περίπτωση UPR, αλλά κατά την ήπια UPR προάγεται η επιβίωση λόγω της αστάθειας του mRNA και της πρωτεΐνης CHOP γεγονός που δεν επιτρέπει την αύξηση της συγκέντρωσης της CHOP στο κύτταρο. Αντίθετα, κατά την παρατεταμένη και έντονη UPR, το mRNA και η πρωτεΐνη CHOP σταθεροποιούνται με άγνωστο μηχανισμό, και η συγκέντρωση της CHOP στο κύτταρο φτάνει σε υψηλά επίπεδα με αποτέλεσμα το κύτταρο να οδηγείται σε απόπτωση. Φαίνεται λοιπόν ότι η ενεργοποίηση των IRE1, ATF6 και PERK βραχιόνων από τον VEGF διαμέσου της PLCγ, αποτελεί ισοδύναμη κατάσταση με την ήπια UPR. Όντως, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP από τον VEGF δεν οδηγεί σε ανιχνεύσιμα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP κατά συνέπεια δεν επάγεται η απόπτωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από χορήγηση VEGF. Αντίθετα, η αντι-αποπτωτική δράση του VEGF ευοδώνεται μέσω της ενεργοποίησης των ATF6 και PERK και της συμμετοχής τους στη φωσφορυλίωση της Akt.

Στα πλαίσια αυτά διαφαίνεται μια ευρύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ αντι- και προ-αποπτωτικών μηχανισμών διαμέσου του ΕΔ. Δεν είναι τυχαίο ότι η προ-αποπτωτική

δράση της CHOP περιλαμβάνει τη μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της πρωτεΐνης GADD34, το οποίο αποφωσφορυλιώνει τον παράγοντα eIF2a και αναστέλλει το μονοπάτι της PERK<sup>237</sup>. Αν και θεωρείται ότι η αναστολή του μονοπατιού PERK από την CHOP, και η αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης που αυτή συνεπάγεται, επιτείνει την υπερφόρτωση του ΕΔ με πρωτεΐνες και επιταχύνει την απόπτωση, από τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής προκύπτει μια εναλλακτική εξήγηση. Η αναστολή της PERK από την CHOP εξασφαλίζει μειωμένη δυνατότητα φωσφορυλίωσης και μειώνει την αντι-αποπτωτική δράση της Akt μεγιστοποιώντας την προ-αποπτωτική της λειτουργία. Επιπλέον, η απενεργοποίηση της Akt επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης CHOP δημιουργώντας φαύλο κύκλο<sup>336</sup>. Η χρήση ειδικών αναστολέων που αποτρέπουν την αποφωσφορυλίωση του eIF2a από την πρωτεΐνη GADD34 σπάζει το φαύλο κύκλο και σώζει τα κύτταρα από τις συνέπειες του στρες του ΕΔ<sup>340,341</sup>. Πράγματι, διαγονιδιακά ζώα μετά από απαλοιφή της CHOP και της GADD34 προστατεύονται από την UPR<sup>342-344</sup>.

Συμπερασματικά, η παρούσα διατριβή προσθέτει καινούργια δεδομένα όσον αφορά τη μεταγωγή του σήματος από τον VEGF, αλλά και το ρόλο του ΕΔ στην ομοιοστασία του κυττάρου. Αναδεικνύει το ΕΔ σαν ενδιάμεσο σταθμό της μεταγωγής του σήματος του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα δείχνοντας ότι ο VEGF ενεργοποιεί, μέσω του μονοπατιού της PLCγ, τους τρεις βραχίονες της UPR (IRE1, ATF6 και PERK). Η ενεργοποίηση των IRE1, ATF6 και PERK πραγματοποιείται εντός 15-30 λεπτών από τη χορήγηση του VEGF και δεν είναι το αποτέλεσμα συσσώρευσης μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στο ΕΔ. Στη σηματοδοτική ενεργοποίηση των IRE1, ATF6 και PERK (και της επακόλουθης μεταγραφικής επαγωγής) δώσαμε την ονομασία Extracellular Signaling Response of ER (ESR), για να τη διαφοροποιήσουμε από την ενεργοποίηση διαμέσου υπερφόρτωσης του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR). Η ενεργοποίηση της ATF6 και PERK έχει θετική επίδραση στη φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF, προάγοντας την αντι-αποπτωτική της δράση και συμβάλλοντας ουσιαστικά στην επαγωγή της επιβίωσης που προκαλεί ο VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα.



**Εικόνα 4.1:** Το ΕΔ είναι ενδιάμεσος σταθμός της μεταγωγής του σήματος από τον VEGF. Το σύμπλεγμα VEGF/VEGFR2 φωσφορυλιώνει την Y1175 της ενδοκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 προσελκύνοντας την PLCγ, η οποία υδρολύει την PIP2 σε IP<sub>3</sub> και DAG. Η IP<sub>3</sub> ανοίγει τους IP<sub>3</sub> διαύλους του ΕΔ απελευθερώνοντας Ca<sup>2+</sup>, το οποίο με τη σειρά του δεσμεύεται από την καλμοδουλίνη και ενεργοποιεί τις CaMKII κινάσες. Η DAG, μέσω της PKC, ενεργοποιεί τη RAF και τελικά τις ERK1/2 επάγοντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (ΕΚ). Η PLCγ ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες IRE1, ATF6 και PERK του ΕΔ με μηχανισμό, ανεξάρτητο των μεταβολών της συγκέντρωσης του Ca<sup>2+</sup> στο ΕΔ. Η ενεργοποίηση των IRE1, ATF6 και PERK μονοπατιών κορυφώνεται σε 15-30 min και δεν είναι αποτέλεσμα υπερφόρτωσης με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Responsee, UPR). Την ενεργοποίηση των τριών αυτών μονοπατιών του ΕΔ από τον VEGF, διαμέσου του σηματοδοτικού μονοπατιού της PLCγ, ονομάσαμε Extracellular Signalling Response (ESR) για να τη διακρίνουμε από την UPR του ΕΔ. Τα μονοπάτια IRE1 και ATF6 ενεργοποιούν τη μεταγραφή σειράς γονιδίων μέσω της XBP1s και p90ATF6, αντίστοιχα, ενώ η PERK, μέσω φωσφορυλίωσης του eIF2α, αναστέλλει τη μετάφραση και ταυτόχρονα, μέσω του ATF4 επάγει σειρά γονιδίων όπως η CHOP. Η ενεργοποίηση των ATF6 και PERK συμμετέχει στο μηχανισμό επιβίωσης των ΕΚ όντας απαραίτητη προϋπόθεση για τη φωσφορυλίωση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Akt από το μονοπάτι PI3K/Akt, όπως έχει ήδη δείχθει και για την VE-καντηρίνη, η παρουσία της οποίας σε σύμπλεγμα με τον VEGFR2, τη β-κατενίνη (β-catenin) και την PI3K είναι απαραίτητη προϋπόθεση για τη ενεργοποίηση της Akt. Για το μονοπάτι της PERK έχει προταθεί ότι αναστολή της μετάφρασης μέσω του p-eIF2α αποτρέπει τη σύνθεση μιας άγνωστης πρωτεΐνης (X) που δρα ως αναστολέας της PI3K, ενώ για το μονοπάτι της ATF6 ο μηχανισμός είναι άγνωστος. Η ενεργοποίηση των CaMKII κινασών, καθοδικών τελεστών του άσβεστο-εξαρτώμενου μονοπατιού του ΕΔ, αποτελεί επίσης απαραίτητη προϋπόθεση για τη φωσφορυλίωση της Akt από τον VEGF. Η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP από τον VEGF δεν οδηγεί σε ανιχνεύσιμα επίπεδα της πρωτεΐνης CHOP, πιθανώς λόγω αστάθειας του mRNA και της πρωτεΐνης CHOP. Η αύξηση της συγκέντρωσης της CHOP θα μπορούσε να ανατρέψει την ισορροπία υπέρ της απόπτωσης, διότι επάγει τη μεταγραφή της πρωτεΐνης GADD34, η οποία αποφωσφορυλιώνει τον eIF2α και δυνητικά θα μπορούσε να ακυρώσει το ρόλο της PERK σαν προϋπόθεση για φωσφορυλίωση της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Akt.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Λειτουργικός Χαρακτηρισμός Γονιδίων τα οποία Ρυθμίζονται από τον VEGF****ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ  
ΕΥΔΟΞΙΑΣ ΚΑΡΑΛΗ**

Ο VEGF είναι ο κύριος ρυθμιστής της δημιουργίας φυσιολογικών αγγείων, αλλά επίσης εμπλέκεται στην παθογένεση των αγγειογενετικών νόσων, όπως ο καρκίνος. Έτσι, η διερεύνηση της μεταγωγής του σήματος του αναμένεται να εντοπίσει νέους μοριακούς στόχους για την ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών θεραπειών. Η παρούσα διατριβή βασίστηκε στην παρατήρηση, με μικροσυστοιχίες cDNA, ότι ο VEGF ενεργοποιεί μεταγραφικά τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*, τα οποία συμμετέχουν στην απόκριση του ΕΔ στην παρουσία μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών στον αυλό του (Unfolded protein Response, UPR). Η υπερέκφραση των δύο αυτών γονιδίων από τον VEGF ήταν ειδική και δεν παρατηρήθηκε μετά από χορήγηση FGF2, ενός άλλου ισχυρού αγγειογενετικού παράγοντα. Παραπέρα μελέτη αποκάλυψε ότι ο VEGF δεν επάγει μόνο τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB9*, αλλά επίσης την πλειοψηφία των γονιδίων που ρυθμίζονται και από τους τρεις βραχίονες της UPR (IRE1, ATF6 και PERK).

Η γενικευμένη αυτή ενεργοποίηση των γονιδίων της UPR δεν προκλήθηκε από αυξημένα φορτία πρωτεϊνών στον αυλό του ΕΔ εξαιτίας της ενεργοποίησης του εκκριτικού μονοπατιού από τον VEGF. Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε στα εξής δεδομένα. Πρώτον, παρά την αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης με κυκλοεξιμίδιο, η προσθήκη VEGF συνέχισε να επάγει μεταγραφικά, αν και σε μικρότερο βαθμό, τα γονίδια *HERPUD1* και *DNAJB*. Δεύτερον, η ενεργοποίηση και των τριών μονοπατιών της UPR (IRE1, ATF6 και PERK) από τον VEGF ήταν ταχύτατη (εντός 15-30 λεπτών) και εξασθένησε γρήγορα. Αντίθετα, η προσθήκη του αναστολέα της N-γλυκοσυλίωσης Tunicamycin (Tm), η οποία υπερφορτώνει το ΕΔ με πρωτεΐνες λανθασμένης διαμόρφωσης, προκάλεσε την ενεργοποίηση των τριών μονοπατιών της UPR σε αργότερο χρονικό διάστημα (μερικές ώρες) και για μακρό χρονικό διάστημα. Τέλος, με τη χρήση ειδικών αναστολέων κινασών και αποσιώπηση γονιδίων με siRNA, δείξαμε πως ο VEGF επάγει την UPR διαμέσου του μονοπατιού της PLCγ. Αν και ο μηχανισμός ενεργοποίησης των βραχιόνων της UPR από

το μονοπάτι της PLCγ παραμένει άγνωστος, τα δεδομένα μας δείχνουν ότι δεν εξαρτάται από τη διακύμανση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα και το ΕΔ.

Η ενεργοποίηση των τριών βραχιόνων της UPR φαίνεται να παίζει κρίσιμο ρόλο στην επαγωγή της επιβίωσης που προκαλεί ο VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η αποσιώπηση των *ATF6* και *eIF2a* γονιδίων μείωσε κατά 50% την επαγωγή της επιβίωσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF. Ουσιαστικά, η ενεργοποίηση αμφοτέρων των μονοπατιών που διαμεσολαβούνται από το ΕΔ είναι κομβικής σημασίας για την αντι-αποπτωτική δράση του VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Πράγματι, η φωσφορυλίωση της Akt από το μονοπάτι της PI3K εξαρτάται από την ταυτόχρονη ενεργοποίηση των PLCγ-ER-ATF6/PERK και PLCγ-IP3-ER-Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-CaMKII μονοπατιών. Παράλληλα, η χορήγηση VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα της προ-αποπτωτικής πρωτεΐνης CHOP, παρά το γεγονός ότι γονίδιο της CHOP ενεργοποιείται μεταγραφικά, κυρίως από το μονοπάτι PERK/ATF4. Η παρατήρηση αυτή είναι συμβατή με προηγούμενη μελέτη όπου το mRNA και η πρωτεΐνη της CHOP είναι ασταθή και αποικοδομούνται ταχύτατα κατά τη διάρκεια ήπιας UPR. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η ενσωμάτωση των μονοπατιών του ΕΔ στους μηχανισμούς μεταγωγής του σήματος του VEGF μεγιστοποιεί την αντι-αποπτωτική δράση του στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Η παρούσα μελέτη προσθέτει νέα γνώση όσον αφορά τη μεταγωγή του σήματος από τον VEGF και φωτίζει άγνωστες πτυχές του ρόλου του ΕΔ στην ομοιοστασία του κυττάρου. Τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο VEGF, διαμέσου της PLCγ, ενεργοποιεί διαδικασίες του ΕΔ, όπως η UPR, οι οποίες εντάσσονται στο μηχανισμό της μεταγωγής σήματος του VEGF συμμετέχοντας στις δράσεις του τελευταίου στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Έτσι, ονομάσαμε την ενεργοποίηση των IRE1, ATF6 και PERK του ΕΔ (και της επακόλουθης μεταγραφικής επαγωγής) από τα μονοπάτια σηματοδότησης εξωκυτταρικών προσδεμάτων ως «Extracellular Signaling Response (ESR)», για να τη διαφοροποιήσουμε από την ενεργοποίηση διαμέσου υπερφόρτωσης του ΕΔ με μη αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR).

## SUMMARY

### *Functional characterization of VEGF-regulated genes*

PHD THESIS BY  
EVDOXIA KARALI

VEGF is the key modulator of normal vessel generation being also involved in the pathogenesis of angiogenic diseases, such as cancer. Therefore, unraveling its signaling cascades in endothelial cell might provide molecular targets for the development of anti-angiogenic therapies. The present thesis was based on the observation, by cDNA microarrays, that two genes participating in the unfolded protein response (UPR) of ER, *HERPUD1* and *DNAJB9*, were transcriptionally activated by VEGF. The over-expression of the two genes was specific for VEGF not being induced by FGF2, another potent angiogenic factor. Additional screening revealed that VEGF induces not only the *HERPUD1* and *DNAJB9* genes, but also the majority of the genes regulated by the three UPR branches (IRE1, ATF6 και PERK).

The generalized transcriptional activation of UPR genes was not caused by increased load of proteins in the ER lumen due to activation of the secretory pathway by VEGF. This conclusion was based on several experimental data. First, inhibition of protein synthesis by cycloheximide exhibited a minor impact on the transcriptional activation of the *HERPUD1* and *DNAJB9* genes by VEGF. Secondly, VEGF leads to a rapid (within 15-30 min) but short-term activation of the three branches of UPR (IRE1, ATF6 and PERK), contrary to Tunicamycin (Tm), a N-linked glycosylation inhibitor that leads to ER overload with misfolded proteins, that induces activation of the IRE1, ATF6 and PERK pathways in a delayed and long-term manner. Finally, using a series of specific inhibitors of VEGF pathways and siRNA gene silencing, we have identified that the PLC $\gamma$  pathway of VEGF was responsible for the activation of the three UPR branches. The mechanism by which the PLC $\gamma$  pathway activates IRE1, ATF6 and PERK is still unknown however, our data indicate that is Ca<sup>2+</sup>-independent.

Activation of the three UPR pathways of ER appeared to be critical for the VEGF-induced endothelial cell survival. In particular, silencing of the *ATF6* and *eIF2a* genes

## SUMMARY

---

reduced the VEGF-induced survival of endothelial cells by 50%. Indeed, activation of the ER-mediated cascades by VEGF was crucial for its anti-apoptotic effect on endothelial cells. VEGF-induced phosphorylation of Akt by the PI3K pathway required concomitantly active PLC $\gamma$ -ER-ATF6/PERK and PLC $\gamma$ -IP $_3$ -ER-Ca $^{2+}$ -calmodulin-CaMKII cascades. Interestingly, VEGF administration to endothelial cells was associated with undetected levels of the pro-apoptotic protein CHOP despite the transcriptional activation of its gene via the PERK/ATF4 pathway. This is compatible with previous studies reporting that the mRNA and protein of CHOP are unstable being rapidly degraded during mild (adaptive) UPR. Thus, VEGF incorporates the ER-dependent cascades in its signaling machinery to achieve a maximal anti-apoptotic effect on endothelial cells.

This study contributes novel knowledge in the signal transduction of VEGF and elucidates unknown aspects of the ER function in cell homeostasis. ER emerges as key component of the signal transducing machinery of VEGF in endothelial cells as the latter activates the three UPR branches of ER through the PLC $\gamma$  pathway. We named the activation of IRE1, ATF6 and PERK (and their following transcriptional induction) by signaling cascades of extracellular ligands as Extracellular Signaling Response (ESR) of ER to distinguish it from activation due to overloading of ER with unfolded proteins (UPR).

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

### A

Ang-2: Angiopoietin-2

ATF4: Activating transcription factor 4 ATF6: Activating transcription factor

ATF6: Activating transcription factor 6

ATF: activating transcription factor

### B

BAK: Bcl-2 homologous antagonist/killer

BAPTA-AM: 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid acetoxymethyl ester

Bax: Bcl2-associated X protein

Bcl2: B cell leukemia 2

BDNF: Brain –Derived Neurotrophic Factor

BFA: Brefeldin AbZIP: Basic leucine zipper domain

Bim: Bcl2-interacting mediator of cell death

BiP: Binding immunoglobulin protein

BM: Bone Marrow

bZIP: basic leucine-zipper-containing

### C

C/EBP: CCAAT/enhancer-binding protein

Ca<sup>2+</sup>: calcium

CaM: calmodulin

CaMK: calcium/calmodulin-dependent protein kinase

CDC42: cell division cycle 42

CHOP: C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein

CHX: cycloheximide

CNX: calnexin

CREB: cAMP response element-binding protein

CREBH: cAMP response element-binding protein H

CRp: constitutive repressor of eIF2 $\alpha$  phosphorylation

CRT: calreticulin

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

---

### D

DAG: diacylglycerol

DSS: distal splice site selection

### E

ECM: Extracellular Matrix

EDEM: ER degradation enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein

EGF: Epidermal Growth Factor

eIF2 $\alpha$ : eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$

EPCs: Endothelial Progenitors Cells

ER: Endoplasmic Reticulum

ERAD: ER-Associated Degradation

ERdj: ER dnaJ

ERK1/2: Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2

ERO1: ER oxidoreductin

ERp57: endoplasmic reticulum resident protein 57

ERp72: ER protein 72

ERSE: ER stress response element

### F

FACS: fluorescence-activate cell sorting

FAK: Focal Adhesion Kinase

FBS: fetal bovine serum

bFGF (FGF2): Basic Fibroblast Growth Factor

### G

GAB: GRB2-Binding Protein

GADD: growth arrest and DNA damage

GADD34: growth arrest and DNA damage-inducible protein-34

GEF: guanine nucleotide exchange factor

GRP: glucose-regulated protein

GRP78: glucose regulated protein 78

GRP94: glucose-regulated protein 94

**H**

HERP: Homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1

HIF-1: Hypoxia Inducible Factor-1

Hrd1: HMG-CoA reductase degradation protein 1

HSCs: Hematopoietic Stem cells

HSP: heat shock protein

Hsp70-40: heat shock protein 70-40

HSPA5: heat-shock 70-kD protein 5

HSPGs: Heparin Sulfate Proteoglygans

HUVECs: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

**I**

IAP: inhibitor of apoptosis

IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5-trisphosphate

IRE1: Inositol requiring protein 1

ISR: Integrated Stress Response

**J**

JAB1: Jun Activation Domain-Binding Protein 1

JAK: Janus kinase

JMD: juxtamembrane domain

JNK: c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase

**K**

KID: Kinase Insert Domain

**L**

LECs: lymphatic endothelial cells

**M**

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAPKKK: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MD: transmembrane domain

MEFs: mouse embryonic fibroblasts

MEK: mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

---

mRNA: messenger RNA

MDG1: Microvascular Differentiation Gene 1

### **N**

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

NF- $\gamma$ : Nuclear Factor- $\gamma$

NO: nitric oxide

NOS: nitric oxide synthase

NRP-1,-2: neuropilin-1 και -2

NUCB1, NUC: Nucleobindin 1

### **O**

### **P**

p58IPK: 58 kDa-inhibitor of protein kinase

PAK2: p21-Activated Protein Kinase-2

pATF6(N): the nuclear form of ATF6 protein

PBS: phosphate-buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PDGF: Platelet Derived Growth Factor

PDI: Protein Disulphide Isomerase

PERK: PKR-like ER kinase

PGI<sub>2</sub>: prostacyclin

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase

PIP<sub>2</sub>: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate PKB: protein kinase B

PKC: Protein Kinase C

PKR: protein kinase R

PLC $\gamma$ : Phospholipase C  $\gamma$

PLGF: Placental Growth Factor

pXBP1(S): the spliced form of XBP1 protein

pXBP1(U): the unspliced form of XBP1 protein

### **Q**

qRT-PCR: quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction



**R**

RACK1: receptor for activated C-kinase 1

RIDD: IRE1-Dependent Decay

RNA: ribonucleic acid

ROS: Reactive Oxygen Species

RTKs: Receptor Tyrosin Kinases

**S**

S1P: Site-1 protease

S2P: Site-2 protease

SAPK: Stress Activated Protein Kinase

Sck: [SHC (Src Homology and Collagen homology)-related adaptor protein]

SERCA: sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase pump

SH2: Src homology 2

SHP2: SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2

SOS: Son of sevenless

SREBP: sterol response element-binding protein

SRP: signal-recognition particle

STAT: signal transducer and activator of transcription

**T**

Tg: Thapsigargin

TGFβ: Transforming Growth Factor Beta

TKD1: ATP-binding domain

TKD2: phosphotransferase domain

Tm: Tunicamycin

TMD: Transmembrane Domain

TNFα: Tumor Necrosis Factor-α

TPS: Thrombospondin

TRAF2: TNF receptor-associated factor 2

TRB3: Tribbles homolog 3

TSAD: T Cell-Specific Adaptor

### **U**

UBA: ubiquitin-associated domain

UBC7: ubiquitin conjugase 7

Ufd1: ubiquitin fusion degradation protein 1

ULD: N-terminal ubiquitin-like domain

UPR: Unfolded protein response

UPRE: Unfolded protein response element

### **V**

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR1: *fms*-like tyrosine kinase-1 or Flt-1

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, Kinase insert Domain-containing Receptor ή KDR/Flk-1

VEGFR3: *Fms*-Like Tyrosine kinase-4 ή Flt-4

VPF: Vascular Permeability Factor

VRAP: VEGFR2-Associated Protein

vSMCs: Smooth Muscle Cells

VVOs: vesicular-vacuolar

### **W**

### **X**

XBP1: X-box binding protein 1

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ**

1. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-4.
2. Schmidt A, Brixius K, Bloch W. Endothelial precursor cell migration during vasculogenesis. *Circ Res* 2007;101:125-36.
3. Risau W. Differentiation of endothelium. *Faseb J* 1995;9:926-33.
4. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 1997;79:1-8.
5. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* 2001;100:157-63.
6. Ribatti D. The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review. *Leuk Res* 2007;31:439-44.
7. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:464-78.
8. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
9. Haar JL, Ackerman GA. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. *Anat Rec* 1971;170:199-223.
10. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation* 1995;91:2793-801.
11. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997;173:206-10.
12. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999;98:147-57.
13. Underwood PA, Bean PA, Whitelock JM. Inhibition of endothelial cell adhesion and proliferation by extracellular matrix from vascular smooth muscle cells: role of type V collagen. *Atherosclerosis* 1998;141:141-52.
14. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998;125:1591-8.
15. Lindahl P, Bostrom H, Karlsson L, Hellstrom M, Kalen M, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in angiogenesis and alveogenesis. *Curr Top Pathol* 1999;93:27-33.
16. Rucker M, Strobel O, Vollmar B, Roesken F, Menger MD. Vasomotion in critically perfused muscle protects adjacent tissues from capillary perfusion failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H550-8.
17. Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *The Journal of pathology* 2000;190:387-405.
18. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 1992;116:435-9.
19. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, et al. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;72:835-46.
20. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-42.

21. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48-50.
22. Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 1999;126:3047-55.
23. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-80.
24. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996;87:1161-9.
25. Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999;13:1055-66.
26. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55-60.
27. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology* 2002;282:C947-70.
28. Jimenez B, Volpert OV, Reiher F, et al. c-Jun N-terminal kinase activation is required for the inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Oncogene* 2001;20:3443-8.
29. Burri PH, Tarek MR. A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec* 1990;228:35-45.
30. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
31. Hohenstein B, Hausknecht B, Boehmer K, Riess R, Brekken RA, Hugo CP. Local VEGF activity but not VEGF expression is tightly regulated during diabetic nephropathy in man. *Kidney Int* 2006;69:1654-61.
32. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
33. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
34. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:315-26.
35. Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003;18:65-70.
36. Djonov VG, Kurz H, Burri PH. Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn* 2002;224:391-402.
37. Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res* 2000;86:286-92.
38. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000;407:242-8.
39. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 1999;284:1994-8.
40. Fukumura D, Jain RK. Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. *Journal of cellular biochemistry* 2007;101:937-49.

41. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:102-11.
42. Eremina V, Quaggin SE. The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2004;13:9-15.
43. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American journal of physiology* 2001;280:C1358-66.
44. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-5.
45. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-9.
46. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1512-20.
47. Servos S, Zachary I, Martin JF. VEGF modulates NO production: the basis of a cytoprotective effect? *Cardiovasc Res* 1999;41:509-10.
48. Zachary I, Glik G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-81.
49. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:227-41.
50. Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem* 2005;280:2126-31.
51. Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995;203:80-92.
52. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 2004;9 Suppl 1:2-10.
53. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996;380:435-9.
54. Ferrara N, Bunting S. Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996;5:35-44.
55. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007;130:691-703.
56. Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilio M. Autocrine VEGF signaling synergizes with EGFR in tumor cells to promote epithelial cancer development. *Cell* 2010;140:268-79.
57. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-74.
58. Plouet J, Moro F, Bertagnolli S, et al. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem* 1997;272:13390-6.
59. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, et al. VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem* 1997;272:7151-8.

60. Borriello F, Tizard R, Rue E, Reeves R. Characterization and localization of Mox2, the gene encoding the murine homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein. *Mamm Genome* 1998;9:114-8.
61. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-14.
62. Bates DO, Cui TG, Doughty JM, et al. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-31.
63. Cohen T, Gitay-Goren H, Sharon R, et al. VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol Chem* 1995;270:11322-6.
64. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996;271:7788-95.
65. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993;4:1317-26.
66. Neufeld G, Cohen T, Gitay-Goren H, et al. Similarities and differences between the vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants. *Cancer Metastasis Rev* 1996;15:153-8.
67. Neufeld G, Tessler S, Gitay-Goren H, Cohen T, Levi BZ. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog Growth Factor Res* 1994;5:89-97.
68. Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem* 1996;271:19310-7.
69. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993;8:925-31.
70. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:21-6.
71. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* 2005;438:946-53.
72. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 2008;454:656-60.
73. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* 2008;8:880-7.
74. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992;359:843-5.
75. Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999;9:211-20.
76. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 1999;13:9-22.

77. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:11197-204.
78. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell structure and function* 2001;26:25-35.
79. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risau W, Keller G. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 1997;124:2039-48.
80. Davis-Smyth T, Presta LG, Ferrara N. Mapping the charged residues in the second immunoglobulin-like domain of the vascular endothelial growth factor/placenta growth factor receptor Flt-1 required for binding and structural stability. *J Biol Chem* 1998;273:3216-22.
81. Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1998;273:31283-8.
82. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011;437:169-83.
83. Nilsson I, Bahram F, Li X, et al. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *The EMBO journal* 2010;29:1377-88.
84. Dosch DD, Ballmer-Hofer K. Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers. *FASEB J* 2010;24:32-8.
85. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life* 2009;61:915-22.
86. Errico M, Riccioni T, Iyer S, et al. Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *J Biol Chem* 2004;279:43929-39.
87. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11709-14.
88. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1994;68:84-92.
89. Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem* 2004;279:46304-14.
90. Cebe-Suarez S, Grunewald FS, Jaussi R, et al. Orf virus VEGF-E NZ2 promotes paracellular NRP-1/VEGFR-2 coreceptor assembly via the peptide RPPR. *FASEB J* 2008;22:3078-86.
91. Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* 2002;515:81-90.
92. Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, et al. Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J Biol Chem* 1994;269:12456-61.

93. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 2002;12:13-9.
94. Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, et al. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 1997;19:995-1005.
95. Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 1997;19:547-59.
96. Favier B, Alam A, Barron P, et al. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* 2006;108:1243-50.
97. Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development* 1995;121:4309-18.
98. Grunewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochimica et biophysica acta* 2010;1804:567-80.
99. Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Developmental cell* 2006;10:625-34.
100. Eliceiri BP, Cheresh DA. Adhesion events in angiogenesis. *Current opinion in cell biology* 2001;13:563-8.
101. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999;18:2221-30.
102. Mahabeleshwar GH, Chen J, Feng W, Somanath PR, Razorenova OV, Byzova TV. Integrin affinity modulation in angiogenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2008;7:335-47.
103. Pampori N, Hato T, Stupack DG, et al. Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J Biol Chem* 1999;274:21609-16.
104. Hutchings H, Ortega N, Plouet J. Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. *FASEB J* 2003;17:1520-2.
105. Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* 2004;23:434-45.
106. Reynolds AR, Reynolds LE, Nagel TE, et al. Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integrin-deficient mice. *Cancer Res* 2004;64:8643-50.
107. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol* 2010;188:595-609.
108. Carmeliet P. Integrin indecision. *Nat Med* 2002;8:14-6.



109. Grazia Lampugnani M, Zanetti A, Corada M, et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* 2003;161:793-804.
110. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 2005;437:426-31.
111. Gallicchio M, Mitola S, Valdembrì D, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood* 2005;105:1970-6.
112. Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, et al. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:11216-21.
113. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, et al. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001;97:785-91.
114. Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem* 1998;273:23410-8.
115. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Shibuya M. The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;238:487-91.
116. Landgren E, Schiller P, Cao Y, Claesson-Welsh L. Placenta growth factor stimulates MAP kinase and mitogenicity but not phospholipase C-gamma and migration of endothelial cells expressing Flt 1. *Oncogene* 1998;16:359-67.
117. Cunningham SA, Waxham MN, Arrate PM, Brock TA. Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding. *J Biol Chem* 1995;270:20254-7.
118. Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cellular signalling* 2001;13:849-54.
119. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006;312:549-60.
120. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 2003;9:936-43.
121. Lundin L, Ronnstrand L, Cross M, Hellberg C, Lindahl U, Claesson-Welsh L. Differential tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor (FGF) receptor-1 and receptor proximal signal transduction in response to FGF-2 and heparin. *Exp Cell Res* 2003;287:190-8.
122. Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *The EMBO journal* 2005;24:2342-53.
123. Kendall RL, Rutledge RZ, Mao X, Tebben AJ, Hungate RW, Thomas KA. Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *J Biol Chem* 1999;274:6453-60.

124. Cunningham SA, Arrate MP, Brock TA, Waxham MN. Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:635-9.
125. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 1984;308:693-8.
126. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* 2004;279:22267-75.
127. Holmqvist K, Cross M, Riley D, Welsh M. The Shb adaptor protein causes Src-dependent cell spreading and activation of focal adhesion kinase in murine brain endothelial cells. *Cellular signalling* 2003;15:171-9.
128. Warner AJ, Lopez-Dee J, Knight EL, Feramisco JR, Prigent SA. The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in transfected cells. *Biochem J* 2000;347:501-9.
129. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal* 2001;20:2768-78.
130. Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, et al. VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *J Biol Chem* 2000;275:6059-62.
131. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998;273:30336-43.
132. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999;399:601-5.
133. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597-601.
134. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995;1:1024-8.
135. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem* 1999;274:10002-7.
136. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
137. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998;273:13313-6.
138. Tran J, Rak J, Sheehan C, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:781-8.
139. Liu ZY, Ganju RK, Wang JF, et al. Characterization of signal transduction pathways in human bone marrow endothelial cells. *Blood* 1997;90:2253-9.

140. Ilan N, Mahooti S, Madri JA. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *Journal of cell science* 1998;111 (Pt 24):3621-31.
141. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:15442-51.
142. Wheeler-Jones C, Abu-Ghazaleh R, Cospedal R, Houliston RA, Martin J, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase. *FEBS Lett* 1997;420:28-32.
143. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* 1998;273:26722-8.
144. Xiong Y, Huo Y, Chen C, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways. *J Biol Chem* 2009;284:23217-24.
145. McLaughlin AP, De Vries GW. Role of PLCgamma and Ca(2+) in VEGF- and FGF-induced choroidal endothelial cell proliferation. *American journal of physiology* 2001;281:C1448-56.
146. Robinson LJ, Razzack ZF, Lawrence JC, Jr., James DE. Mitogen-activated protein kinase activation is not sufficient for stimulation of glucose transport or glycogen synthase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 1993;268:26422-7.
147. Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hastly KA, Charles ST. Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. *Microvasc Res* 1998;55:29-42.
148. Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res* 1995;30:544-56.
149. Rousseau S, Houle F, Kotanides H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2000;275:10661-72.
150. Laramee M, Chabot C, Cloutier M, et al. The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *J Biol Chem* 2007;282:7758-69.
151. Dance M, Montagner A, Yart A, et al. The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2006;281:23285-95.
152. Lamalice L, Houle F, Huot J. Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J Biol Chem* 2006;281:34009-20.
153. Goligorsky MS, Abedi H, Noiri E, et al. Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. *Am J Physiol* 1999;276:C1271-81.
154. Gliki G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I. Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein

- kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>. *Biochem J* 2001;353:503-12.
155. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998;140:947-59.
  156. Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of cell science* 1995;108 (Pt 6):2369-79.
  157. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 1997;57:765-72.
  158. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 1999;252:13-9.
  159. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 1998;111 (Pt 13):1853-65.
  160. Kevil CG, Payne DK, Mire E, Alexander JS. Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem* 1998;273:15099-103.
  161. Suarez S, Ballmer-Hofer K. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *Journal of cell science* 2001;114:1229-35.
  162. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol* 1999;9:845-8.
  163. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998;97:99-107.
  164. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, et al. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* 2003;278:40973-9.
  165. Bellou S, Hink MA, Bagli E, et al. VEGF autoregulates its proliferative and migratory ERK1/2 and p38 cascades by enhancing the expression of DUSP1 and DUSP5 phosphatases in endothelial cells. *American journal of physiology* 2009;297:C1477-89.
  166. Cyr DM, Langer T, Douglas MG. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends in biochemical sciences* 1994;19:176-81.
  167. Shen Y, Meunier L, Hendershot LM. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem* 2002;277:15947-56.
  168. Kurisu J, Honma A, Miyajima H, Kondo S, Okumura M, Imaizumi K. MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes Cells* 2003;8:189-202.
  169. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003;23:7448-59.

170. Dong M, Bridges JP, Apsley K, Xu Y, Weaver TE. ERdj4 and ERdj5 are required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation of misfolded surfactant protein C. *Mol Biol Cell* 2008;19:2620-30.
171. Prols F, Mayer MP, Renner O, et al. Upregulation of the cochaperone Mdg1 in endothelial cells is induced by stress and during in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* 2001;269:42-53.
172. Berger BJ, Muller TS, Buschmann IR, et al. High levels of the molecular chaperone Mdg1/ERdj4 reflect the activation state of endothelial cells. *Exp Cell Res* 2003;290:82-92.
173. Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2000;275:32846-53.
174. Hori O, Ichinoda F, Yamaguchi A, et al. Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response. *Genes Cells* 2004;9:457-69.
175. Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001;276:9199-205.
176. Ma Y, Hendershot LM. Herp is dually regulated by both the endoplasmic reticulum stress-specific branch of the unfolded protein response and a branch that is shared with other cellular stress pathways. *J Biol Chem* 2004;279:13792-9.
177. Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 2005;569:29-63.
178. Schulze A, Standera S, Buerger E, et al. The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. *J Mol Biol* 2005;354:1021-7.
179. Sai X, Kokame K, Shiraishi H, et al. The ubiquitin-like domain of Herp is involved in Herp degradation, but not necessary for its enhancement of amyloid beta-protein generation. *FEBS Lett* 2003;553:151-6.
180. Chan SL, Fu W, Zhang P, et al. Herp stabilizes neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and mitochondrial function during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 2004;279:28733-43.
181. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999;13:1211-33.
182. Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 1998;92:381-90.
183. Fedorov AN, Baldwin TO. Cotranslational protein folding. *J Biol Chem* 1997;272:32715-8.
184. Sanchez IE, Morillas M, Zobeley E, Kiefhaber T, Glockshuber R. Fast folding of the two-domain semliki forest virus capsid protein explains co-translational proteolytic activity. *J Mol Biol* 2004;338:159-67.
185. Pittman DD, Tomkinson KN, Kaufman RJ. Post-translational requirements for functional factor V and factor VIII secretion in mammalian cells. *J Biol Chem* 1994;269:17329-37.
186. Chakrabarti A, Chen AW, Varner JD. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng* 2011;108:2777-93.

187. Lee AS. Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Current opinion in cell biology* 1992;4:267-73.
188. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397:271-4.
189. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355:33-45.
190. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000;101:451-4.
191. Ma Y, Hendershot LM. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 2004;4:966-77.
192. Rutkowski DT, Hegde RS. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol*;189:783-94.
193. Flynn GC, Pohl J, Flocco MT, Rothman JE. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* 1991;353:726-30.
194. Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 1989;245:385-90.
195. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry* 2005;74:739-89.
196. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2000;2:326-32.
197. Liu CY, Wong HN, Schauerte JA, Kaufman RJ. The protein kinase/endoribonuclease IRE1 $\alpha$  that signals the unfolded protein response has a luminal N-terminal ligand-independent dimerization domain. *J Biol Chem* 2002;277:18346-56.
198. Liu CY, Schroder M, Kaufman RJ. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2000;275:24881-5.
199. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880-5.
200. Dong D, Ni M, Li J, et al. Critical role of the stress chaperone GRP78/BiP in tumor proliferation, survival, and tumor angiogenesis in transgene-induced mammary tumor development. *Cancer Res* 2008;68:498-505.
201. Katanasaka Y, Ishii T, Asai T, et al. Cancer antineovascular therapy with liposome drug delivery systems targeted to BiP/GRP78. *Int J Cancer* 2010;127:2685-98.
202. Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J Chem Neuroanat* 2004;28:93-100.
203. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* 2008;8:851-64.
204. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998;273:33741-9.
205. Thuerauf DJ, Morrison L, Glembotski CC. Opposing roles for ATF6 $\alpha$  and ATF6 $\beta$  in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *J Biol Chem* 2004;279:21078-84.

206. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999;10:3787-99.
207. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem* 2000;275:27013-20.
208. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001;107:881-91.
209. Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2000;20:6755-67.
210. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Developmental cell* 2007;13:365-76.
211. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, et al. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Developmental cell* 2007;13:351-64.
212. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519-29.
213. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *The EMBO journal* 1998;17:5708-17.
214. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 1998;12:1812-24.
215. Urano F, Bertolotti A, Ron D. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* 2000;113 Pt 21:3697-702.
216. Shamu CE, Walter P. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *The EMBO journal* 1996;15:3028-39.
217. Welihinda AA, Kaufman RJ. The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* 1996;271:18181-7.
218. Calton M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 2002;415:92-6.
219. Hai T, Hartman MG. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 2001;273:1-11.
220. Yoshida H, Okada T, Haze K, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2001;21:1239-48.

221. Shen X, Ellis RE, Lee K, et al. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 2001;107:893-903.
222. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 2000;101:249-58.
223. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Developmental cell* 2003;4:265-71.
224. Hosokawa N. [ER quality control and ERAD: EDEM accelerates glycoprotein ERAD]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2004;49:984-7.
225. Hollien J, Weissman JS. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 2006;313:104-7.
226. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:89-102.
227. Han D, Lerner AG, Vande Walle L, et al. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 2009;138:562-75.
228. Urano F, Wang X, Bertolotti A, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000;287:664-6.
229. Hu P, Han Z, Couvillon AD, Exton JH. Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2004;279:49420-9.
230. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000;103:239-52.
231. Lee K, Tirasophon W, Shen X, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 2002;16:452-66.
232. Masaki T, Noguchi H, Kobayashi M, Yoshida M, Takamatsu K. Isolation and characterization of the gene encoding mouse tax-responsive element-binding protein (TREB) 5. *DNA Res* 2000;7:187-93.
233. Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 2001;276:13935-40.
234. Woehlbier U, Hetz C. Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends in biochemical sciences* 2011;36:329-37.
235. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell* 2000;6:1099-108.
236. Scheuner D, Song B, McEwen E, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Molecular cell* 2001;7:1165-76.
237. Novoa I, Zeng H, Harding HP, Ron D. Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J Cell Biol* 2001;153:1011-22.



238. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* 2005;115:2656-64.
239. Jousse C, Oyadomari S, Novoa I, et al. Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 2003;163:767-75.
240. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochemical Society transactions* 2006;34:7-11.
241. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell* 2003;11:619-33.
242. Yung HW, Korolchuk S, Tolkovsky AM, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Endoplasmic reticulum stress exacerbates ischemia-reperfusion-induced apoptosis through attenuation of Akt protein synthesis in human choriocarcinoma cells. *FASEB J* 2007;21:872-84.
243. Hosoi T, Hyoda K, Okuma Y, Nomura Y, Ozawa K. Akt up- and down-regulation in response to endoplasmic reticulum stress. *Brain Res* 2007;1152:27-31.
244. McCracken AA, Karpichev IV, Ernaga JE, Werner ED, Dillin AG, Courchesne WE. Yeast mutants deficient in ER-associated degradation of the Z variant of alpha-1-protease inhibitor. *Genetics* 1996;144:1355-62.
245. Nakatsukasa K, Brodsky JL. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 2008;9:861-70.
246. Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 2004;429:841-7.
247. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 2006;281:30299-304.
248. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy* 2007;3:160-2.
249. Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* 2006;4:e423.
250. Murray JI, Whitfield ML, Trinklein ND, Myers RM, Brown PO, Botstein D. Diverse and specific gene expression responses to stresses in cultured human cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:2361-74.
251. Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011;13:184-90.
252. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation* 2002;110:1389-98.
253. Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003;22:8608-18.
254. Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell death and differentiation* 2006;13:374-84.
255. Lei K, Davis RJ. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2432-7.
256. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999;19:8469-78.
257. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001;15:2922-33.

258. Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, Leissring MA, Shepel PN, Geiger JD. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2000;23:222-9.
259. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000;150:887-94.
260. Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *The EMBO journal* 1999;18:2330-41.
261. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell death and differentiation* 2004;11:381-9.
262. Marciniak SJ, Ron D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev* 2006;86:1133-49.
263. Song Y, Buelow B, Perraud AL, Scharenberg AM. Development and validation of a cell-based high-throughput screening assay for TRPM2 channel modulators. *J Biomol Screen* 2008;13:54-61.
264. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998;12:982-95.
265. Tsang KY, Chan D, Bateman JF, Cheah KS. In vivo cellular adaptation to ER stress: survival strategies with double-edged consequences. *Journal of cell science*;123:2145-54.
266. Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease. *J Hepatol* 2011;54:795-809.
267. Yan W, Frank CL, Korth MJ, et al. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15920-5.
268. Tsukumo Y, Tomida A, Kitahara O, et al. Nucleobindin 1 controls the unfolded protein response by inhibiting ATF6 activation. *J Biol Chem* 2007;282:29264-72.
269. Yoshida H, Uemura A, Mori K. pXBP1(U), a negative regulator of the unfolded protein response activator pXBP1(S), targets ATF6 but not ATF4 in proteasome-mediated degradation. *Cell structure and function* 2009;34:1-10.
270. Ng DT, Spear ED, Walter P. The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol* 2000;150:77-88.
271. Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8505-10.
272. Brewer JW, Diehl JA. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12625-30.
273. Iwawaki T, Akai R, Yamanaka S, Kohno K. Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16657-62.
274. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* 2001;412:300-7.
275. Lee AH, Chu GC, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *The EMBO journal* 2005;24:4368-80.

276. Lee AH, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1alpha and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:8885-90.
277. Delepine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 2000;25:406-9.
278. Cho YM, Jang YS, Jang YM, et al. Induction of unfolded protein response during neuronal induction of rat bone marrow stromal cells and mouse embryonic stem cells. *Exp Mol Med* 2009;41:440-52.
279. Sugiura K, Muro Y, Futamura K, et al. The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2009;129:2126-35.
280. Yang G, Sun Q, Teng Y, Li F, Weng T, Yang X. PTEN deficiency causes dyschondroplasia in mice by enhanced hypoxia-inducible factor 1alpha signaling and endoplasmic reticulum stress. *Development* 2008;135:3587-97.
281. Wang W, Lian N, Li L, et al. Atf4 regulates chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification by activating Ihh transcription. *Development* 2009;136:4143-53.
282. Yoshizawa T, Hinoi E, Jung DY, et al. The transcription factor ATF4 regulates glucose metabolism in mice through its expression in osteoblasts. *The Journal of clinical investigation* 2009;119:2807-17.
283. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;320:1492-6.
284. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 2010;140:900-17.
285. Zhang K, Wang S, Malhotra J, et al. The unfolded protein response transducer IRE1alpha prevents ER stress-induced hepatic steatosis. *The EMBO journal* 2011;30:1357-75.
286. Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, et al. Induction of liver steatosis and lipid droplet formation in ATF6alpha-knockout mice burdened with pharmacological endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 2010;21:2975-86.
287. Zhou Y, Lee J, Reno CM, et al. Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat Med* 2011;17:356-65.
288. Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K, et al. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. *J Biol Chem* 2007;282:34525-34.
289. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S455-61.
290. Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem* 2003;36:431-41.
291. Ji C, Kaplowitz N. ER stress: can the liver cope? *J Hepatol* 2006;45:321-33.
292. Kaplowitz N, Ji C. Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21 Suppl 3:S7-9.
293. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, et al. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation* 2004;110:705-12.

294. Martindale JJ, Fernandez R, Thuerauf D, et al. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res* 2006;98:1186-93.
295. Zhang C, Cai Y, Adachi MT, et al. Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 2001;276:35867-74.
296. Lin WS, Harding HP, Ron D, Popko B. Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *Journal of Cell Biology* 2005;169:603-12.
297. Zhao L, Longo-Guess C, Harris BS, Lee JW, Ackerman SL. Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP. *Nat Genet* 2005;37:974-9.
298. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell death and differentiation* 2006;13:385-92.
299. Imaizumi K, Miyoshi K, Katayama T, et al. The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta* 2001;1536:85-96.
300. Shimura H, Mizuno Y, Hattori N. Parkin and Parkinson Disease. *Clin Chem* 2012.
301. Rissanen A, Sivenius J, Jolkkonen J. Prolonged bihemispheric alterations in unfolded protein response related gene expression after experimental stroke. *Brain Res* 2006;1087:60-6.
302. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in biochemical sciences* 2001;26:504-10.
303. Denoyelle C, Abou-Rjaily G, Bezrookove V, et al. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 2006;8:1053-63.
304. Ranganathan AC, Adam AP, Zhang L, Aguirre-Ghiso JA. Tumor cell dormancy induced by p38SAPK and ER-stress signaling: an adaptive advantage for metastatic cells? *Cancer biology & therapy* 2006;5:729-35.
305. Fels DR, Koumenis C. The PERK/eIF2alpha/ATF4 module of the UPR in hypoxia resistance and tumor growth. *Cancer biology & therapy* 2006;5:723-8.
306. Koong AC, Chauhan V, Romero-Ramirez L. Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy. *Cancer biology & therapy* 2006;5:756-9.
307. Fu Y, Lee AS. Glucose regulated proteins in cancer progression, drug resistance and immunotherapy. *Cancer biology & therapy* 2006;5:741-4.
308. Ozcan L, Tabas I. Role of endoplasmic reticulum stress in metabolic disease and other disorders. *Annu Rev Med* 2012;63:317-28.
309. Mahoney WC, Duksin D. Biological activities of the two major components of tunicamycin. *J Biol Chem* 1979;254:6572-6.
310. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
311. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.

312. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
313. Bogatcheva NV, Garcia JG, Verin AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67:75-84.
314. Soker S, Fidder H, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem* 1996;271:5761-7.
315. Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* 1995;268:726-31.
316. Yoshida E, Atkinson TG, Chakravarthy B. Neuroprotective gene expression profiles in ischemic cortical cultures preconditioned with IGF-1 or bFGF. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;131:33-50.
317. Dombroski BA, Nayak RR, Ewens KG, Ankener W, Cheung VG, Spielman RS. Gene expression and genetic variation in response to endoplasmic reticulum stress in human cells. *Am J Hum Genet* 2010;86:719-29.
318. Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 1993;73:1197-206.
319. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 1993;74:743-56.
320. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 2002;277:13045-52.
321. Kim KM, Pae HO, Zheng M, Park R, Kim YM, Chung HT. Carbon monoxide induces heme oxygenase-1 via activation of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and inhibits endothelial cell apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress. *Circ Res* 2007;101:919-27.
322. Hong M, Li M, Mao C, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress triggers an acute proteasome-dependent degradation of ATF6. *Journal of cellular biochemistry* 2004;92:723-32.
323. Haas IG. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia* 1994;50:1012-20.
324. Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca<sup>2+</sup>. *J Biol Chem* 1997;272:30873-9.
325. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem* 2004;279:45495-502.
326. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359-71.

327. Rondaij MG, Bierings R, Kragt A, van Mourik JA, Voorberg J. Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1002-7.
328. Wang Y, Wu J, Wang Z. Akt binds to and phosphorylates phospholipase C-gamma1 in response to epidermal growth factor. *Mol Biol Cell* 2006;17:2267-77.
329. Maffucci T, Raimondi C, Abu-Hayyeh S, et al. A phosphoinositide 3-kinase/phospholipase Cgamma1 pathway regulates fibroblast growth factor-induced capillary tube formation. *PLoS one* 2009;4:e8285.
330. Banumathi E, O'Connor A, Gurunathan S, Simpson DA, McGeown JG, Curtis TM. VEGF-induced retinal angiogenic signaling is critically dependent on Ca(2) signaling by Ca(2)/calmodulin-dependent protein kinase II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3103-11.
331. Kazemi S, Mounir Z, Baltzis D, et al. A novel function of eIF2alpha kinases as inducers of the phosphoinositide-3 kinase signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2007;18:3635-44.
332. Lepine S, Allegood JC, Park M, Dent P, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell death and differentiation* 2011;18:350-61.
333. Mounir Z, Krishnamoorthy JL, Wang S, et al. Akt determines cell fate through inhibition of the PERK-eIF2alpha phosphorylation pathway. *Sci Signal* 2011;4:ra62.
334. Yamazaki H, Hiramatsu N, Hayakawa K, et al. Activation of the Akt-NF-kappaB pathway by subtilase cytotoxin through the ATF6 branch of the unfolded protein response. *J Immunol* 2009;183:1480-7.
335. Yung HW, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Regulation of AKT phosphorylation at Ser473 and Thr308 by endoplasmic reticulum stress modulates substrate specificity in a severity dependent manner. *PLoS one* 2011;6:e17894.
336. Hyoda K, Hosoi T, Horie N, Okuma Y, Ozawa K, Nomura Y. PI3K-Akt inactivation induced CHOP expression in endoplasmic reticulum-stressed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:286-90.
337. Qin L, Wang Z, Tao L, Wang Y. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy. *Autophagy* 2010;6:239-47.
338. Bromati CR, Lellis-Santos C, Yamanaka TS, et al. UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300:R92-100.
339. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, et al. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 2006;4:e374.
340. Boyce M, Bryant KF, Jousse C, et al. A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* 2005;307:935-9.
341. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* 2011;332:91-4.
342. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004;18:3066-77.

343. Malhotra JD, Miao H, Zhang K, et al. Antioxidants reduce endoplasmic reticulum stress and improve protein secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18525-30.
344. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:3378-89.