



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»**

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ
VEGFR2 ΣΤΗ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ VEGF**

**ΜΠΑΣΑΓΙΑΝΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2014

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



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



**ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ**
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

**ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



**ΕΣΠΑ
2007-2013**
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο - ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ) – Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος II . Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου

Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» του κ. Μπασαγιάννη Δημήτριο: 23-2-2009

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 23-2-2009 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία».

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Σάββας Χριστοφορίδης Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων επιβλέπων

Φώτσης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος

Carol Murphy Ερευνήτρια Β΄ Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, μέλος

Ορισμός Θέματος: 23-2-2009

«Ο ρόλος της διαμερισματοποίησης του υποδοχέα VEGFR2 στη μεταγωγή του σήματος VEGF»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: 1-7-2013

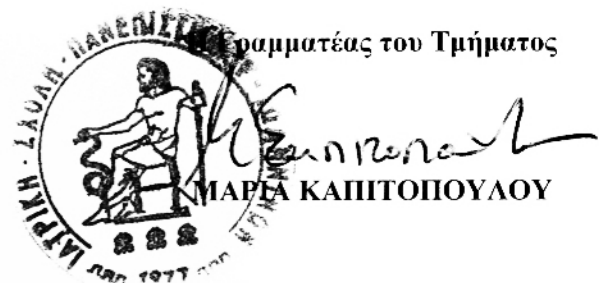
Φριλίγγος Ευστάθιος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Φώτσης Θεόδωρος	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παπαμαρκάκη Θωμαή	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Πολίτου Αναστασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κούκλης Παναγιώτης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σάββας Χριστοφορίδης	Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Carol Murphy	Ερευνήτρια Β΄ Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 13-9-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Φωτόπουλος Ανδρέας

Καθηγητής Πυρηνικής Ιατρικής



Στην οικογένεια μου...

‘Οὐδὲν τοῖς θαρροῦσιν ἀνάλωτον’

Μέγας Ἀλέξανδρος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας (IMBB-ITE), κατά τη χρονική περίοδο 2009-2013, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθ. κ. Σάββα Χριστοφορίδη και πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βιοτεχνολογία» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας υπήρξε ένας προσωπικός αγώνας δρόμου, ένας αγώνας ο οποίος δεν θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς τη συμβολή και τη συμπαράσταση ανθρώπων, οι οποίοι με στήριξαν και με βοήθησαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της προσπάθειας και τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντά μου, κ. Σάββα Χριστοφορίδη, τόσο για την επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη την πορεία της διατριβής αυτής όσο και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, για τη δυνατότητα που μου έδωσε να δοκιμάσω τις δυνάμεις μου και ευελπιστώ η εργασία αυτή να είναι αντάξια των προσδοκιών του. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστώ τον Καθ. κ. Θεόδωρο Φώτση και την Ερευνήτρια Β' κ. Carol Murphy, μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την υλικοτεχνική υποστήριξη, τις υποδείξεις και τη συμμετοχή τους στη βελτίωση και αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Οφείλω να ευχαριστήσω θερμά τα μέλη του εργαστηρίου μου, την Αλεξάνδρα και την Βασιλική αλλά και τα προγενέστερα μέλη, την Τάνια, τον Θανάση, την Γεωργία και την Μιχαέλα για τη συνεργασία και τη βοήθειά τους, όποτε τη χρειάστηκα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Σοφία Ζωγράφου, η οποία συμμετείχε ενεργά στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, για τις συμβουλές και την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξή της όλα αυτά τα χρόνια.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Ινστιτούτου Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας και του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας και ιδιαίτερα τον Λευτέρη, την Εύη, τη Σοφία το Μιχάλη το Γιώργο, τον Κώστα και τον Παντελή για την προσωπική τους στήριξη και βοήθεια και για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε, τόσο εντός, όσο και εκτός του εργαστηρίου.

Κλείνοντας, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στους γονείς μου, Γιώργο και Σουμέλα, και στα αδέρφια μου, Γιάννη και Μαρίτα, οι οποίοι δεν έπαψαν ποτέ να στηρίζουν τις επιλογές μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Ενδοθήλιο και αγγειακή λειτουργία	1
1.1.1. Ομαλή ροή του αίματος και θρομβορύθμιση	1
1.1.2. Αγγειακή διαπερατότητα και φλεγμονή	2
1.1.3. Δημιουργία των αγγείων-αγγειογένεση.....	3
1.2. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF).....	4
1.3. Ο υποδοχέας 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, VEGFR2)	5
1.4. Η σηματοδότηση του VEGFR2.....	7
1.5. Διαμερισματοποίηση και ρύθμιση της σηματοδότησης.....	9
1.5.1. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης	10
1.5.2. Ενδοκυτταρική κυκλοφορία	15
1.5.3 Ενδοκυττάρωση και σηματοδότηση.....	17
1.5.4 Σηματοδότηση και ενδοκυττάρωση	19
1.6. Διαμερισματοποίηση, ενδοκυτταρική κυκλοφορία και ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2.....	21
1.6.1 Ενδοκυτταρική κυκλοφορία του VEGFR2.....	21
1.6.2 Ενδοκυτταρική κυκλοφορία και ρύθμιση της σηματοδότησης και αποικοδόμησης του VEGFR2.....	22
1.6.3 Ο ρόλος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2.....	23
1.7 Σύντομη ανασκόπηση της υπάρχουσας γνώσης και των κενών της, και σκοπός της παρούσας μελέτης	26
2. ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 Αντιδραστήρια και αντισώματα	27
2.2 Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs)	28

2.3 Καλλιέργειες κυττάρων HUVE	28
2.4 Διαμόλυνση και επιμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων	29
2.4.1 Διαμόλυνση με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs)	29
2.4.2 Διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (DNA)	30
2.4.3 Επιμόλυνση με αδενοϊούς.....	30
2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western.....	31
2.6 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης.....	32
2.7 Δοκιμασίες χημικών αναστολέων.....	32
2.7.1 Δοκιμασίες άμεσης δράσης των χημικών αναστολέων	32
2.7.2 Δοκιμασίες αντιστρεπτής δράσης των χημικών αναστολέων	33
2.7.3 Πείραμα απεμπλοκής	34
2.8 Έμμεσος ανοσοφθορισμός	34
2.9 Συνενσιακή μικροσκοπία και μικροσκοπία TIRF	35
2.10 Δοκιμασίες μικροσκοπίας	35
2.10.1 Δοκιμασίες ενδοκυττάρωσης	35
2.10.2 Δοκιμασίες ανακύκλησης	36
2.11 Δοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) για τον επιφανειακό VEGFR2	37
2.12 Επώαση των κυτταρικών λυμάτων με τα ένζυμα EndoH και PNGase F.....	38
2.13 Μέτρηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου	38
2.14 Ανίχνευση του εκκρινόμενου VEGFR2	39
2.15 Δοκιμασίες ανοσοκατακρύμνησης	39
2.15.1 Ανοσοκατακρύμνηση του εκκρινόμενου VEGFR2	39
2.15.2 Ανοσοκατακρύμνηση του φωσφορυλιωμένου VEGFR2	40
2.16 Δοκιμασίες <i>in vivo</i> αγγειογένεσης	41
2.16.1 Δοκιμασίες αγγειογένεσης σε ενθέματα Matrigel σε ποντίκια.....	41

2.16.2 Δοκιμασίες αγγειογένεσης στον οφθαλμό κουνελιών	42
2.17 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση.....	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	45
3.1 Ανάλυση των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2.....	45
3.1.1 Απουσία του VEGF, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται μεταξύ των ενδοσωμάτων και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης	45
3.1.2 Ο VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 μέσω ενός μονοπατιού ενδοκυττάρωσης το οποίο είναι ανεξάρτητο από το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από τη δυναμίνη	49
3.1.3 Ο VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της μακροπυνοκυττάρωσης.....	54
3.2. Ανάλυση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης του μη ενεργοποιημένου VEGFR2	57
3.2.1 Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 επάγει την πρωτεολυτική σχάση του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη	57
3.2.2 Η σχάση του VEGFR2 λειτουργεί ως ένας αρνητικός μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης του υποδοχέα.....	65
3.3. Ανάλυση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης του ενεργοποιημένου VEGFR2 ...	68
3.3.1 Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF, υπό την αναστολή του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης	68
3.3.2 Η εξαρτώμενη από τη δυναμίνης ενδοκυττάρωση και η μακροπυνοκυττάρωση του VEGFR2 είναι απολύτως αναγκαία για τη μεταγωγή του σήματος και την επαγωγή της αγγειογένεσης.....	73
3.3.3 Ο VEGFR2 σηματοδοτεί από το μονοπάτι της μακροπυνοκυττάρωσης	78
3.3.4 Η αναστολή της δυναμίνης αναστέλλει την ενεργοποίηση της ERK1/2 μέσω παρεμπόδισης της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του καθοδικού σηματοδοτικού μορίου PLCγ.....	85
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	93
Η σχάση του VEGFR2.....	94
Ενδοκυττάρωση και ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2	95

Ο ρόλος της δυναμίνης στην ενδοκυτταρική κυκλοφορία και ενεργοποίηση της PLCγ.....	97
Η σημασία της μακροπυκνωκτώσεως στη σηματοδότηση του VEGFR2.....	98
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ενδοθήλιο και αγγειακή λειτουργία

Το ενδοθήλιο αποτελεί μια μονοστοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία επενδύει όλο το κυκλοφορικό σύστημα, αποτελώντας ένα φραγμό ανάμεσα στον αγγειακό χώρο και τους υποκείμενους ιστούς. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανήκουν στην κατηγορία των επιθηλιακών κυττάρων και προέρχονται από τη διαφοροποίηση πρόδρομων αιμοποιητικών κυττάρων, των αιμαγγειοβλαστών^{1,2}. Η χαρακτηριστική πόλωση των ενδοθηλιακών κυττάρων χωρίζει την κυτταροπλασματική τους μεμβράνη σε τρεις διακριτές περιοχές: την κορυφαία, η οποία βρίσκεται προς τον αυλό των αγγείων, τη βασική, η οποία βρίσκεται προς τους ιστούς και τη βασηοπλευρική, με την οποία σχηματίζουν συνδέσεις με γειτονικά κύτταρα, μια οργάνωση η οποία εξυπηρετεί την ιδιαίτερη λειτουργία των κυττάρων αυτών^{3,4}. Η δομική και λειτουργική ακεραιότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τη διατήρηση του αγγειακού τοιχώματος και της ομαλής κυκλοφορικής λειτουργίας. Ωστόσο, υπό την παρουσία κατάλληλων παραγόντων, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενεργοποιούνται, μεταβάλλουν το συνθετικό τους πρόγραμμα και οδηγούνται σε μια νέα κατάσταση η οποία είναι προ-θρομβωτική, προ-πολλαπλασιαστική και αγγειοσυσταλτική, προκειμένου να επιτρέψουν την ανάπτυξη φαινομένων όπως η θρόμβωση, η φλεγμονή και η αγγειογένεση¹.

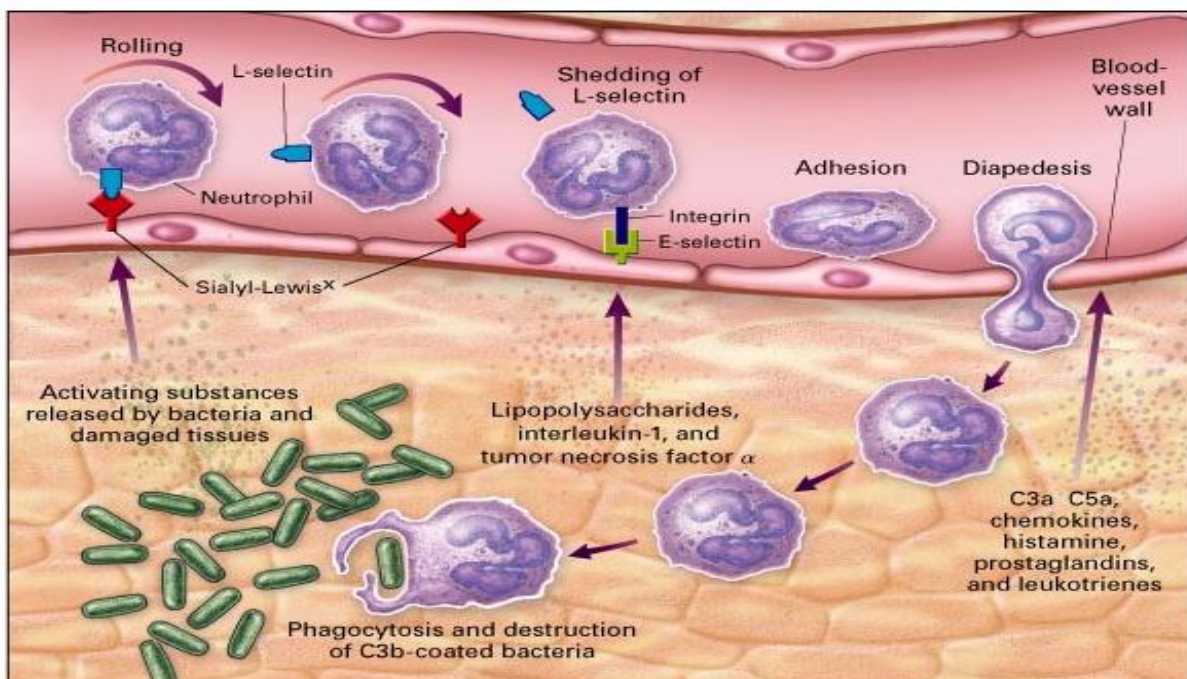
1.1.1. Ομαλή ροή του αίματος και θρομβορύθμιση

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ενδοθήλιο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ομαλή αγγειακή λειτουργία, παρέχοντας μια αντί-θρομβωτική επιφάνεια απαραίτητη για τη ροή του αίματος και επιτρέποντας την επιλεκτική μεταφορά μορίων και αιμοποιητικών κυττάρων μεταξύ του αγγειακού αυλού και των υποκείμενων ιστών. Η αντι-θρομβωτική δράση των ενδοθηλιακών κυττάρων οφείλεται τόσο στην έκκριση ισχυρών αντι-θρομβωτικών παραγόντων, όπως η θρομβομοντουλίνη, η προστακυκλίνη και το μονοξειδίο του αζώτου όσο και στο ένζυμο CD39, έναν ισχυρό ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων⁵. Όταν όμως ενεργοποιηθούν από προ-θρομβωτικούς παράγοντες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν μόρια, όπως η φιμπρονεκτίνη, η θρομβοσποντίνη και ο παράγοντας

von-Willebrand, τα οποία προάγουν το σχηματισμό θρόμβου. Συνεπώς, ανάλογα με τις συνθήκες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν αντι-θρομβωτική ή προ-θρομβωτική δράση. Εξαιτίας της διπλής αυτής λειτουργίας τους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα φέρουν θρομβορυθμιστική ικανότητα⁶.

1.1.2. Αγγειακή διαπερατότητα και φλεγμονή

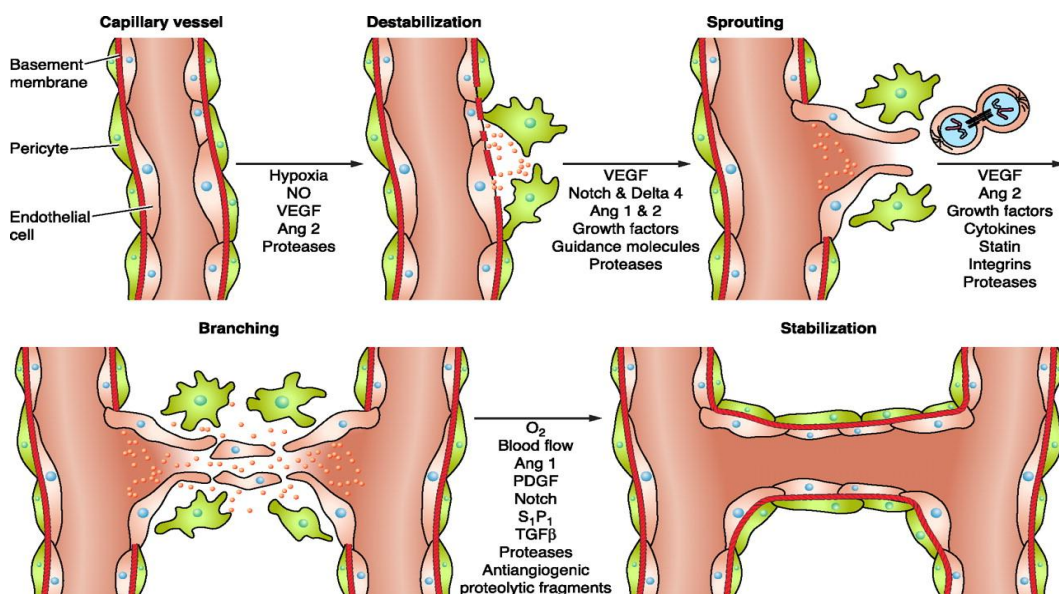
Κατά τη φλεγμονή, το ενδοθήλιο παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυκλοφορίας των λευκοκυττάρων από τον αγγειακό χώρο προς τις εξωαγγειακές φλεγμονώδεις εστίες. Ο μηχανισμός κατά τον οποίο πραγματοποιείται η μετανάστευση των λευκοκυττάρων και ο ρόλος των μορίων προσκόλλησης, όπως οι σελεκτίνες, οι ιντεγκρίνες και η οικογένεια των ανοσοσφαιρινών έχει μελετηθεί διεξοδικά. Σε γενικές γραμμές, ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει αρχικά τη διαμεσολαβούμενη από τις σελεκτίνες τυχαία και ασθενή προσκόλληση των λευκοκυττάρων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, την ισχυρή προσκόλληση μέσω ενεργοποίησης των λευκοκυτταρικών ιντεγκρινών και τέλος, την εξαγγείωση των λευκοκυττάρων μέσω των ενδοθηλιακών συνδέσεων και την προσκόλλησή τους στα συστατικά του εξωκυτταρικού στρώματος⁷⁻¹⁰ (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 : Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών βημάτων κατά την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετανάστευση των λευκοκυττάρων στη φλεγμονή.

1.1.3. Δημιουργία των αγγείων-αγγειογένεση

Η δημιουργία των αγγείων πραγματοποιείται μέσω δύο διακριτών διεργασιών, της εμβρυικής αγγειογένεσης (vasculogenesis), η οποία λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυική, *de novo* διαφοροποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων μεσοδερμικής προέλευσης, όπου οδηγεί στο σχηματισμό του πρωτογενούς αγγειακού και λεμφικού πλέγματος και της αγγειογένεσης (angiogenesis), κατά την οποία νέα αγγεία δημιουργούνται είτε μέσω εκβλάστησης, είτε μέσω διαχωρισμού προϋπαρχόντων μητρικών αγγείων. Υπό την παρουσία κατάλληλων σημάτων από το περιβάλλον τους, τα ενδοθηλιακά κύτταρα πολλαπλασιάζονται, εκφράζουν αντι-αποπτωτικά μόρια προάγοντας την επιβίωσή τους, μεταβάλλουν τις τοπικές συνδέσεις, αναδιοργανώνουν τον κυτταροσκελετό τους, μεταναστεύουν και τελικά διαφοροποιούνται δημιουργώντας νέα αγγεία (εικόνα 1.2). Στους ενήλικες, η αγγειογένεση είναι απαραίτητη για τον αναπαραγωγικό κύκλο των θηλυκών και για την επισκευή, αναδιοργάνωση και αναγέννηση των αγγείων, όπως στην περίπτωση της επούλωσης των τραυμάτων, ενώ εμπλέκεται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, η ρετινοπάθεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση, οι νευροδιαβιβαστικές ασθένειες και η ανάπτυξη του καρκίνου¹⁰⁻¹².



Εικόνα 1.2 : Σχηματική αναπαράσταση των διαδοχικών γεγονότων κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχικά ενεργοποιούνται από αγγειογενετικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από τους υποκείμενους ιστούς. Στο σημείο ενεργοποίησης, το εξωκυτταρικό στρώμα αναδιοργανώνεται και τα αγγεία αποσταθεροποιούνται. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκβλαστάνουν και μεταναστεύουν, πολλαπλασιάζονται, σχηματίζονται πρώιμα, ανώριμα αγγεία τα οποία στη συνέχεια ενώνονται με προϋπάρχοντα αγγεία και η δομή τους σταθεροποιείται με την υποστήριξη περικυττάρων.

1.2. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)

Ανάμεσα στους παράγοντες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αγγειακής λειτουργίας, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο. Ο VEGF αποτελεί κύριο ρυθμιστή για την ανάπτυξη του αγγειακού και λεμφικού συστήματος κατά την εμβρυογένεση, τη διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης και τη δημιουργία νέων αγγείων στους ενήλικες¹³. Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στη διαπερατότητα των αγγείων. Στη δράση του αυτή οφείλει και το προηγούμενο όνομα του VPF (Vascular Permeability Factor)¹⁴. Κατά συνέπεια, η έκφραση, η έκκριση και η δραστηριότητά του VEGF πρέπει να ελέγχεται σε χωροχρονικό και ποσοτικό επίπεδο για να αποφευχθεί η αγγειακή δυσλειτουργία. Η μετάβαση από τη φυσιολογική, εφησυχασμένη κατάσταση των αγγείων προς την αγγειογένεση επάγεται μέσω της απελευθέρωσης του VEGF, κυρίως από ενδοθηλιακά και αιμοποιητικά κύτταρα και κύτταρα του στρώματος. Τα κύτταρα αυτά, εκκρίνουν τον VEGF μετά από ενεργοποίηση από ένα εύρος κυτοκινών (ιντερλευκίνες IL-1α, IL-1β, IL-6 και TNF-α) και αυξητικών παραγόντων (PDGF, TGF-α και β, FGF-4, KGF/FGF-7, EGF και IGF-1) και μετά από καταστάσεις υποξίας, οι οποίες επάγουν μια γρήγορη και οξεία αύξηση στα επίπεδα του mRNA του VEGF^{15,16}.

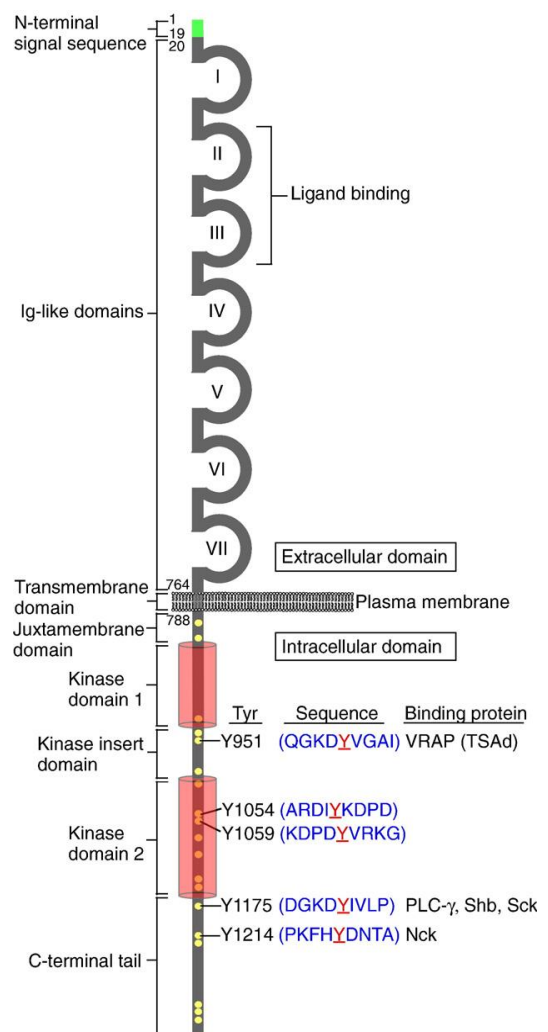
Η εκδήλωση της βιολογικής δράσης του VEGF είναι απόλυτα συνδεδεμένη με την ενεργοποίηση του VEGF υποδοχέα, του οποίου η έκφραση είναι σχεδόν αποκλειστική στα ενδοθηλιακά και προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (EPCs, Endothelial Progenitor Cells). Κατά συνέπεια, σε σχέση με άλλους αυξητικούς παράγοντες, η δραστηριότητα του VEGF περιορίζεται στα κύτταρα αυτά. Μέσω της σύνδεσης στον υποδοχέα του, ο VEGF ενεργοποιεί διακριτά σηματοδοτικά μονοπάτια, προάγοντας την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα βήματα αυτά είναι απαραίτητα για την έναρξη και προώθηση της αγγειογένεσης. Παράλληλα, ο VEGF φέρει πλήθος προ-αγγειογενετικών δραστηριοτήτων. Επάγει την έκφραση μεταλλοπρωτεϊνών, οι οποίες επιτρέπουν την αποσύνδεση από το εξωκυττάριο στρώμα και τη μετανάστευση των κυττάρων, αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα μέσω απελευθέρωσης του μονοξειδίου του αζώτου και προάγει την επιβίωση των προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων^{13,17}.

Η σημασία της βιολογικής δράσης του VEGF στη λειτουργία του ενδοθηλίου αναδεικνύεται από το γεγονός ότι αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στην εξέλιξη

πολλών ασθενειών που σχετίζονται με μη φυσιολογική αγγειογένεση, αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα και χρόνια φλεγμονή, όπως οι ρετινοπάθειες και ο καρκίνος. Ο ρόλος του VEGF στην εξέλιξη και προώθηση του καρκίνου φαίνεται να είναι πρωταγωνιστικός και η υπερέκφρασή του έχει αναγνωριστεί στην πλειοψηφία των όγκων. Η επαγόμενη από τα καρκινικά κύτταρα έκφραση του VEGF αφενός οδηγεί σε αυξημένη ροή του αίματος, αγγειακή διαπερατότητα και αγγειογένεση, αφετέρου προάγει τη μετανάστευση και διείσδυση των καρκινικών κυττάρων και επάγει την έλευση πρώιμων ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία βοηθούν τη μετάσταση σε νέες εστίες^{18,19, 20}.

1.3. Ο υποδοχέας 2 του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2, VEGFR2)

Ο VEGFR2 αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των υποδοχέων με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης (type III RTKs) και επάγει σχεδόν όλες τις εξαρτώμενες από τον VEGF αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων. Δομικά, ο VEGFR2 φέρει ένα εξωκυτταρικό τμήμα μήκους περίπου 750 αμινοξικών καταλοίπων, το οποίο είναι οργανωμένο σε επτά περιοχές όμοιες με αυτές των ανοσοσφαιρινών (Ig-like folds). Το εξωκυτταρικό τμήμα διαδέχεται από ένα διαμεμβρανικό τμήμα και έπονται μια μικρή περιοχή μεμβρανικής σύνδεσης, μια περιοχή με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης, η οποία διαχωρίζεται από ένα τμήμα μήκους 70 αμινοξικών καταλοίπων και τέλος, μια καρβοξυτελική ουρά²¹ (εικόνα 1.3). Ο VEGFR2 συντίθεται ως μία πρωτεΐνη των 150 kD η οποία υφίσταται γρήγορη γλυκοζυλίωση οδηγώντας σε μια ενδιάμεση, ανώριμη λειτουργικά πρωτεϊνική μορφή



Εικόνα 1.3 : Δομή του VEGFR2

μοριακού βάρους 200 kD. Περεταίρω προσθήκη σακχάρων αυξάνει το μοριακό βάρος του VEGFR2 στα 230 kD και η μορφή αυτή αποτελεί τον ώριμο, λειτουργικό υποδοχέα ο οποίος εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ²². Η γλυκοζυλίωση πραγματοποιείται μόνο στην εξωκυτταρική περιοχή του VEGFR2 και επιτρέπει τη σταθεροποίηση του υποδοχέα στη μεμβράνη και τη σύνδεση του VEGF η οποία πραγματοποιείται μεταξύ της δεύτερης και τρίτης Ig περιοχής ²³. Η έκφραση του VEGFR2 επάγεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου και του VEGF. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον VEGF ρυθμίζει θετικά τη γονιδιακή έκφραση του VEGFR2 και αυξάνει τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του υποδοχέα. Επιπλέον, αντίστοιχα με την επαγωγή της έκφρασης του VEGF, η υποξία αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την έκφραση του VEGFR2. Επίσης, οι δια-κυτταρικές συνδέσεις και οι συνδέσεις των κυττάρων με την εξωκυτταρική μήτρα επηρεάζουν σημαντικά την έκφραση του υποδοχέα, μιας και τα επίπεδα έκφρασης του VEGFR2 διαφέρουν ανάλογα με την πυκνότητα και τις συνθήκες καλλιέργειας και ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων ^{24, 25}.

Η ενεργοποίηση του VEGFR2 επάγεται μέσω της σύνδεσης του VEGF η οποία οδηγεί στο διμερισμό του υποδοχέα μέσω δομικών αλλαγών στην περιοχή σύνδεσης. Ακολούθως, ο διμερισμός επάγει δομικές αλλαγές της ενδοκυτταρικής περιοχής με δραστικότητα κινάσης τυροσίνης μέσω αναδιοργάνωσης της διαμεμβρανικής και ενδοκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα. Οι δομικές αυτές αλλαγές οδηγούν σε διαδοχική φωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσίνης, δημιουργώντας θέσεις σύνδεσης για πρωτεΐνες που περιέχουν SH περιοχές (Src homology domain) και περιοχές σύνδεσης φωσφοτυροσίνης (phosphotyrosine binding domain, PTB). Οι πρωτεΐνες αυτές με τη σειρά τους υπόκεινται σε αυτοφωσφορυλίωση, οδηγώντας τελικά στην ενεργοποίηση πλήθους σηματοδοτικών μονοπατιών. Μεταλλάξεις των περιοχών φωσφορυλίωσης και των υπόλοιπων δομικών περιοχών, έχουν σαν αποτέλεσμα τη μεταβολή της δραστικότητας του υποδοχέα και της σύνδεσης και ενεργοποίησης των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, οι οποίες ως επί το πλείστον οδηγούν σε καρκινικούς χαρακτήρες. Το γεγονός αυτό αναδεικνύει τη σημασία της δομικής και λειτουργικής ακεραιότητας των περιοχών αυτών ^{21,25,26}.

1.4. Η σηματοδότηση του VEGFR2

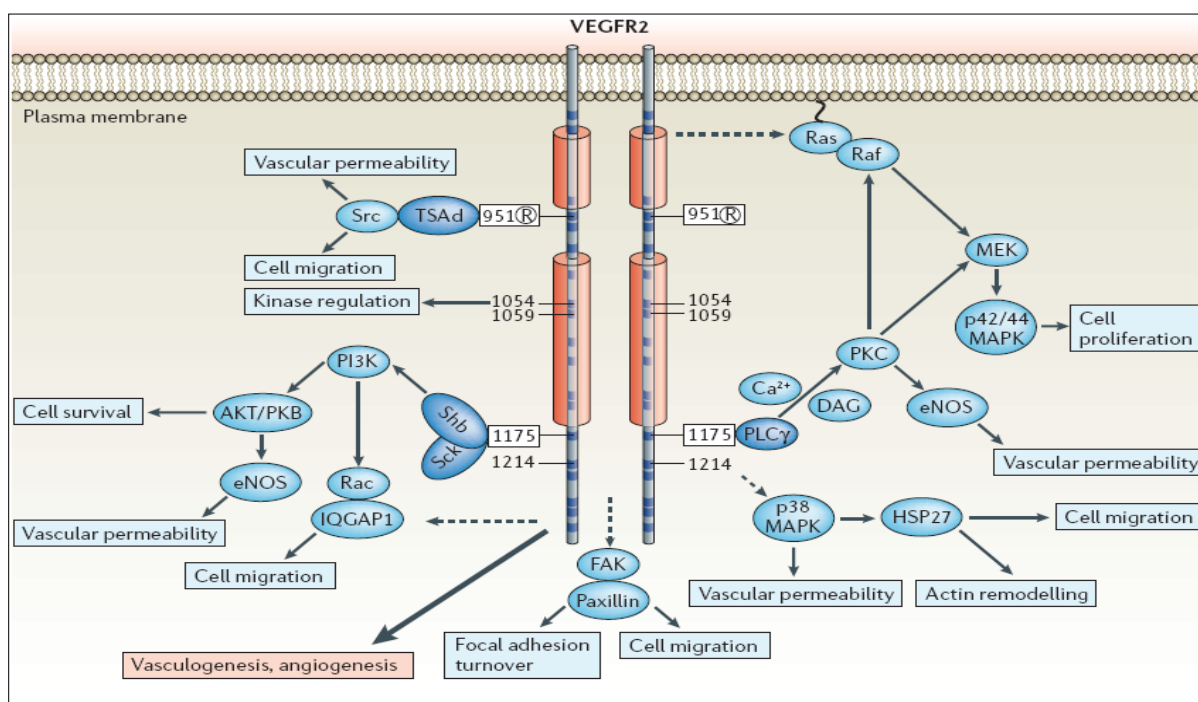
Οι πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες που ελέγχονται από τον VEGFR2 πραγματοποιούνται μέσω ενεργοποίησης τουλάχιστον τριών διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών: το μονοπάτι των κινασών της φωσφατιδυλοϊνσιπόλης (PI3K) και άλφα σερίνης/θρεονίνης (Akt), το μονοπάτι της ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) και το μονοπάτι της φωσφολιπάσης C-γ (PLCγ) και πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), (εικόνα 1.4).

Παρά το γεγονός ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα δημιουργεί θέσεις σύνδεσης για μόρια που περιέχουν SH περιοχές, λίγα είναι αυτά που αλληλεπιδρούν άμεσα με τον VEGFR2. Η PLCγ συνδέεται απευθείας στη φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 1175 (pTyr1175) και επάγει, μέσω της PKC, την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού καταρράκτη των MAPK και της ρυθμιζόμενης από εξωκυτταρικό σήμα κινάσης 1/2 (ERK1/2 ή p42/p44 MAPK), ενεργοποιώντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (μονοπάτι Raf-MEK1/2-ERK1/2). Η PLCγ ενεργοποιεί την PKC με την παραγωγή διάκυλογλυκερόλης και αυξάνοντας τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του ασβεστίου. Εκτός από την PLCγ, η ενεργοποίηση της ERK1/2 φαίνεται να επάγεται και μέσω του κλασικού σηματοδοτικού μονοπατιού Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 καθοδικά του VEGFR2. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών Shc και Skc από τον VEGFR2, επάγουν τη σύνδεση της Grb2 στον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων SOS, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί την Ras, επάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Η σύνδεση της πρωτεΐνης Shb στην pTyr1175 επάγει την κυτταρική επιβίωση και μετανάστευση μέσω ενεργοποίησης της PI3K. Η ενεργοποίηση της PI3K επάγει καθοδικά τις κινάσες Akt/PKB, οι οποίες προάγουν την κυτταρική επιβίωση μέσω της έκφρασης αντί-αποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως οι Bcl-2 και A1, οι οποίες αναστέλλουν τις κασπάσες και ενεργοποιούν την έκφραση αναστολέων των προ-κασπασών. Επίσης, η ενεργοποίηση των Akt/PKB και της PKC επάγει τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της ενδοθηλιακής συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS). Η παραγωγή NO αυξάνει την αγγειακή διαπερατότητα και φαίνεται να συμμετέχει στην κυτταρική μετανάστευση ρυθμίζοντας τον σχηματισμό των κυτταρικών συνδέσεων κατά την κίνηση των κυττάρων και τη φωσφορυλίωση της κινάσης τοπικής προσκόλλησης (Focal Adhesion Kinase, FAK) των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η FAK ενεργοποιείται μέσω φωσφορυλίωσης από την καρβοξυτελική ουρά του VEGFR2 και μέσω του

υποστρώματός της, της παξιλίνης (paxillin), συμμετέχει στη ρύθμιση των τοπικών συνδέσεων κατά την κυτταρική μετανάστευση.

Εκτός από την ενεργοποίηση της PI3K και της FAK, σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυτάρων διαδραματίζουν τα σηματοδοτικά μόρια TSA_d και CDC42, τα οποία ενεργοποιούνται μετά από φωσφορυλίωση του VEGFR2 στις θέσεις Tyr951 και Tyr1214, αντίστοιχα. Επίσης, η επαγόμενη από τον VEGF δημιουργία συμπλόκου με την κινάση Src υποδεικνύει την πιθανή ενεργοποίηση της Src από την TSA_d καθοδικά του VEGFR2 και κατ' επέκταση, την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας μέσω ενεργοποίησης της eNOS. Σε ότι αφορά την πρωτεΐνη CDC42, η ενεργοποίησή της οδηγεί στη φωσφορυλίωση της p38 MAPK η οποία εν' συνεχεία ενεργοποιεί την MAPKAPK2/3. Η ενεργοποίηση της MAPKAPK2/3 οδηγεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 27 (HSP27), μιας συνοδού πρωτεΐνης η οποία ελέγχει θετικά τον επαγόμενο από τον VEGF πολυμερισμό του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυτάρων 25,27,28.



Εικόνα 1.4 : Τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια που επάγει η ενεργοποίηση του VEGFR2 από τον VEGF.

1.5. Διαμερισματοποίηση και ρύθμιση της σηματοδότησης

Η μεταγωγή του σήματος αποτελεί μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία μέσω της οποίας τα κύτταρα ανταποκρίνονται στα εξωκυτταρικά μηνύματα που δέχονται από το μικροπεριβάλλον τους. Οι υποδοχείς οι οποίοι εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη λειτουργούν ως ειδικοί ανιχνευτές και διαμεσολαβητές των μηνυμάτων από τον εξωκυτταρικό χώρο μέσα στο κύτταρο μέσω της ενεργοποίησης διακριτών σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία επάγουν αλλαγές στη λειτουργία των κυττάρων. Για πολλά χρόνια, θεωρούνταν πως η ενεργοποίηση των υποδοχέων και η μεταγωγή του σήματος συμβαίνει ανεξάρτητα από τη θέση του υποδοχέα στη μεμβρανική διπλοστοιβάδα. Η πεποίθηση αυτή στηρίζονταν στην υπόθεση ότι η κυτταροπλασματική μεμβράνη αποτελεί ένα δυσδιάστατο 'ρευστό μωσαϊκό' με χαλαρή δομή και υψηλό ρυθμό διάχυσης, ένα μοντέλο στο οποίο όλες οι πρωτεΐνες της μεμβράνης θεωρούνταν ομοιόμορφα κατανεμημένες μέσα σε μια 'θάλασσα λιπιδίων'. Κατά συνέπεια, σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, η ακριβής θέση μιας πρωτεΐνης στη μεμβράνη δεν έχει ιδιαίτερη σημασία διότι σε οποιαδήποτε θέση η σύσταση του μικροπεριβάλλοντός της παραμένει ίδια. Ωστόσο, η πεποίθηση αυτή άρχισε να αλλάζει με τη σταδιακή ανακάλυψη μεμβρανικών περιοχών με συγκεκριμένη δομή, σύσταση και λειτουργία, αποκαλύπτοντας την ετερογένεια και την πολυπλοκότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Μέσω της οργάνωσής της η μεμβράνη επιτρέπει τη διαμερισματοποίηση των υποδοχέων και τη ρύθμιση της σηματοδότησης είτε μέσω της γειννίασης των υποδοχέων με τα καθοδικά σηματοδοτικά μόρια, επάγοντας ειδικές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις, είτε δημιουργώντας ένα φυσικό φραγμό μεταξύ μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ο οποίος αναστέλλει την ελεύθερη διάχυση των μορίων και επιτρέπει τη χωροταξική ρύθμιση της σηματοδότησης.

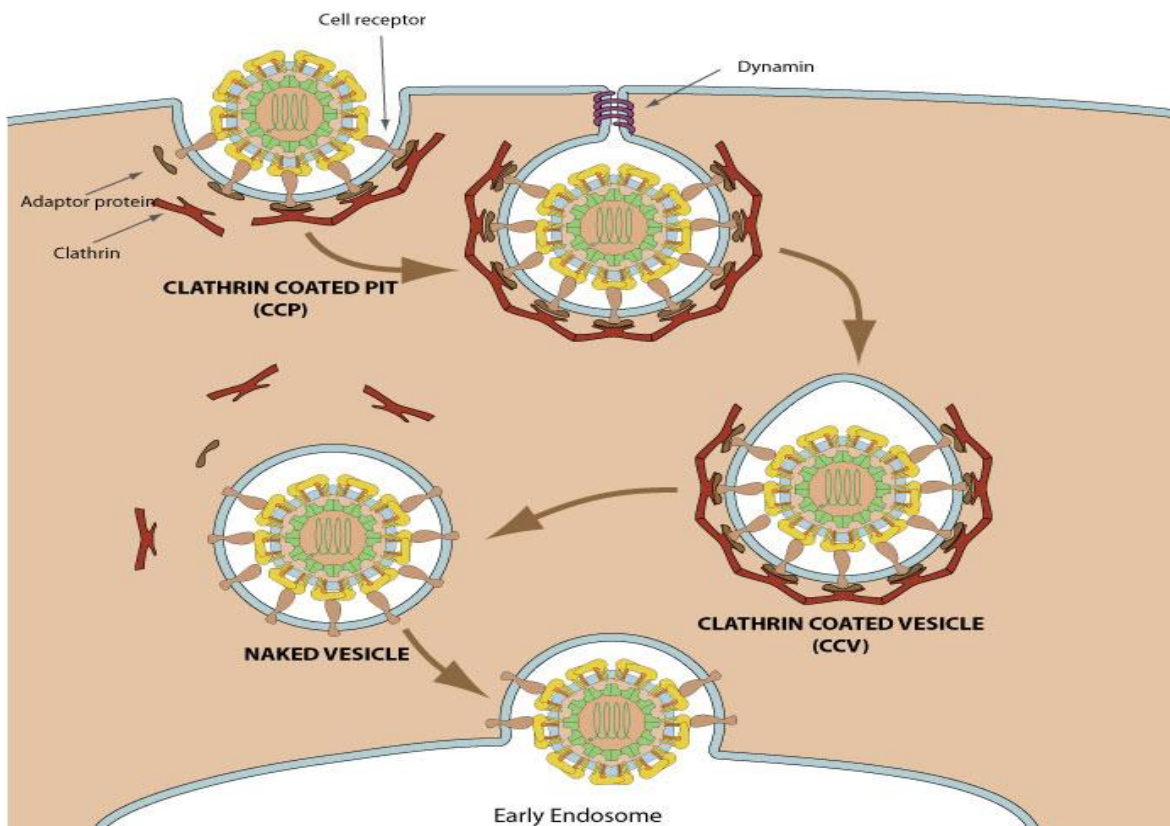
Εξαιτίας του γεγονότος ότι η κυτταροπλασματική μεμβράνη αντιπροσωπεύει την πρωτογενή περιοχή μέσω της οποίας το κύτταρο επικοινωνεί με τον εξωκυτταρικό χώρο, η οργάνωσή της υφίσταται αυστηρή ρύθμιση. Η αλλαγή της κατανομής και της σύστασης των πρωτεϊνών και λιπιδίων, οι οποίες πραγματοποιούνται μέσω δυναμικών γεγονότων αποκοπής και σύντηξης κυστιδίων από και προς τη μεμβράνη, αποτελεί ένα από τους κύριους

μηχανισμούς ελέγχου της επικοινωνίας του κυττάρου με το περιβάλλον του και την ακριβή απόκριση στα εξωκυτταρικά μηνύματα. Ο όρος ενδοκυττάρωση περιγράφει τη *de novo* δημιουργία ενδοκυτταρικών μεμβρανών από την λιπιδική διπλοστιβάδα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, μια διαδικασία μέσω της οποίας οι υποδοχείς εισέρχονται μέσα στο κύτταρο. Η ενδοκυττάρωση μπορεί να θεωρηθεί ως η μορφολογικά αντίθετη διαδικασία της εξωκυττάρωσης κατά την οποία πραγματοποιείται σύντηξη των εσωτερικών μεμβρανών με την κυτταροπλασματική μεμβράνη προκειμένου να απελευθερωθούν ενδοκυτταρικά συστατικά στον εξωκυτταρικό χώρο καθώς και να τροφοδοτηθεί η μεμβράνη με νέα λιπίδια και πρωτεΐνες. Πλέον, είναι γνωστό ότι η μεταγωγή του σήματος δεν περιορίζεται μόνο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μέσω της ενδοκυττάρωσης οι υποδοχείς οδηγούνται σε συγκεκριμένα ενδοκυτταρικές δομές, τα ενδοσώματα, στα οποία παραμένουν ενεργοί και αλληλεπιδρούν με καθοδικά σηματοδοτικά μόρια. Ανάλογα με τη θέση τους στη μεμβράνη οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς θα ακολουθήσουν και ένα διαφορετικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης μέσω του οποίου θα οδηγηθούν στα πρώιμα ενδοσώματα, ένα κρίσιμο ενδοκυτταρικό σταθμό από όπου και θα καθοριστεί η 'τύχη' τους. Από εδώ, είτε θα ανακυκλωθούν στη μεμβράνη για ένα νέο κύκλο ενεργοποίησης, είτε θα οδηγηθούν στα όψιμα ενδοσώματα και τελικά στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση και παύση της σηματοδότησης. Είναι σαφές ότι η ενδοκυτταρική διακίνηση των υποδοχέων αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ρύθμισης της κυτταρικής σηματοδότησης. Ωστόσο, το σημείο εισόδου από την κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι αυτό που θα καθορίσει την ενδοκυτταρική πορεία του υποδοχέα και συνεπώς αποτελεί το πρώτο σταθμό ελέγχου της έντασης, της διάρκειας και της εξειδίκευσης της μεταγωγής του σήματος.

1.5.1. Μονοπάτια ενδοκυττάρωσης

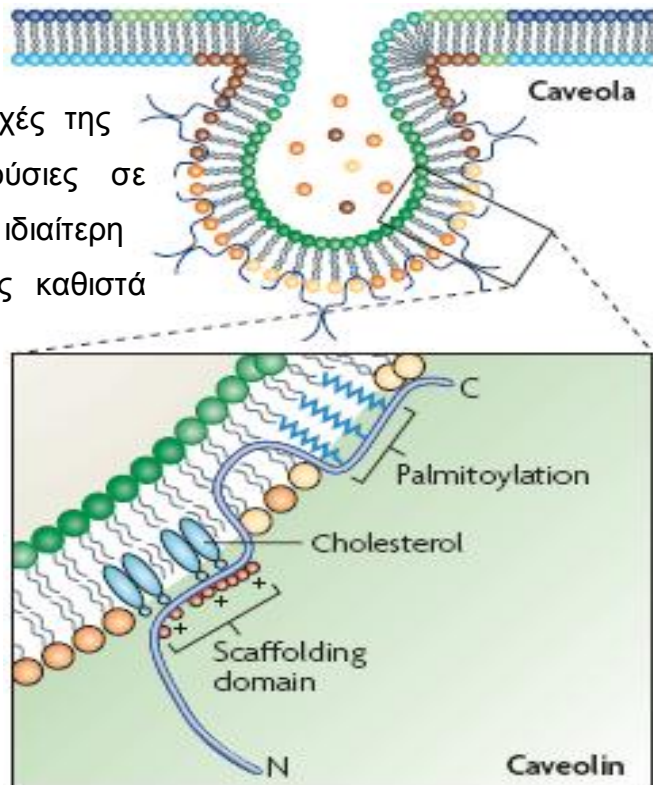
Από τα μέχρι σήμερα γνωστά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης εξαρτώμενο από κλαθρίνη αποτελεί ένα από τα πιο καλά μελετημένα μονοπάτια εισόδου των υποδοχέων στο κύτταρο. Κεντρικό μορφολογικό χαρακτηριστικό αυτού του μονοπατιού αποτελεί η χαρακτηριστική οργάνωση της κλαθρίνης (clathrin) η οποία με τη μορφή τρισκελίων δημιουργεί μια πολυγωνική δομή που επιτρέπει το σχηματισμό εγκολπώσεων στην

κυτταροπλασματική μεμβράνη (clathrin-coated pits) σχήματος ύψιλον (U). Η αποκοπή των εγκολπώσεων κλαθρίνης οδηγεί στον σχηματισμό διακριτών πρωτογενών ενδοκυτταρικών κυστιδίων (clathrin-coated vesicles) τα οποία εν συνεχεία, μετά από την απομάκρυνση της κλαθρίνης, συντήκονται με το πρώιμο ενδόσωμα (εικόνα 1.5). Η λειτουργία της ελεγχόμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης εξαρτάται τόσο από την ίδια την κλαθρίνη όσο και από την παρουσία προσαρμοστικών πρωτεϊνών (adaptor proteins, AP) και πρωτεϊνικών συμπλόκων που συνδέονται απευθείας στην κλαθρίνη. Μέσω αυτής της σύνδεσης διαμεσολαβείται η αλληλεπίδραση των συμπλόκων με το πρωτεϊνικό φορτίο της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που εντοπίζεται στις εγκολπώσεις κλαθρίνης. Η ενεργοποίηση αυτών των συμπλόκων πραγματοποιείται είτε μέσω της αναγνώρισης χαρακτηριστικών πρωτεϊνικών μοτίβων των υποδοχέων (π.χ. μοτίβα τυροσίνης ή λευκίνης), είτε μέσω απευθείας φωσφορυλίωσης τους από τους ενεργοποιημένους υποδοχείς και επάγουν τόσο την έναρξη της ενδοκυττάρωσης όσο και την οργάνωση της μεταφοράς και σύντηξης των κυστιδίων κλαθρίνης με το πρώιμο ενδόσωμα²⁹⁻³¹.



Εικόνα 1.5 : Σχηματική αναπαράσταση της ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από την πρωτεΐνη κλαθρίνη .

Εκτός από το μονοπάτι της κλαθρίνης ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα lipid rafts, περιοχές της μεμβράνης οι οποίες είναι πλούσιες σε χοληστερόλη και σφιγγολιπίδια. Η ιδιαίτερη σύσταση των περιοχών αυτών τις καθιστά περισσότερο σταθερές και λιγότερο ρευστές σε σχέση με την υπόλοιπη κυτταροπλασματική μεμβράνη^{32,33}. Παρά το γεγονός ότι η θεωρία των lipid rafts έχει αμφισβητηθεί από διάφορες εργασίες^{34,35}, η συνεχής μελέτη των ερευνητών για τη διερεύνηση του ρόλου τους σε πολυάριθμες κυτταρικές λειτουργίες υποδηλώνει τη σημασία των περιοχών αυτών.

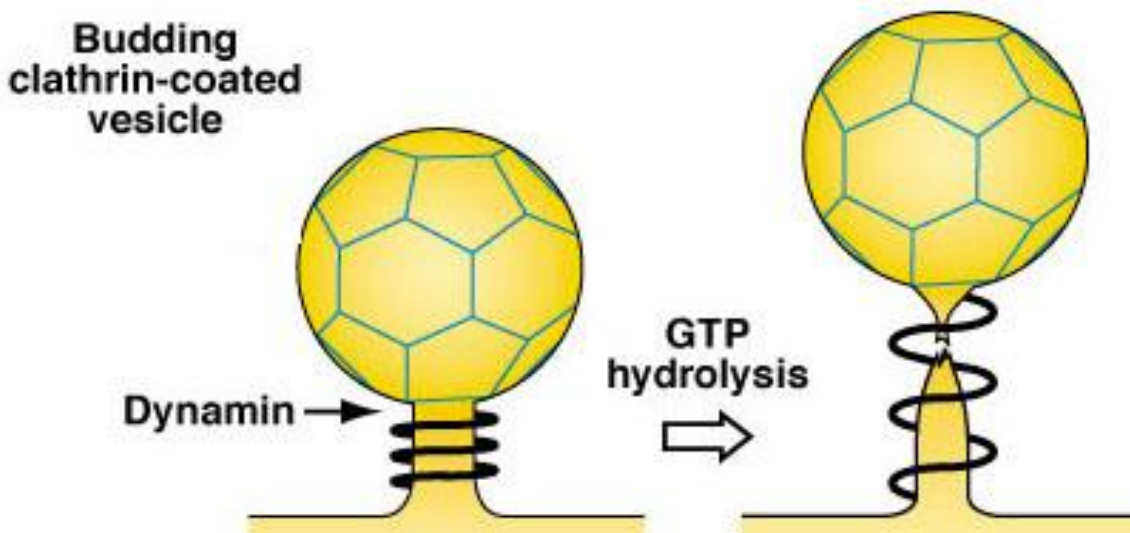


Εικόνα 1.6: Μορφολογία των caveolae και δομική οργάνωση της καβεολίνης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

Πλέον, είναι ξεκάθαρο ότι τα lipid rafts διαδραματίζουν ιδιαίτερο ρόλο, λειτουργώντας ως πλατφόρμες κυτταρικής σηματοδότησης. Στα θηλαστικά, υπάρχουν διάφορες τάξεις τέτοιων λιπιδικά οργανωμένων περιοχών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη εκ των οποίων, από άλλες απουσιάζουν^{34,35} δομικά πρωτεϊνικά συστατικά ενώ άλλες μπορεί να είναι εμπλουτισμένες με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη, η οποία μεταβάλλει δραστικά τη μορφολογία και τη λειτουργία τους. Το πρώτο δομικό πρωτεϊνικό συστατικό, το οποίο αναγνωρίστηκε να συσχετίζεται με τις κυτταροπλασματικές αυτές μικροδομές ήταν η πρωτεΐνη καβεολίνη (caveolin). Η ενσωμάτωση της καβεολίνης στο μικροπεριβάλλον των lipid rafts έχει ως αποτέλεσμα την εγκόλπωση των οργανωμένων αυτών περιοχών και τον σχηματισμό διακριτών μεμβρανικών μικροδομών σχήματος ωμέγα (Ω), των caveolae^{31,36, 37} (εικόνα 1.6). Αν και τα lipid rafts έχουν αμφισβητηθεί λόγω του μικρού τους μεγέθους που τα καθιστά μη διακριτά από το μικροσκόπιο, τα caveolae αποτελούν αδιαμφισβήτητες υποπεριοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης³⁸. Στην επιφάνεια που οριοθετούν τα caveolae έχουν εντοπιστεί διάφοροι τύποι υποδοχέων καθώς και

σημαντικά σηματοδοτικά μόρια όπως οι κινάσες Src, πρωτεΐνες της οικογένειας Ras, η PKC και η eNOS. Θεωρείται ότι τα caveolae αποτελούν ένα κέντρο διαμερισματοποίησης της κυτταρικής σηματοδότησης, επιτρέποντας την επιλεκτική ρύθμιση των σηματοδοτικών μορίων που ελέγχουν ³⁹. Αν και η ενδοκυττάρωση πρωτεϊνών μέσω των caveolae αποτελεί μια αδιαμφισβήτητη κυτταρική διαδικασία, η αρχική θεωρία της δημιουργίας ξεχωριστών ενδοσωμάτων (caveosomes) που υπόκεινται σε ρύθμιση από την καβεολίνη αρχίζει να εγκαταλείπεται ⁴⁰. Πλέον, θεωρείται πως η αποκοπή των εγκολπώσεων των caveolae από τη μεμβράνη οδηγεί σε γρήγορη αποδέσμευση της καβεολίνης και στον σχηματισμό ενδοκυτταρικών κυστιδίων τα οποία συντήκονται με το πρώιμο ενδόσωμα.

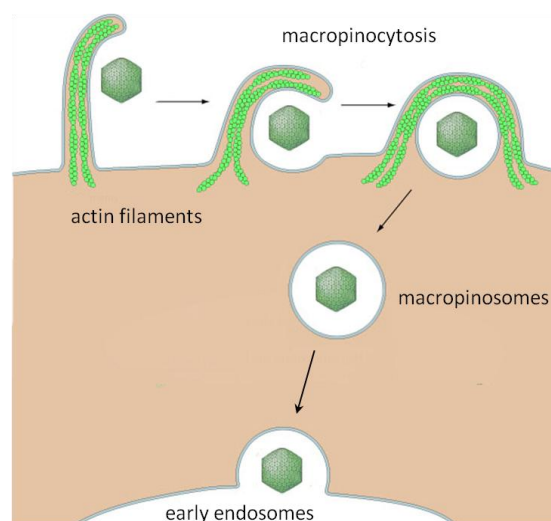
Παρότι οι περιοχές οργάνωσης κλαθρίνης και καβεολίνης διαφέρουν δομικά και λειτουργικά, η αποκοπή των εγκολπώσεων και συνεπώς η ενδοκυττάρωση των πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές ελέγχεται από την πρωτεΐνη δυναμίνη (dynamin). Η σύνδεση και ο πολυμερισμός των μονομερών της δυναμίνης στο σημείο σύνδεσης των εγκολπώσεων της κλαθρίνης και των caveolae με την κυτταροπλασματική μεμβράνη δημιουργεί μία ελικοειδή δομή η οποία μέσω της δέσμευσης και υδρόλυσης τριφωσφορικής γουανοσίνης (GTP) προάγει την σύσφιξη και την αποκοπή των εγκολπώσεων και τον σχηματισμό των πρωτογενών ενδοκυτταρικών κυστιδίων ^{41,42} (εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.6 : Σχηματική αναπαράσταση της αποκοπής ενός κυστιδίου κλαθρίνης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη η οποία διαμεσολαβείται από την πρωτεΐνη δυναμίνη.

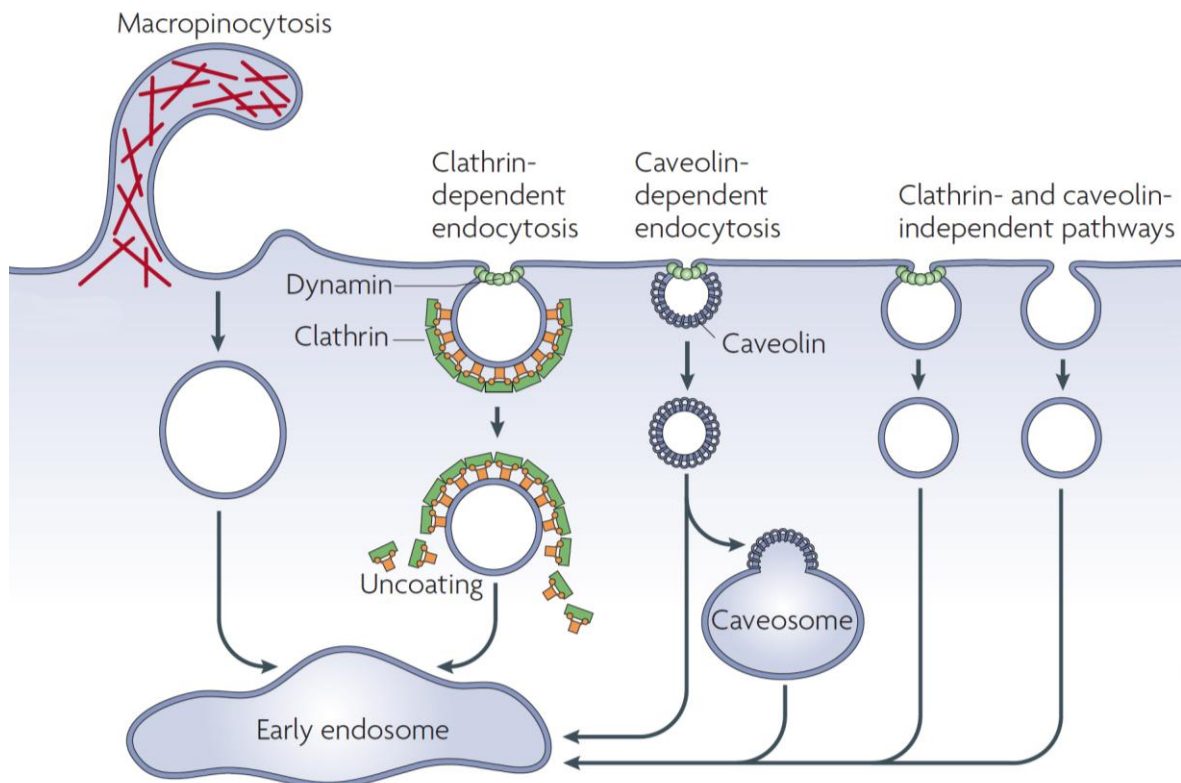
Αναστολή της δράσης της δυναμίνης μέσω τεχνικών αποσιώπησης, υπερέκφρασης μεταλλαγμένων μορφών της και μέσω χρήσης ειδικών χημικών αναστολέων οδηγεί σε δραματική μείωση των κυστιδίων κλαθρίνης, στην ανακατανομή των AP πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα στη μεμβράνη και στην αύξηση των εγκολπώσεων κλαθρίνης και των caveolae³¹. Τέλος, ο ρόλος της δυναμίνης δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης αλλά και στον έλεγχο της αποκοπής κυστιδίων που από την trans περιοχή της συσκευής Golgi, τα οποία φέρουν νέο-συντιθέμενες πρωτεΐνες, καθώς και στην οργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω απευθείας αλληλεπίδρασης της δυναμίνης με τα ινίδια της ακτίνης⁴³.

Η κοινή ρύθμιση της αποκοπής των εγκολπώσεων κλαθρίνης και των caveolae από τη δυναμίνη επιτρέπει τον διαχωρισμό της ενδοκυττάρωσης σε δύο μεγάλες κατηγορίες γεγονότων εσωτερίκευσης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη: στην εξαρτώμενη και ανεξάρτητη από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωση. Μια γενική κατηγοριοποίηση της ανεξάρτητης από δυναμίνη ενδοκυττάρωσης αποτελεί η διαδικασία εσωτερίκευσης στο κύτταρο μεγάλων όγκων εξωκυτταρικών υλικών (fluid phase endocytosis). Ο τύπος αυτός της ενδοκυττάρωσης δεν χαρακτηρίζεται από κάποια δομική πρωτεΐνη αλλά ελέγχεται κυρίως από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού που πλαισιώνει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η μικρο- και μακροπιννοκυττάρωση^{44, 45, 46}. Αν και πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν τη συμμετοχή της δυναμίνης σε γεγονότα μικροπιννοκυττάρωσης, η οποία αποτελεί μια μη ελεγχόμενη και συνεχή διαδικασία ενδοκυττάρωσης, η μακροπιννοκυττάρωση είναι ανεξάρτητη της δυναμίνης και έχειδειχθεί ότι επάγεται μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων από αυξητικούς παράγοντες^{47, 48}. Η έναρξη της μακροπιννοκυττάρωσης καθορίζει μια σειρά γεγονότων κυματισμών, μεγάλων εγκολπώσεων και προεκβολών της μεμβράνης οι οποίες συντήκονται και ενδοκυτταρώνονται δημιουργώντας ευμεγέθη ενδοκυτταρικά κυστίδια, τα μακροπιννοσώματα (εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 : Σχηματική αναπαράσταση της μακροπιννοκυττάρωσης.

Εξαιτίας της απουσίας κάποιου χαρακτηριστικού δομικού συστατικού, η αναγνώριση των μακροπρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη χρήση μεγαλομοριακών δεικτών (όπως HRP ή δεξτράνη) οι οποίοι λόγω μεγέθους εισέρχονται στο κύτταρο σχεδόν κατά αποκλειστικότητα από το μονοπάτι της μακροπρωτεϊνοκυττάρωσης. Αν και η ενδοκυτταρική διακίνηση των μακροπρωτεϊνών εμφανίζει ετερογένεια στα διάφορα κυτταρικά συστήματα που έχει μελετηθεί, ωστόσο, η ανίχνευση κύριων ρυθμιστικών πρωτεϊνών των πρώιμων και όψιμων ενδοσωμάτων και η παρατήρηση γεγονότων ανακύκλωσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη υποδεικνύουν πως τα μακροπρωτεϊνώματα υφίστανται παρόμοια ρύθμιση της κυκλοφορίας τους με τα υπόλοιπα κυστίδια μεμβρανικής προέλευσης^{49, 50}.



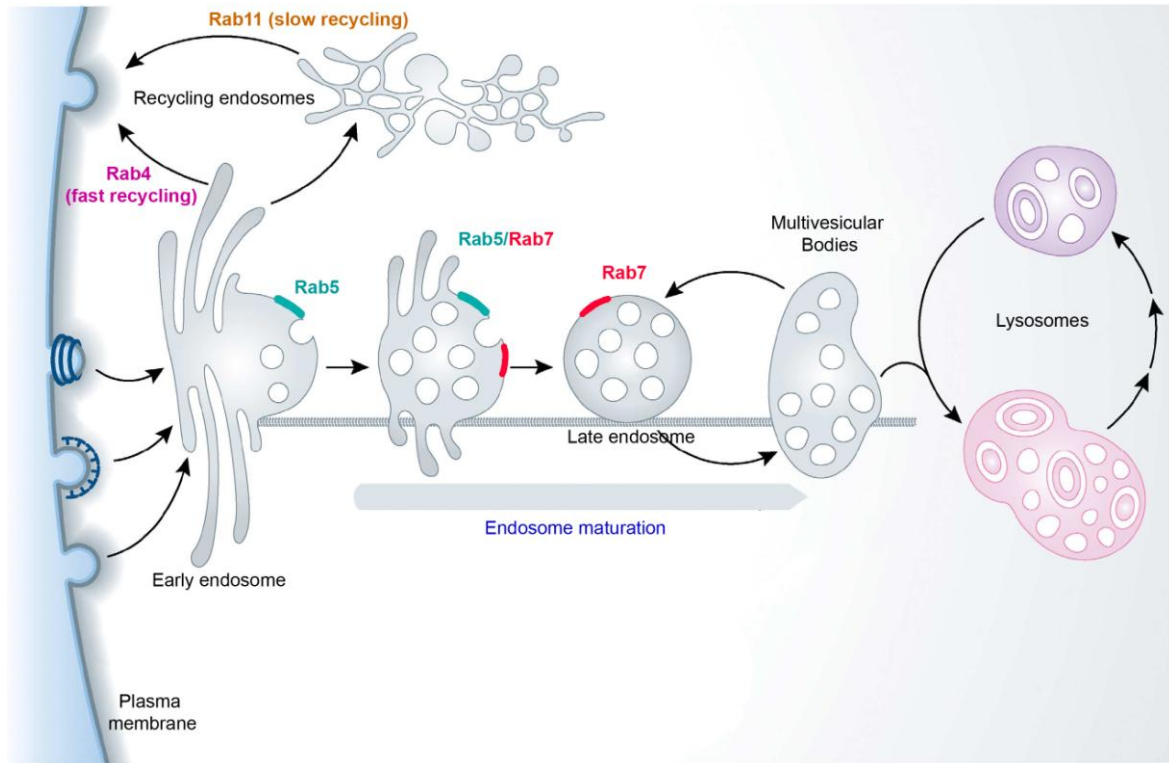
Εικόνα 1.8 : Σχηματική αναπαράσταση του συνόλου των εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης.

1.5.2. Ενδοκυτταρική κυκλοφορία

Παρά το πλήθος και την ετερογένεια των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης (εικόνα 1.8), το πρώιμο ενδόσωμα αποτελεί ένα κοινό σημείο ελέγχου της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των υποδοχέων και αντιπροσωπεύει το πρώτο

ενδοκυτταρικό διαμέρισμα το οποίο δέχεται πρωτεϊνικό φορτίο από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αποτελεί μια δυναμική δομή η οποία μορφολογικά χαρακτηρίζεται από περιοχές με εκτεταμένη σωληνοειδή μορφολογία, μεγάλα κυστίδια και υποπεριοχές με εκτενείς μεμβρανικές εγκολλώσεις οι οποίες αποδίδουν ένα πολυκυστιδιακό φαινότυπο. Αυτές οι μορφολογικά διακριτές περιοχές έχουν ιδιαίτερη λειτουργική σημασία καθώς αποτελούν σημεία διαλογής και διαμερισματοποίησης των πρωτεϊνών από όπου καθορίζεται η μετέπειτα πορεία τους στο κύτταρο ^{51,52}. Η στόχευση των πρωτεϊνών στις διάφορες περιοχές του πρώιμου ενδοσώματος δεν αποτελεί απλά μια διαδικασία μεταφοράς αλλά χαρακτηρίζεται ως μια διαδικασία κυστιδικής ωρίμανσης η οποία ελέγχεται από ένα σύνολο κρίσιμων ενδοσωματικών ρυθμιστικών μορίων, των πρωτεϊνών Rab ^{53,54}. Οι Rabs αποτελούν μικρές πρωτεΐνες με ικανότητα σύνδεσης GTP/GDP οι οποίες μετακυλύουν συνεχώς μεταξύ μιας ενεργούς (σύνδεση GTP) και ανενεργούς (σύνδεση GDP) κατάστασης. Στην ενεργή τους κατάσταση εντοπίζονται σε ενδοκυτταρικές μεμβράνες όπου, μέσω της συστράτευσης και αλληλεπίδρασης με μόρια-τελεστές (effectors), ελέγχουν την ενδοκυτταρική κυκλοφορία των ενδοσωμάτων ⁵⁵.

Από το σύνολο της οικογένειας των πρωτεϊνών Rab, η Rab5 αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του πρώιμου ενδοσώματος καθώς ελέγχει τη σύντηξη των μεμβρανικών κυστιδίων, την οργάνωση της λιπιδικής και πρωτεϊνικής σύστασης, καθώς και τη μεταφορά και τη σύντηξη των πρώιμων ενδοσωμάτων ⁵⁶. Η λειτουργία της Rab5 εξαρτάται από την παρουσία μορίων-τελεστών όπως η EEA1, η οποία είναι απαραίτητη για την ομοτυπική σύντηξη των ενδοσωμάτων ⁵⁷, ή η Rabankyrin-5, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των μακροπινοσωμάτων ⁵⁸. Εκτός από τη Rab5, οι Rab4/Rab11 αποτελούν επίσης κύριες πρωτεΐνες του πρώιμου ενδοσώματος. Ενώ η Rab5 οργανώνει την είσοδο των πρωτεϊνών στο πρώιμο ενδοσώμα, η Rab4 (ταχεία ανακύκληση) και Rab11 (αργή ανακύκληση) ελέγχουν την κατανομή του πρωτεϊνικού φορτίου των ενδοσωμάτων στις περιοχές ανακύκλησης και ρυθμίζουν την έξοδο και επιστροφή των πρωτεϊνών αυτών στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, η προοδευτική απομάκρυνση της Rab5 από τις περιοχές με πολυκυστιδική μορφολογία του πρώιμου ενδοσώματος και η ενσωμάτωση της Rab7 οδηγεί στη σταδιακή δημιουργία του όψιμου ενδοσώματος και τη μετάβαση των πρωτεϊνών προς αποικοδόμηση μέσω σύντηξης του όψιμου ενδοσώματος με τα λυσοσώματα ^{56,59} (εικόνα 1.9).

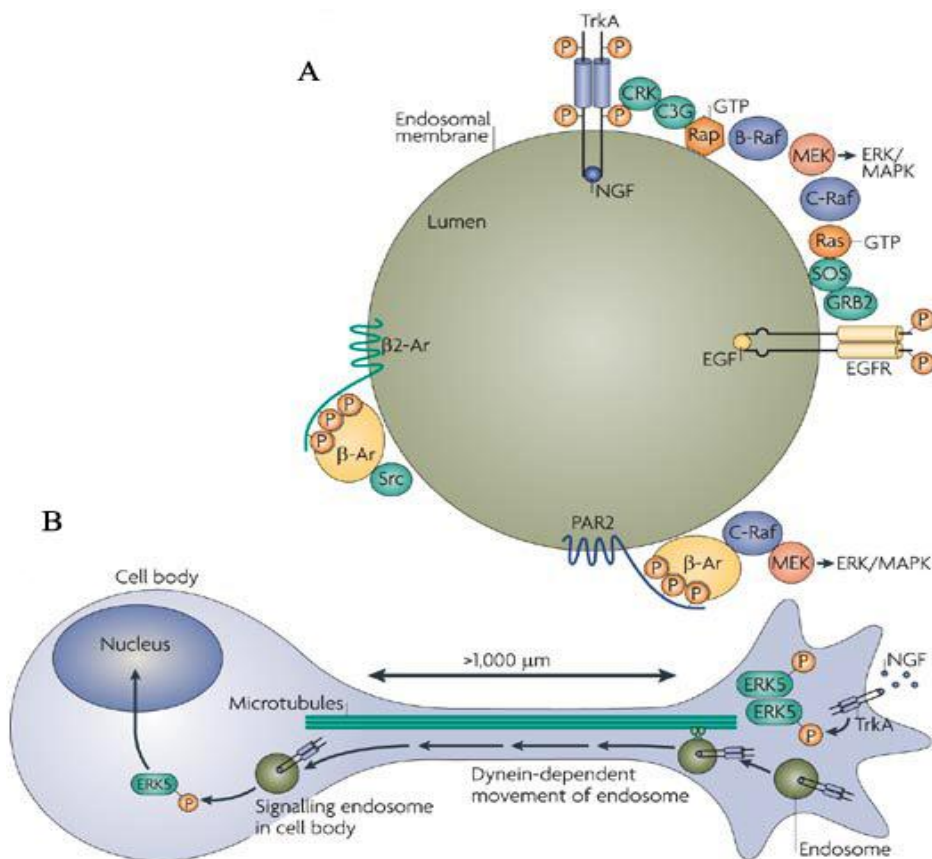


Εικόνα 1.9 : Σχηματική αναπαράσταση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας μέσω της διαδικασίας ωρίμανσης των ενδοσωμάτων.

1.5.3 Ενδοκυττάρωση και σηματοδότηση

Κατά την ενδοκυτταρική κυκλοφορία τους οι υποδοχείς μπορεί να αποδεσμεύσουν τον συνδέτη τους, να αποφωσφορυλιωθούν και να σημανθούν ως πρωτεΐνες προς αποικοδόμηση, γεγονός τα οποία ελέγχουν αρνητικά τη μεταγωγή του σήματος. Παράλληλα, τα γεγονότα ανακύκλησης και αποικοδόμησης αποτελούν ένα μηχανισμό ελέγχου των πρωτεϊνικών επιπέδων και της διαθεσιμότητας των υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και κατ' επέκταση, καθορίζουν το δυναμικό απόκρισης των κυττάρων στα εξωκυτταρικά ερεθίσματα. Ωστόσο, ο ρόλος των ενδοσωμάτων στη μεταγωγή του σήματος δεν περιορίζεται απλά σε ένα μηχανισμό ρύθμισης της διακίνησης των υποδοχέων. Κατά αντιστοιχία με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, τα ενδοσώματα αποτελούν επίσης ένα κέντρο διαμερισματοποίησης, οργάνωσης και ελέγχου της κυτταρικής σηματοδότησης. Ο εναλλακτικός εντοπισμός των υποδοχέων στους διαφορετικούς τύπους ενδοσωμάτων καθορίζει την εξειδίκευση της σηματοδότησης καθώς επιτρέπει την ειδική αλληλεπίδραση των υποδοχέων με σηματοδοτικά μόρια τα οποία εντοπίζονται σε αυτά τα ενδοσώματα. Επίσης, ο χρόνος παραμονής των υποδοχέων στα ενδοσώματα καθορίζει τη διάρκεια της

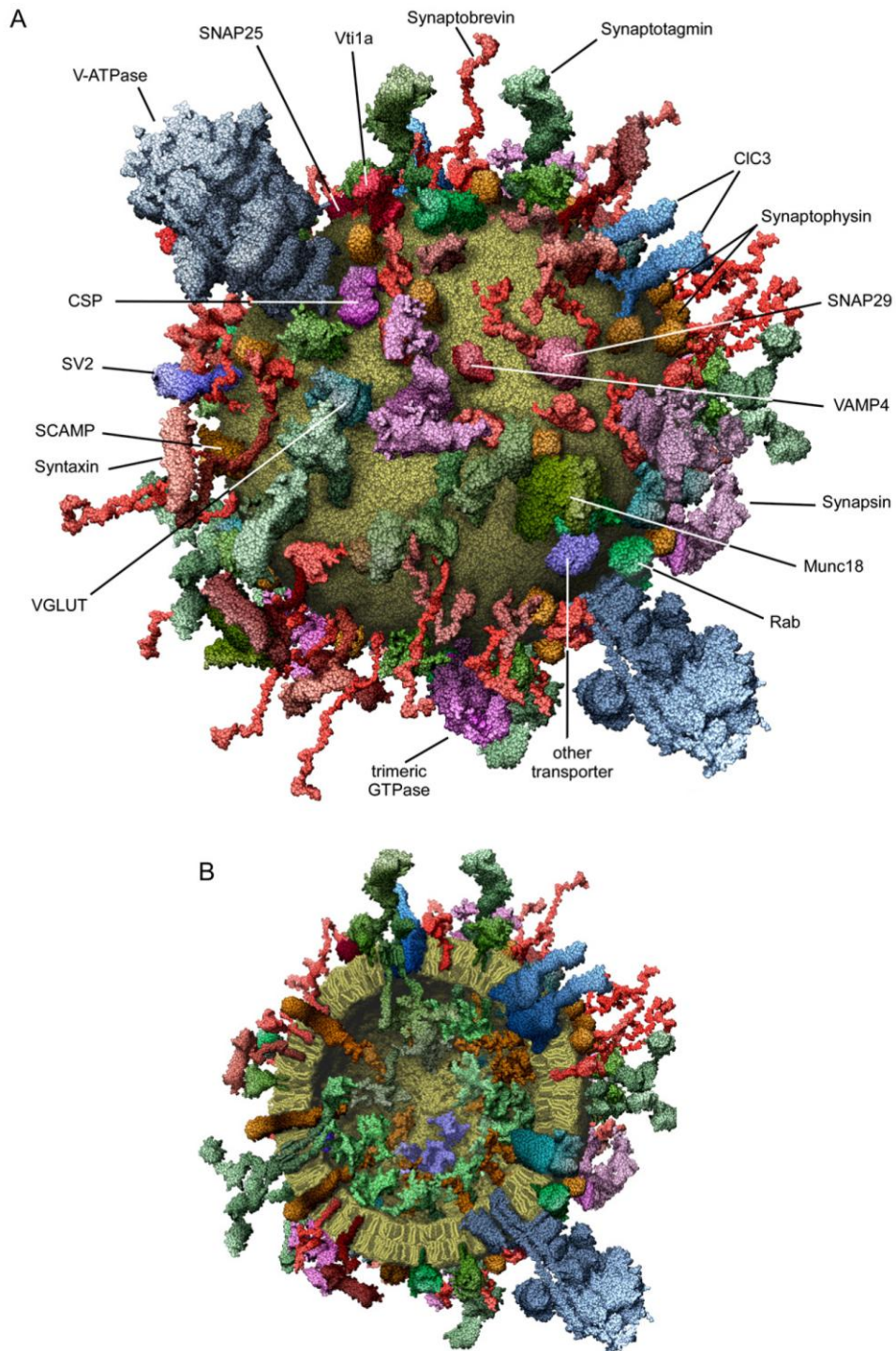
σηματοδότησης καθώς ελέγχει τόσο την ενεργότητα των υποδοχέων όσο και τη διάρκεια της αλληλεπίδρασής τους με τα ενδοσωματικά σηματοδοτικά μόρια ^{40,52,60,61}. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της σημασίας της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης στην κυτταρική λειτουργία αποτελεί η μεταγωγή του σήματος του υποδοχέα του νευρικού αυξητικού παράγοντα TrkA στα νευρικά κύτταρα. Μετά την ενεργοποίηση του στη μεμβράνη, ο TrkA εισέρχεται στα ενδοσώματα όπου αλληλεπιδρά με κύρια καθοδικά σηματοδοτικά μόρια των ERK1/2 και PI3K/Akt μονοπατιών σηματοδότησης, επιτρέποντας έτσι την μεταγωγή του σήματος από τις νευρικές απολήξεις, οι οποίες μπορεί να φτάνουν έως και ένα μέτρο σε μήκος, μέχρι το κύριο σώμα των νευρώνων. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR έχει αποδειχθεί ότι σχεδόν όλος ο σηματοδοτικός μηχανισμός του μονοπατιού ERK1/2 εντοπίζεται στο πρώιμο ενδόσωμα ⁶² (εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10 : (A) Γραφική απεικόνιση του σηματοδοτικού καταρράκτη της ERK1/2 και των υποδοχέων TrkA και EGFR στη μεμβράνη του πρώιμου ενδοσώματος. (B) Σχηματική αναπαράσταση της μεταγωγής του σήματος του υποδοχέα TrkA στα νευρικά κύτταρα. Η μεταγωγή του σήματος λαμβάνει χώρα σε όλο το κύτταρο μέσω της ενδοκυττάρωσης του TrkA από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και την ενδοκυτταρική κυκλοφορία του υποδοχέα κατά μήκος των νευρικών αξόνων, διαμέσου των ενδοσωμάτων.

1.5.4 Σηματοδότηση και ενδοκυττάρωση

Είναι ξεκάθαρο ότι η ενδοκυτταρική κυκλοφορία των υποδοχέων συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος. Ωστόσο, η ίδια η σηματοδότηση είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ενδοκυττάρωση όχι μόνο γιατί υφίσταται ρύθμιση από αυτή αλλά διότι η ίδια ελέγχει τα γεγονότα ενδοκυττάρωσης. Τα σηματοδοτικά γεγονότα ελέγχουν τη διαδικασία της πρωτεϊνικής μεταφοράς καθώς επιτρέπουν την επιλεκτική ενεργοποίηση ανοδικών σηματοδοτικών μορίων που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και τα οποία μέσω ενδοκυττάρωσης συναντούν καθοδικά σηματοδοτικά μόρια στα ενδοσώματα. Μάλιστα, η διαδικασία αυτή είναι ανεξάρτητη από την κυκλοφορία των υποδοχέων καθώς αφορά την ενδοκυτταρική διακίνηση των σηματοδοτικών μορίων^{63,64}. Μελέτες αποσιώπησης των κινασών του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι αποκαλυπτικές για το ρόλο των σηματοδοτικών μορίων στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας. Από το σύνολο των κινασών που βρέθηκαν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της εξαρτώμενης και ανεξάρτητης από την κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης, 36 από αυτές ελέγχουν από κοινού τα δυο μονοπάτια ενώ 23 λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες οι οποίοι αναστέλλουν επιλεκτικά το ένα από τα δύο μονοπάτια και επάγουν την ενδοκυττάρωση από το άλλο⁶⁵. Επίσης, πρωτεϊνική ανάλυση του φορτίου των κυστιδίων κλαθρίνης σε εγκεφαλικά κύτταρα οδήγησε στον εντοπισμό περισσότερων των 200 πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και ενός συνόλου σηματοδοτικών μορίων, από τις οποίες τουλάχιστον 30 είναι κοινές με τις πρωτεΐνες των ενδοσωμάτων^{66,67} (εικόνα 1.11). Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν αφενός την πολυπλοκότητα της σύνθεσης των κυστιδίων μεταφοράς, αφετέρου, υποδεικνύουν τη μετάβαση πλήθους μορίων μεταξύ των κυτταρικών διαμερισμάτων. Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι η ενδοκυττάρωση και η σηματοδότηση αποτελούν ένα αλληλένδετο σύστημα και συνεπώς, η μελέτη του ρόλου της διαμερισματοποίησης των υποδοχέων στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος είναι αδύνατη εάν δεν ληφθεί υπόψη η διαμερισματοποίηση των επιμέρους μορίων που εμπλέκονται στο υπό μελέτη σύστημα⁶³.



Εικόνα 1.11 : Μοριακό μοντέλο ενός τυπικού συναπτικού κυστιδίου στα εγκεφαλικά κύτταρα. **(A)** Εξωτερική απεικόνιση του κυστιδίου. **(B)** Εσωτερική απεικόνιση του κυστιδίου (εγκάρσια τομή). Το παραπάνω μοντέλο βασίζεται σε υπολογιστικά μοντέλα κατανομής χώρου των μακρομορίων που ανιχνεύθηκαν στα κυστίδια μέσω φασματοσκοπίας μάζας. Το μοντέλο κατασκευάστηκε σε επίπεδο ατομικής ευκρίνειας.

1.6. Διαμερισματοποίηση, ενδοκυτταρική κυκλοφορία και ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2

1.6.1 Ενδοκυτταρική κυκλοφορία του VEGFR2

Σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς οι οποίοι απουσία του συνδέτη τους κατανέμονται στο μεγαλύτερο ποσοστό τους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, απουσία του VEGF, ο VEGFR2 εντοπίζεται τόσο στη μεμβράνη όσο και στα ενδοσώματα. Δεδομένα μικροσκοπίας αποκάλυψαν ότι από το σύνολο των VEGFR2-θετικών ενδοσωμάτων το μεγαλύτερο ποσοστό του εντοπίζεται στα πρώιμα ενδοσώματα (Rab5/EEA1) και στα ενδοσώματα ταχείας ανακύκλησης (Rab4) ενώ ένα ποσοστό εντοπίζεται στη συσκευή Golgi⁶⁸⁻⁷⁰. Σε συνδυασμό με βιοχημικά δεδομένα, ο εντοπισμός του VEGFR2 στα ενδοσώματα ανακύκλησης αποδεικνύει ότι ο VEGFR2 δεν είναι στατικά κατανεμημένος μεταξύ της μεμβράνης και των ενδοσωμάτων. Υπό συνθήκες ηρεμίας, ο υποδοχέας βρίσκεται σε μια κατάσταση συνεχούς ανακύκλησης μεταξύ των δύο κυτταρικών διαμερισμάτων, μια δυναμική διαδικασία για την οποία όμως μέχρι σήμερα δεν έχει αποδοθεί κάποιος λειτουργικός ρόλος^{68,71}. Η επαγόμενη από τον VEGF ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων οδηγεί σε δραματική ανακατανομή του VEGFR2 στον κυτταρικό χάρτη καθώς επάγει την ταχεία ενδοκυττάρωση του υποδοχέα και την είσοδό του στα πρώιμα ενδοσώματα, τη μετάβασή του στα όψιμα ενδοσώματα (Rab5→Rab7) και τελικά, την αποικοδόμησή του^{68,69,72}.

Σε ότι αφορά τη θέση του υποδοχέα στη μεμβράνη, τα μέχρι σήμερα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι, από το σύνολο των εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης, ο VEGFR2 ακολουθεί το εξαρτώμενο από κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης. Ο εντοπισμός του VEGFR2 στα κυστίδια κλαθρίνης σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη μείωση της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα μετά από αναστολή τόσο της κλαθρίνης^{73,74} όσο και κύριων πρωτεϊνών που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι (Epsin 1/2, AP2, Hrs)^{72,75,76} έχουν οδηγήσει στην πεποίθηση ότι η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 διαμεσολαβείται κατά αποκλειστικότητα μέσω της κλαθρίνης. Σε σχέση με τα υπόλοιπα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, ένα σύνολο δεδομένων υποδεικνύουν ότι ο VEGFR2 κατανέμεται επίσης σε περιοχές που οριοθετούνται από τα caveolae⁷⁷⁻⁷⁹. Ωστόσο, ο ρόλος των caveolae στην ενδοκυττάρωση του VEGFR2 παραμένει άγνωστος.

1.6.2 Ενδοκυτταρική κυκλοφορία και ρύθμιση της σηματοδότησης και αποικοδόμησης του VEGFR2

Σε ένα πρώτο επίπεδο ρύθμισης, η ενδοκυτταρική κυκλοφορία και η κατανομή του VEGFR2 ελέγχει τη σηματοδότηση μέσω της ρύθμισης των πρωτεϊνικών επιπέδων και της διαθεσιμότητας του υποδοχέα στη μεμβράνη. Η επαγόμενη από τον VEGF αποικοδόμηση του VEGFR2 δεν πραγματοποιείται κατά αποκλειστικότητα στα λυσοσώματα καθώς έχει αποδειχθεί ότι ένα μέρος του VEGFR2 υφίσταται αποικοδόμηση στο πρωτεάσωμα ⁷². Επίσης, η διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση του VEGFR2 επάγει την πρωτεολυτική σχάση (shedding) του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη οδηγώντας στην απελευθέρωση ενός εκκρινόμενου τμήματος της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 ⁸⁰. Η σχάση του VEGFR2 έχει αποδειχθεί ότι επάγεται από μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs) της οικογένειας ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ^{81,82}. Οι MMPs αποτελούν ενδοπεπτιδάσες οι οποίες εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όπου αναγνωρίζουν και πρωτεολύουν ένα ετερογενές σύνολο υποστρωμάτων όπως υποδοχείς, μόρια προσκόλλησης και σχεδόν όλα τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας ⁸³. Η δράση των ADAMs ελέγχεται από τον VEGF καθώς, μέσω της σηματοδότησής του, προάγει θετικά τη μεταγραφή τους και επάγει την ενεργοποίησή τους στη μεμβράνη η οποία οδηγεί στον κερματισμό του VEGFR2. Τέλος, η δράση του VEGF δεν περιορίζεται μόνο στην αρνητική ρύθμιση των επιπέδων του VEGFR2 καθώς επάγει τόσο την ανακύκλυσή του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όσο και την έξοδο του από τη συσκευή Golgi προκειμένου να ανατροφοδοτηθεί η μεμβράνη και να αυξηθεί το δυναμικό απόκρισης των κυττάρων στα πολλαπλασιαστικά σήματα του VEGF ^{70,82}.

Όπως προαναφέρθηκε, η ενεργοποίηση της ενδοκυττάρωσης δεν αποσκοπεί μόνο στον έλεγχο των πρωτεϊνικών επιπέδων των υποδοχέων αλλά αποτελεί έναν κρίσιμο μηχανισμό ελέγχου και οργάνωσης της κυτταρικής σηματοδότησης. Κατά αντιστοιχία με άλλους υποδοχείς, η ενδοκυτταρική κυκλοφορία του VEGFR2 φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος του υποδοχέα. Προηγούμενες εργασίες αποδεικνύουν ότι ο VEGFR2 παραμένει ενεργοποιημένος στα ενδοσώματα όπου και

αλληλεπιδρά με κύρια καθοδικά μόρια όπως η PLCγ, το πρώτο σηματοδοτικό μόριο στον καταρράκτη ενεργοποίησης του μονοπατιού της ERK1/2⁷³. Αναστολή της μετάβασης του VEGFR2 από τα πρώιμα στα όψιμα ενδοσώματα μέσω αποσιώπησης της Rab7 (η οποία ελέγχει το σχηματισμό των όψιμων ενδοσωμάτων) οδηγεί σε παρατεταμένη ενεργοποίηση της ERK1/2 και σε μείωση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων⁶⁹. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν αφενός ότι η μεταγωγή του σήματος συνεχίζεται στα ενδοσώματα, αφετέρου ότι υπάρχει εξειδίκευση της σηματοδότησης μεταξύ των πληθυσμών των ενδοσωμάτων. Υπό την παρουσία του VEGF, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται στη μεμβράνη μέσω των ενδοσωμάτων αργής ανακύκλησης (Rab11) η οποία όμως προϋποθέτει την αρχική μετάβαση του υποδοχέα από τα πρώιμα ενδοσώματα και τα ενδοσώματα ταχείας ανακύκλησης (Rab5→Rab4→Rab11). Αντίστοιχα με την αναστολή της Rab7, η αναστολή της ανακύκλησης του VEGFR2 μέσω της αποσιώπησης της Rab11 οδηγεί επίσης σε αυξημένη ενεργοποίηση της ERK1/2. Σε συνδυασμό με το γεγονός ότι η μετάβαση του VEGFR2 στα ενδοσώματα Rab11 επάγει την αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα, θεωρείται ότι η μεταγωγή του σήματος, τουλάχιστον στην περίπτωση της ERK1/2, λαμβάνει χώρα στα πρώιμα ενδοσώματα και στα ενδοσώματα ταχείας ανακύκλησης (Rab5/Rab4)^{84,85}.

1.6.3 Ο ρόλος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2

Ενώ οι μελέτες του ρόλου της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ενδοσωματικός εντοπισμός του VEGFR2 επάγει θετικά τη σηματοδότησή του, οι επιμέρους εργασίες που αφορούν τη μελέτη του ρόλου της θέσης του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη καθώς και της σημασίας της ενδοκυττάρωσης στη μεταγωγή του σήματος, όχι μόνο δεν αποσαφηνίζουν το πεδίο αλλά έρχονται σε αντίφαση με τα προηγούμενα δεδομένα, οδηγώντας σε μια σειρά από αναπάντητα ερωτήματα. Ενώ η αναστολή της εξαρτώμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης αναστέλλει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2, οδηγεί είτε σε επαγωγή της σηματοδότησης του υποδοχέα είτε σε αναστολή ή δεν έχει καμία επίδραση στη σηματοδότηση του VEGFR2^{72,73,75,76}. Αντίστοιχα, οι επιμέρους εργασίες που εστιάζονται στη μελέτη του ρόλου των caveolae στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος του VEGFR2 έχουν οδηγήσει σε ένα σύνολο

αντικρουόμενων αποτελεσμάτων⁸⁶⁻⁹³. Παρόλα αυτά, η συνδυαστική αναστολή της ελεγχόμενης από κλαθρίνη ενδοκυττάρωσης και της ενδοκυττάρωσης από τα caveolae, μέσω αναστολής της δυναμίνης (η οποία ελέγχει τα δύο μονοπάτια ενδοκυττάρωσης), οδηγεί σε αναστολή της σηματοδότησης του VEGFR2^{94,95}. Τα δεδομένα αυτά ενισχύουν την άποψη ότι η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για τη μεταγωγή του σήματος. Ωστόσο, αν και η εξαρτώμενη από δυναμίνη ενδοκυττάρωση φαίνεται αναγκαία για τη μεταγωγή του σήματος του VEGFR2, η αναστολή της δυναμίνης δεν εμποδίζει τη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση του υποδοχέα⁹⁶ καθώς και την αποικοδόμηση του, η οποία πραγματοποιείται με έναν άγνωστο μέχρι σήμερα μηχανισμό⁹⁴. Εφόσον η αναστολή της δυναμίνης δεν εμποδίζει τη φωσφορυλίωση και την αποικοδόμηση του VEGFR2 θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από ένα εναλλακτικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης μέσω του οποίου ο VEGFR2 οδηγείται προς αποικοδόμηση. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από μελέτες που αποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση του VEGFR2 είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ενδοκυττάρωσή του υποδοχέα^{76,97}. Επιπλέον, η αναγκαιότητα της απομάκρυνση του ενεργοποιημένου VEGFR2 από την κυτταροπλασματική μεμβράνη υποστηρίζεται περαιτέρω από εργασίες που αποδεικνύουν ότι η μετάβαση του υποδοχέα στα ενδοσώματα λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προστασίας από φωσφατάσες οι οποίες δρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη^{73,84,98}. Ωστόσο, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δεδομένα που να υποστηρίζουν την ύπαρξη εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, πέραν του κλασικού μονοπατιού ενδοκυττάρωσης που διαμεσολαβείται από την κλαθρίνη. Βέβαια, ακόμα και στην περίπτωση της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα από ένα εναλλακτικό της δυναμίνης μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, το ερώτημα που παραμένει είναι γιατί ο VEGFR2, ενώ ενεργοποιείται από τον VEGF, δεν μπορεί να σηματοδοτήσει.

Τέλος, είναι αξιοσημείωτο να ειπωθεί πως ένα από τα μεγαλύτερα κενά σε όλες τις μελέτες που σχετίζονται με την αποσαφήνιση του ρόλου της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας στον έλεγχο της κυτταρικής σηματοδότησης, όχι μόνο του VEGFR2 αλλά και των υπόλοιπων υποδοχέων, αποτελεί η παντελής έλλειψη πληροφοριών για τη σημασία της κυκλοφορίας των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, στη ρύθμιση της μεταγωγή του σήματος. Δεδομένου ότι τα

καθοδικά μόρια της σηματοδότησης του VEGFR2 υφίστανται ενδοκυττάρωση και ο ενδοσωματικός εντοπισμός τους είναι απαραίτητος για τη μεταγωγή του σήματος^{99,100}, παραμένει άγνωστο εάν η επίδραση στη σηματοδότηση του VEGFR2, λόγω αναστολής της ενδοκυττάρωσης, είναι αποτέλεσμα της αναστολής της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του ίδιου του υποδοχέα ή λόγω αναστολής της κυκλοφορίας των καθοδικών μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση.

1.7 Σύντομη ανασκόπηση της υπάρχουσας γνώσης και των κενών της, και σκοπός της παρούσας μελέτης

Ανακεφαλαιώνοντας, η κυτταροπλασματική μεμβράνη αντιπροσωπεύει την πρωτογενή περιοχή απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πολλαπλασιαστικά μηνύματα του VEGF και αποτελεί το εναρκτήριο σημείο από όπου θα καθοριστεί η ενδοκυτταρική κατανομή και κατά συνέπεια, η σηματοδότηση του VEGFR2. Από το σύνολο των μέχρι σήμερα εργασιών διαφαίνεται ξεκάθαρα ότι η ενδοκυττάρωση και η ενδοκυτταρική κυκλοφορία του VEGFR2 αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της ρύθμισης της σηματοδότησης του υποδοχέα. Ωστόσο, η σημασία της θέσης και της διαμερισματοποίησης του VEGFR2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η παρουσία πιθανών εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης και ο ρόλος τους στον έλεγχο της μεταγωγής του σήματος, αποτελούν ανοιχτά ερωτήματα στο εν λόγω πεδίο. Καθώς ο VEGFR2 αποτελεί έναν από τους κυριότερους ρυθμιστές της λειτουργίας του ενδοθηλίου, η διαλεύκανση και η αποσαφήνιση των μηχανισμών που διέπουν τη ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2 αποτελούν υψίστης προτεραιότητας ζητήματα, τόσο για την κατανόηση της λειτουργίας του αγγειακού συστήματος, όσο και για την εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών σε παθολογικές καταστάσεις.

ΣΚΟΠΟΣ

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, θέσαμε ως στόχο της παρούσας εργασίας:

- να χαρτογραφήσουμε όλα τα εναλλακτικά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του VEGFR2,
- να διαλευκάνουμε τη σημασία της ενδοκυττάρωσης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα και
- να μελετήσουμε, για πρώτη φορά στο πεδίο της ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων, τη σημασία της κυτταρικής κυκλοφορίας όχι μόνο του VEGFR2 αλλά και των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αντιδραστήρια και αντισώματα

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν (οι οποίες αναγράφονται μέσα στις παρενθέσεις, δίπλα στο όνομα του αντιδραστηρίου) διατηρήθηκαν σταθερές σε όλες τις πειραματικές διατάξεις που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Σε συγκεκριμένες δοκιμασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, αυτές αναφέρονται στην ενότητα που αναπτύσσεται η μέθοδος. Ο ανθρώπινος ανασυνδυσασμένος VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) αποκτήθηκε από την εταιρεία Immunotools. Τα αντιδραστήρια dynasore (100 μmol/L), 5-N-Ethyl-N-isopropyl amiloride (EIPA) (50 μmol/L), lactacystin (10 μmol/L), chloroquine (100 μmol/L), filipin (1 μg/ml), methyl-β-cyclodextrin (2.5 mmol/L), και cytochalasin D (2 μg/ml) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich ενώ ο αναστολέας των μεταλλοπρωτεϊνών TAPI-1 (25 μmol/L) αγοράστηκε από την εταιρεία Calbiochem. Η τρανσφερίνη συζευγμένη με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη (50 μg/ml) και η δεξτράνη μοριακού βάρους 70.000 συζευγμένη με τη φθορίζουσα χρωστική Texas-Red (1.5 mg/ml) αποκτήθηκαν από την εταιρεία Invitrogen. Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich, εκτός και εάν αναφέρεται διαφορετικά.

Τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του εξωκυτταρικού (άμινο-τελικού) τμήματος του VEGFR2 τα οποία απομονώθηκαν από ποντίκια ή κασικές αγοράστηκαν από τις εταιρείες Abcam και R&D Systems, αντίστοιχα, ενώ τα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού (καρβόξυ-τελικού) τμήματος του VEGFR2 τα οποία απομονώθηκαν από κουνέλια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Cell Signaling και Santa Cruz Biotechnology, αντίστοιχα. Το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης αποκτήθηκε από την εταιρεία DSHB (Iowa) και το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ακτίνης από την εταιρεία Millipore. Τα πολυκλωνικά αντισώματα από κουνέλια έναντι των πρωτεϊνών EEA-1 (Early Endosome Antigen-1), Rab-5 και Rabankyrin-5 ήταν ευγενική προσφορά του M. Zerial (Max Plank, Δρέσδη, Γερμανία). Το μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκια έναντι της βαριάς αλυσίδας της κλαθρίνης

(clathrin heavy chain, CHC) και το πολυκλωνικό αντίσωμα από κουνέλια έναντι της καβεολίνης-1 αγοράστηκαν από τις εταιρείες BD Biosciences και Santa Cruz Biotechnology, αντίστοιχα. Τα μονοκλωνικά αντισώματα από κουνέλια έναντι των πρωτεϊνών ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, p-Akt, PLCγ, p-PLCγ και p-MEK1/2 αγοράστηκαν από την εταιρεία Cell Signaling. Το μονοκλωνικό αντίσωμα από κατσίκια έναντι του VEGF αποκτήθηκε από την εταιρεία R&D Systems. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με τα φθοριοχρώματα Alexa (Alexa-488, 594, 650) αγοράστηκαν από την εταιρεία Invitrogen ενώ τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) αγοράστηκαν από την εταιρεία Jackson Immunoresearch.

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

Η διαδικασία της απομόνωσης κυττάρων HUVE περιγράφεται ακολούθως: σε φρέσκο ανθρώπινο λώρο εντοπίζεται η φλέβα και η περιοχή πλένεται τοπικά με περίσσεια διαλύματος φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffer Saline, PBS, PAA Laboratories GmbH) με τη βοήθεια σύριγγας. Στα άκρα του λώρου (στις εισόδους της φλέβας) τοποθετούνται στρόφιγγες τριπλής ροής και η φλέβα πλένεται εσωτερικά με περίσσεια PBS. Ακολούθως, αποφράσσεται το ένα άκρο και από το ελεύθερο άκρο η φλέβα διαποτίζεται με διάλυμα κολλαγενάσης 0.1 % σε HBSS (Hanks Balanced Salt Solution, GIBCO) και ο λώρος τοποθετείται σε υάλινο δοχείο με περίσσεια PBS, σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37⁰C, για 12 λεπτά. Ακολουθεί πλύση με 10 ml πλήρους θρεπτικού μέσου ανάπτυξης M199, συλλογή του διαλύματος, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 600 rpm, απομάκρυνση του υπερκείμενου και επαναιώρηση του κυτταρικού ιζήματος σε πλήρες θρεπτικό μέσο ανάπτυξης M199.

2.3 Καλλιέργειες κυττάρων HUVE

Μετά την απομόνωσή τους, τα κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 100-mm. Τα τρυβλία είχαν προηγουμένως επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I, για μία ώρα στους 37⁰C. Το θρεπτικό

υλικό καλλιέργειας των κυττάρων ήταν M199 (Gibco) εμπλουτισμένο με 24 % ορό εμβρυικού βοός (Fetal Bovine Serum, FBS), 0.06 mg/ml συμπλήρωμα ανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) απομονωμένο από εγκέφαλο βοός, 10 Units/μl ηπαρίνης, 1.2 % πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και 1.2 % L-γλουταμίνη. Η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο επώασης σταθερής θερμοκρασίας 37°C και ατμόσφαιρας εμπλουτισμένης με 5 % CO₂. Σε όλες τις πειραματικές διατάξεις χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενεάς 2-4.

2.4 Διαμόλυνση και επιμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων

2.4.1 Διαμόλυνση με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια (siRNAs)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 6 ή 24 φρεατίων ή σε πιάτα μικροσκοπίας σε οπτική πυκνότητα 30-50% κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου ή του πιάτου μικροσκοπίας. Μετά το πέρας 24 ωρών, πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με siRNAs συμπληρωματικά του μεταγραφήματος της πρωτεΐνης στόχου ή ολιγονουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (scrabbled siRNAs). Για τη διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο RNAiMAX LIPOFECTAMINE (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μείγμα του λιπιδίου και των siRNAs επωάστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε ελάχιστο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης Optimem1 (Gibco) και στη συνέχεια προστέθηκε στα κύτταρα. Μετά από τέσσερις ώρες, το μέσο ανάπτυξης των κυττάρων αντικαταστάθηκε με πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας M199 και τα κύτταρα επεξεργάστηκαν μετά από 72 ώρες, υπό τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος. Σε όλες τις περιπτώσεις, η τελική συγκέντρωση των siRNAs κατά την διαμόλυνση των κυττάρων ήταν 50 nM. Για την αποσιώπηση της πρωτεΐνης PLCγ χρησιμοποιήθηκε μείγμα δύο διαφορετικών siRNAs (το καθένα σε συγκέντρωση 25 nM). Τα siRNAs που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία και οι αλληλουχίες τους αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πρωτεΐνη στόχος	Αλληλουχία siRNA	Εταιρία παραγωγής
Clathrin Heavy Chain	5'GGGUGCCAGAUUAUCAAUUtt3'	Ambion
Caveolin-1	5'AAGAGCUUCCUGAUUGAGAtt3'	Biospring
PLCγ	5'CCCUUACCAACAAGAUCAAtt3'	Ambion
PLCγ	5'GGGAAACAAAGUUUACAUUtt3'	Ambion

2.4.2 Διαμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης (DNA)

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24 φρεατίων ή σε πιάτα μικροσκοπίας ώστε τη μέρα της διαμόλυνσης να βρίσκονται σε οπτική πυκνότητα 60-70% κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου ή του πιάτου μικροσκοπίας. Για τη διαμόλυνση των κυττάρων HUVE με DNA χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro (Biontexas) σε αναλογία λιπιδίου προς DNA 3:1. Μείγμα του λιπιδίου και DNA επωάστηκε για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, σε μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199 παρουσία 5 % FBS και στη συνέχεια προστέθηκε στα κύτταρα. Μετά από τρεις ώρες, το μέσο ανάπτυξης των κυττάρων αντικαταστάθηκε με πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας M199 και τα κύτταρα επεξεργάστηκαν μετά από 24-48 ώρες, υπό τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος. Για τη διαμόλυνση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ο πλασμιδιακός φορέας έκφρασης pCMV ο οποίος περιείχε την αλληλουχία DNA του VEGFR2 συζευγμένη με τη την αλληλουχία της φθορίζουσας χρωστικής mCherry (ευγενική προσφορά του J. Huot, Centre de recherche du CHU de Québec, Καναδάς). Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα πλασμίδια έκφρασης των πρωτεϊνών GFP-Rab5, GFP-Rab7, GFP-Rab4, GFP-Rab5S34N και GFP-Rab5Q79L τα οποία ήταν ευγενική προσφορά του M. Zerial.

2.4.3 Επιμόλυνση με αδενοϊούς

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24 φρεατίων ή σε πιάτα μικροσκοπίας ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης να βρίσκονται σε οπτική πυκνότητα 90% κάλυψης της επιφάνειας του φρεατίου ή του πιάτου μικροσκοπίας. Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με την προσθήκη ανασυνδυασμένων αδενοϊών σε αναλογία κυττάρων προς ισοστάσια 1:300. Το θρεπτικό μέσο κυτταρικής

ανάπτυξης αντικαταστάθηκε την επόμενη ημέρα και τα κύτταρα επεξεργάστηκαν μετά από 12 ώρες, υπό τις συνθήκες του εκάστοτε πειράματος. Οι ανασυνδυασμένοι αδenoϊοί που χρησιμοποιήθηκαν για την υπερέκφραση των πρωτεϊνών Rab5Q79L και Rab5S34N ήταν ευγενική προσφορά του Θ. Φώτση και της C. Murphy (IMBB/ITE, Ιωάννινα).

2.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Ανάλογα με την πειραματική διάταξη που ακολουθήθηκε, τα κύτταρα λύθηκαν με διάλυμα κυτταρικής λύσης 1% SDS (sodium dodecyl sulfate) σε PBS και τα κυτταρικά λύματα επεξεργάστηκαν δύο φορές με υπερήχους έντασης 13 %, για 10 δευτερόλεπτα. Ακολούθησε βρασμός για 5 λεπτά στους 100°C και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13200 rpm. Στη συνέχεια, τα κυτταρικά λύματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ακολούθησε πρωτεϊνική μεταφορά σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Millipore). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της μεταφοράς, οι μεμβράνες βάφτηκαν με τη χρωστική Ponceau S (Serva) για 30 δευτερόλεπτα και πλύθηκαν με ddH₂O. Μετά τον έλεγχο, οι μεμβράνες επώαστηκαν για μια ώρα σε διάλυμα 5 % γάλακτος σε διάλυμα Western (0.1 % Tween 20 σε 1 % PBS) για τη δέσμευση των μη ειδικών αντιγονικών θέσεων και ακολούθως, επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα σε διάλυμα 2 % ζελατίνης ή διάλυμα 5 % γάλακτος σε διάλυμα Western, είτε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, είτε ολονυκτίως στους 4°C. Ακολούθως, οι μεμβράνες πλύθηκαν 4 φορές για 5 λεπτά με διάλυμα Western και ακολούθησε επώαση με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησαν 4 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα Western, επώαση για 1 λεπτό με αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) ή για 5 λεπτά με ECL της εταιρίας Roche (Roche Diagnostics GmbH, Germany) και εμφάνιση του σήματος σε σκοτεινό θάλαμο.

2.6 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυτταρικών λυμάτων χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο BCA (Bikinchromic Acid, PIERCE), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Εν συντομία, σε 1 ml αντιδραστήριου BCA, προστέθηκε 10 % διάλυμα κυτταρικού λύματος σε ddH₂O. Το μείγμα αντίδρασης επωάστηκε για 30 λεπτά στους 60⁰C και φωτομετρήθηκε σε μήκος κύματος 562 nm. Για τον υπολογισμό της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις διαλύματος αλβουμίνης (Bovine Serum Albumin, BSA).

2.7 Δοκιμασίες χημικών αναστολέων

2.7.1 Δοκιμασίες άμεσης δράσης των χημικών αναστολέων

Όλα τα πειράματα με τους χημικούς αναστολείς τα οποία περιελάμβαναν την ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα HUVE τα οποία είχαν υποστεί αρχικά στέρηση ορού για δύο ώρες. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με DMSO (Dimethyl sulfoxide) ή με τους χημικούς αναστολείς dynasore ή/και TAPI-1, για 30 λεπτά, και ενεργοποιήθηκαν με VEGF για διάφορα χρονικά διαστήματα (παρουσία των αναστολέων). Τα κύτταρα λύθηκαν και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Το DMSO αποτελεί τον διαλύτη των χημικών αναστολέων και συνεπώς, τα κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε επώαση με DMSO αντιπροσωπεύουν τα κύτταρα μάρτυρες. Όλες οι επωάσεις πραγματοποιήθηκαν σε θρεπτικό μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, απουσία ορού.

Στα πειράματα που δεν πραγματοποιήθηκε ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF, τα κύτταρα επωάστηκαν με DMSO ή με τους χημικούς αναστολείς dynasore ή dynasore + TAPI-1, για διάφορα χρονικά διαστήματα, λύθηκαν και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Στα πειράματα αναστολής της λυσοσωματικής ή πρωτεασωματικής αποικοδόμησης, πριν από την προσθήκη του αναστολέα dynasore, τα κύτταρα προ-επωάστηκαν με τον αναστολέα των λυσοσωμάτων chloroquine ή τον αναστολέα των πρωτεασωμάτων lactacystin, για 2 ώρες.

Στα πειράματα ανάλυσης του ρόλου της πυκνότητας καλλιέργειας των ενδοθηλιακών κυττάρων στη σχάση του VEGFR2, κύτταρα HUVE επιστρώθηκαν στα τρυβλία σε πυκνότητες 5×10^4 και 2×10^4 κύτταρα/cm² ώστε να αποκτήσουμε πυκνές και αραιές κυτταρικές καλλιέργειες, αντίστοιχα. Μετά από 24 ώρες, τα κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με τον χημικό αναστολέα dynasore, λύθηκαν και ακολούθησε ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.7.2 Δοκιμασίες αντιστρεπτής δράσης των χημικών αναστολέων

Προκειμένου να ελέγξουμε την αντιστρεπτή δράση των χημικών αναστολέων dynasore και EIPA, εφαρμόσαμε την ακόλουθη πειραματική διάταξη: κύτταρα HUVE, τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού για 2 ώρες, επώαστηκαν με τον αναστολέα dynasore ή τον αναστολέα EIPA, για 30 λεπτά. Στο τέλος της επώασης, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με περίσσεια Ca^{2+}/Mg^{2+} HBSS και το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με μέσο M199, απουσία ορού. 10 λεπτά μετά την αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF, λύθηκαν ανά χρονικά διαστήματα των 10 λεπτών (μέχρι 30 λεπτά) και ακολούθησε ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ERK1/2 και p-ERK1/2. Κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με DMSO (κύτταρα μάρτυρες), επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν παράλληλα με τα κύτταρα που είχαν επωαστεί με τους αναστολείς. Για να ελέγξουμε την λειτουργικότητα των αναστολέων υπό τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες, κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τον αναστολέα dynasore ή EIPA ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για 10 λεπτά, παρουσία των αναστολέων. Τα κύτταρα λύθηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω. Τέλος, για να ελέγξουμε ότι η ενεργοποίηση της ERK1/2 (μετά την απομάκρυνση των αναστολέων) είναι ειδικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF, κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τους αναστολείς dynasore ή EIPA λύθηκαν ανά χρονικά διαστήματα των 10 λεπτών, μετά την απομάκρυνση των αναστολέων και απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF, και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν ταυτόχρονα με τα υπόλοιπα δείγματα.

Για να διερευνήσουμε τη σημασία της σχάσης του VEGFR2 στη μεταγωγή του σήματος του υποδοχέα, κύτταρα HUVE επώαστηκαν για 2 ώρες με τον

αναστολέα dynasore ή τους αναστολείς dynasore + TAPI-1, πλύθηκαν 3 φορές με περίσσεια PBS και το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με μέσο M199, απουσία ορού. 10 λεπτά μετά την αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF για διάφορα χρονικά διαστήματα, λύθηκαν και ακολούθησε ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του VEGFR2 (Cell Signaling) και της p-ERK1/2.

2.7.3 Πείραμα απεμπλοκής

Φάση I: Κύτταρα HUVE στερήθηκαν ορού για 2 ώρες και στη συνέχεια επώαστηκαν με DMSO ή με τους αναστολείς dynasore, EIPA ή dynasore + EIPA, για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF για 10 λεπτά και λύθηκαν ή πλύθηκαν 2 φορές με όξινο μέσο M199, pH 2.0, ακολούθησαν 3 πλύσεις με περίσσεια $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ HBSS και το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με μέσο M199, απουσία ορού. **Φάση II:** 10 και 20 λεπτά μετά την αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα λύθηκαν και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ERK1/2 και p-ERK1/2.

2.8 Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε κατάλληλα για μικροσκοπία πλαστικά πιάτα επιφάνειας 35-mm (Ibidi) ή σε υάλινες καλυπτρίδες (επιστρωμένα/ες με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I) και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν στις διάφορες συνθήκες, ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Μετά το πέρας της επεξεργασίας, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης (PFA) 3.7% σε PBS, για 15-20 λεπτά και το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε με διάλυμα 50 mM NH_4Cl σε PBS, για 30 λεπτά. Για την ανίχνευση ενδοκυτταρικού σήματος, τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα 0.1% Triton σε PBS για 4 λεπτά, προκειμένου να επιτευχθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης για την διείσδυση των αντισωμάτων. Ακολούθως, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και επώαστηκαν με διάλυμα 10 % FBS σε PBS για 20 λεπτά, προκειμένου να δεσμευθούν οι μη ειδικές

αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση των κυττάρων με διάλυμα πρωτογενών αντισωμάτων (10 % FCS σε PBS), για 1 ώρα, ακολούθησαν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με PBS και τα κύτταρα επώαστηκαν με διάλυμα δευτερογενών αντισωμάτων συζευγμένων με φθοριοχρώματα. Τέλος, τα κύτταρα στα πιάτα μικροσκοπίας εμβαπτίστηκαν σε PBS ενώ οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους πλάκες με το αντιδραστήριο τοποθέτησης AntiFade Gold (Invitrogen). Ακολούθως, τα δείγματα παρατηρήθηκαν στο συνενστιακό μικροσκόπιο (confocal) ή στο μικροσκόπιο TIRF (Total Internal Fluorescence).

2.9 Συνενστιακή μικροσκοπία και μικροσκοπία TIRF

Οι παρατηρήσεις των δειγμάτων μικροσκοπίας πραγματοποιήθηκαν σε συνενστιακό μικροσκόπιο SP1 (Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Leica TCS ή σε συνενστιακό μικροσκόπιο Leica TCS SP5 II (Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας - Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Πανεπιστημιούπολη Ιωαννίνων) εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/SS-561/HeNe και λογισμικό Las AF Lite. Η παρατήρηση του επιφανειακού VEGFR2 σε ζωντανά κύτταρα HUVE πραγματοποιήθηκε μέσω μικροσκοπίας TIRF (Total Internal Fluorescence) σε διάταξη Leica AM TIRF MC εξοπλισμένη με μικροσκόπιο DMI6000 B, χρησιμοποιώντας φακό Leica 100X HCX PL APO 1.4 NA.

2.10 Δοκιμασίες μικροσκοπίας

2.10.1 Δοκιμασίες ενδοκυττάρωσης

Προκειμένου να μελετήσουμε την κυτταρική κυκλοφορία του ποσοστού του VEGFR2 που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, κύτταρα HUVE στερήθηκαν ορού για 2 ώρες, μεταφέρθηκαν σε ψυχρό θάλαμο 4°C και το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με ψυχρό μέσο M199 + 1% BSA + 20 mmol/L HEPES, για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα

επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (Abcam, 10 µg/ml), για 1 ώρα.

Στην περίπτωση των πειραμάτων όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με περίσσεια M199 + 1% BSA + 20 mmol/L HEPES, επώαστηκαν με DMSO ή με τους κατάλληλους ανά συνθήκη αναστολείς (dynasore, EIPA, TAPI-1) και μεταφέρθηκαν στους 37°C. Ακολούθως, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF παρουσία τρανσφερίνης συζευγμένης με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη ή δεξτράνης μοριακού βάρους 70.000 συζευγμένη με τη φθορίζουσα χρωστική Texas-Red. Μετά το πέρας της ενεργοποίησης, τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με όξινο μέσο M199, pH 2.0, ακολούθησαν 3 πλύσεις με περίσσεια Ca^{2+}/Mg^{2+} HBSS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν για μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού. Αντίστοιχη πειραματική πορεία ακολουθήθηκε και για τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με siRNAs. Όλες οι επώσεις πραγματοποιήθηκαν σε μέσο M199 + 1% BSA + 20 mmol/L HEPES.

Στην περίπτωση των πειραμάτων όπου πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέσω μικροσκοπίας TIRF, μετά το στάδιο της επώασης των κυττάρων με τα πρωτογενή αντισώματα έναντι του VEGFR2, τα κύτταρα επώαστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα (1:200), για 1 ώρα στους 4°C. Μετά από τρεις πλύσεις με περίσσεια Ca^{2+}/Mg^{2+} HBSS, τα κύτταρα επώαστηκαν με DMSO ή με τον αναστολέα dynasore σε διάλυμα μικροσκοπίας, για 30 λεπτά, και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο θερμοκρασίας 37°C του μικροσκοπίου TIRF, όπου και αναλύθηκαν. Στην περίπτωση της διαμόλυνσης των κυττάρων HUVE με τον πλασμιδιακό φορέα έκφρασης του υβριδικού VEGFR2-mCherry, 48 ώρες μετά τη διαμόλυνση των κυττάρων, το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με διάλυμα μικροσκοπίας και τα κύτταρα αναλύθηκαν με μικροσκοπία TIRF. Κατά την διάρκεια της ανάλυσης, ο αναστολέας dynasore και ο VEGF προστέθηκαν διαδοχικά.

2.10.2 Δοκιμασίες ανακύκλισης

Για τα πειράματα ανακύκλισης του υπό κατάσταση ηρεμίας VEGFR2 (απουσία VEGF) κύτταρα HUVE επώαστηκαν με DMSO ή με τον αναστολέα

dynasore, για 30 λεπτά, και ακολούθησε επώαση με πρωτογενή αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (Abcam, 10 µg/ml), για 30 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα πλύθηκαν 2 φορές με όξινο μέσο M199, pH 2.0, ακολούθησαν 3 πλύσεις με περίσσεια $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ HBSS και τα κύτταρα επωάστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα (1:200), για 30 λεπτά στους 37°C. Ακολούθησαν 2 πλύσεις με όξινο μέσο M199, pH 2.0, 3 πλύσεις με περίσσεια $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ HBSS και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν για μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού.

Στα πειράματα της επαγόμενης από τον VEGF ανακύκλισης του VEGFR2, τα κύτταρα αναλύθηκαν μέσω μικροσκοπίας TIRF. Κύτταρα HUVE σημάνθηκαν με πρωτογενή αντισώματα για τον επιφανειακό VEGFR2, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.10.1. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάστηκαν με τους χημικούς αναστολείς dynasore ή dynasore + EIPA, για 30 λεπτά, μεταφέρθηκαν στους 37°C και ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για 5 λεπτά. Μετά από 2 πλύσεις με όξινο μέσο M199, pH 2.0, και 3 πλύσεις με περίσσεια $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ HBSS, το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με μέσο M199, για 5 λεπτά, και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και επεξεργάστηκαν για μικροσκοπία έμμεσου ανοσοφθορισμού, χωρίς να πραγματοποιηθεί διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων.

2.11 Δοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) για τον επιφανειακό VEGFR2

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 96 φρεατίων και επωάστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα με DMSO ή με τους κατάλληλους ανά περίπτωση χημικούς αναστολείς (dynasore, EIPA, TAPI-1, filipin, methyl-β-cyclodextrin, cytochalasin D) σε μέσο κυτταρικής καλλιέργειας M199, απουσία ορού, παρουσία ή απουσία VEGF. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με περίσσεια PBS, μονιμοποιήθηκαν με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3.7% σε PBS, για 15-20 λεπτά, και το μέσο μονιμοποίησης εξουδετερώθηκε με διάλυμα 50 mM NH_4Cl σε PBS. Οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις δεσμεύτηκαν μέσω επώασης των κυττάρων με διάλυμα 1% BSA σε PBS, για 1 ώρα, και ακολούθησε επώαση με πρωτογενή αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (R&D Systems, 1.5 µg/ml), για 2 ώρες στους 37°C, υπό ήπια ανατάραξη. Τα κύτταρα

πλύθηκαν 5 φορές με διάλυμα 1% BSA σε PBS και επωάστηκαν με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με HRP, για 1 ώρα. Ακολούθως, τα κύτταρα πλύθηκαν 5 φορές με διάλυμα 1% BSA σε PBS και η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη 250 μl διαλύματος υποστρώματος (0,51 % w/v κιτρικό οξύ, 0,73 % w/v Na₂HPO₄, 0,04 % w/v o-phenylenediamine και 0,04 % v/v διαλύματος 30 % H₂O₂). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες σκότους και τερματίστηκε με προσθήκη 50 μl διαλύματος θειικού οξέος 2N. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν σε μήκος κύματος 492 nm. Στην περίπτωση των πειραμάτων όπου πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση των κυττάρων με siRNAs, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πιάτα 24 φρεατίων. 48 ώρες μετά την διαμόλυνση, τα κύτταρα τρυψινοποιήθηκαν και επιστρώθηκαν σε πιάτα 96 φρεατίων ώστε να λάβουμε πυκνές καλλιέργειες. Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν μετά από 24 ώρες, όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.12 Επώαση των κυτταρικών λυμάτων με τα ένζυμα EndoH και PNGase F

Κύτταρα HUVE επωάστηκαν για 2 ώρες με DMSO ή με τον αναστολέα dynasore σε μέσο M199, απουσία ορού, και λύθηκαν. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης των κυτταρικών λυμάτων μετρήθηκε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.6 και 15 μg από τα δείγματα επωάστηκαν με τα ένζυμα EndoH ή PNGase F, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του VEGFR2 (Cell Signaling).

2.13 Μέτρηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου

Κύτταρα HUVE στερήθηκαν ορού για 2 ώρες και επωάστηκαν για 30 λεπτά στους 37°C με το δείκτη του ενδοκυτταρικού ασβεστίου Fluo-4-AM, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, παρουσία DMSO ή παρουσία του αναστολέα dynasore ή του αναστολέα EIPA. Η επώαση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε μέσο M199, απουσία ορού. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με περίσσεια Ca²⁺/Mg²⁺ HBSS, το θρεπτικό υλικό αντικαταστάθηκε με διάλυμα μικροσκοπίας (παρουσία των αναστολέων) και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν

σε θάλαμο 37°C του συνεστιακού μικροσκοπίου. Τα βασικά επίπεδα φθορισμού του ενδοκυτταρικού ασβεστίου καταγράφηκαν για 3-5 λεπτά, μέσω διέγερσης των κυττάρων στα 480nm, και ακολούθησε ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF. Οι αλλαγές στα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου καταγράφηκαν για 15 λεπτά (λήψη εικόνων ανά 1.3 sec) και οι εικόνες μικροσκοπίας αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού ImageJ για την κατασκευή του γραφήματος.

2.14 Ανίχνευση του εκκρινόμενου VEGFR2

Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία επιφάνειας 100-mm και επωάστηκαν για 2 ώρες με DMSO ή με τους αναστολείς dynasore ή dynasore + TAPI-1, σε μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, απουσία ορού. Μετά το πέρας της επώασης, τα θρεπτικά υλικά συλλέχθηκαν και τα κύτταρα λύθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του VEGFR2 (Cell Signaling). Στα θρεπτικά υλικά που συλλέχθηκαν προστέθηκε 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L EGTA και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών (Roche Complete) και φυγοκεντρήθηκαν στα 6.000 g, για 10 λεπτά στους 4°C. Τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν, συμπυκνώθηκαν με τα φίλτρα συμπύκνωσης YM-3 centriplus και YM-3 centricon (Millipore), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (R&D Systems).

2.15 Δοκιμασίες ανοσοκατακρύμησης

2.15.1 Ανοσοκατακρύμηση του εκκρινόμενου VEGFR2

Για να διερευνήσουμε την αλληλεπίδραση του εκκρινόμενου VEGFR2 με τον VEGF, κύτταρα HUVE τα οποία καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 100-mm (συνολικά 8 τρυβλία) επωάστηκαν με μέσο M199 (απουσία ορού), για 3 ώρες, και τα θρεπτικά υλικά συλλέχθηκαν, αναμείχθηκαν και συμπυκνώθηκαν, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.14 (τελικός όγκος 0.6 ml). Τα συμπυκνωμένα θρεπτικά υλικά επωάστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης (protein G-agarose beads, Pharmacia

Biotech), για 1 ώρα στους 4⁰C, και τα υπερκείμενα συλλέχθηκαν (μετά από 3 φυγοκεντρήσεις, 1000 rpm, 4⁰C) και χωρίστηκαν σε δύο δείγματα ίσου όγκου (0.3 ml ανά δείγμα). Το ένα δείγμα επωάστηκε με 10 µg αντισώματος (δεσμευμένο σε σφαιρίδια αγαρόζης) έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (R&D Systems), για 4 ώρες, ενώ το άλλο δείγμα επωάστηκε παράλληλα με κενά σφαιρίδια αγαρόζης. Ακολούθως, τα σφαιρίδια απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση και τα δείγματα επωάστηκαν με 125 ng/ml VEGF, για 4 ώρες. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάστηκαν με 10 µg αντισώματος έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (R&D Systems) ολονυκτίως στους 4⁰C, υπό ανάδευση, και ακολούθησε επώαση με σφαιρίδια αγαρόζης, για 4 ώρες. Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση, πλύθηκαν 3 φορές με PBS και πραγματοποιήθηκε έκλυση των πρωτεϊνών, μετά από βρασμό των σφαιριδίων σε διάλυμα Laemmli (100⁰C για 10 λεπτά). Τέλος, οι πρωτεΐνες αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (R&D Systems) και με αντισώματα έναντι του VEGF.

2.15.2 Ανοσοκατακρύμηση του φωσφορυλιωμένου VEGFR2

Προκειμένου να ελέγξουμε την επίδραση της αναστολής της ενδοκυττάρωσης στην φωσφορυλίωση του VEGFR2, κύτταρα HUVE στερήθηκαν ορού για 4 ώρες και επωάστηκαν για 30 λεπτά με DMSO ή με τους αναστολείς dynasore ή EIPA ή dynasore + EIPA, σε θρεπτικό μέσο M199, απουσία ορού. Τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για 5 λεπτά με VEGF, μεταφέρθηκαν σε ψυχρό θάλαμο 4⁰C, πλύθηκαν 3 φορές με ψυχρό διάλυμα Ca²⁺/Mg²⁺ HBSS (υποκατεστημένο με 300 µM vanadate, 600 µmol/L H₂O₂ και 1 mmol/L phenylmethanesulfonyl fluoride) και λύθηκαν με ψυχρό διάλυμα λύσης (50 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 300 µmol/L vanadate, 600 µmol/L H₂O₂ και μείγμα αναστολέων των πρωτεασών). Τα κυτταρικά λύματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16.000 g, για 30 λεπτά, και τα υπερκείμενα επωάστηκαν με σφαιρίδια αγαρόζης (protein G-agarose beads, Pharmacia Biotech), για 1 ώρα στους 4⁰C. Τα σφαιρίδια απομακρύνθηκαν με φυγοκέντρηση και τα υπερκείμενα επωάστηκαν με 10 µg αντισώματος έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnology)

ολονυκτίως στους 4⁰C, υπό ανάδευση. Τα ανοσοσυμπλέγματα καταβυθίστηκαν μετά από επώαση των δειγμάτων με σφαιρίδια αγαρόζης, για 4 ώρες. Τα σφαιρίδια συλλέχτηκαν με φυγοκέντρηση και ίσοι όγκοι από τις εκλούμενες πρωτεΐνες (μετά από βρασμό των σφαιριδίων σε διάλυμα Laemmli για 10 λεπτά) αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι την φωσφοτυροσίνης. Η κανονικοποίηση των επιπέδων του φωσφορυλιωμένου VEGFR2 πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης με ανοσοαποτύπωση κατά Western ίσων όγκων δειγμάτων των ανοσοκαταβυθιζόμενων πρωτεϊνών, χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του VEGFR2 (Cell Signaling).

2.16 Δοκιμασίες *in vivo* αγγειογένεσης

Τα πειράματα *in vivo* αγγειογένεσης σχεδιάστηκαν από το εργαστήριό μας σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα της M. Ziche (Department of Life Sciences, University of Siena, Italy) και εκτελέστηκαν από την L. Morbidelli, στο Πανεπιστήμιο της Σιένα, στην Ιταλία.

2.16.1 Δοκιμασίες αγγειογένεσης σε ενθέματα Matrigel σε ποντίκια

Για την παρασκευή των ενθεμάτων, ο VEGF, παρουσία του αναστολέα TAPI-1 ή/και των αναστολέων dynasore ή EIPA, διαλύθηκε σε Matrigel, στον πάγο. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων ήταν 500 ng/ένθεμα VEGF, 25 μmol/L TAPI-1, 50 μmol/L EIPA και 100 μmol/L dynasore. Η έγχυση των ενθεμάτων (0.4 ml/ένθεμα) πραγματοποιήθηκε υποδόρια και κατά μήκος της μέσης ραχιαίας περιοχής, σε ποντίκια C57/B6J (συνολικά 30 ποντίκια ηλικίας 12 εβδομάδων). Μετά από 7 ημέρες, τα ζώα θανατώθηκαν ώστε να ανακτηθούν τα ενθέματα. Τα ενθέματα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml αντιδραστηρίου Drabkin (Sigma), για 18 ώρες σε πάγο, και η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης προσδιορίστηκε βάση πρότυπης καμπύλης συγκέντρωσης (Sigma), μετά από μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων στα 540 nm.

2.16.2 Δοκιμασίες αγγειογένεσης στον οφθαλμό κουνελιών

Η επαγωγή ή αναστολή της αγγειογένεσης μελετήθηκε στον οφθαλμό αρσενικών κουνελιών από τη Νέα Ζηλανδία (n=8, Charles River Laboratories). Τα πειράματα εκτελέστηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Επιτροπής για τη φροντίδα και το χειρισμό των ζώων (Directive 2010/63/EU) και της Εθνικής Επιτροπής Βιοηθικής του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας. Τα ζώα αναισθητοποιήθηκαν μέσω έγχυσης xilazine 2% (0.5 ml/ζώο) και tiletamine/zolazepam (10 mg/kg). Το βάθος της αναισθησίας ελέγχτηκε μέσω του παλμού της αρτηριακής πίεσης. Ο κάθε οφθαλμός εξορύχτηκε με την βοήθεια οδοντικών ελαστικών φύλλων απομόνωσης και πριν από την εγχείρηση εφαρμόστηκε τοπική αναισθησία (0.4% benoxinate). Η διαδικασία εισαγωγής του εμφυτεύματος ξεκίνησε με μία κάθετη τομή στην ενδοστρωματική περιοχή του οφθαλμού. Η θέση εισαγωγής του εμφυτεύματος δημιουργήθηκε στο κάτω μέρος του κερατοειδούς με τη βοήθεια εύκαμπτης μεταλλικής σπάτουλας, πάχους 1.5 mm. Τα εμφυτεύματα εισήχθησαν σε απόσταση 2 mm από τον σκληρό χιτώνα για την αποφυγή μη ειδικής αγγειογένεσης εξαιτίας της αυξημένης μηχανικής πίεσης, λόγω παρουσίας του εμφυτεύματος, και για τη βαθμιαία διάχυση των ουσιών προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα του χιτώνα. Για τον έλεγχο τη επίδρασης των αναστολέων dynasore και EIPA στην αγγειογένεση στον οφθαλμό, παράλληλα με τα εμφυτεύματα που περιείχαν τους αναστολείς, εισήχθησαν εμφυτεύματα με VEGF (200 ng/εμφύτευμα) σε γειτονικές θέσεις, ώστε η απελευθέρωση του VEGF και των αναστολέων να πραγματοποιείται από διαφορετικά σημεία. Μετά την εισαγωγή των εμφυτευμάτων, εικόνες των οφθαλμών λαμβάνονταν ημερησίως με τη βοήθεια στερεοσκοπίου.

2.17 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση

Η ποσοτικοποίηση των αναστοτωπύσεων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ImageJ (NIH) και το λογισμικό Quantity One (Biorad). Στα *in vivo* πειράματα, το σκορ αγγειογένεσης (αριθμός νέο-σχηματιζόμενων αγγείων/mm²) υπολογίστηκε μέσω του λογισμικού ImageJ, μετά από ανάλυση των στερεοσκοπικών εικόνων. Τα γραφήματα απεικονίζουν τις μέσες τιμές ± τη μέση τυπική απόκλιση (S.E.M.) ή την τυπική απόκλιση (S.D.) των τιμών και

υπολογίστηκαν μετά από τουλάχιστον τρεις επαναλήψεις των ανά συνθήκη πειραματικών διατάξεων. Οι στατιστικές διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω στατιστικής ανάλυσης student t-test (για την ανάλυση δύο ομάδων) ή μέσω ανάλυσης ANOVA (για την ανάλυση τριών ή περισσότερων ομάδων) ακολουθούμενη από ανάλυση Dunnett's (post hoc test).

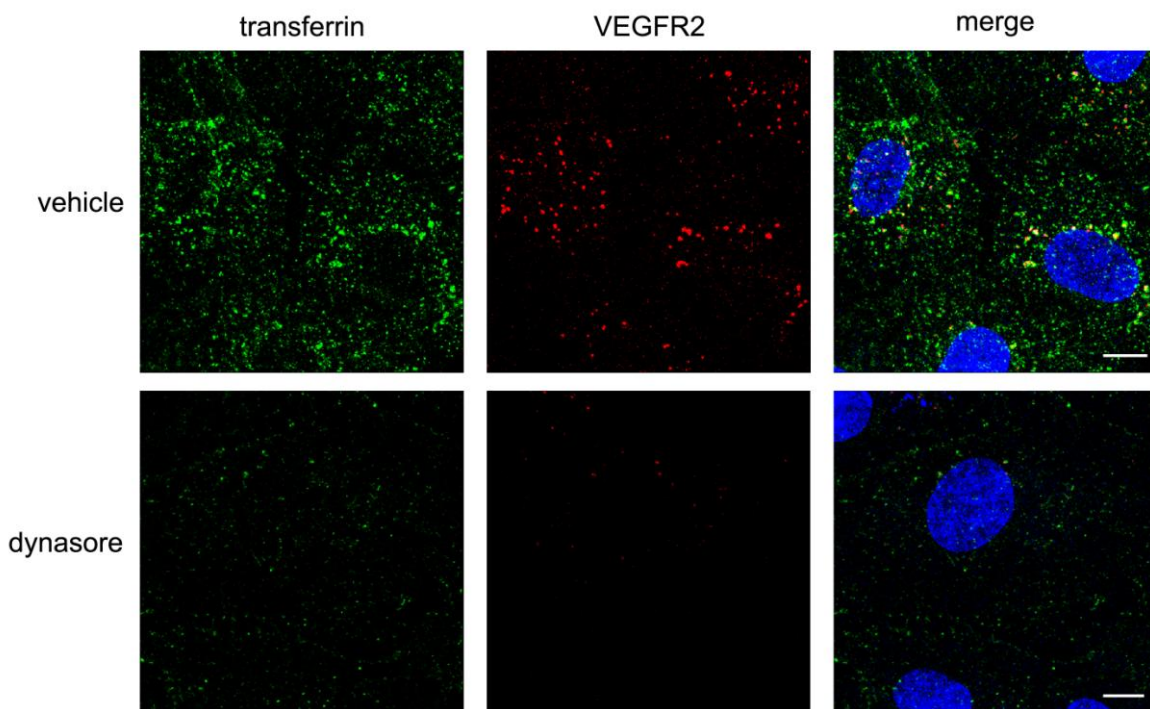
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάλυση των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2

3.1.1 Απουσία του VEGF, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται μεταξύ των ενδοσωμάτων και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης μέσω του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης

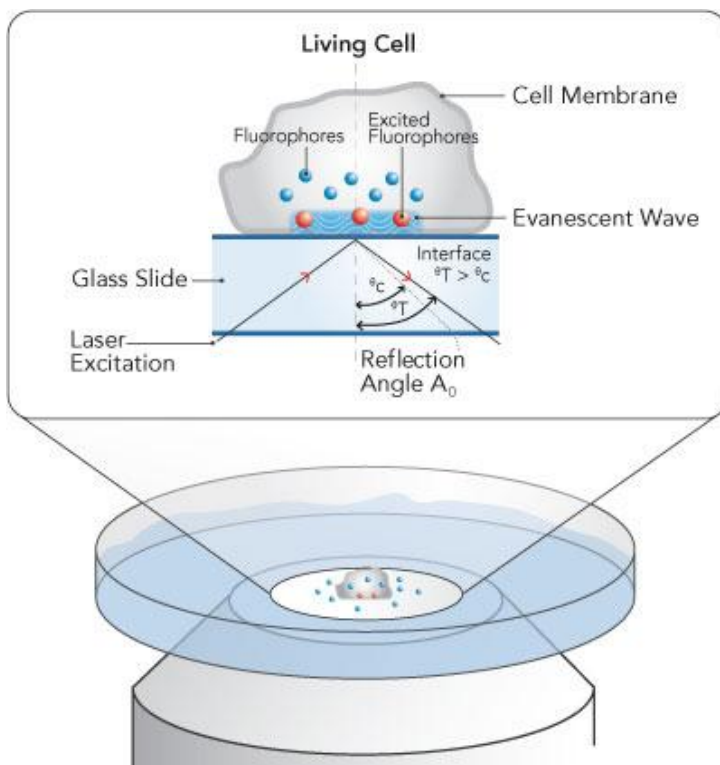
Προκειμένου να αναλύσουμε συστηματικά τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, μελετήσαμε την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα τόσο υπό κατάσταση ηρεμίας (απουσία VEGF) όσο και μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF. Υπό κατάσταση ηρεμίας, ο VEGFR2 εντοπίζεται τόσο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη όσο και στα ενδοσώματα. Θέλοντας να μελετήσουμε μόνο το ποσοστό του υποδοχέα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που εισέρχεται στα ενδοσώματα, εφαρμόσαμε μια δοκιμασία σήμανσης του υποδοχέα μέσω αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το εξωκυτταρικό τμήμα του VEGFR2. Κατά τη δοκιμασία σήμανσης, ο VEGFR2 της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ζωντανών ενδοθηλιακών κυττάρων σημαίνεται με τα κατάλληλα πρωτογενή αντισώματα και ακολούθως, ο υποδοχέας ενδοκυτταρώνεται σε σύμπλεγμα με τα αντισώματα. Στο τέλος της δοκιμασίας και πριν τη μονιμοποίηση των κυττάρων, τα κύτταρα πλένονται με ένα όξινο διάλυμα (pH 2.0) προκειμένου να αποδεσμευθούν τα αντισώματα που είναι δεσμευμένα στην επιφάνεια των κυττάρων (σε σύμπλεγμα με τον VEGFR2) και ο ενδοκυτταρικός υποδοχέας αποκαλύπτεται με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Κατά συνέπεια, το σήμα που ανιχνεύεται στο τέλος της δοκιμασίας αντιπροσωπεύει μόνο το σύνολο του VEGFR2 που έχει ενδοκυτταρωθεί από τη μεμβράνη. Εφαρμόζοντας την παραπάνω δοκιμασία και χρησιμοποιώντας συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού παρατηρήσαμε ότι η απουσία του VEGF δεν εμποδίζει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα (Εικόνα 3.1. vehicle). Για να διερευνήσουμε το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης μέσω του οποίου ο μη ενεργοποιημένος VEGFR2 εισέρχεται στο κύτταρο, αρχικά εστιαστήκαμε στο εξαρτώμενο από τη δυναμίνη μονοπάτι εισόδου το οποίο αντιπροσωπεύει ένα από τα πιο καλά μελετημένα

μονοπάτια ενδοκυττάρωσης των υποδοχέων^{101,102}. Σε αυτό το σημείο χρησιμοποιήσαμε τον χημικό αναστολέα της δυναμίνης, dynasore¹⁰³. Ο λόγος για τον οποίο χρησιμοποιήσαμε έναν αναστολέα ο οποίος δρα γρήγορα, έναντι μεθόδων αποσιώπησης της δυναμίνης ή υπερέκφρασης ανενεργών μεταλλαγμάτων της πρωτεΐνης, υπήρξε η αποφυγή μη ειδικών πρωτεϊνικών δράσεων ή η ενεργοποίηση συμπληρωματικών μηχανισμών ενδοκυττάρωσης λόγω προσαρμογής των κυττάρων εξαιτίας της παρατεταμένης αναστολής του μονοπατιού της δυναμίνης¹⁰⁴. Η αναστολή της δυναμίνης μέσω του αναστολέα dynasore οδήγησε σε σχεδόν πλήρη εξαφάνιση του ενδοκυτταρικού σήματος του υποδοχέα υποδηλώνοντας ότι, απουσία του VEGF, ο VEGFR2 ενδοκυτταρώνεται κατά αποκλειστικότητα από το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από τη δυναμίνη (Εικόνα 3.1, dynasore). Ως μάρτυρας της αποδοτικής αναστολής της δυναμίνης χρησιμοποιήθηκε ο υποδοχέας της τρανσφερίνης, μια πρωτεΐνη η οποία ενδοκυτταρώνεται αποκλειστικά από το μονοπάτι της δυναμίνης.



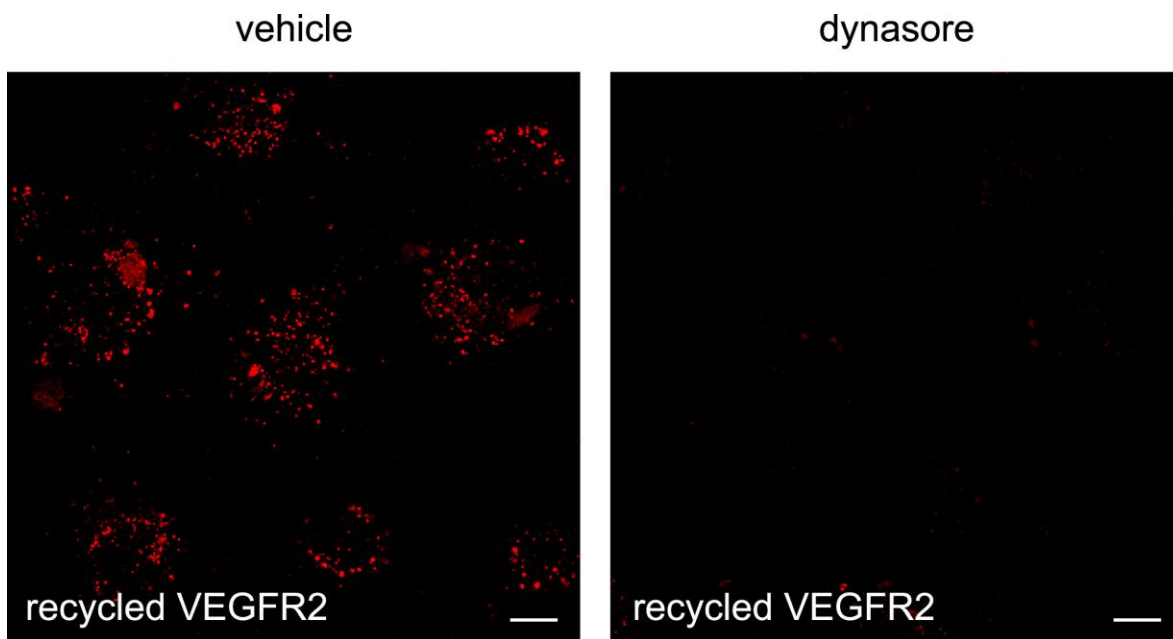
Εικόνα 3.1 : Ανάλυση της ενδοκυττάρωσης του ανενεργού VEGFR2 υπό την αναστολή του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης. Ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 στους 4°C, επώαστηκαν με DMSO (vehicle) ή τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore και μεταφέρθηκαν στους 37°C, για 15 λεπτά, παρουσία τρανσφερίνης συζευγμένης με ισοθιοκυανική φθορισείνη. Μετά το πέρας της επώασης στους 37°C, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, μονιμοποιήθηκαν και ο ενδοκυτταρικός VEGFR2 αποκαλύφθηκε με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Οι πυρήνες των κυττάρων εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm.

Προκειμένου να διευρύνουμε τη μελέτη μας σε σχέση με τον ρόλο της δυναμίνης στη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης του ανενεργού VEGFR2, εφαρμόσαμε μικροσκοπία TIRF (Total Internal Fluorescence Microscopy) σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν σημανθεί με αντισώματα έναντι του επιφανειακού VEGFR2. Σε αντίθεση με τη συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, η μικροσκοπία TIRF επιτρέπει την παρατήρηση γεγονότων στο επίπεδο της κυτοπλασματικής μεμβράνης (εικόνα 3.2). Μέσω της μικροσκοπίας TIRF παρατηρήσαμε ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ο υποδοχέας εμφανίζεται και εξαφανίζεται από τη μεμβράνη των κυττάρων, γεγονότα που υποδηλώνουν καταστάσεις ενδοκυττάρωσης και ανακύκλωσης του VEGFR2 (ταινία 1, vehicle). Απεναντίας, υπό συνθήκες αναστολής της δυναμίνης (παρουσία του αναστολέα dynasore) ο VEGFR2 παρέμεινε ακινητοποιημένος στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (ταινία 1, dynasore). Οι παρατηρήσεις αυτές, σε συνδυασμό με τα προηγούμενα αποτελέσματα της συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (βλέπε εικόνα 3.1) επιβεβαιώνουν ότι, απουσία του συνδέτη του, η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 διαμεσολαβείται μόνο από το μονοπάτι της δυναμίνης.



Εικόνα 3.2 : Γραφική απεικόνιση της μικροσκοπίας TIRF. Τα σημασμένα με φθοριοχρώματα κύτταρα διεγείρονται μέσω μιας υπό γωνία δέσμης laser. Η γωνία της δέσμης laser επιτρέπει τη διείσδυση της δέσμης σε μικρό κυτταρικό βάθος καθώς αυτή ανακλάται από το μέσο της διεπιφάνειας των κυττάρων και της αντικειμενοφόρου πλάκας. Συνεπώς, μόνο τα μόρια τα οποία εντοπίζονται κοντά στη διεπιφάνεια (δηλαδή πολύ κοντά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη) διεγείρονται από τη δέσμη laser. Η γωνία της δέσμης laser καθορίζει και το βάθος διείσδυσης άρα και το βάθος ανίχνευσης των μορίων στα κύτταρα (μεγάλη γωνία = μικρό κυτταρικό βάθος)

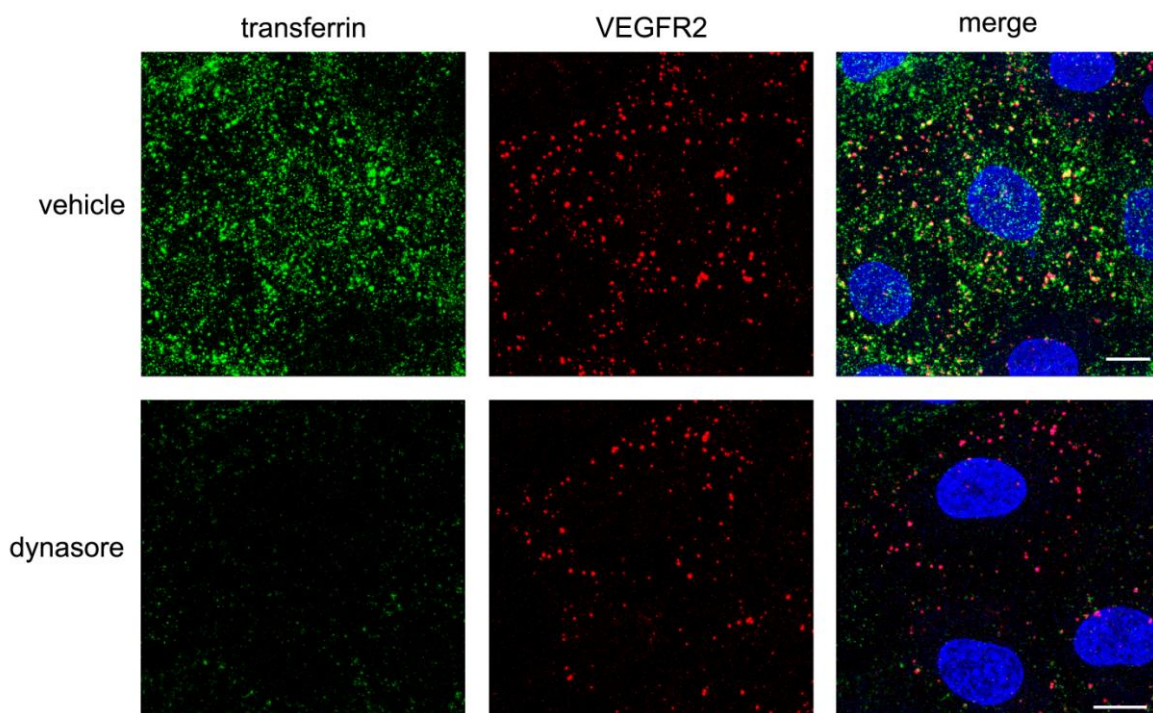
Εφόσον υπό κατάσταση ηρεμίας ο ανενεργός VEGFR2 ενδοκυτταρώνεται αποδοτικά, το ερώτημα που δημιουργείται είναι πώς τα επιφανειακά επίπεδα του υποδοχέα αναπληρώνονται έτσι ώστε, υπό την παρουσία του VEGF, να υπάρχει ένα ικανοποιητικό ποσοστό του VEGFR2 στη μεμβράνη για επαρκή ενεργοποίηση και κυτταρική σηματοδότηση. Λαμβάνοντας υπόψη μας τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας TIRF και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, θεωρήσαμε ότι ο VEGFR2 ανακυκλώνεται συνεχώς μεταξύ της μεμβράνης και των ενδοσωμάτων. Για να επιβεβαιώσουμε την παραπάνω υπόθεση εφαρμόσαμε μια δοκιμασία ανακύκλησης η οποία βασίζεται σε δύο κύκλους ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα. Κατά τη διάρκεια του πρώτου κύκλου, ο υποδοχέας ενδοκυτταρώνεται σε σύμπλεγμα με πρωτογενή αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής της πρωτεΐνης. Στο τέλος του κύκλου, τα κύτταρα πλένονται με ένα όξινο διάλυμα (pH 2.0) ώστε να αφαιρεθούν τα αντισώματα που είναι συνδεδεμένα στην επιφάνεια των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου, τα κύτταρα επωάζονται με δευτερογενή αντισώματα που φέρουν φθοριοχρώματα, ακολουθεί μια δεύτερη πλύση με όξινο διάλυμα και τα κύτταρα μονιμοποιούνται. Προκειμένου να ανιχνευθεί ενδοκυτταρικό σήμα θα πρέπει κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου το σύμπλεγμα υποδοχέα-πρωτογενούς αντισώματος (το οποίο έχει ενδοκυτταρωθεί στον πρώτο κύκλο) να επιστρέψει στη μεμβράνη, να σχηματίσει σύμπλεγμα με το δευτερογενές αντίσωμα και ακολούθως, να ενδοκυτταρωθεί για δεύτερη φορά ώστε να προστατευθεί από τη δεύτερη όξινη πλύση. Συνεπώς, το σήμα που ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει ενδοκυτταρικά μόρια του υποδοχέα που έχουν πραγματοποιήσει τουλάχιστον ένα πλήρες κύκλο ανακύκλησης. Εφαρμόζοντας την παραπάνω δοκιμασία παρατηρήσαμε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού ότι, ενώ στα κύτταρα μάρτυρες (vehicle) ανιχνεύθηκε ισχυρό ενδοκυτταρικό σήμα του υποδοχέα, η αναστολή της δυναμίνης (dynasore) οδήγησε σε σχεδόν πλήρη εξαφάνιση του ενδοκυτταρικού σήματος του VEGFR2 (εικόνα 3.3). Συμπερασματικά, τα μέχρι τώρα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως, απουσία του VEGF, ο VEGFR2 υφίσταται συνεχόμενους κύκλους ενδοκυττάρωσης και ανακύκλησης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης.



Εικόνα 3.3 : Δοκιμασία ανακύκλισης του VEGFR2 υπό την αναστολή του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης. Ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν με DMSO (vehicle) ή τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore στους 37⁰ C, για 30 λεπτά. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα επωάστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 (παρουσία DMSO ή dynasore), για 30 λεπτά. Εν συνεχεία, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, και ακολούθησε μια δεύτερη επώαση με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα, για 30 λεπτά. Ακολούθησε μια δεύτερη όξινη πλύση και τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού για την ανίχνευση ενδοκυτταρικού σήματος του VEGFR2. Οι συστάδες του σήματος αντιπροσωπεύουν ξεχωριστά κύτταρα. Και οι δύο εικόνες περιέχουν ίδιο αριθμό κυττάρων. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 µm.

3.1.2 Ο VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 μέσω ενός μονοπατιού ενδοκυττάρωσης το οποίο είναι ανεξάρτητο από το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από τη δυναμίνη

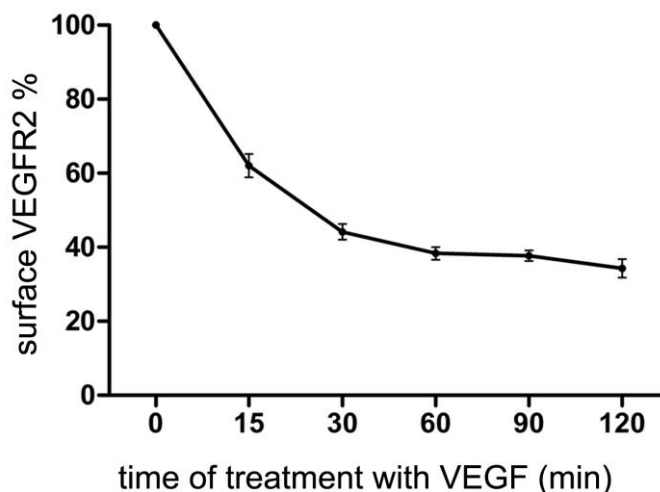
Καθώς ο ανενεργός VEGFR2 ενδοκυτταρώνεται κατά αποκλειστικότητα από το μονοπάτι που ελέγχεται από τη δυναμίνη, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον VEGF μεταβάλλει το πρότυπο ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα. Ενώ η αναστολή της δυναμίνης οδήγησε σε πλήρη αναστολή της ενδοκυττάρωσης του ανενεργού VEGFR2 (βλέπε εικόνα 3.1), η παρουσία του VEGF οδήγησε σε εμφάνιση ισχυρού ενδοκυτταρικού σήματος (εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4 : Ανάλυση της επαγόμενη από τον VEGF ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 υπό την αναστολή του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης. Ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 στους 4⁰C, επώαστηκαν με DMSO (vehicle) ή τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore και μεταφέρθηκαν στους 37⁰ C, για 15 λεπτά, παρουσία VEGF και τρανσφερίνης συζευγμένης με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη. Μετά το πέρας της επώασης στους 37⁰ C, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, μονιμοποιήθηκαν και ο ενδοκυτταρικός VEGFR2 αποκαλύφθηκε με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Οι πυρήνες των κυττάρων εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm.

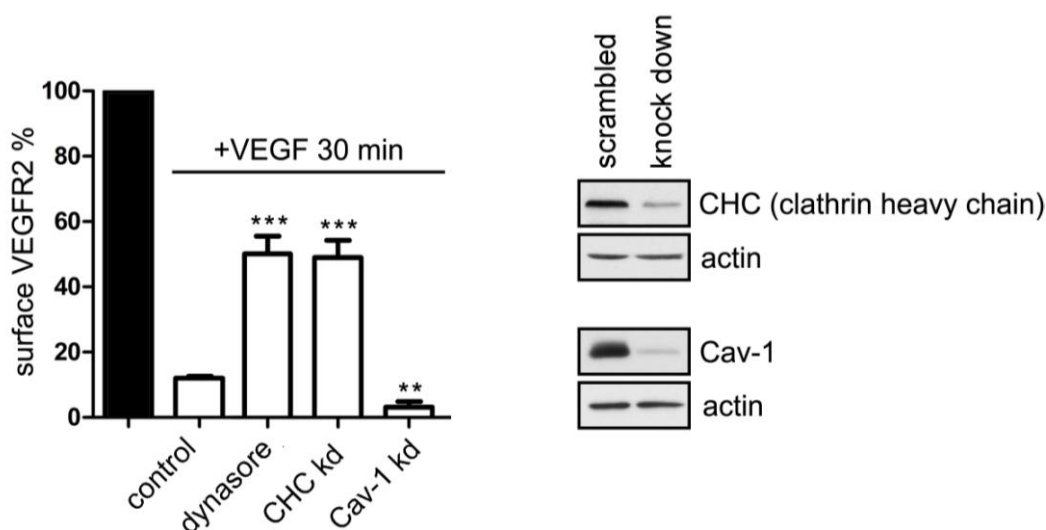
Το γεγονός ότι (α) το μονοπάτι της δυναμίνης ήταν μη ενεργό και (β) το ενδοκυτταρικό σήμα που ανιχνεύθηκε αντιπροσωπεύει μόρια του υποδοχέα τα οποία ενδοκυτταρώθηκαν από τη μεμβράνη (μέσω δοκιμασίας σήμανσης του επιφανειακού υποδοχέα) μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η ενεργοποίηση του VEGFR2 από τον VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από ένα μονοπάτι το οποίο είναι ανεξάρτητο της δυναμίνης. Η υπόθεση αυτή ισχυροποιήθηκε μέσω μικροσκοπίας TIRF σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία εξέφραζαν μια υβριδική πρωτεΐνη όπου ο VEGFR2 ήταν συζευγμένος με τη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry στο καρβόξυ-τελικό άκρο του υποδοχέα (ταινία 2). Ο λόγος για τον οποίο ακολουθήσαμε τη μέθοδο της υπερέκφρασης έναντι της

σήμανσης των κυττάρων με αντισώματα που αναγνωρίζουν το εξωκυτταρικό (άμινο-τελικό) τμήμα του υποδοχέα ήταν η αποφυγή πιθανών στερεοχημικών παρεμποδίσεων λόγω της σύνδεσης των αντισωμάτων στην περιοχή σύνδεσης του VEGF με τον VEGFR2. Παρατηρώντας τη ταινία μικροσκοπίας TIRF διαπιστώσαμε ότι, ενώ η αναστολή της δυναμίνης οδήγησε σε σταδιακή μείωση της κινητικότητας των μορίων του υποδοχέα και συσσώρευσή τους στη μεμβράνη, η παρουσία του VEGF οδήγησε σε μια γρήγορη εξαφάνιση του μεμβρανικού σήματος του VEGFR2, το οποίο υποδηλώνει γεγονότα ενδοκυττάρωσης. Θέλοντας να μελετήσουμε σε ποσοτικό επίπεδο την επίδραση της αναστολής της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στα επιφανειακά επίπεδα του υποδοχέα αλλά και να εντοπίσουμε πιθανά εναλλακτικά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, αναπτύξαμε μια δοκιμασία ELISA η οποία μας επιτρέπει να ανιχνεύσουμε ποσοτικά, τα επίπεδα του υποδοχέα που εντοπίζεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Εφαρμόζοντας τη δοκιμασία ELISA παρατηρήσαμε ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, η παρουσία του VEGF οδηγεί σε εξαφάνιση του επιφανειακού σήματος του υποδοχέα το οποίο αντιστοιχεί σε ένα ποσοστό της τάξεως του 60 % του ολικού VEGFR2 που εντοπίζεται στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων (εικόνα 3.5).

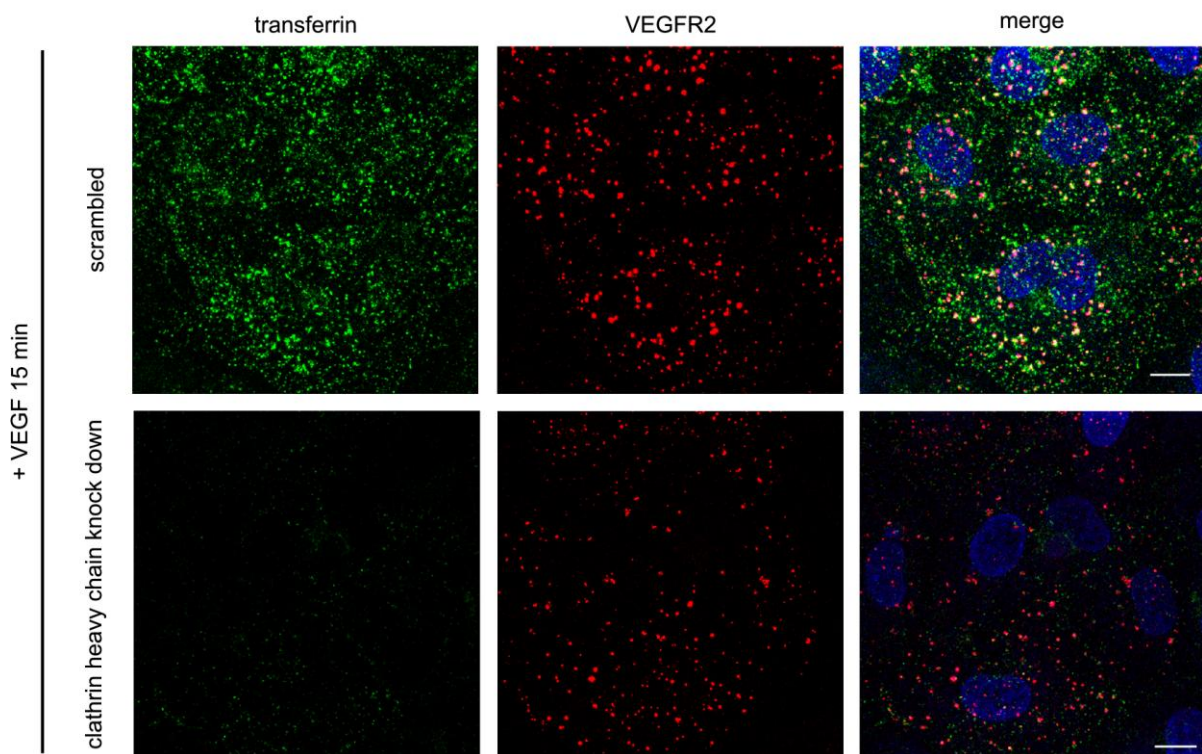


Εικόνα 3.5 : Δοκιμασία ELISA για τον επιφανειακό VEGFR2. Η παρουσία του VEGF επάγει την εξαφάνιση του επιφανειακού VEGFR2. Από το σύνολο των μορίων του υποδοχέα που εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ενδοκυττάρωνεται το 60 %. Η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 ολοκληρώνεται στα πρώτα 30 λεπτά της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF.

Όταν αναστείλαμε το μονοπάτι της δυναμίνης παρατηρήσαμε ότι η αναστολή της δυναμίνης δεν ήταν αρκετή ώστε να παρεμποδίσει την εξαφάνιση και κατά συνέπεια, την ενδοκυττάρωση του επιφανειακού VEGFR2 (εικόνα 3.6, dynasore). Η πρωτεΐνη δυναμίνη ελέγχει δύο κύρια μονοπάτια ενδοκυττάρωσης: το μονοπάτι που ελέγχεται από την πρωτεΐνη κλαθρίνη και το μονοπάτι που ελέγχεται από την πρωτεΐνη καβεολίνη-1¹⁰⁵. Αποσιώπηση της πρωτεΐνης κλαθρίνης μέσω χρήσης αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (siRNAs) δεν εμπόδισε την εμφάνιση ενδοκυτταρικού σήματος του VEGFR2 (συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, εικόνα 3.7) και οδήγησε σε ~50% αναστολή της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα (δοκιμασία ELISA, εικόνα 3.6), αποτελέσματα τα οποία είναι σε πλήρη συμφωνία με την αναστολή που παρατηρήθηκε κατά την αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης, μέσω του αναστολέα dynasore. Αντίθετα, η αποσιώπηση της πρωτεΐνης καβεολίνης-1 (siRNAs) δεν μπόρεσε να αναστείλει την επαγόμενη από τον VEGF ενδοκυττάρωση του VEGFR2 (δοκιμασία ELISA, εικόνα 3.6), αποδεικνύοντας πως ο υποδοχέας δεν ενδοκυτταρώνεται το μονοπάτι των caveolae.



Εικόνα 3.6 : Δοκιμασία ELISA για τον επιφανειακό VEGFR2 υπό την αναστολή της δυναμίνης ή την αποσιώπηση της κλαθρίνης ή της καβεολίνης-1. Ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore (30 λεπτά επώασης) ή στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της βαριάς αλυσίδας της κλαθρίνης (clathrin heavy chain knock down, CHC kd) ή της καβεολίνης-1 (Caveolin-1 knock down, Cav-1 kd) μετά από διαμόλυνση των κυττάρων με siRNAs, επωάστηκαν για 30 λεπτά με VEGF και ακολούθησε ανάλυση της επίδρασης της αναστολής της δυναμίνης ή της αποσιώπησης της κλαθρίνης/καβεολίνης-1 στην επαγόμενη από τον VEGF εξαφάνιση του επιφανειακού VEGFR2, μέσω δοκιμασίας ELISA. Η αποδοτική αποσιώπηση της κλαθρίνης ή της καβεολίνης-1 ελέγχθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (δεξιά). (n=3 ± SD, *** P<0.001, ** P<0.01, ANOVA).

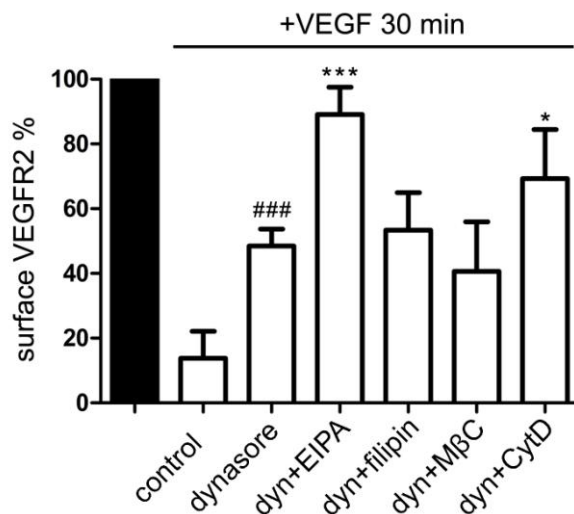


Εικόνα 3.7 : Ανάλυση της επαγόμενη από τον VEGF ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 υπό την αναστολή του εξαρτώμενου από την κλαθρίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης. Ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της βαριάς αλυσίδας της κλαθρίνης (clathrin heavy chain knock down) με siRNAs (κάτω) ή κύτταρα τα οποία διαμολύνθηκαν με siRNAs τυχαίας αλληλουχίας (scrambled, επάνω) σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 στους 4⁰C και μεταφέρθηκαν στους 37⁰ C, για 15 λεπτά, παρουσία VEGF και τρανσφερίνης συζευγμένης με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη. Μετά το πέρας της επώασης στους 37⁰ C, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, μονιμοποιήθηκαν και ο ενδοκυτταρικός VEGFR2 αποκαλύφθηκε με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Οι πυρήνες των κυττάρων εμφανίζονται με μπλε χρώμα. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm.

Από το σύνολο των μέχρι τώρα πειραματικών δεδομένων συμπεραίνουμε πως η ενεργοποίηση του VEGFR2 από τον VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από το μονοπάτι της δυναμίνης (και συγκεκριμένα από το μονοπάτι της κλαθρίνης) καθώς και από ένα εναλλακτικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης το οποίο είναι ανεξάρτητο του ελέγχου της δυναμίνης.

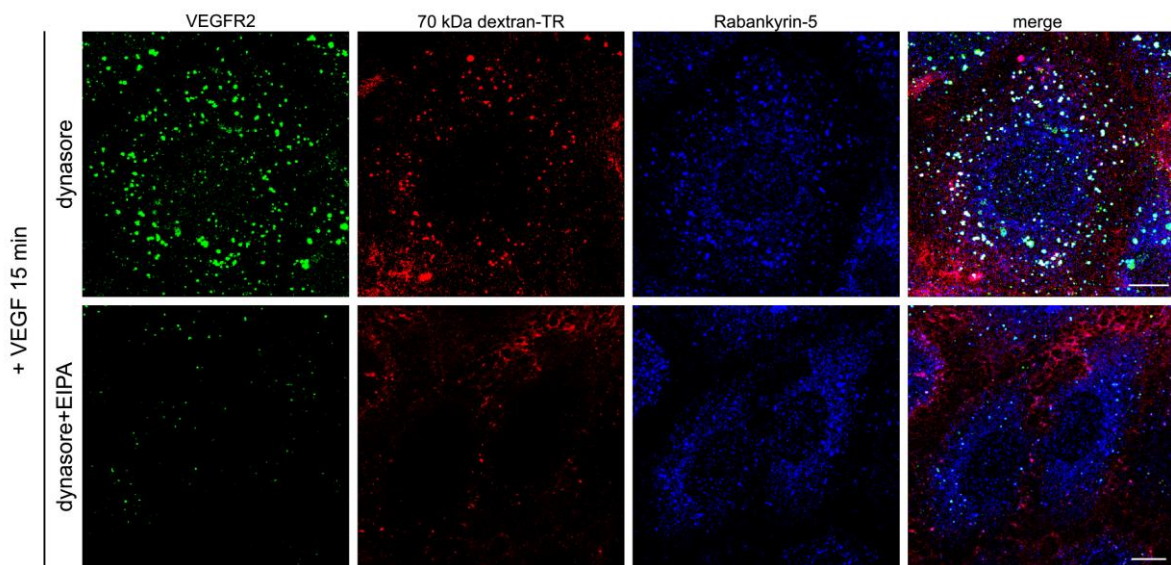
3.1.3 Ο VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της μακροπιννοκυττάρωσης

Προκειμένου να εντοπίσουμε το ανεξάρτητο της δυναμίνης μονοπάτι (ή τα μονοπάτια) ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, χρησιμοποιήσαμε χημικούς αναστολείς έναντι γνωστών εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης, σε συνδυασμό με αναστολή της δυναμίνης. Μέσω δοκιμασίας ELISA παρατηρήσαμε πως μόνο η συνδυαστική αναστολή της δυναμίνης (μέσω του αναστολέα dynasore) και του μονοπατιού της μακροπιννοκυττάρωσης⁴⁹ (μέσω του αναστολέα EIPA) υπήρξε ικανή ώστε να αναστείλει σχεδόν πλήρως τη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF εξαφάνιση των επιφανειακών επιπέδων του VEGFR2 (εικόνα 3.8). Επίσης, στατιστικά σημαντική αναστολή παρατηρήσαμε και μέσω του αναστολέα της ακτίνης (η αναδιοργάνωση της οποίας είναι απαραίτητη για την επίτευξη της μακροπιννοκυττάρωσης⁴⁹), cytochalasin D (CytD). Αντίθετα, η συνδυαστική αναστολή της ενδοκυττάρωσης από το μονοπάτι της δυναμίνης και των caveolae (μέσω του αναστολέα methyl-β-cyclodextrin, MβC) ή των lipid rafts (μέσω του αναστολέα filipin)¹⁰⁶ δεν μπόρεσε να αναστείλει την ενδοκυττάρωση του VEGFR2.



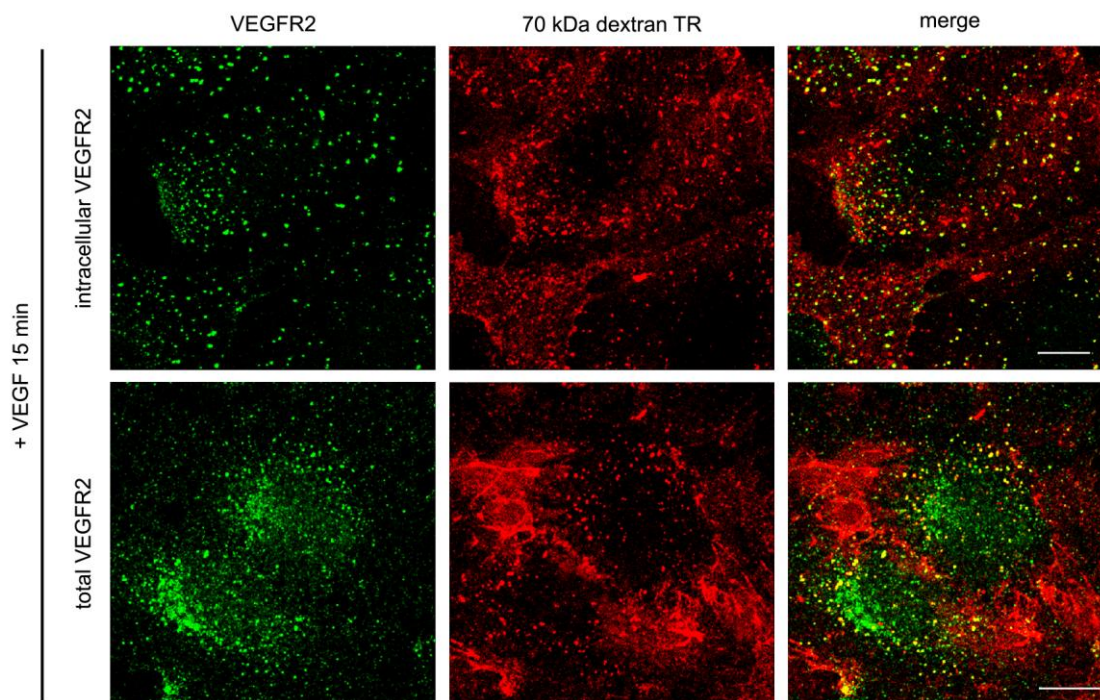
Εικόνα 3.8 : Δοκιμασία ELISA για τον επιφανειακό VEGFR2 υπό την αναστολή όλων των γνωστών εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης. Ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης (dynasore) σε συνδυασμό με αναστολή της μακροπιννοκυττάρωσης (EIPA) ή των lipid rafts (filipin) ή των caveolae (Methyl-β-cyclodextrin, MβC) ή της ακτίνης (cytochalasin D, CytD) επώαστηκαν για 30 λεπτά με VEGF και ακολούθησε ανάλυση της επίδρασης της αναστολής των μονοπατιών ενδοκυττάρωσης στην επαγόμενη από τον VEGF εξαφάνιση του επιφανειακού VEGFR2, μέσω δοκιμασίας ELISA (n=3 ± SEM, ### P<0.001, t test, *** P<0.001 και * P<0.05, ANOVA).

Για να επιβεβαιώσουμε περαιτέρω την μακροπυκνοποίηση του ενεργοποιημένου VEGFR2, ελέγξαμε με συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού (σε ενδοθηλιακά κύτταρα σημασμένα με αντισώματα έναντι του επιφανειακού VEGFR2) τον πιθανό εντοπισμό του υποδοχέα σε ενδοσώματα τα οποία φέρουν μεγάλου μοριακού βάρους δεξτράνη (70 kDa dextran) καθώς και την πρωτεΐνη Rabankyrin-5. Τόσο η δεξτράνη όσο και η πρωτεΐνη Rabankyrin-5 αποτελούν δείκτες ενδοσωμάτων τα οποία σχηματίζονται μέσω μακροπυκνοποίησης (μακροπυκνωσώματα) ^{58,107}. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μικροσκοπίας τα οποία παρατίθενται στην εικόνα 3.9, η αναστολή της δυναμίνης δεν εμπόδισε την ενδοκυττάρωση και την είσοδο του VEGFR2 σε ενδοσώματα θετικά για δεξτράνη και την πρωτεΐνη Rabankyrin-5 (εικόνα 3.9, επάνω). Αντίθετα, συνδυαστική αναστολή της δυναμίνης (dynasore) και της μακροπυκνοποίησης (EIPA) ανέστειλε σχεδόν πλήρως την ενδοκυττάρωση και τον εντοπισμό του VEGFR2 στα μακροπυκνωσώματα (εικόνα 3.9, κάτω), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της δοκιμασίας ELISA.



Εικόνα 3.9 : Ανάλυση του συνεντοπισμού του VEGFR2 με τους δείκτες της μακροπυκνοποίησης δεξτράνη και Rabankyrin-5. Ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2, στους 4⁰C, επώαστηκαν με τον αναστολέα dynasore (επάνω) ή με τους αναστολείς dynasore + EIPA (κάτω) και μεταφέρθηκαν στους 37⁰ C, για 15 λεπτά. παρουσία VEGF και δεξτράνης μοριακού βάρους 70 kDa συζευγμένης με τη φθορίζουσα χρωστική Texas-Red (70 kDa dextran-TR). Μετά το πέρας της επώασης στους 37⁰ C, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, μονιμοποιήθηκαν και ο ενδοκυτταρικός VEGFR2 αποκαλύφθηκε με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm.

Παράλληλα, για να επαληθεύσουμε ότι ο εντοπισμός του VEGFR2 στα μακροπινোসώματα δεν είναι αποτέλεσμα βεβιασμένης εναλλακτικής ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα λόγω της πειραματικής αναστολής του μονοπατιού της δυναμίνης ή λόγω μακροπινοκυττάρωσης του πρωτογενούς αντισώματος (και άρα το σήμα που ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει το αντίσωμα και όχι τον υποδοχέα), επαναλάβαμε την παραπάνω πειραματική διάταξη απουσία οποιαδήποτε αναστολέα, τόσο σε κύτταρα σημασμένα για τον επιφανειακό VEGFR2 αλλά και σε κύτταρα που σημάνθηκαν για τον ολικό υποδοχέα, μετά τη μονιμοποίηση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα μικροσκοπίας φθορισμού απέδειξαν ότι, και στις δύο περιπτώσεις, ο VEGFR2 εντοπίζεται αποδοτικά σε ενδοσώματα θετικά για δεξτράνη (εικόνα 3.10) και συνεπώς, παρουσία VEGF, η μακροπινοκυττάρωση αποτελεί ένα κανονικό μονοπάτι εισόδου του υποδοχέα.



Εικόνα 3.10 : Ανάλυση του συνεντοπισμού του επιφανειακά σημασμένου ή του ολικού VEGFR2 με το δείκτη της μακροπινοκυττάρωσης δεξτράνη. (επάνω) Ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα σημάνθηκαν με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 και επωάστηκαν για 15 λεπτά με VEGF παρουσία δεξτράνης μοριακού βάρους 70 kDa συζευγμένης με τη φθορίζουσα χρωστική Texas-Red (70 kDa dextran-TR). Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, μονιμοποιήθηκαν και ο ενδοκυτταρικός VEGFR2 (intracellular VEGFR2) αποκαλύφθηκε με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. (κάτω) Ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν με VEGF για 15 λεπτά παρουσία δεξτράνης, μονιμοποιήθηκαν και ο ολικός VEGFR2 των κυττάρων (total VEGFR2) αποκαλύφθηκε με πρωτογενή αντισώματα έναντι του υποδοχέα και δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm .

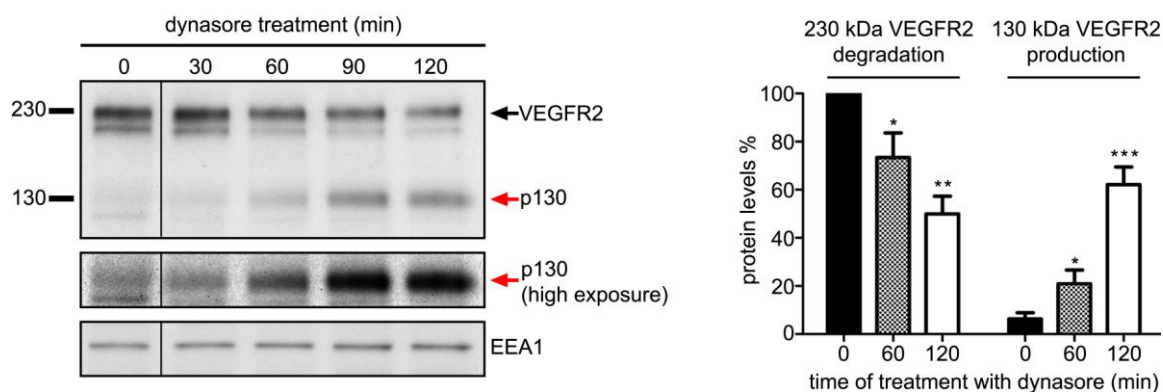
Από το σύνολο των μέχρι τώρα πειραματικών δεδομένων δημιουργούνται δύο καίρια ερωτήματα σε ό,τι αφορά το ρόλο της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2: (α) ποια είναι η σημασία της συνεχούς ενδοκυττάρωσης και ανακύκλωσης του μη ενεργοποιημένου VEGFR2 και (β) ποια είναι η σημασία της μακροπυκνωκυττάρωσης μετά από την ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον VEGF.

3.2. Ανάλυση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης του μη ενεργοποιημένου VEGFR2

3.2.1 Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 επάγει την πρωτεολυτική σχάση του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη

Η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 απουσία του VEGF προκαλεί έκπληξη καθώς, στην πλειοψηφία τους, οι υποδοχείς βρίσκονται εντοπισμένοι στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και ενδοκυττάρωνονται μόνο υπό την παρουσία του συνδέτη τους. Δεδομένου ότι η ενδοκυττάρωση σχετίζεται άμεσα με την εσωτερίκευση και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών στον αυλό των λυσοσωμάτων ή των πρωτεασωμάτων, θελήσαμε να ελέγξουμε μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western εάν η αναστολή της εξαρτώμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης μεταβάλλει τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VEGFR2. Ο VEGFR2 αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη ή οποία φέρει μοριακό βάρος της τάξεως των 230 kDa. Ωστόσο, ο VEGFR2 συντίθεται αρχικά ως ένα πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 150 kDa. Κατά τη σύνθεσή του στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τη μεταφορά του στη συσκευή Golgi και τελικά, τον εντοπισμό του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, ο οποίος είναι και ο τελικός προορισμός της πρωτεΐνης, ο VEGFR2 υφίστανται μια διαδικασία ωρίμανσης (γλυκοζυλίωση) κατά την οποία σάκχαρα προστίθενται και τροποποιούνται στο εξωκυτταρικό, άμινο-τελικό του άκρο. Οι τροποποιήσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα τη σταδιακή αύξηση του μοριακού βάρους του υποδοχέα. Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην ανίχνευση δύο πρωτεϊνικών μορφών του VEGFR2: μιας μερικώς γλυκοζυλιωμένης (ανώριμης, μη λειτουργικής) πρωτεϊνικής μορφής, της τάξεως των 200 kDa, η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στη συσκευή Golgi, και μιας πλήρως γλυκοζυλιωμένης (ώριμης) μορφής του υποδοχέα, της τάξεως των 230 kDa, η οποία αντιπροσωπεύει τον λειτουργικό,

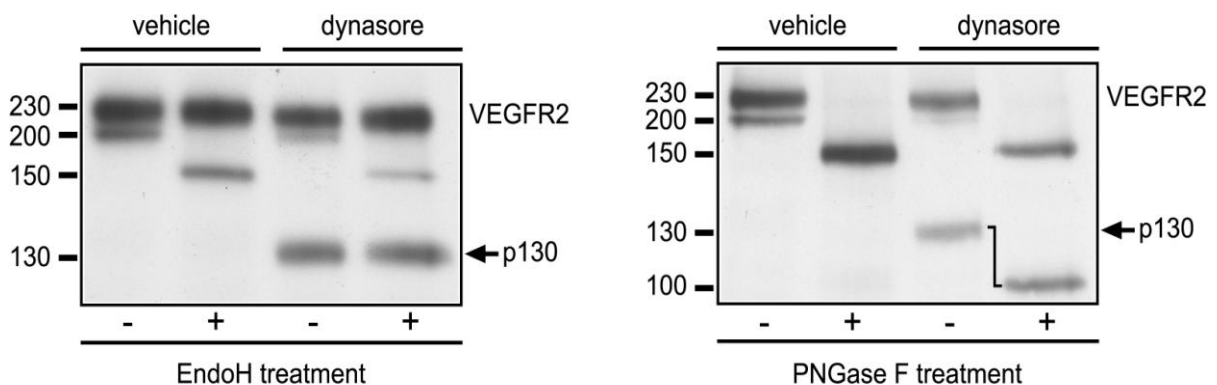
μεμβρανικό VEGFR2. Εφόσον η αναστολή της δυναμίνης αναστέλλει σχεδόν πλήρως την ενδοκυττάρωση του ανενεργού VEGFR2, κάποιος θα υπέθετε ότι η αναστολή της ενδοκυττάρωσης από το μονοπάτι της δυναμίνης θα οδηγούσε και σε αναστολή της αποικοδόμησης και προστασία των πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα. Προς έκπληξή μας, η αναστολή της δυναμίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων του ώριμου (230 kDa) VEGFR2 (εικόνα 3.11, μαύρο βέλος στην ανοσοαποτύπωση) και την εμφάνιση ενός νέου πολυπεπτιδίου, μοριακού βάρους 130 kDa, το οποίο μπορούσε να ανιχνευθεί ασθενώς στα κύτταρα μάρτυρες (vehicle) (εικόνα 3.11, κόκκινο βέλος στην ανοσοαποτύπωση). Μάλιστα, η αποικοδόμηση του ολικού υποδοχέα και η συσσώρευση του πεπτιδίου ήταν ανάλογη με το χρόνο επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα dynasore και κατ' επέκταση, ανάλογη με το χρόνο αναστολής του μονοπατιού της δυναμίνης (εικόνα 3.11, διάγραμμα).



Εικόνα 3.11 : Ανάλυση της επίδρασης της αναστολής του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης στα πρωτεϊνικά επίπεδα του VEGFR2. (αριστερά) Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα με τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore, λύθηκαν και ακολούθησε ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν το κυτταροπλασματικό (καρβόξυ-τελικό) τμήμα του υποδοχέα. Ο ολικός, 230 kDa VEGFR2, επισημαίνεται με μαύρο βέλος. Το πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 130 kDa επισημαίνεται με κόκκινο βέλος. (δεξιά) Πυκνομετρική ανάλυση των πρωτεϊνικών ζωνών του VEGFR2 που ανιχνεύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western ($n=5 \pm \text{SEM}$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ANOVA).

Δεδομένου ότι, πέραν του ρόλου της στην ενδοκυττάρωση, η δυναμίνη φαίνεται να εμπλέκεται και στη μεταφορά κυστιδίων από τη συσκευή Golgi προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, θα μπορούσε κάποιος να υποθέσει ότι, κατά την αναστολή της δυναμίνης, η εμφάνιση του πολυπεπτιδίου των 130 kDa είναι

αποτέλεσμα της συσσώρευσης μερικώς γλυκοζυλιωμένων μορφών του VEGFR2 στη συσκευή Golgi (βλέπε προηγούμενη παράγραφο). Βέβαια, το μοριακό βάρος του πεπτιδίου που ανιχνεύεται είναι μικρότερο του μοριακού βάρους του νέο-συντιθέμενου, μη γλυκοζυλιωμένου υποδοχέα (130<150 kDa) και συνεπώς, η πιθανότητα να συμβαίνει κάτι τέτοιο είναι περιορισμένη. Θέλοντας να αποκλείσουμε το παραπάνω ενδεχόμενο, λύματα από κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αναστολή της δυναμίνης επώαστηκαν με ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν και αφαιρούν σάκχαρα από μόνο μερικώς (ένζυμο Endo H) ή μερικώς και πλήρως (ένζυμο PNGase F) γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες. Εφόσον η γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη αναγνωριστεί από το ένζυμο τότε το μοριακό της βάρος θα μειωθεί λόγω αφαίρεσης των σακχάρων που φέρει. Μετά την επώαση των κυτταρικών λυμάτων με τα παραπάνω ένζυμα, διαπιστώσαμε, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, ότι το πεπτίδιο των 130 kDa αναγνωρίστηκε μόνο από το ένζυμο PNGase F (το οποίο αναγνωρίζει όλες τις γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες) με αποτέλεσμα τη μετάπτωση του μοριακού του βάρους στα 100 kDa (εικόνα 3.12, δεξιά). Αντίθετα, η επώαση με το ένζυμο EndoH (το οποίο αναγνωρίζει μόνο μερικώς γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες) δεν είχε καμία επίπτωση στο μοριακό βάρος της πεπτιδίου (εικόνα 3.12, αριστερά). Συνεπώς, το πολυπεπτίδιο μοριακού βάρους 130 kDa αποτελεί πρωτεϊνικό θραύσμα του ώριμου (230 kDa) VEGFR2.

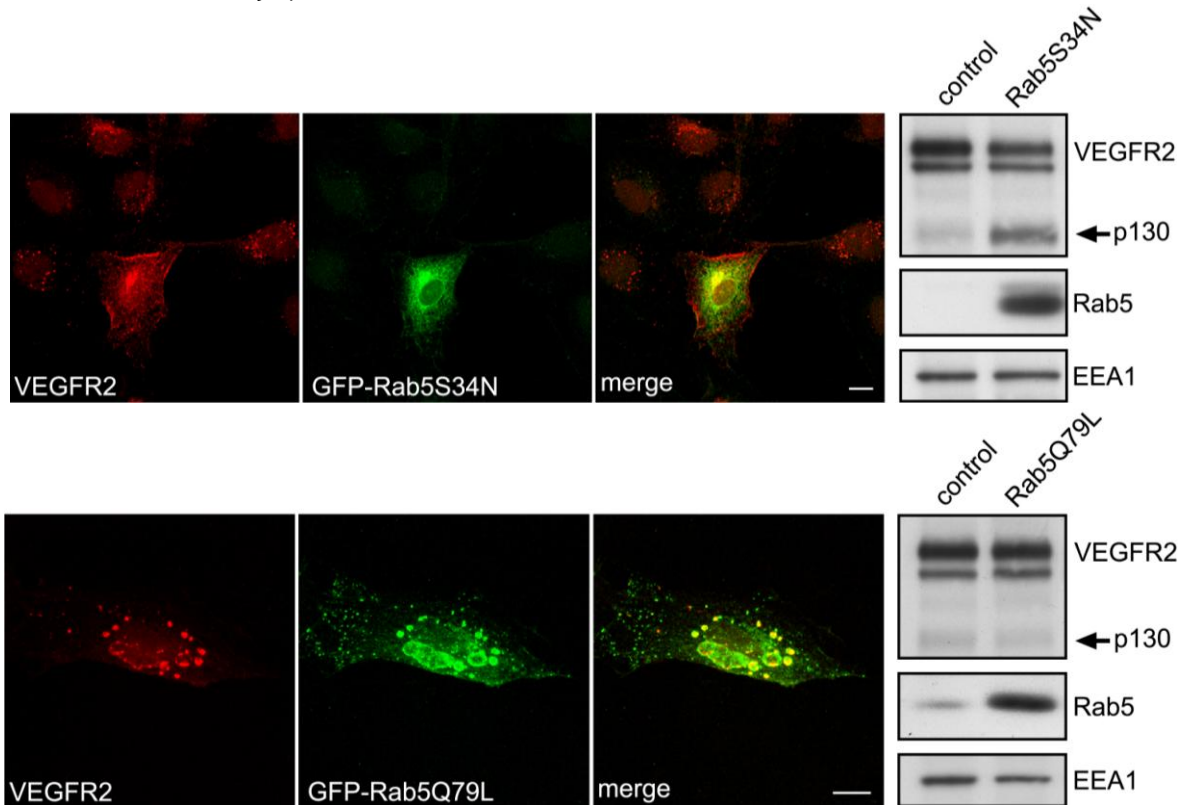


Εικόνα 3.12 : Ανάλυση της γλυκοζυλίωσης του p130. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με DMSO (vehicle) ή με τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore, λύθηκαν και τα κυτταρικά λύματα επώαστηκαν με το ένζυμο EndoH (αριστερά) ή με το ένζυμο PNGase F (δεξιά), για 12 ώρες. Ακολούθως, τα λύματα αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναγνωρίζουν το κυτταροπλασματικό (καρβόξυ-τελικό) τμήμα του υποδοχέα. Οι ενωμένες πρωτεϊνικές ζώνες στη δεξιά ανοσοαποτύπωση (PNGase F) δείχνουν τη μετάπτωση του p130 σε μικρότερο μοριακό βάρος, μετά από την επώαση των κυτταρικών λυμάτων με το ένζυμο.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι, (1) το πεπτιδίο της τάξεως των 130 kDa είναι γλυκοζυλιωμένο, (2) η γλυκοζυλίωση λαμβάνει χώρα μόνο στο εξωκυτταρικό (άμινο-τελικό) τμήμα του VEGFR2 και (3) το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε στα μέχρι τώρα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western αναγνωρίζει τα τελευταία 150 αμινοξέα του κυτταροπλασματικού (καρβόξυ-τελικού) τμήματος του υποδοχέα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι, το πεπτιδίο των 130 kDa αντιπροσωπεύει ένα πρωτεϊνικό θραύσμα το οποίο αποτελείται από το κυτταροπλασματικό, διαμεμβρανικό και τουλάχιστον ενός μέρους του εξωκυτταρικού τμήματος του 230 kDa VEGFR2. Από εδώ και στο έξης το πρωτεϊνικό θραύσμα των 130 kDa θα αναφέρεται ως p130.

Για να αποδείξουμε περαιτέρω ότι ο κερματισμός του VEGFR2 είναι αποτέλεσμα της αναστολής της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα και όχι εξαιτίας μη ειδικών δράσεων, λόγω της αναστολής της δυναμίνης, αναστείλαμε την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 έμμεσα, μέσω τροποποίησης της λειτουργίας της πρωτεΐνης Rab5. Η Rab5 αποτελεί κύρια ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία, μέσω μεταβολής μεταξύ μιας ενεργούς και ανενεργούς κατάστασης, ελέγχει το σχηματισμό και τη σύντηξη των ενδοσωμάτων από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και το σχηματισμό του πρώιμου ενδοσώματος^{57,108-111}. Η υπερέκφραση σε ενδοθηλιακά κύτταρα μιας μεταλλαγμένης μορφής της Rab5, της Rab5S34N, η οποία καθιστά την πρωτεΐνη κλειδωμένη στην ανενεργή της μορφή και συνεπώς αναστέλλεται ο σχηματισμός των ενδοσωμάτων από τη μεμβράνη, ανέστειλε την ενδοκυτταρική κυκλοφορία του VEGFR2 και οδήγησε στη μετατόπιση και συσσώρευση του σήματος του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (εικόνα 3.13, συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, επάνω αριστερά). Η ανακατανομή του VEGFR2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη οδήγησε και στην ανίχνευση του p130 στα εκχυλίσματα ενδοθηλιακών κυττάρων που υπερέκφραζαν την πρωτεΐνη Rab5S34N (εικόνα 3.13, ανοσοαποτύπωση κατά Western, επάνω δεξιά). Η υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της Rab5, της Rab5Q79L, η οποία καθιστά την πρωτεΐνη κλειδωμένη στη συνεχώς ενεργή της μορφή, οδήγησε επίσης σε αναστολή της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του VEGFR2 και στη συσσώρευση του σήματος του υποδοχέα στα ενδοσώματα (εικόνα 3.13, συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού, κάτω αριστερά). Ωστόσο, η αναστολή της κυκλοφορίας του VEGFR2 μέσω της υπερέκφρασης της Rab5Q79L δεν είχε καμία

επίπτωση στα πρωτεϊνικά επίπεδα του ολικού υποδοχέα γεγονός το οποίο συνοδεύεται και από την απουσία του p130 στα λύματα κυττάρων που υπερέκφραζαν τη μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (εικόνα 3.13, ανοσοαποτύπωση κατά Western, κάτω δεξιά).

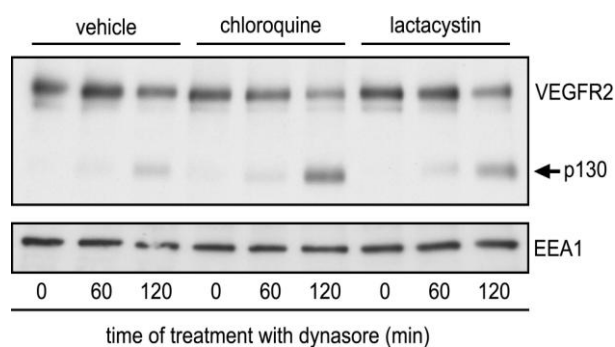


Εικόνα 3.13 : Ανάλυση της αναστολής της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του VEGFR2 μέσω τροποποίησης της λειτουργίας της πρωτεΐνης Rab5. (Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού) Ενδοθηλιακά κύτταρα που υπερέκφραζαν, μέσω διαμόλυνσης των κυττάρων με πλασμίδια, τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Rab5, Rab5S34N (επάνω) ή Rab5Q79L (κάτω), συζευγμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP (green fluorescence protein), μονιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν για τον κυτταρικό εντοπισμό του VEGFR2. (Ανοσοαποτύπωση κατά Western) Ενδοθηλιακά κύτταρα που υπερέκφραζαν, μέσω επιμόλυνσης των κυττάρων με αδenoϊούς, τη μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης Rab5, Rab5S34N (επάνω) ή Rab5Q79L (κάτω), λύθηκαν και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν μέσω χρήσης αντισωμάτων που αναγνωρίζουν το κυτταροπλασματικό τμήμα του VEGFR2. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm .

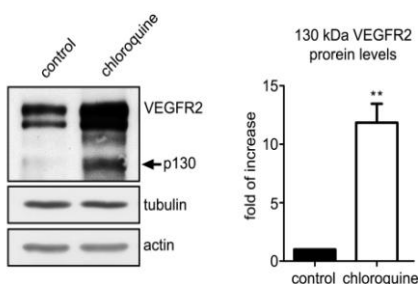
Τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν πως η σχέση του VEGFR2 και η εμφάνιση του p130 είναι αποτέλεσμα της εκτεταμένης παραμονής του VEGFR2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (dynasore, Rab5S34N) και όχι αποτέλεσμα της γενικότερης αναστολής της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του υποδοχέα (Rab5Q79L). Επίσης, εφόσον η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 αναστέλλεται πλήρως, η σχέση του υποδοχέα θα πρέπει να λαμβάνει χώρα στη μεμβράνη.

Πράγματι, αναστολή της λυσοσωματικής και πρωτεασωματικής αποικοδόμησης (η οποία πραγματοποιείται ενδοκυτταρικά) δεν μπόρεσε να αναστείλει τη διαμεσολαβούμενη από την αναστολή της δυναμίνης εμφάνιση του p130 (εικόνα 3.14). Μάλιστα, η αναστολή της λυσοσωματικής αποικοδόμησης οδήγησε σε αύξηση των πρωτεϊνικών επιπέδων του p130 γεγονός το οποίο αποδεικνύει αφενός, πως η σχάση του υποδοχέα πραγματοποιείται με ένα μηχανισμό ο οποίος προηγείται της μεταφοράς του υποδοχέα στα λυσοσώματα, αφετέρου, ότι το p130 που παράγεται αποικοδομείται δευτερογενώς στα προαναφερθέντα ενδοκυτταρικά οργανίδια.

Εικόνα 3.14 : Ανάλυση της αναστολής της λυσοσωματικής ή πρωτεασωματικής αποικοδόμησης στην επαγόμενη από την αναστολή της δυναμίνης παραγωγή του p130. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με DMSO (vehicle) ή τον αναστολέα των λυσοσωμάτων chloroquine ή τον αναστολέα των πρωτεασωμάτων lactacystin. Μετά το πέρας της επώασης, ο αναστολέας της δυναμίνης dynasore προστέθηκε στα κύτταρα για διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος του VEGFR2.



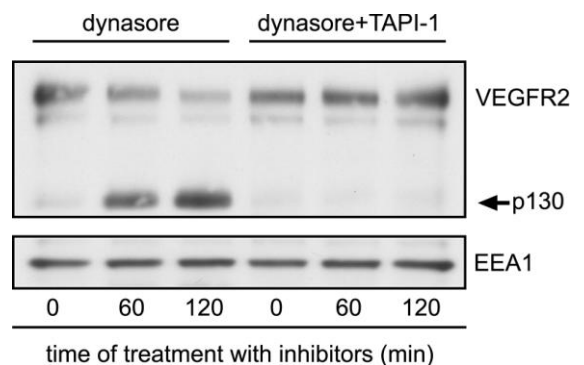
Παρατεταμένη αναστολή της λυσοσωματικής αποικοδόμησης σε κύτταρα στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε καμία αναστολή της ενδοκυττάρωσης, οδήγησε στην ανίχνευση του p130 (εικόνα 3.15). Κατά συνέπεια, αφενός η σχάση του υποδοχέα δεν είναι αποτέλεσμα της πειραματικής αναστολής της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και αποτελεί μια φυσιολογική κυτταρική διαδικασία, αφετέρου, η ανίχνευση του p130 στα κύτταρα μάρτυρες είναι αδύνατη διότι αυτό αποικοδομείται ταχέως στα λυσοσώματα.



Εικόνα 3.15 : Ανίχνευση του p130 στα κύτταρα μάρτυρες μέσω αναστολής της λυσοσωματικής αποικοδόμησης. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για 6 ώρες με τον αναστολέα των λυσοσωμάτων chloroquine, λύθηκαν και αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (αριστερά), με αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος του VEGFR2. (δεξιά) Πυκνομετρική ανάλυση της ζώνης των 130 kDa ($n=3 \pm SD$, $**P<0.01$, t test).

Πώς λοιπόν η αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 επάγει τον κερματισμό του υποδοχέα; Προηγούμενες εργασίες απέδειξαν ότι ένα σύνολο πρωτεϊνών, μεταξύ αυτών και ο VEGFR2, υφίστανται πρωτεολυτική σχάση από μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs), ένζυμα τα οποία δρουν στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και αναγνωρίζουν και πρωτεολύουν ένα ετερογενές σύνολο υποστρωμάτων. Επώαση των κυττάρων με τον γενικό αναστολέα των MMPs, TAPI-1, υπό την αναστολή της δυναμίνης (μέσω του αναστολέα dynasore), ανέστειλε πλήρως την εμφάνιση του p130 (εικόνα 3.16). Μάλιστα, τα ολικά επίπεδα του υποδοχέα παρέμειναν σταθερά ακόμα και μετά από παρατεταμένη αναστολή της δυναμίνης (2 ώρες) γεγονός που υποδηλώνει ότι, κατά την αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, η πρωτεολυτική σχάση του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη αντιπροσωπεύει το μοναδικό γεγονός αποικοδόμησης του VEGFR2.

Εικόνα 3.16 : Ανάλυση της αναστολής των μεταλλοπρωτεϊνών στην επαγόμενη από την αναστολή της δυναμίνης παραγωγή του p130. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα με τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore ή σε συνδυασμό με τον αναστολέα dynasore και τον γενικό αναστολέα των μεταλλοπρωτεϊνών TAPI-1. Τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος του VEGFR2.



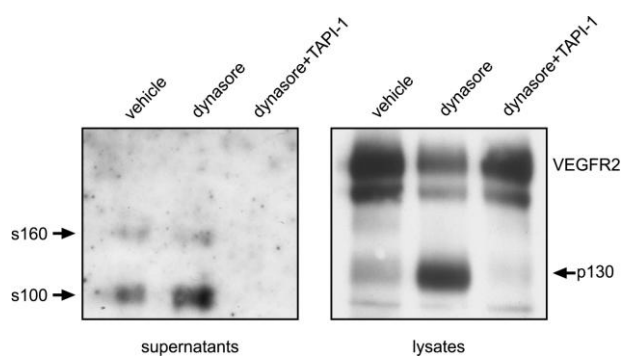
Εφόσον ο VEGFR2 κερματίζεται στη μεμβράνη, η διαδικασία αυτή θα πρέπει να οδηγεί στην απελευθέρωση ενός εκκρινόμενου τμήματος της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα (soluble VEGFR2, sVEGFR2) το οποίο θα πρέπει να φέρει μοριακό βάρος της τάξεως των 100 kDa (s100) ώστε να είναι συμπληρωματικό του p130 (s100+p130=230 kDa VEGFR2). Προκειμένου να εντοπίσουμε το εκκρινόμενο αυτό κομμάτι του υποδοχέα, θρεπτικά υλικά από κύτταρα μάρτυρες (vehicle), από κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τον αναστολέα dynasore και από κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τον αναστολέα dynasore και τον αναστολέα TAPI-1 συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του εξωκυτταρικού τμήματος του VEGFR2. Η παραπάνω

ανάλυση οδήγησε στην ανίχνευση δύο εκκρινόμενων πρωτεϊνών οι οποίες αναγνωρίστηκαν από το αντίσωμα: στην ανίχνευση μιας ασθενούς πρωτεϊνικής ζώνης της τάξεως των 160 kDa (s160) η οποία θα πρέπει να αντιπροσωπεύει ένα εναλλακτικό εκκρινόμενο τμήμα του VEGFR2 (σύμφωνα με προηγούμενες αναφορές⁸⁰) και στην ανίχνευση μιας έντονης πρωτεϊνικής ζώνης της τάξεως των 100 kDa (s100) η οποία θα πρέπει να αντιστοιχεί στο συμπληρωματικό κομμάτι των 130 kDa που ανιχνεύεται στα κυτταρικά λύματα (εικόνα 3.17). Ωστόσο, από τα δύο εκκρινόμενα τμήματα του υποδοχέα μόνο το s100 υφίσταται ρύθμιση από την ενδοκυττάρωση καθώς η αναστολή της δυναμίνης οδήγησε σε αύξηση των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων μόνο του s100, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (vehicle), κατά αντιστοιχία με την παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων του p130 στα κυτταρικά λύματα (εικόνα 3.17, δεξιά ανοσοαποτύπωση). Η παρουσία του αναστολέα TAPI-1 ανέστειλε πλήρως την παραγωγή των s160 και s100, επιβεβαιώνοντας ότι η ανίχνευση των εξωκυτταρικών αυτών πρωτεϊνικών θραυσμάτων του VEGFR2 είναι αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής σχάσης του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τέλος, η ανίχνευση του s100 στα κύτταρα μάρτυρες αποδεικνύει περαιτέρω ότι η πρωτεολυτική σχάση του VEGFR2 αποτελεί μια φυσιολογική κυτταρική διαδικασία η οποία επάγεται μέσω της αναστολής της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, λόγω του εγκλωβισμού του υποδοχέα στη μεμβράνη.

Εικόνα 3.17 : Ανίχνευση του εκκρινόμενου τμήματος του VEGFR2.

(αριστερά) Θρεπτικά υλικά από ενδοθηλιακά κύτταρα που επωάστηκαν για 2 ώρες με DMSO (vehicle) ή με dynasore ή με dynasore + TAPI-1, συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν και αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western,

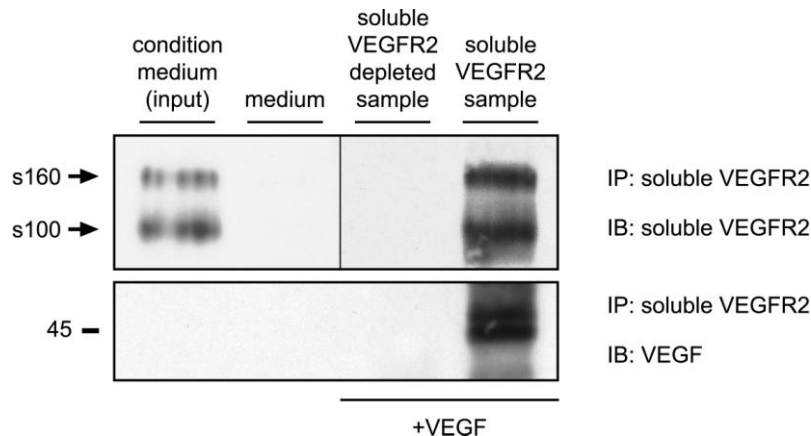
χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του εξωκυτταρικού τμήματος του VEGFR2. (δεξιά) Μετά την απομάκρυνση των θρεπτικών υλικών, τα κύτταρα λύθηκαν και αναλύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος του VEGFR2.



Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα αποδεικνύουν ότι, υπό κατάσταση ηρεμίας, η συνεχής ενδοκυττάρωση και ανακύκλωση του VEGFR2 λειτουργεί ως ένας προστατευτικός μηχανισμός έναντι της αποικοδόμησης του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.

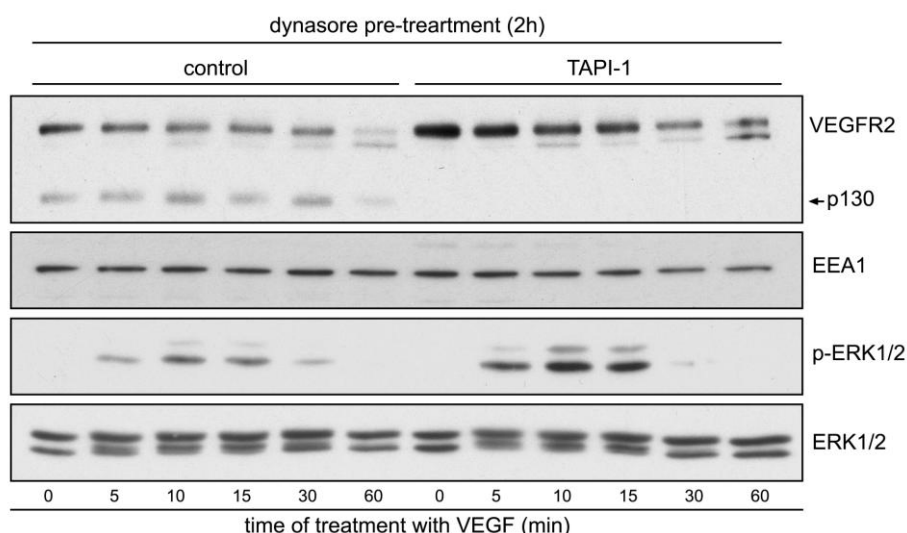
3.2.2 Η σχέση του VEGFR2 λειτουργεί ως ένας αρνητικός μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης του υποδοχέα

Το άμεσο ερώτημα που δημιουργείται από τις μέχρι τώρα παρατηρήσεις μας αφορά το λειτουργικό ρόλο ενός τέτοιου μηχανισμού αποικοδόμησης του VEGFR2. Η σχέση των υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη λειτουργεί ως ένας διπτός, αρνητικός μηχανισμός ρύθμισης της σηματοδότησης ο οποίος περιορίζει τόσο τα διαθέσιμα επίπεδα των υποδοχέων όσο και τη διαθεσιμότητα του συνδέτη, μέσω αλληλεπίδρασής του με το εκκρινόμενο τμήμα του υποδοχέα. Προκειμένου να ελέγξουμε την πιθανότητα αλληλεπίδρασης του εκκρινόμενου θραύσματος με τον VEGF, πραγματοποιήσαμε πειράματα συν-ανοσοκαταβύθισης του s100 με τον VEGF. Θρεπτικά υλικά ενδοθηλιακών κυττάρων συλλέχθηκαν, επωάστηκαν με VEGF και ακολούθησε ανασοκαταβύθιση του εκκρινόμενου τμήματος του VEGFR2 με αντισώματα έναντι του εξωκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του VEGF απέδειξε πως ο VEGF συν-ανοσοκαταβυθίζεται με τον sVEGFR2 και συνεπώς, ο εκκρινόμενος υποδοχέας φέρει ικανότητα δέσμευσης του συνδέτη του (εικόνα 3.18).



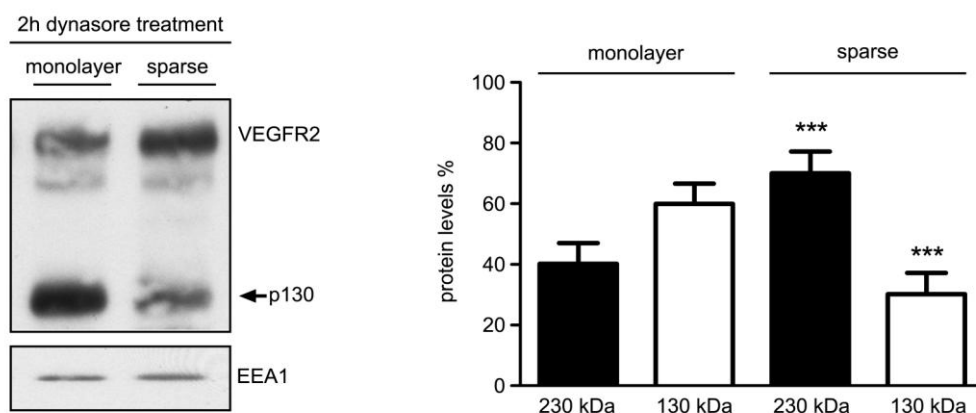
Εικόνα 3.18 : Ανάλυση της αλληλεπίδρασης του εκκρινόμενου τμήματος του VEGFR2 με τον VEGF. Θρεπτικά υλικά ενδοθηλιακών κυττάρων (condition medium) συλλέχθηκαν, συγκεντρώθηκαν και χωρίστηκαν σε δύο δείγματα ίσου όγκου. Το ένα δείγμα επωάστηκε με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα, ώστε να αφαιρεθεί ο εκκρινόμενος VEGFR2 (soluble VEGFR2 depleted sample). Στη συνέχεια, και τα δύο δείγματα επωάστηκαν με VEGF, για 4 ώρες, πραγματοποιήθηκε ανασοκαταβύθιση με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα και ακολούθως, ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του VEGF. Η απουσία ανίχνευσης του VEGF στο δείγμα από το οποίο αφαιρέθηκε ο εκκρινόμενος VEGFR2, επαληθεύει ότι η ανίχνευση του VEGF (στο soluble VEGFR2 sample) είναι αποτέλεσμα της ειδικής αλληλεπίδρασης του sVEGFR2 με τον VEGF.

Θέλοντας να ελέγξουμε άμεσα την επίδραση της σχάσης του VEGFR2 στη σηματοδότηση του υποδοχέα, ακολουθήσαμε μια πειραματική μεθοδολογία κατά την οποία πραγματοποιήσαμε παρατεταμένη αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης (επώαση των κυττάρων για 2 ώρες με τον αναστολέα dynasore) ώστε να επάγουμε τη σχάση του υποδοχέα. Στη συνέχεια, ο αναστολέας αφαιρέθηκε ώστε να απελευθερωθεί το μονοπάτι της δυναμίνης (αντιστρεπτή αναστολή), τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF, λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης ERK1/2, ενός κύριου καθοδικού μορίου της σηματοδότησης του VEGFR2. Ως κύτταρα μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αναστολή της δυναμίνης, υπό προστασία όμως του υποδοχέα από σχάση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (dynasore + TAPI-1). Μέσω της παραπάνω πειραματική μεθοδολογίας διαπιστώσαμε ότι η μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 (λόγω σχάσης του στη μεμβράνη) είχε αρνητικό αντίκτυπο στη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση της ERK1/2, σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (vehicle), επαληθεύοντας τον αρνητικό ρόλο του μηχανισμού στη ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα (εικόνα 3.19).



Εικόνα 3.19 : Ανάλυση της επίδρασης της σχάσης του VEGFR2 στην επαγόμενη από τον VEGF ενεργοποίηση της ERK1/2. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για 2 ώρες με τον αναστολέα dynasore ή με τους αναστολείς dynasore + TAPI-1, απουσία ορού. Ακολούθως, οι αναστολείς απομακρύνθηκαν και μετά από 10 λεπτά τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για διάφορους χρόνους. Τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι του VEGFR2 και της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης ERK1/2.

Τέλος, διερωτηθήκαμε εάν η σχέση του υποδοχέα υφίσταται κάποια ρύθμιση στο επίπεδο της φυσιολογικής λειτουργίας των κυττάρων. Είναι γνωστό ότι η σηματοδότηση του VEGFR2 ρυθμίζεται από την πυκνότητα ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων^{98,112-114}. Όταν η κυτταρική καλλιέργεια φτάσει στο επίπεδο της μονοστιβάδας τότε η ένταση της σηματοδότησης του VEGFR2 μειώνεται ώστε να περιοριστεί ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Συνεπώς, υποθέσαμε ότι η σχέση του VEGFR2, καθώς λειτουργεί ως ένας αρνητικός μηχανισμός της μεταγωγής του σήματος του υποδοχέα, πιθανά ρυθμίζεται από την πυκνότητα της καλλιέργειας των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πράγματι, όταν αναστείλαμε την εξαρτώμενη από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωση του VEGFR2 σε πυκνές και αραιές καλλιέργειες κυττάρων, διαπιστώσαμε πως η αύξηση της πυκνότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων επάγει τον κερματισμό του υποδοχέα (εικόνα 3.20), υποδεικνύοντας πως η διαμεσολαβούμενη από τις διακυτταρικές συνδέσεις επαγωγή της σχέσης του VEGFR2 θα μπορούσε να λειτουργεί ως ένας μηχανισμός ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.



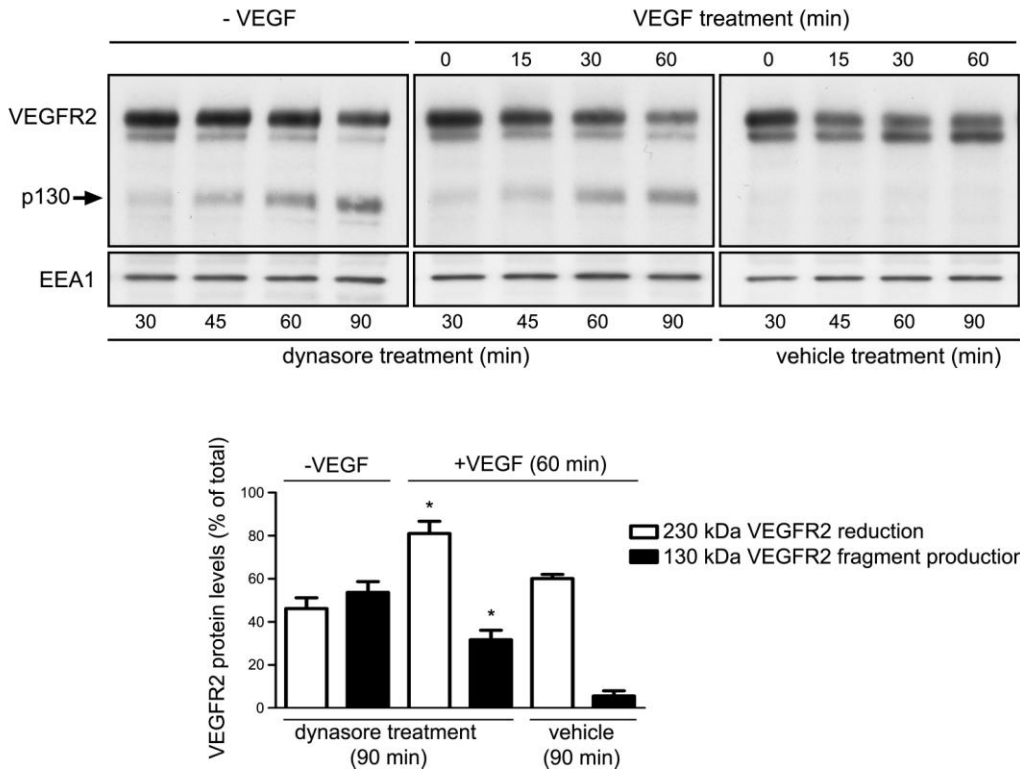
Εικόνα 3.20 : Ανάλυση της ρύθμισης της σχέσης του VEGFR2 από την πυκνότητα ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων. (αριστερά) Ενδοθηλιακά κύτταρα τρυπινοποιήθηκαν και επιστρώθηκαν εκ νέου σε πυκνότητες 2×10^4 και 5×10^4 κύτταρα/cm², προκειμένου να λάβουμε αραιές και πυκνές κυτταρικές καλλιέργειες, αντίστοιχα. Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα επωάστηκαν για 2 ώρες με τον αναστολέα dynasore, λύθηκαν και τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος του VEGFR2. (δεξιά) Πυκνομετρική ανάλυση των 230 kDa και 130 kDa πρωτεϊνικών ζωνών του VEGFR2 (n=3 ± SD, ***P<0.001, t test).

3.3. Ανάλυση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης του ενεργοποιημένου VEGFR2

3.3.1 Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF, υπό την αναστολή του εξαρτώμενου από τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης

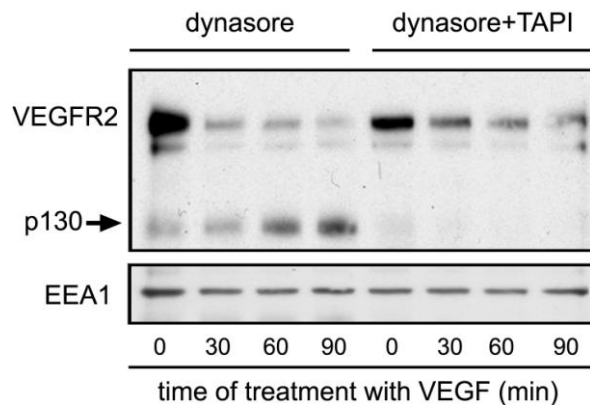
Καθώς υπό συνθήκες ηρεμίας και κατά την αναστολή της ρυθμιζόμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, η σχάση του υποδοχέα στη μεμβράνη αντιπροσωπεύει το μοναδικό γεγονός αποικοδόμησής του, θελήσαμε να ελέγξουμε εάν η παρουσία του VEGF μεταβάλλει τα πρωτεϊνικά επίπεδα του VEGFR2. Όπως παρατηρήσαμε προηγουμένως, η αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 (μέσω του αναστολέα dynasore) οδήγησε σε μείωση των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων του υποδοχέα και στην εμφάνιση του p130 (βλέπε εικόνα 3.11). Επίσης, η συσσώρευση του p130 ήταν ανάλογη της εξαφάνισης του 230 kDa VEGFR2 καθώς το θραύσμα αυτό προέρχεται από τον ολικό υποδοχέα. Ωστόσο, η παρουσία του VEGF μετέβαλε αυτή την αναλογία οδηγώντας σε αύξηση της εξαφάνισης του ολικού VEGFR2 και στη μείωση της παραγωγής του p130 (εικόνα 3.21).

Θέλοντας να αποκλείσουμε το γεγονός ότι η επιπλέον μείωση του 230 kDa VEGFR2 είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός εναλλακτικού μηχανισμού σχάσης του υποδοχέα, ο οποίος επάγεται από τον VEGF (εξαρτώμενη από τον VEGF σχάση του VEGFR2), αναστείλαμε την εξαρτώμενη από δυναμίνη ενδοκυττάρωση και σχάση του VEGFR2 (dynasore + TAPI-1), ενεργοποιήσαμε τα κύτταρα με VEGF και ελέγξαμε με ανοσοαποτύπωση κατά Western το αποτέλεσμα στα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα. Η αναστολή των MMPs μέσω του αναστολέα TAPI-1, αν και ανέστειλε την παραγωγή του p130, δεν μπόρεσε να εμποδίσει την επαγόμενη από τον VEGF αποικοδόμηση του 230 kDa VEGFR2 (εικόνα 3.22). Άρα, η επαγόμενη από τον VEGF εξαφάνιση του ολικού VEGFR2 δεν μπορεί να αποδοθεί σε ένα εναλλακτικό γεγονός σχάσης του υποδοχέα στη μεμβράνη. Κατά συνέπεια, υποθέσαμε ότι η παρατηρούμενη μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του 230 kDa VEGFR2 είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης ενός εναλλακτικού της δυναμίνης μονοπατιού ενδοκυττάρωσης μέσω του οποίου ο VEGFR2 οδηγείται προς αποικοδόμηση.

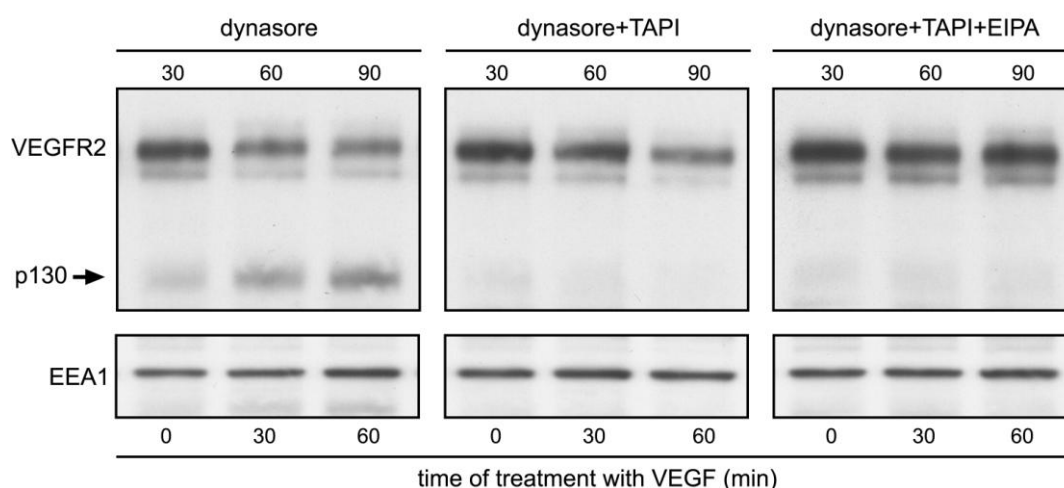


Εικόνα 3.21 : Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων με VEGF, υπό την αναστολή της δυναμίνης. (επάνω) Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά με τον αναστολέα της δυναμίνης dynasore και, είτε ενεργοποιήθηκαν με VEGF (παρουσία του αναστολέα, 4 μεσαίες διαδρομές), για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα και λύθηκαν, είτε επώαστηκαν μόνο με τον αναστολέα dynasore και λύθηκαν στους ίδιους χρόνους με τα κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με τον VEGF (4 πρώτες διαδρομές). Ακολούθως, τα κυτταρικά λύματα αναλύθηκαν μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western με αντισώματα έναντι του κυτταροπλασματικού τμήματος του VEGFR2. Οι τελευταίες 4 διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση αντιπροσωπεύουν δείγματα από κύτταρα μάρτυρες (vehicle) που επώαστηκαν μόνο με VEGF. (κάτω) Πυκνομετρική ανάλυση των 230 kDa και 130 kDa πρωτεϊνικών ζωνών του VEGFR2 ($n=4 \pm \text{SEM}$, $*P<0.05$, t test).

Εικόνα 3.22 : Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 υπό την αναστολή της δυναμίνης και των MMPs, μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα dynasore ή με τους αναστολείς dynasore + TAPI-1 (30 λεπτά επώασης), ενεργοποιήθηκαν με VEGF για διάφορα χρονικά διαστήματα, λύθηκαν και ακολούθησε ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 και του p130.

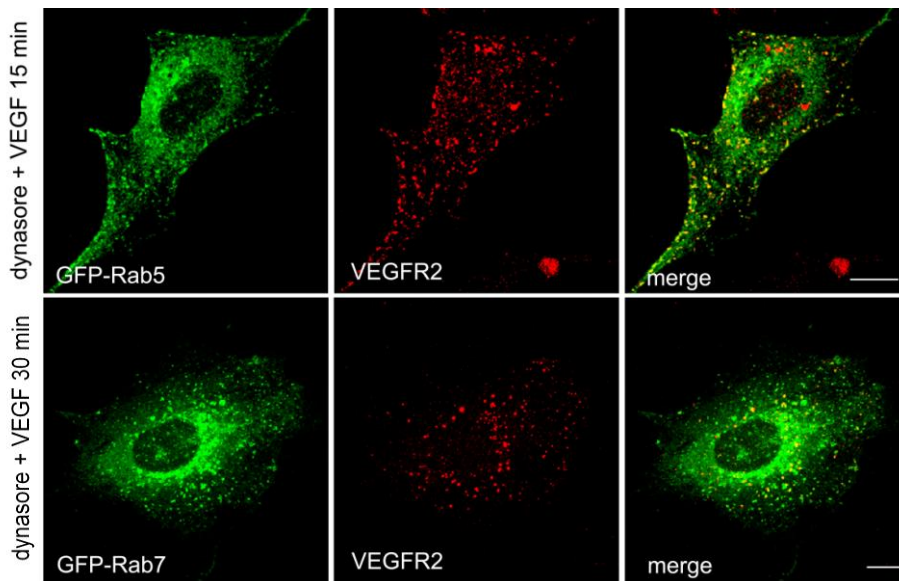


Σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματά τα οποία λάβαμε κατά την προσπάθεια ανίχνευσης όλων των πιθανών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 (βλέπε εικόνα 3.8) υποθέσαμε πως το εναλλακτικό μονοπάτι μέσω του οποίου ο VEGFR2 οδηγείται προς αποικοδόμηση είναι η μακροπυκνωκυττάρωση. Πράγματι, η συνδυαστική αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης, της μακροπυκνωκυττάρωσης και των MMPs (dynasore + EIPA + TAPI-1) οδήγησε σε πλήρη προστασία των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2 (εικόνα 3.23).



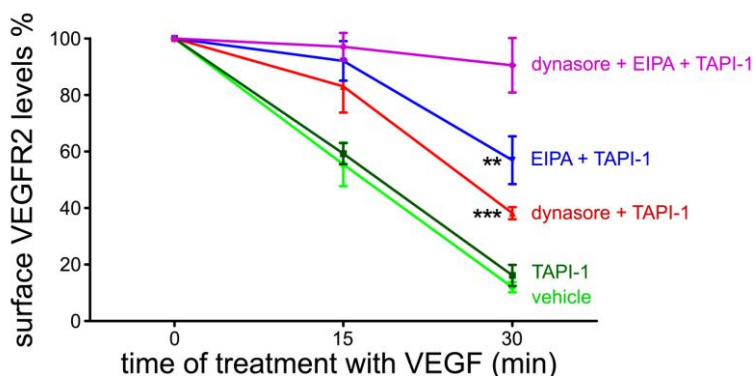
Εικόνα 3.23 : Ανάλυση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2, υπό την αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης της μακροπυκνωκυττάρωσης και των MMPs . Ενδοθηλιακά κύτταρα επωάστηκαν για 30 λεπτά με τον αναστολέα dynasore (αριστερά) ή τους αναστολείς dynasore + TAPI-1 (μέση) ή τους αναστολείς dynasore + TAPI-1+ EIPA (δεξιά) και ενεργοποιήθηκαν με VEGF για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα. Τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών επιπέδων του VEGFR2.

Τα αποτελέσματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western επιβεβαιώθηκαν και μέσω πειραμάτων μικροσκοπίας φθορισμού όπου, υπό την αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης και παρουσία VEGF, ο VEGFR2 βρέθηκε να εντοπίζεται αρχικά σε περιφερειακά ενδοσώματα, θετικά για την πρωτεΐνη Rab5, και σε μεταγενέστερο χρόνο σε περι-πυρηνικά ενδοσώματα, θετικά για την πρωτεΐνη Rab7, τον τελευταίο ενδοκυτταρικό σταθμό πριν τη μετάβαση στα λυσοσώματα (εικόνα 3.24). Συνεπώς, κατά αντιστοιχία με άλλους υποδοχείς, μέσω της μακροπυκνωκυττάρωσης ο VEGFR2 ακολουθεί την κανονική κυτταρική κυκλοφορία μέσω της οποίας ενδοκυτταρώνεται, οδηγείται αρχικά στα πρώιμα ενδοσώματα (Rab5), εν συνεχεία στα όψιμα ενδοσώματα (Rab7) και τελικά, στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση.



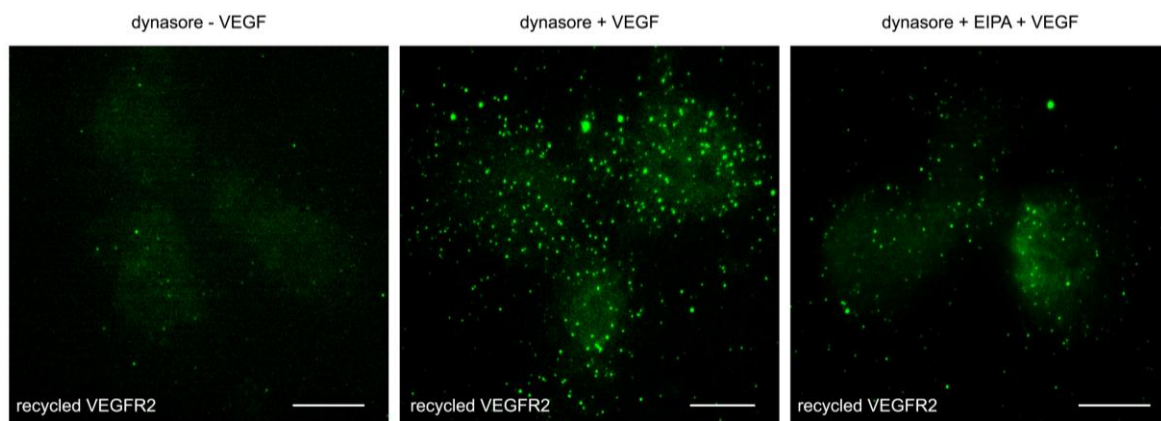
Εικόνα 3.24 : Ανάλυση του εντοπισμού του ενεργοποιημένου VEGFR2 στα πρώιμα και όψιμα ενδοσώματα, υπό την αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης. Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού του VEGFR2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα που υπερεκφράζουν (μέσω διαμόλυνσης των κυττάρων με πλασμίδια) τις πρωτεΐνες Rab5 (επάνω) ή Rab7 (κάτω), συζευγμένες με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP. Τα κύτταρα σημάθηκαν για τον επιφανειακό VEGFR2 με αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα, υπό την παρουσία του αναστολέα dynasore, και ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για 15 (επάνω) και 30 λεπτά (κάτω). Ακολούθησε μία πλύση με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ο ενδοκυτταρικός VEGFR2 αποκαλύφθηκε με δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με φθοριοχρώματα. Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm.

Επίσης, δοκιμασία ELISA όπου πραγματοποιήθηκε συνδυαστική αναστολή της σχάσης του VEGFR2 και των δύο εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης επιβεβαίωσε ότι, παρουσία του VEGF, το μονοπάτι της δυναμίνης και η μακροπυνοκυττάρωση αποτελούν τα μοναδικά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του ενεργοποιημένου VEGFR2 (εικόνα 3.25).

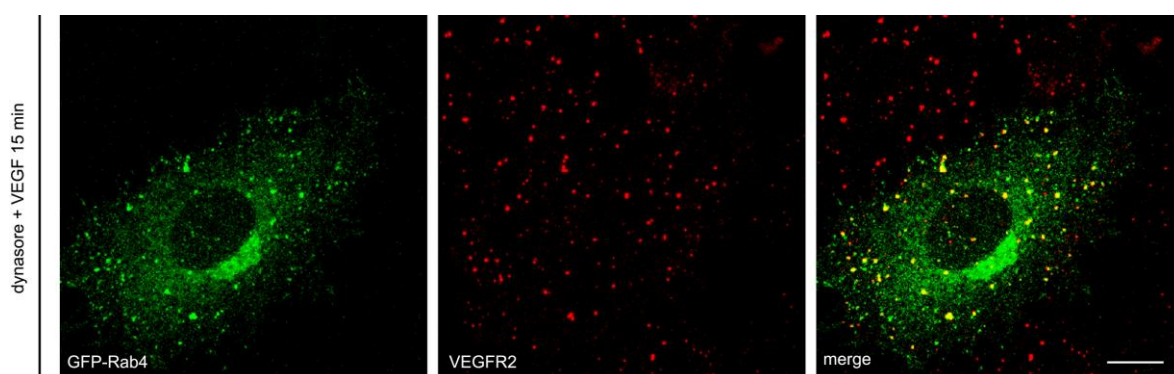


Εικόνα 3.25 : Δοκιμασία ELISA για τον επιφανειακό VEGFR2 υπό αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης (dynasore) και της μακροπυνοκυττάρωσης (EIPA) (μονή ή συνδυαστική αναστολή των μονοπατιών) και των MMPs (TAPI-1). n=4 ± SEM, **P<0.01 και ***P<0.001, ANOVA.

Τέλος, η διαμεσολαβούμενη από τον VEGF επαγωγή της μακροπιννοκυττάρωση του VEGFR2 επάγει εν μέρη, εκτός από την αποικοδόμηση, και την ανακύκλωση του υποδοχέα, όπως αποκαλύφθηκε με δοκιμασίες ανακύκλωσης του ενεργοποιημένου VEGFR2 μέσω μικροσκοπίας TIRF (εικόνα 3.26) και μέσω ανάλυσης του συνεντοπισμού του υποδοχέα με την πρωτεΐνη Rab4 (εικόνα 3.27), ένα δείκτη των ενδοσωμάτων ανακύκλωσης, υπό την αναστολή της δυναμίνης.



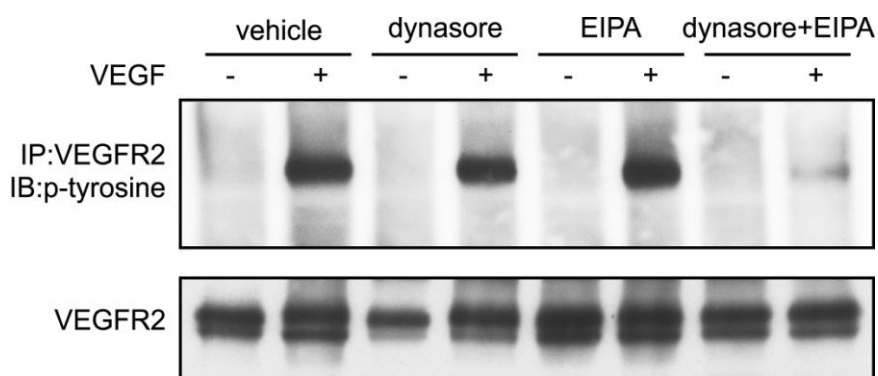
Εικόνα 3.26 : Δοκιμασία ανακύκλωσης του ενεργοποιημένου VEGFR2, μέσω της μακροπιννοκυττάρωσης. Ενδοθηλιακά κύτταρα επώαστηκαν με πρωτογενή αντισώματα έναντι της εξωκυτταρικής περιοχής του VEGFR2 προκειμένου να επιτευχθεί η σήμανση του επιφανειακού υποδοχέα. Ακολούθως, τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα dynasore (μεσαία εικόνα) ή με τους αναστολείς dynasore + EIPA (αριστερή εικόνα), για 30 λεπτά, και επώαστηκαν με VEGF, για 5 λεπτά, ώστε να επαχθεί η ενεργοποίηση και η ενδοκυττάρωση του VEGFR2. Τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο κυτταρικής ανάπτυξης M199, pH 2.0, και νέο μέσο M199 (απουσία ορού) προστέθηκε στα κύτταρα, για 5 λεπτά, ώστε να επιτραπεί η ανακύκλωση του ενεργοποιημένου υποδοχέα. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν, επεξεργάστηκαν για μικροσκοπία φθορισμού και αναλύθηκαν με μικροσκοπία TIRF. Υπό τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες, το σήμα που ανιχνεύεται αντιπροσωπεύει μόρια του επιφανειακού VEGFR2 τα οποία ανακυκλώθηκαν τουλάχιστον μια φορά στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μετά από την ενεργοποίηση των κυττάρων με τον VEGF. Η αριστερή εικόνα αντιπροσωπεύει κύτταρα ελέγχου της πειραματικής διάταξης (ανακύκλωση του VEGFR2 υπό αναστολή της δυναμίνης, απουσία VEGF).



Εικόνα 3.27 : Ανάλυση του εντοπισμού του ενεργοποιημένου VEGFR2 στα ενδοσώματα ανακύκλωσης, υπό την αναστολή του μονοπατιού της δυναμίνης. Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού του VEGFR2 σε ενδοθηλιακά κύτταρα που υπερεκφράζουν την πρωτεΐνη Rab4 συζευγμένη με την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, υπό αναστολή της δυναμίνης. Τα κύτταρα επεξεργάστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφεται στην εικόνα 3.24.

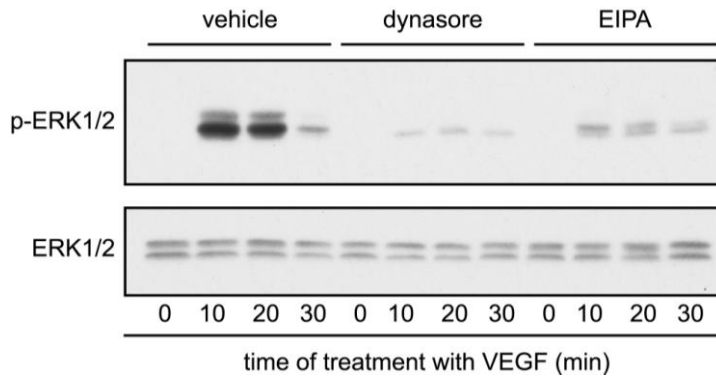
3.3.2 Η εξαρτώμενη από τη δυναμίνης ενδοκυττάρωση και η μακροπυνοκυττάρωση του VEGFR2 είναι απολύτως αναγκαία για τη μεταγωγή του σήματος και την επαγωγή της αγγειογένεσης

Ποια είναι λοιπόν η σημασία των δύο εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα; Προκειμένου να ελέγξουμε τη σημασία της ενδοκυττάρωσης στην ενεργοποίηση του ίδιου του VEGFR2, αναστείλαμε την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από το μονοπάτι της δυναμίνης ή της μακροπυνοκυττάρωσης ή και μέσω συνδυαστικής αναστολής των δύο μονοπατιών (μέσω των αναστολέων dynasore και EIPA) και ελέγξαμε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (μετά από ανασοκαταβύθιση του VEGFR2) το αποτέλεσμα της αναστολής της ενδοκυττάρωσης στην επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση του VEGFR2. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως μόνο η συνδυαστική αναστολή των δύο μονοπατιών ενδοκυττάρωσης είναι ικανή να αναστείλει την ενεργοποίηση του VEGFR2 (εικόνα 3.28). Κατά συνέπεια, ο VEGFR2 δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη.



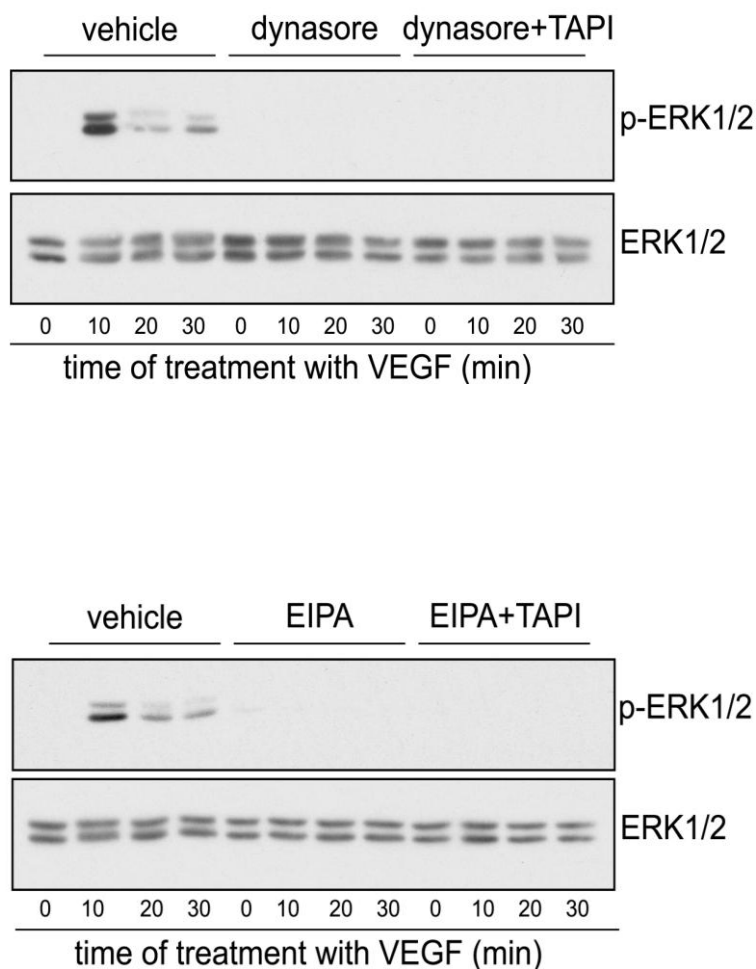
Εικόνα 3.28 : Ανάλυση της αναστολής της διαμεσολαβούμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης και της μακροπυνοκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού για 4 ώρες επωάστηκαν για 30 λεπτά με DMSO (vehicle) ή με τον αναστολέα dynasore ή με τον αναστολέα EIPA ή με συνδυασμό των δύο αναστολέων και ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για 5 λεπτά. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν και ο VEGFR2 ανοσοκαταβυθίστηκε με αντισώματα έναντι της κυτταροπλασματικής περιοχής του υποδοχέα. Ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης τυροσίνης αποκάλυψε την επίδραση της αναστολής της ενδοκυττάρωσης στη φωσφορυλίωση του VEGFR2. Η ισοφόρτωση των δειγμάτων ελέγχθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης με αντισώματα έναντι του VEGFR2.

Ωστόσο, προς έκπληξη μας, αν και η αναστολή της ενδοκυττάρωσης, είτε από το ένα μονοπάτι, είτε από το άλλο, δεν εμπόδισε τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα, η αναστολή της ενδοκυττάρωσης τόσο από το μονοπάτι της δυναμίνης όσο και από το μονοπάτι της μακροπυκνωκυττάρωσης ανέστειλε σχεδόν πλήρως την ενεργοποίηση της ERK1/2 (εικόνα 3.29).



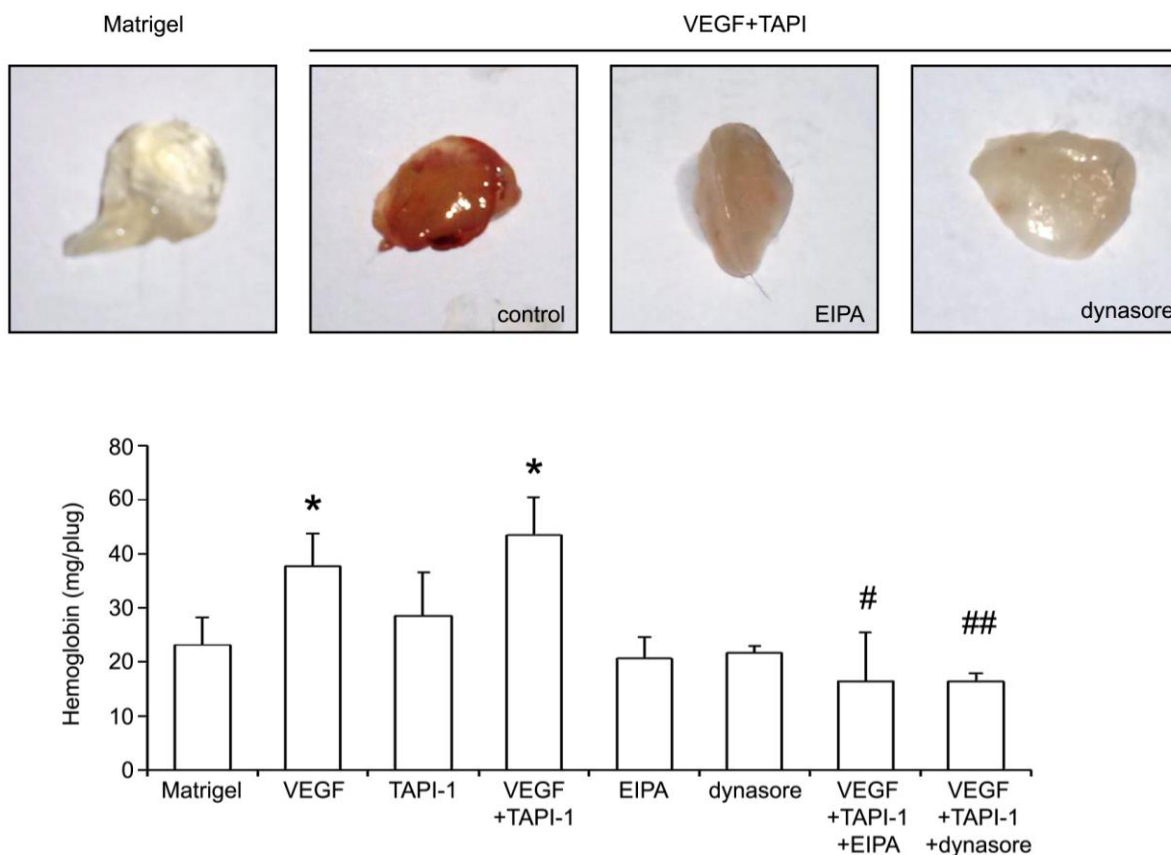
Εικόνα 3.29 : Ανάλυση της αναστολής της διαμεσολαβούμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης και της μακροπυκνωκυττάρωσης του VEGFR2 στην επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση της ERK1/2. Ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί στέρωση ορού για 2 ώρες επωάστηκαν για 30 λεπτά με DMSO (vehicle) ή με τον αναστολέα dynasore ή με τον αναστολέα EIPA και ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ERK1/2 και p-ERK1/2.

Η παρατηρούμενη αναστολή της σηματοδότησης δεν μπορεί να αποδοθεί στη σχάση του υποδοχέα καθώς, σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματά μας, μόνο παρατεταμένη χρονικά αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 (η οποία επάγει αποδοτική σχάση του υποδοχέα) οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης της ERK1/2 (βλέπε εικόνα 3.19). Πράγματι, προστασία του υποδοχέα από σχάση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, μέσω του αναστολέα TAPI-1, δεν είχε καμία επίδραση στη διαμεσολαβούμενη από την αναστολή της δυναμίνης ή της μακροπυκνωκυττάρωσης αναστολή της ενεργοποίησης της ERK1/2 (εικόνα 3.30).

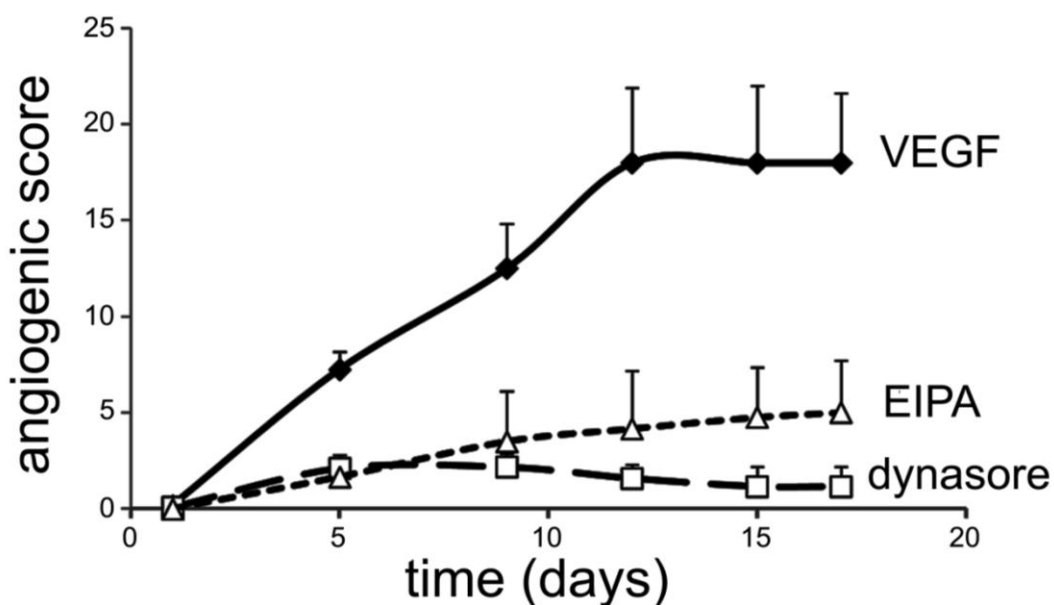
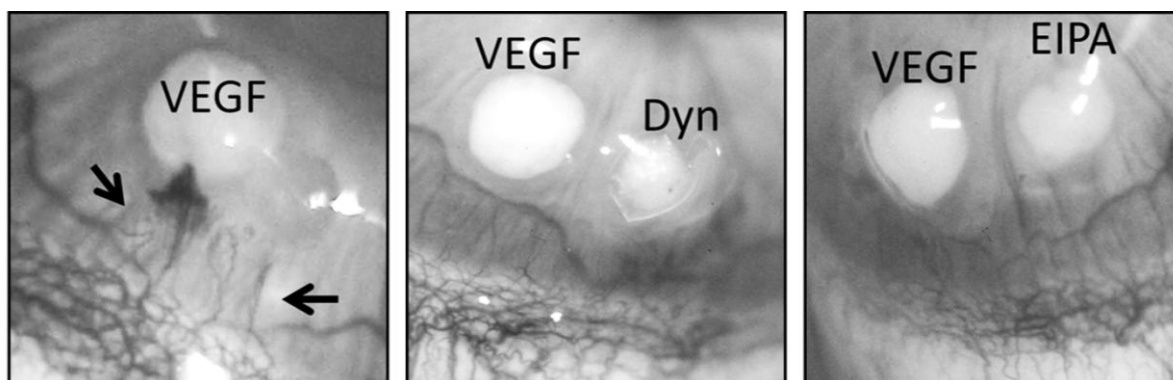


Εικόνα 3.30 : Ανάλυση της επίδρασης της αναστολής της σχάσης του VEGFR2 στη διαμεσολαβούμενη από την αναστολή της δυναμίνη ή της μακροπυκνωτικής αναστολή της φωσφορυλίωσης της ERK1/2. (επάνω) Ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού για 2 ώρες επωάστηκαν για 30 λεπτά με DMSO (vehicle, 4 πρώτες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση) ή με τον αναστολέα dynasore (4 μεσαίες διαδρομές) ή με τους αναστολείς dynasore + TAPI-1 (4 τελευταίες διαδρομές) και ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα. Στη συνέχεια, τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ERK1/2 και p-ERK1/2. (κάτω) Αντίστοιχη πειραματική πορεία ακολούθηθηκε και στην περίπτωση της αναστολής της μακροπυκνωτικής, μέσω του αναστολέα EIPA.

Σε πλήρη συμφωνία με τα παραπάνω βιοχημικά δεδομένα, *in vivo* πειράματα αγγειογένεσης σε ποντίκια (δοκιμασίες αγγειογένεσης σε ενθέματα Matrigel, εικόνα 3.31) και σε κουνέλια (δοκιμασίες αγγειογένεση στον οφθαλμό, εικόνα 3.32), σε συνεργασία με την ερευνητική ομάδα της M. Ziche (Πανεπιστήμιο της Σιένα, Ιταλία), έδειξαν ότι η εναλλακτική αναστολή των δυο μονοπατιών ενδοκυττάρωσης οδήγησε σε πλήρη αναστολής της επαγόμενης από τον VEGF αγγειογένεσης.



Εικόνα 3.31 : Ανάλυση της αναστολής της εξαρτώμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης και της μακροπικοκυττάρωσης του VEGFR2 στη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF επαγωγή της αγγειογένεσης σε ενθέματα Matrigel σε ποντίκια. (επάνω) Αντιπροσωπευτικές εικόνες ενθεμάτων Matrigel μετά από 7 ημέρες από την υποδόρια εμφύτευσή τους στη μέση ραχιαία περιοχή ποντικών. Το κόκκινο χρώμα αντιπροσωπεύει το βαθμό αιμάτωσης (αιμοσφαιρίνη) των ενθεμάτων. Η επαγόμενη από τον VEGF αγγειογένεση (σε συνδυασμό με την παρουσία του αναστολέα TAPI-1) αναστέλλεται υπό την αναστολή της δυναμίνης (dynasore) ή της μακροπικοκυττάρωσης (EIPA). (κάτω) Ποσοτικοποίηση της αιμοσφαιρίνης των ενθεμάτων Matrigel μετά από 7 ημέρες από τη εμφύτευσή τους ($n \geq 4 \pm SD$, * $P < 0.05$, προς ενθέματα μάρτυρες, # $P < 0.05$ και ## $P < 0.01$, προς ενθέματα VEGF + TAPI-1, ANOVA)

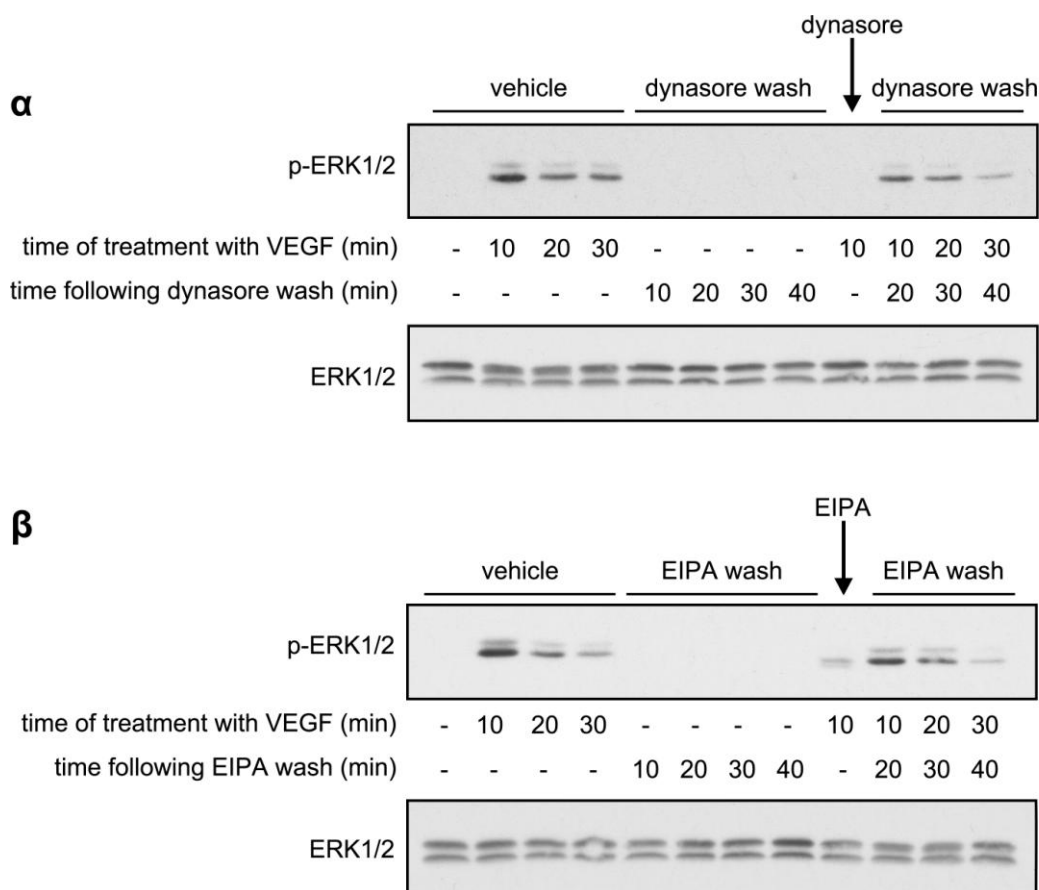


Εικόνα 3.32 : Ανάλυση της αναστολής της εξαρτώμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης και της μακροπινοκυττάρωσης στη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF επαγωγή της αγγειογένεσης σε οφθαλμούς κουνελιών. (επάνω) Αντιπροσωπευτικές εικόνες αγγειογένεσης σε οφθαλμούς κουνελιών υπό την παρουσία ενθεμάτων που περιέχουν VEGF. Τα βέλη στην αριστερή εικόνα δείχνουν νεο-σχηματιζόμενα αγγεία τα οποία κατευθύνονται προς το ένθεμα το οποίο περιέχει τον VEGF. Η αναστολή της ενδοκυττάρωσης μέσω αναστολής της δυναμίνης (ενθέματα dynasore, μεσαία εικόνα) ή της μακροπινοκυττάρωσης (ενθέματα EIPA, δεξιά εικόνα) αναστέλλει την επαγόμενη από τον VEGF αγγειογένεση. (κάτω, γράφημα) Ποσοτικοποίηση της αγγειογένεσης σε σχέση με το χρόνο επαγωγής με τον VEGF (σکور αγγειογένεσης, αριθμός νεο-σχηματιζόμενων αγγείων/mm²). $n \geq 4 \pm SEM$. Η επαγωγή ή η αναστολή της αγγειογένεσης είναι στατιστικά σημαντική μετά από την 5^η ημέρα της παρουσίας των ενθεμάτων στον οφθαλμό.

3.3.3 Ο VEGFR2 σηματοδοτεί από το μονοπάτι της μακροπτινοκυττάρωσης

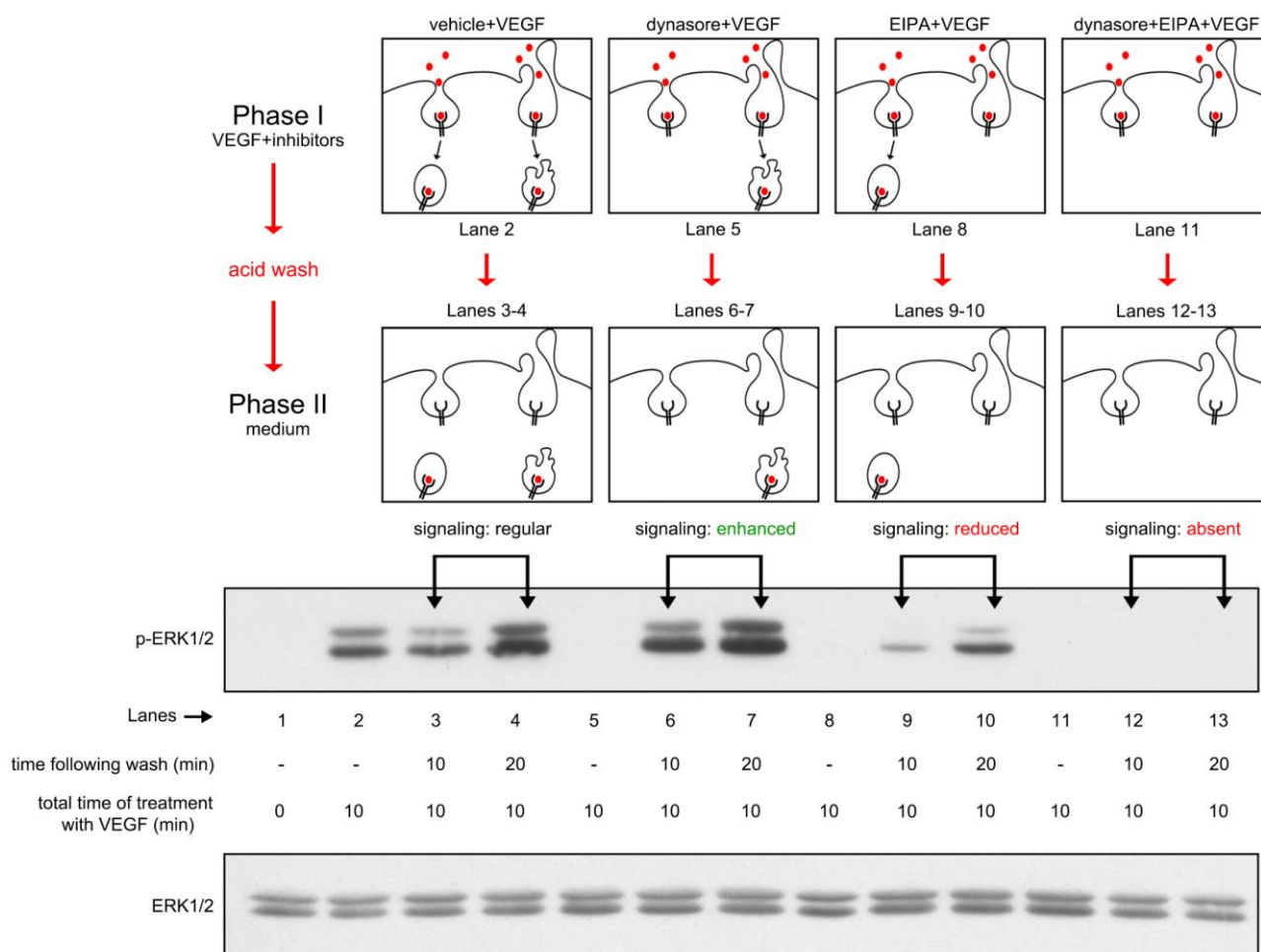
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το γεγονός πως και τα δύο μονοπάτια ενδοκυττάρωσης είναι απολύτως αναγκαία για την ενεργοποίηση της ERK1/2 προκαλεί έκπληξη διότι η εναλλακτική αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, είτε από το ένα μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, είτε από το άλλο, δεν αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση μεταξύ τους υποδηλώνουν πως η παρατηρούμενη αναστολή της σηματοδότησης του VEGFR2 πιθανά δεν είναι αποτέλεσμα της αναστολής της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα αυτού καθ' αυτού αλλά αποτέλεσμα της αναστολής της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας καθοδικών σηματοδοτικών μορίων. Σε όλες τις προηγούμενες μελέτες που εστιάζονταν στην αποσαφήνιση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης στη ρύθμιση της σηματοδότησης ενός υποδοχέα (τόσο του VEGFR2 όσο και όλων των άλλων υποδοχέων), εφόσον η αναστολή της ενδοκυττάρωσης από κάποιο μονοπάτι είχε ένα αποτέλεσμα στη μεταγωγή του σήματος (είτε θετικό, είτε αρνητικό) θεωρούνταν αυτόματα ότι η ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από το συγκεκριμένο μονοπάτι είναι αναγκαία για τη ρύθμιση της σηματοδότησής του. Το εναλλακτικό ενδεχόμενο ότι η αναστολή της κυκλοφορίας άλλων μορίων που εμπλέκονται στη σηματοδότηση του υποδοχέα, και όχι του ίδιου του υποδοχέα, είναι η αιτία της μεταβολής της σηματοδότησης, είχε παραβλεφθεί εντελώς. Προκειμένου να ελέγξουμε εάν η μεταγωγή του σήματος του VEGFR2 απαιτεί την κυκλοφορία του ίδιου του υποδοχέα ή την κυκλοφορία άλλων μορίων, αναπτύξαμε ένα πρωτόκολλο το οποίο μας επέτρεψε να διαχωρίσουμε αυτές τις δύο πιθανότητες, μέσω απεμπλοκής της δράσης των αναστολέων (dynasore και EIPA) στην ενδοκυττάρωση του VEGFR2, από την δράση τους στην κυκλοφορία άλλων μορίων. Από εδώ και στο εξής το πρωτόκολλο αυτό θα αναφέρεται ως πείραμα απεμπλοκής. Το πείραμα απεμπλοκής αποτελείται από δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση (φάση I), ο ενεργοποιημένος (παρουσία VEGF) υποδοχέας επιτρέπεται να ενδοκυτταρωθεί επιλεκτικά από το ένα από τα δύο μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, μέσω αναστολής του άλλου μονοπατιού με τον κατάλληλο χημικό αναστολέα. Συνεπώς, ο VEGFR2 μπορεί να ενεργοποιηθεί και εν δυνάμει να σηματοδοτήσει μόνο από το ελεύθερο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης (ανοιχτό μονοπάτι εισόδου). Στη συνέχεια, ο αναστολέας του άλλου μονοπατιού (κλειστό μονοπάτι εισόδου)

απομακρύνεται και τα κύτταρα πλένονται με όξινο διάλυμα ώστε να αποδεσμευθούν τα μόρια του VEGF που είναι συνδεδεμένα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τέλος, στη δεύτερη φάση (φάση II) τα κύτταρα επωάζονται με μέσο κυτταρικής ανάπτυξης (απουσία οποιουδήποτε αναστολέα και απουσία VEGF) έτσι ώστε όλα τα μόρια να μπορούν να ενδοκυτταρωθούν και να διακινηθούν ελεύθερα από όλα τα πιθανά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης και να συνεισφέρουν στη μεταγωγή της σήματος, σύμφωνα με τη λειτουργία τους. Η όξινη πλύση μεταξύ των δύο φάσεων για την αφαίρεση του συνδεδεμένου VEGF στη μεμβράνη των κυττάρων (σε σύμπλεγμα με τον VEGFR2) εξασφαλίζει ότι, μετά την απομάκρυνση του αναστολέα και κατά συνέπεια την απελευθέρωση του κλειστού μονοπατιού εισόδου, ο VEGFR2 δεν θα μπορέσει να ενδοκυτταρωθεί και να ενεργοποιηθεί από αυτό το μονοπάτι (η ενεργοποίηση του VEGFR2 δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί στη μεμβράνη, βλέπε εικόνα 3.28). Συνεπώς, υπό αυτές τις συνθήκες, ο VEGFR2 θα μπορέσει εν δυνάμει να σηματοδοτήσει μόνο από το μονοπάτι που ενδοκυτταρώθηκε κατά την πρώτη φάση του πειράματος, δηλαδή από το ανοιχτό μονοπάτι εισόδου. Η παραπάνω δοκιμασία μπορεί να λειτουργήσει μόνο υπό την προϋπόθεση της ταχείας, αντιστρεπτής αναστολής των χημικών αναστολέων των δύο μονοπατιών ενδοκυττάρωσης (dynasore και EIPA), μετά την απομάκρυνσή τους από τα κύτταρα κατά τη δεύτερη φάση του πειράματος. Για να ελέγξουμε την αντιστρεπτή δράση των χημικών αναστολέων, ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τους αναστολείς (ώστε να επιτευχθεί αρχικά η αναστολή της ενδοκυττάρωσης) ενεργοποιήθηκαν με VEGF, 10 λεπτά μετά την απομάκρυνση των αναστολέων από τα κύτταρα. Ανάλυση των κυτταρικών εκχυλισμάτων μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western έδειξε πως, υπό τις παραπάνω συνθήκες, το πρότυπο ενεργοποίησης της ERK1/2 στα κύτταρα που αφαιρέθηκαν οι αναστολείς, δεν διέφερε από το πρότυπο και την ένταση ενεργοποίησης της πρωτεΐνης σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (εικόνα 3.33, τελευταίες 3 διαδρομές σε σύγκριση με τις 4 πρώτες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση). Παράλληλα η παρατηρούμενη ενεργοποίηση της ERK1/2 ήταν ειδικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των κυττάρων από τον VEGF καθώς, μετά την απομάκρυνση των αναστολέων και απουσία VEGF, δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 (εικόνα 3.33, 4 μεσαίες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση).



Εικόνα 3.33 : Ανάλυση της αντιστρεπτής δράσης των αναστολέων dynasore και EIPA μέσω ελέγχου της επαγόμενης από τον VEGF φωσφορυλίωσης της ERK1/2. (α) Ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί στέρωση ορού για 2 ώρες επωάστηκαν για 30 λεπτά με τον αναστολέα dynasore. Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν και το μέσο ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με νέο μέσο M199, απουσία ορού. 10 λεπτά μετά την αντικατάσταση του μέσου κυτταρικής ανάπτυξης, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF για τα παραπάνω χρονικά διαστήματα, λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της ERK1/2 και p-ERK1/2 (3 τελευταίες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση). Οι υπόλοιπες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση αποτελούν δείγματα ελέγχου της πειραματικής διάταξης και περιγράφονται ακολούθως: κύτταρα μάρτυρες τα οποία είχαν επωαστεί με DMSO (vehicle, 4 πρώτες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση) ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για τους ίδιους χρόνους με τα κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον αναστολέα dynasore, και επεξεργάστηκαν παράλληλα (δείγματα σύγκρισης του προτύπου και της έντασης της φωσφορυλίωσης της ERK1/2). Οι 4 μεσαίες διαδρομές στην ανοσοαποτύπωση αντιπροσωπεύουν δείγματα από κύτταρα τα οποία επωάστηκαν με τον αναστολέα dynasore αλλά, μετά την αφαίρεση του αναστολέα, δεν ακολούθησε ενεργοποίηση με VEGF (δείγματα ελέγχου της ειδικότητας της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 από τον VEGF). Τα κύτταρα αυτά λύθηκαν στους ίδιους χρόνους με τα κύτταρα τα οποία είχαν επωαστεί με τον VEGF. Η 9^η διαδρομή στην ανοσοαποτύπωση αντιπροσωπεύει δείγμα από κύτταρα τα οποία ενεργοποιήθηκαν με VEGF παρουσία του αναστολέα dynasore (δείγμα ελέγχου της λειτουργικότητας του αναστολέα). **(β)** Ίδια πειραματική πορεία ακολούθηθηκε και στην περίπτωση του ελέγχου της αντιστρεπτής δράσης του αναστολέα EIPA.

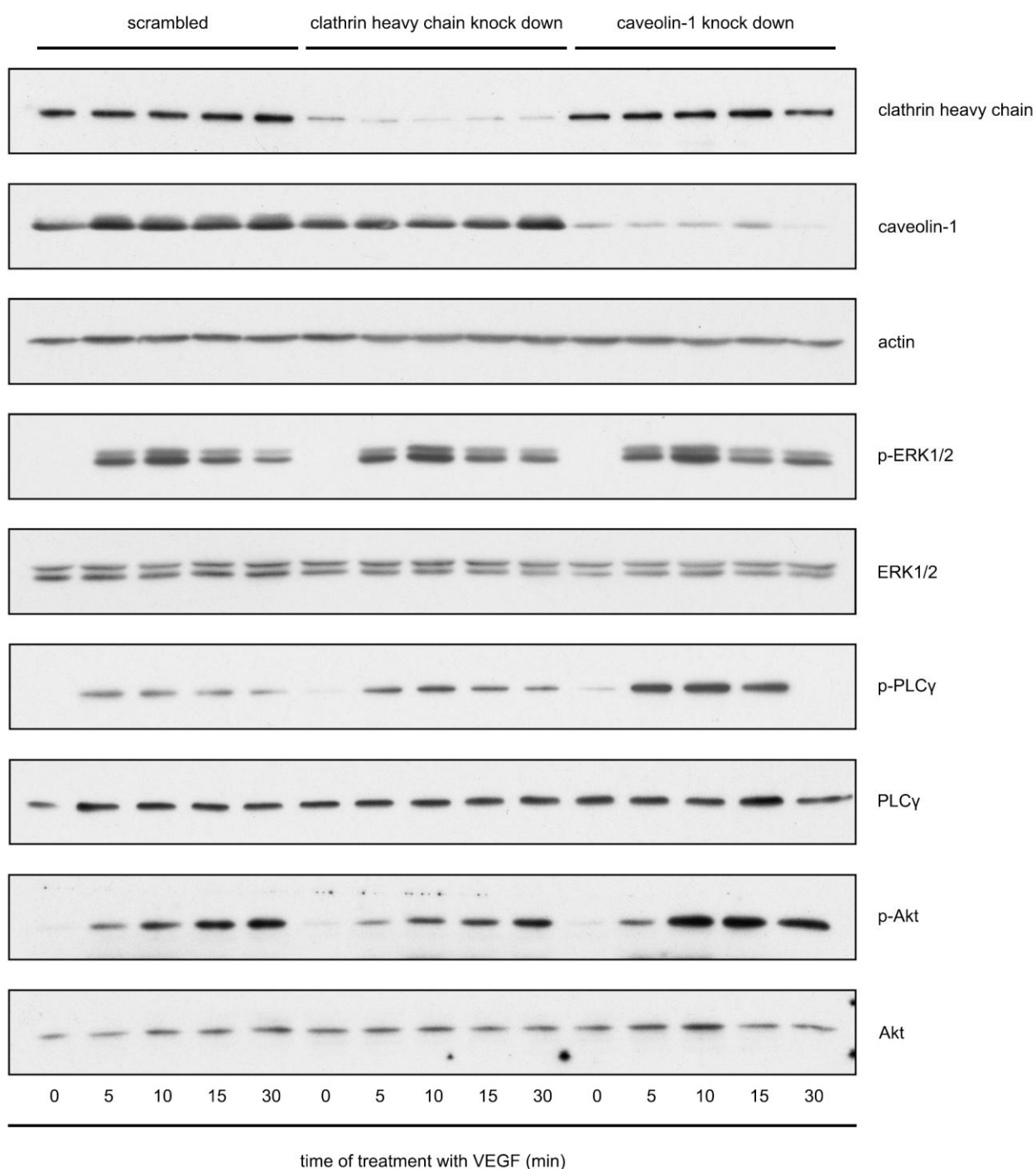
Η ταχεία αντιστρεπτή δράση των αναστολέων μας επέτρεψε να εφαρμόσουμε το πείραμα απεμπλοκής και να αποσαφηνίσουμε τη σημασία της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 από τη σημασία της κυκλοφορίας άλλων μορίων στη σηματοδότηση του υποδοχέα. Σε αυτό το σημείο ελέγξαμε πρώτα τη σημασία της μακροπυκνωκυττάρωσης μέσω αναστολής του μονοπατιού της δυναμίνης. Αρχικά, τα κύτταρα επώαστηκαν με τον αναστολέα dynasore ώστε να αναστείλουμε την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης. Εν' συνεχεία, τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF για 10 λεπτά (παρουσία του αναστολέα) ώστε να επάγουμε την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από το μονοπάτι της μακροπυκνωκυττάρωσης (εικόνα 3.34, φάση I). Ακολούθως, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο διάλυμα ώστε να αφαιρέσουμε τον επιφανειακά συνδεδεμένο VEGF και το μέσο επώασης αντικαταστάθηκε με φρέσκο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυττάρων. 10 και 20 λεπτά μετά την αντικατάσταση του θρεπτικού υλικού, τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανάλυση μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western για την ανίχνευση της φωσφορυλιωμένης μορφής της πρωτεΐνης ERK1/2 (εικόνα 3.34, φάση II). Κατά αντιστοιχία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις μας, η παρουσία του αναστολέα dynasore κατά την πρώτη φάση του πειράματος είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της διαμεσολαβούμενης από τον VEGF ενεργοποίησης της ERK1/2 (διαδρομή 5). Ωστόσο, 10 και 20 λεπτά μετά την απομάκρυνση του αναστολέα και του VEGF ανιχνεύθηκε ένα ισχυρό σήμα της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 (διαδρομές 6, 7), σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (vehicle). Εφόσον, κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF το μονοπάτι της μακροπυκνωκυττάρωσης ήταν το μόνο διαθέσιμο μονοπάτι εισόδου του VEGFR2, η παρατηρούμενη ενεργοποίηση της ERK1/2 μπορεί να αποδοθεί μόνο σε σηματοδότηση του VEGFR2 από τα μακροπυκνωσώματα. Συνεπώς, η αναστολή της ενεργοποίησης της ERK1/2, η οποία παρατηρείται κατά την παρουσία του αναστολέα της δυναμίνης, δεν μπορεί να αποδοθεί στην αναστολή της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης αλλά στην παρεμπόδιση της κυκλοφορίας άλλων μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό καταρράκτη της ERK1/2.



Εικόνα 3.34 : Πείραμα απεμπλοκής. (φάση I) Ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία είχαν υποστεί στέρηση ορού για 2 ώρες επώαστηκαν για 30 λεπτά με DMSO (vehicle) ή με τον αναστολέα dynasore ή με τον αναστολέα EIPA η συνδυαστικά με τους αναστολείς dynasore και EIPA. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης με τους αναστολείς, τα κύτταρα επώαστηκαν με VEGF για 10 λεπτά (παρουσία των αναστολέων) ώστε να επαχθεί η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από τα ανοιχτά μονοπάτια εισόδου. Ακολούθως, τα κύτταρα πλύθηκαν με όξινο μέσο M199, pH 2.0, προκειμένου να αποδεσμευτεί ο επιφανειακά συνδεδεμένος VEGF και το μέσο κυτταρικής ανάπτυξης αντικαταστάθηκε με νέο, απουσία ορού, αναστολέων και VEGF (τέλος φάσης I → έναρξης φάσης II) ή τα κύτταρα λύθηκαν αμέσως μετά την όξινη πλύση (δείγματα ελέγχου της λειτουργικότητας των αναστολέων, διαδρομές 2, 5, 8 και 11 στην ανοσοαποτύπωση). **(φάση II)** 10 και 20 λεπτά μετά την αντικατάσταση του μέσου κυτταρικής ανάπτυξης, τα κύτταρα λύθηκαν και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών ERK1/2 και p-ERK1/2.

Όταν ακολουθήσαμε την ίδια πειραματική πορεία υπό την αναστολή της μακροπιννοκυττάρωσης (μέσω του αναστολέα EIPA) και συνεπώς, επιτρέψαμε την ενδοκυττάρωση του VEGFR2 μόνο από το μονοπάτι της δυναμίνης, παρατηρήσαμε ότι, 10 και 20 λεπτά μετά την απομάκρυνση του αναστολέα και του VEGF, ανιχνεύθηκε ένα ασθενές σήμα της p-ERK1/2 (εικόνα 3.34, διαδρομές 9, 10), σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Κατά συνέπεια, αντίθετα με τη μέχρι τώρα πεποίθηση, η ικανότητα σηματοδότησης του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης είναι περιορισμένη σε σχέση με την ικανότητα σηματοδότησης του υποδοχέα μέσω της μακροπιννοκυττάρωσης. Τέλος, συνδυαστική αναστολή και των δύο μονοπατιών ενδοκυττάρωσης ανέστειλε πλήρως τη φωσφορυλίωση της ERK1/2 (εικόνα 3.34, διαδρομές 12, 13) επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα μας σχετικά με το ρόλο της ενδοκυττάρωσης στη φωσφορυλίωση του VEGFR2 δηλαδή ότι ο VEGFR2 ενεργοποιείται μόνο στα ενδοσώματα και δεν μπορεί να σηματοδοτήσει από την κυτταροπλασματική μεμβράνη.

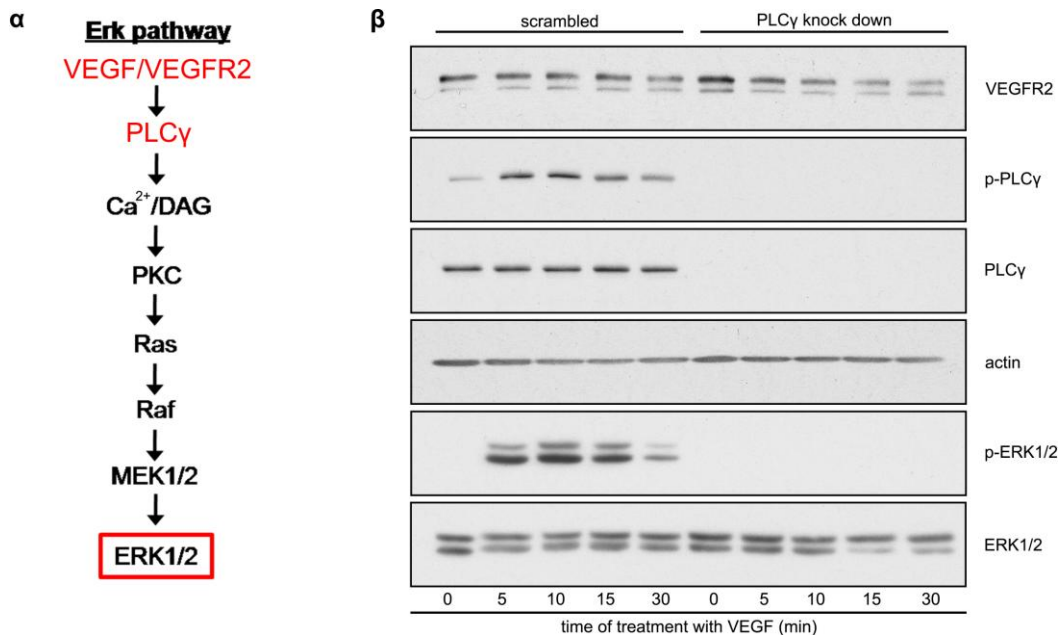
Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και μέσω αναστολής της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 από τα δύο κύρια μονοπάτια ενδοκυττάρωσης που ελέγχονται από τη δυναμίνη, το εξαρτώμενο από κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης και το μονοπάτι των caveolae. Αναστολή είτε του εξαρτώμενου από κλαθρίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης είτε της ενδοκυττάρωσης από τα caveolae, μέσω αποσιώπησης της κλαθρίνης και της καβεολίνης-1, αντίστοιχα (μέσω χρήσης siRNAs), δεν μπόρεσε να αναστείλει τη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση των καθοδικών μορίων της σηματοδότησης του VEGFR2 (εικόνα 3.35). Συμπερασματικά, σε αντίθεση με τη μέχρι σήμερα θεωρία^{73,74,94,95,115}, ο ρόλος της δυναμίνης στη σηματοδότηση του VEGFR2 είναι ανεξάρτητος από τη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα. Επιπλέον, η μεταγωγή του σήματος πραγματοποιείται από ένα άγνωστο μέχρι σήμερα μονοπάτι ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, το μονοπάτι της μακροπιννοκυττάρωσης.



Εικόνα 3.35 : Ανάλυση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 από το μονοπάτι της κλαθρίνης ή των caveolae στη σηματοδότηση του υποδοχέα. Ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της βαριάς αλυσίδας της κλαθρίνης (clathrin heavy chain knock down) ή της καβεολίνης-1 (caveolin-1 knock down), μέσω διαμόλυνσης των κυττάρων με siRNAs, υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες και εν' συνεχεία, επώαστηκαν με VEGF για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι της κλαθρίνης, της καβεολίνης-1 και της ακτίνης και των ολικών και φωσφορυλιωμένων μορφών των πρωτεϊνών ERK1/2, PLCγ και Akt.

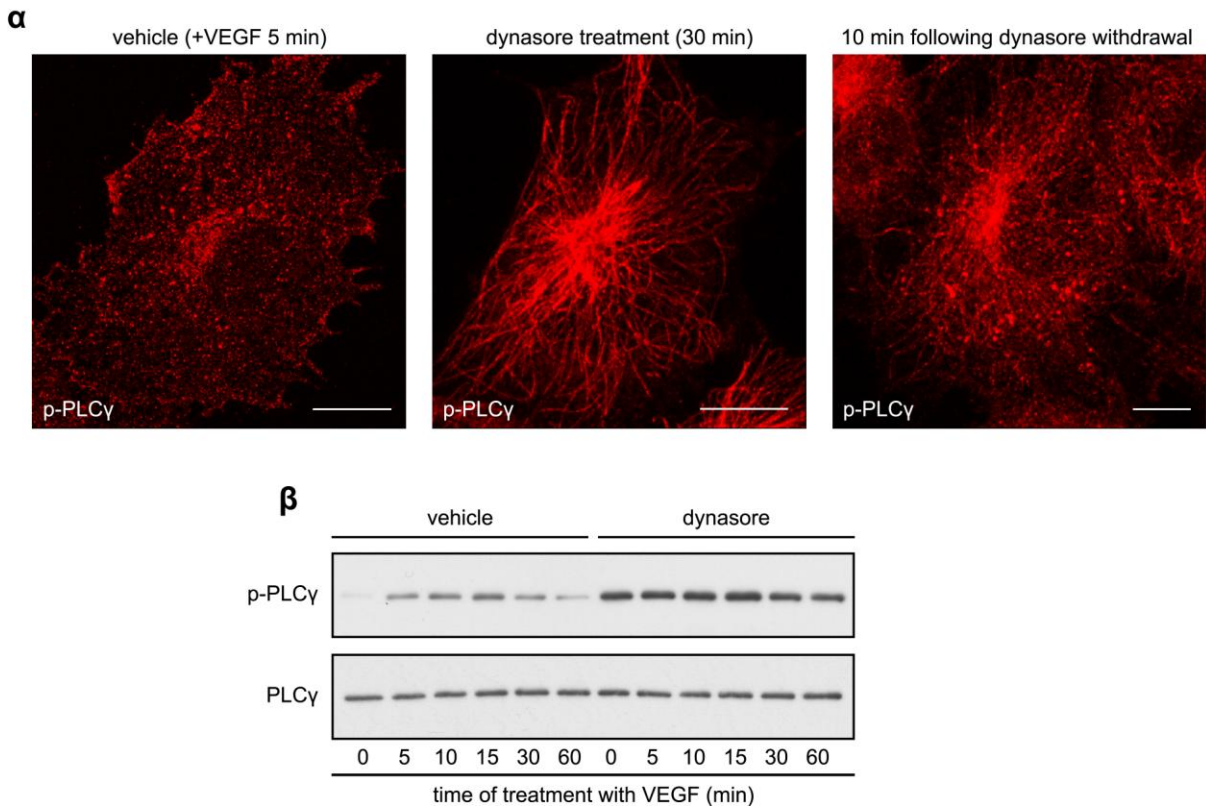
3.3.4 Η αναστολή της δυναμίνης αναστέλλει την ενεργοποίηση της ERK1/2 μέσω παρεμπόδισης της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του καθοδικού σηματοδοτικού μορίου PLC γ

Εφόσον η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης δεν είναι απαραίτητη για τη μεταγωγή του σήματος του υποδοχέα, το ερώτημα που δημιουργείται είναι πώς η δυναμίνη ελέγχει την ενεργοποίηση της ERK1/2. Δεδομένου ότι τα μόρια που συμμετέχουν στη σηματοδότηση του VEGFR2 υφίστανται επίσης ενδοκυττάρωση και ενδοκυτταρική κυκλοφορία, υποθέσαμε πως ένα μόριο καθοδικά του VEGFR2 και ανοδικά της ERK1/2 πιθανά να επηρεάζεται από την αναστολή της δυναμίνης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο σηματοδοτικό καταρράκτη του μονοπατιού της ERK1/2 το πρώτο μόριο το οποίο ενεργοποιείται από τον VEGFR2 είναι η PLC γ ^{22,25,116} (εικόνα 3.36α), ελέγξαμε την πιθανότητα πως η πρωτεΐνη αυτή επηρεάζεται από την αναστολή της δυναμίνης. Πράγματι, αποσιώπηση της PLC γ με siRNAs ανέστειλε πλήρως την επαγόμενη από τον VEGF ενεργοποίηση της ERK1/2, επιβεβαιώνοντας πως η PLC γ είναι απολύτως αναγκαία για την ενεργοποίηση της ERK1/2 (εικόνα 3.36β).



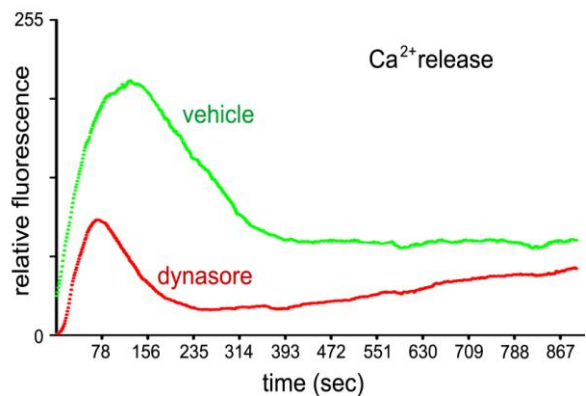
Εικόνα 3.36 : (α) Σηματοδοτικός καταρράκτης της ERK1/2. (β) Ενδοθηλιακά κύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε αποσιώπηση της PLC γ , μέσω διαμόλυνσης των κυττάρων με siRNAs, υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες και εν' συνεχεία, επωάστηκαν με VEGF διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν και πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών VEGFR2, PLC γ , p-PLC γ , ERK, p-ERK1/2 και ακτίνη.

Όταν ελέγξαμε με μικροσκοπία φθορισμού το ενδοκυτταρικό πρότυπο κατανομής της ενεργοποιημένης μορφής της PLCγ (μετά από σύντομη ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF) παρατηρήσαμε ότι η πρωτεΐνη φέρει κυστιδική μορφολογία και κατανέμεται σε όλο το εύρος του κυττάρου (εικόνα 3.37α, αριστερά). Προς έκπληξή μας, η αναστολή της δυναμίνης (μέσω του αναστολέα dynasore) οδήγησε σε ισχυρή ενεργοποίηση της PLCγ (απουσία VEGF), στην απώλεια του κυστιδικού φαινοτύπου της πρωτεΐνης, στον περιπυρηνικό εντοπισμό της καθώς και στον εντοπισμό της σε ινώδεις δομές οι οποίες διατρέχουν όλο κύτταρο (εικόνα 3.37α, μέση). Η μη ειδική ενεργοποίηση της PLCγ μέσω της αναστολής της δυναμίνης επαληθεύτηκε και με ανοσοαποτύπωσης κατά Western (εικόνα 3.37β). Μάλιστα, η παρουσία του VEGF δεν είχε καμία επίδραση στο πρότυπο της ήδη ενεργοποιημένης PLCγ, σε σύγκριση με το πρότυπο ενεργοποίησης στα κύτταρα μάρτυρες (vehicle). Παράλληλα, όταν ελέγξαμε την επαγόμενη από τον VEGF έκκριση του ασβεστίου, το επόμενο σηματοδοτικό μόριο μετά την PLCγ στο σηματοδοτικό καταρράκτη της ERK1/2, διαπιστώσαμε πως, αν και η PLCγ ήταν ήδη ενεργοποιημένη, η παρουσία του VEGF δεν μπόρεσε να επάγει την έκκριση του Ca^{2+} (εικόνα 3.38). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν περαιτέρω ότι ο ρόλος της δυναμίνης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2 είναι ανεξάρτητος από το ρόλο της πρωτεΐνης στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα. Πράγματι, απεμπλοκή της αναστολής της δυναμίνης μέσω αφαίρεσης του αναστολέα dynasore από τα κύτταρα (κατά αντιστοιχία με την φάση II του πειράματος απεμπλοκής) οδήγησε σε σταδιακή αλλαγή του φαινοτύπου του ενδοκυτταρικού σήματος της PLCγ και στη μετάβαση του προτύπου κατανομής της πρωτεΐνης από ινώδες σε κυστιδικό (εικόνα 3.37α, δεξιά), επιβεβαιώνοντας πως ο ρόλος της δυναμίνης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2 έγκειται στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας της PLCγ και όχι του ίδιου του υποδοχέα.



Εικόνα 3.37 : Ανάλυση της ρόλου της δυναμίνης στον ενδοκυτταρικό εντοπισμό και τη φωσφορυλίωση της PLCγ. (α) Συνεσιακή μικροσκοπία φθορισμού της φωσφορυλιωμένης PLCγ σε ενδοθηλιακά κύτταρα. (αριστερά) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της p-PLCγ σε κύτταρα μάρτυρες (vehicle), μετά από 5 λεπτά ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF. (μέση) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της p-PLCγ μετά από 30 λεπτά επώασης των κυττάρων με τον αναστολέα dynasore (απουσία VEGF). (δεξιά) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της p-PLCγ μετά από 10 λεπτά από την αφαίρεση του αναστολέα dynasore. Η απομάκρυνση του αναστολέα οδηγεί στη μετάβαση του πρότυπου του εντοπισμού της p-PLCγ από ινώδες σε κυστιδικό, αντίστοιχα με το πρότυπο που παρατηρείται στα κύτταρα μάρτυρες (σύγκριση αριστερής και δεξιάς εικόνας). Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm. (β) Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την PLCγ. Ενδοθηλιακά κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες, επώαστηκαν για 30 λεπτά με τον αναστολέα dynasore και ενεργοποιήθηκαν με VEGF για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν και η PLCγ/p-PLCγ αποκαλύφθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης με τα κατάλληλα αντισώματα.

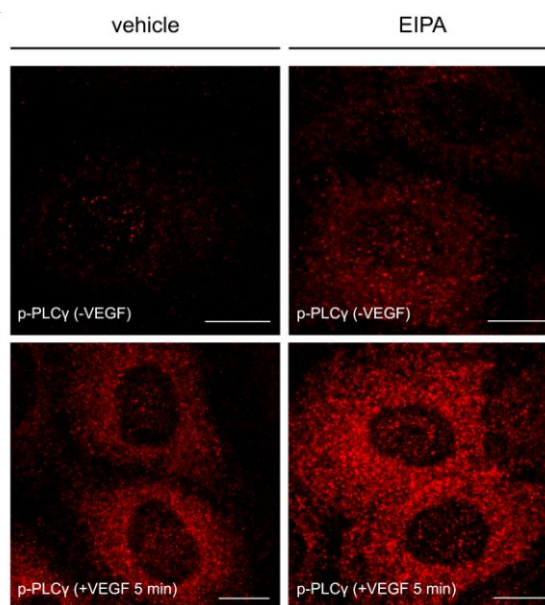
Εικόνα 3.38 : Ανάλυση της επαγόμενης από τον VEGF έκκρισης Ca^{2+} υπό την αναστολή της δυναμίνης. Κύτταρα μάρτυρες (vehicle) ή κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον αναστολέα dynasore (30 λεπτά), επώαστηκαν με το δείκτη του ενδοκυτταρικού ασβεστίου FLUO4-AM και ενεργοποιήθηκαν με VEGF. Η μεταβολή του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} καταγράφηκε μέσω συνεσιακής μικροσκοπίας φθορισμού (λήψη εικόνων κάθε 1.3 sec). Η ένταση φθορισμού των εικόνων αναλύθηκε με το λογισμικό ImageJ για την κατασκευή του γραφήματος.

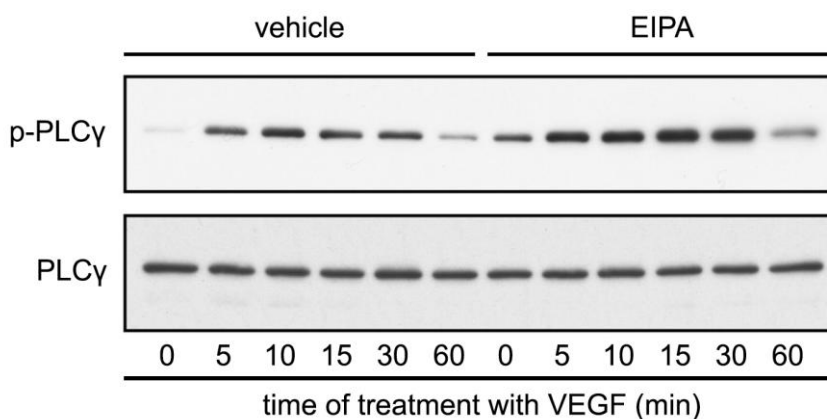


Αντίστοιχα με το ερώτημα που αφορούσε το ρόλο της δυναμίνης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2, διερωτηθήκαμε εάν η αναστολή της μεταγωγής του σήματος του VEGFR2 κατά την αναστολή της μακροπυνοκυττάρωσης οφείλεται επίσης στον έλεγχο της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των καθοδικών μορίων της σηματοδότησης του υποδοχέα. Κατά αντιστοιχία με την ανάλυση που πραγματοποιήσαμε στην προσπάθειά μας να κατανοήσουμε το μηχανισμό ελέγχου της μεταγωγής του σήματος από την δυναμίνη, πραγματοποιήσαμε παρόμοια ανάλυση υπό την αναστολή αυτή τη φορά της μακροπυνοκυττάρωσης. Ανάλυση της ενδοκυτταρικής κατανομής της PLC γ , μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού, και ανάλυση του προτύπου ενεργοποίησης της πρωτεΐνης από τον VEGF, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western, απέδειξε ότι η αναστολή της μακροπυνοκυττάρωσης (μέσω του αναστολέα EIPA) δεν είχε επίδραση στο πρότυπο της ενδοκυτταρικής κατανομής (εικόνα 3.39) και στο πρότυπο ενεργοποίησης της πρωτεΐνης (εικόνα 3.40), σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες (vehicle). Μάλιστα, η αναστολή της μακροπυνοκυττάρωσης δεν εμπόδισε τη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF έκκριση του ασβεστίου (εικόνα 3.41). Συνεπώς, ο τρόπος με τον οποίο η μακροπυνοκυττάρωση εμπλέκεται στη σηματοδότηση του VEGFR2 αφορά τη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα και όχι της κυκλοφορίας της PLC γ .

Εικόνα 3.39 : Ανάλυση του ενδοκυτταρικού εντοπισμού της φωσφορυλιωμένης PLC γ υπό την αναστολή τη μακροπυνοκυττάρωσης.

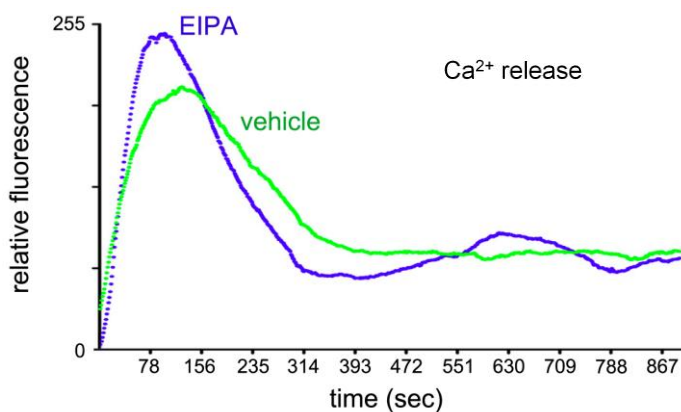
Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού της φωσφορυλιωμένης PLC γ σε ενδοθηλιακά κύτταρα. (αριστερά) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της p-PLC γ ο κύτταρα μάρτυρες (vehicle), απουσία (επάνω) παρουσία VEGF κάτω, μετά από 5 λεπτά ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF. (δεξιά) Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της p-PLC γ μετά απ 30 λεπτά επώασης των κυττάρων με το αναστολέα EIPA, απουσία VEGF (επάνω) ή μετ από 5 λεπτά ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF (κάτω). Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μ m.



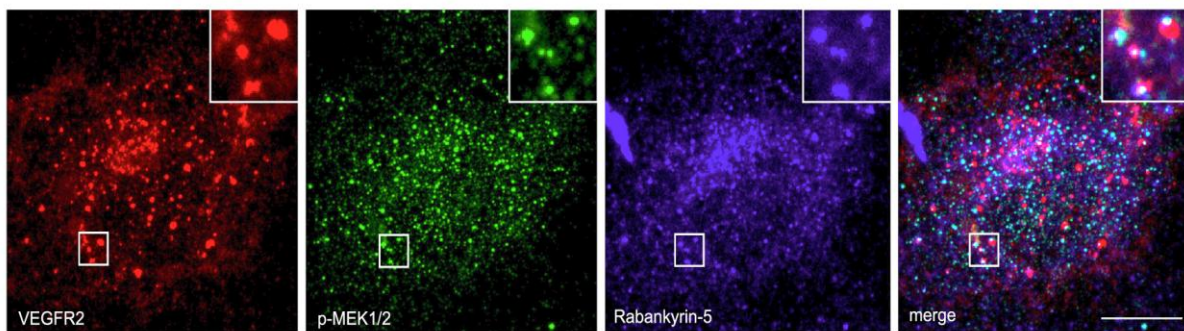


Εικόνα 3.40 : Ανάλυση της επαγόμενης από τον VEGF φωσφορυλίωσης της PLCγ, υπό την αναστολή της μακροπινουκτάρωσης. Ανοσοαποτύπωση κατά Western για την PLCγ υπό αναστολή της μακροπινουκτάρωσης. Ενδοθηλιακά κύτταρα υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες, επωάστηκαν για 30 λεπτά με τον αναστολέα EIPA και ενεργοποιήθηκαν με VEGF, για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθως, τα κύτταρα λύθηκαν και η PLCγ/p-PLCγ αποκαλύφθηκε μέσω ανοσοαποτύπωσης με τα κατάλληλα αντισώματα.

Εικόνα 3.41 : Ανάλυση της επαγόμενης από τον VEGF έκκρισης Ca^{2+} , υπό την αναστολή της μακροπινουκτάρωσης. Κύτταρα μάρτυρες (vehicle) ή κύτταρα που είχαν επωαστεί με τον αναστολέα EIPA (30 λεπτά), επωάστηκαν με το δείκτη του ενδοκυτταρικού ασβεστίου FLUO4-AM και ενεργοποιήθηκαν με VEGF. Η μεταβολή του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} καταγράφηκε μέσω συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού (λήψη εικόνων κάθε 1.3 sec). Η ένταση φθορισμού των εικόνων αναλύθηκε με το λογισμικό ImageJ για την κατασκευή του γραφήματος.

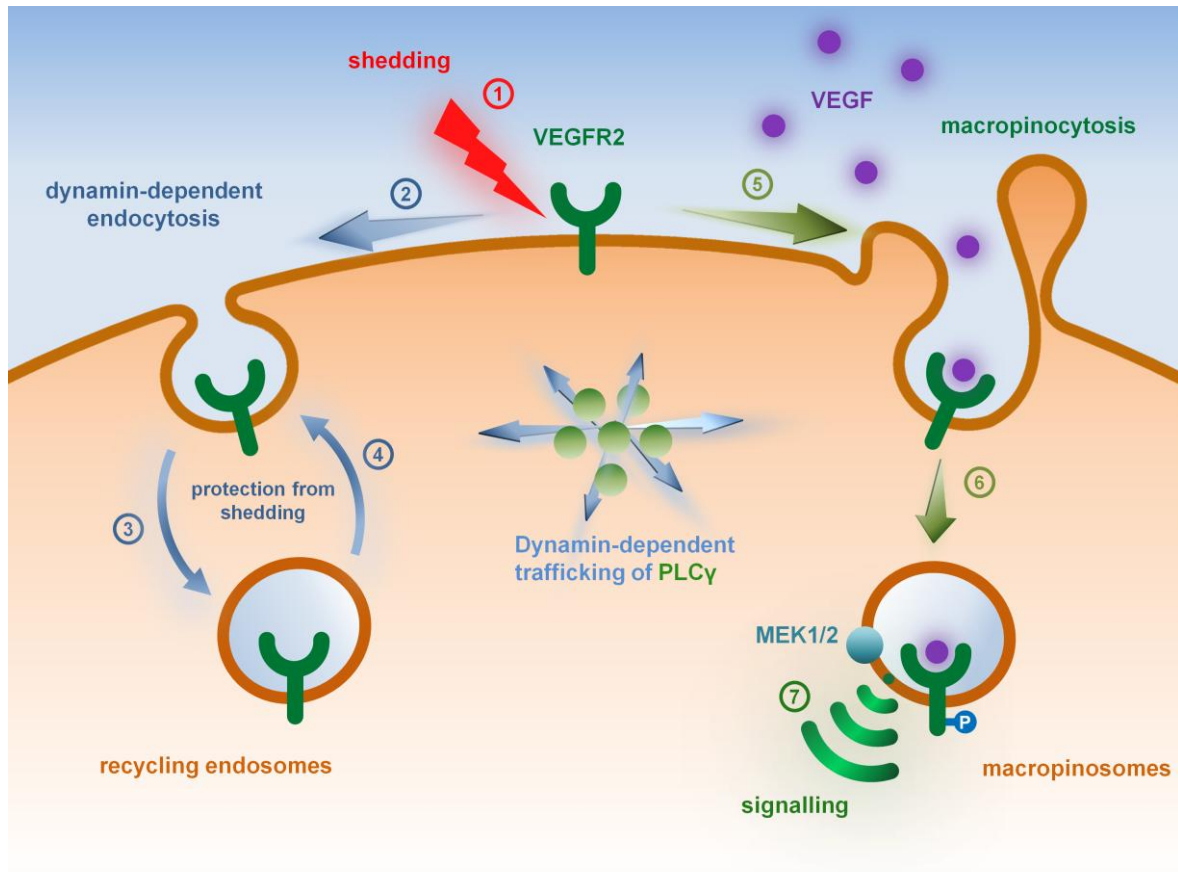


Λαμβάνοντας υπόψη τα μέχρι τώρα δεδομένα καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η μακροπυκνότητα του VEGFR2 αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την προώθηση της σηματοδότησης του υποδοχέα. Το τελευταίο ερώτημα που προκύπτει αφορά το λόγο για τον οποίο ο υποδοχέας πρέπει να ενδοκυτταρωθεί ειδικά από το μονοπάτι της μακροπυκνότητας και όχι από το μονοπάτι της δυναμίνης το οποίο αποτελεί επίσης ένα κύριο μονοπάτι εισόδου του VEGFR2. Καθώς τα ενδοσώματα αποτελούν κέντρο διαμερισματοποίησης της σηματοδότησης, είναι πιθανό ο VEGFR2 να αλληλεπιδρά ειδικά με καθοδικά σηματοδοτικά μόρια στα μακροπυκνωσώματα. Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού αποκάλυψε πως, μετά την ενεργοποίηση του από τον VEGF, ο VEGFR2 συνεντοπίζεται με το καθοδικό σηματοδοτικό μόριο MEK1/2 (το οποίο βρίσκεται ανοδικά της ERK1/2 στο σηματοδοτικό καταρράκτη, βλέπε εικόνα 3.36α) σε ενδοσώματα θετικά για την πρωτεΐνη Rabankyrin-5 (εικόνα 3.42).



Εικόνα 3.42 : Ανάλυση του συνεντοπισμού του VEGFR2 με το καθοδικό σηματοδοτικό μόριο p-MEK1/2 στα μακροπυκνωσώματα. Συνεστιακή μικροσκοπία φθορισμού του VEGFR2, της p-MEK1/2 και της Rabankyrin-5 σε ενδοθηλιακά κύτταρα, μετά από 5 λεπτά ενεργοποίησης των κυττάρων με VEGF. Επιλεγμένες περιοχές του συνεντοπισμού του VEGFR2 με τη p-MEK1/2 και τη Rabankyrin-5 παρουσιάζονται μεγεθυμένες στα λευκά τετράγωνα εντός των εικόνων (επάνω δεξιά). Οι μπάρες κλίμακας των εικόνων αντιστοιχούν σε 10 μm .

Συμπερασματικά, καταλήγουμε πως η διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση της ERK1/2 απαιτεί (i) την μακροπυκνότητα και εντοπισμό του VEGFR2 στα μακροπυκνωσώματα και (ii) τη διαμεσολαβούμενη από την δυναμίνη ενδοκυτταρική κυκλοφορία της PLC γ , ανεξάρτητα από τον ευρέως καθιερωμένο ρόλο της δυναμίνης στη ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης πρωτεϊνών από την κυτταροπλασματική μεμβράνη (εικόνα 3.43).



Εικόνα 3.43 : Γραφική απεικόνιση της κυτταρικής κυκλοφορίας και της σηματοδότησης του **VEGFR2**. Υπό κατάσταση ηρεμίας, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων (2, 3 και 4 στην απεικόνιση). Οι συνεχόμενοι κύκλοι ενδοκυττάρωσης και ανακύκλισης του VEGFR2 προστατεύουν τον υποδοχέα από σχάση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (1). Ο VEGF εισαγάγει την μακροπinoκυττάρωση ως εναλλακτικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 (5, 6). Η μακροπinoκυττάρωση του VEGFR2 είναι απαραίτητη για τη φωσφορυλίωση του υποδοχέα και τη μεταγωγή του σήματος (7). Ωστόσο, για να επιτευχθεί η σηματοδότηση, απαιτείται παράλληλα η διαμεσολαβούμενη από τη δυναμίνη ενδοκυτταρική κυκλοφορία της PLCγ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από το σύνολο των μέχρι σήμερα δεδομένων θεωρούνταν πως ο VEGFR2 ενδοκυτταρώνεται κατά αποκλειστικότητα από ένα και μόνο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης, το κλασικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από την πρωτεΐνη κλαθρίνη και τη δυναμίνη^{72-76,84,94,95,115,117-119}. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήσαμε μια συστηματική ανάλυση ώστε να χαρτογραφήσουμε όλα τα πιθανά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα. Η ανάλυσή αυτή έδειξε πως η αποκλειστική ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης πραγματοποιείται μόνο κατά την απουσία του συνδέτη του, του VEGF. Απρόσμενα, η ενεργοποίηση του VEGFR2 από τον VEGF οδήγησε, επιπλέον, στην ενδοκυττάρωση του υποδοχέα από το μονοπάτι της μακροπρινοκυττάρωσης.

Σε αντίθεση με τους περισσότερους υποδοχείς, οι οποίοι υπό κατάσταση ηρεμίας (απουσία του συνδέτη τους) εντοπίζονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη¹²⁰, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται συνεχώς μεταξύ της μεμβράνης και των ενδοσωμάτων. Η ανακύκληση του υποδοχέα αποδείχθηκε τόσο από την παρούσα όσο και από προηγούμενες εργασίες που αφορούσαν τη μελέτη της ενδοκυτταρικής διακίνησης του VEGFR2^{68,71,76,121}. Ωστόσο, η λειτουργική σημασία των συνεχόμενων κύκλων ανακύκλησης του υποδοχέα ήταν μέχρι σήμερα άγνωστη. Εδώ, αποδείξαμε πως η ενδοκυττάρωση του ανενεργού VEGFR2 λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προστασίας του υποδοχέα από τη σχάση του στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Το αποτέλεσμα αυτό προκαλεί έκπληξη καθώς ο κυρίαρχος λειτουργικός ρόλος της ενδοκυττάρωσης είναι η εσωτερίκευση και ενδοκυτταρική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Συνεπώς, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας και προηγούμενων εργασιών αποδεικνύεται πως η ενδοκυττάρωση ελέγχει την κυτταρική σηματοδότηση μέσω τριών διακριτών μηχανισμών ρύθμισης: (1) παρέχει προστασία από γεγονότα αποικοδόμησης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (2) επάγει τον εντοπισμό των υποδοχέων και άλλων σηματοδοτικών μορίων σε συγκεκριμένα ενδοσώματα, ελέγχοντας το σχηματισμό και την ενεργοποίηση σηματοδοτικών πρωτεϊνικών συμπλόκων, και (3) οδηγεί σε μη αντιστρεπτή παύση της σηματοδότησης κατευθύνοντας τους ενεργοποιημένους υποδοχείς στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση.

Η σχέση του VEGFR2

Παρά το γεγονός ότι η σχέση του VEGFR2 έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες⁸⁰⁻⁸², βασιζόμενοι στο σύνολο των αποτελεσμάτων μας δηλαδή, στο μοριακό βάρος των θραυσμάτων που ανιχνεύθηκαν, στην εξάρτηση του μηχανισμού σχάσης από την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα και το ρόλο της στη ρύθμιση της σηματοδότησης, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι ο μηχανισμός της μεμβρανικής αποικοδόμησης που αναλύθηκε στην παρούσα εργασία δεν σχετίζεται με τους μέχρι σήμερα γνωστούς μηχανισμούς σχάσης του VEGFR2. Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν ότι η πρωτεασωματική αποικοδόμηση του VEGFR2 οδηγεί στο σχηματισμό ενός καρβόξυ-τελικού τμήματος του υποδοχέα μοριακού βάρους 160 kDa το οποίο φέρει μέρος της διαμεμβρανικής του περιοχής^{72,76}. Σε αντίθεση με το μηχανισμό σχάσης που βρέθηκε στην παρούσα εργασία, όπου η σχάση του υποδοχέα είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μικρότερου κυτταροπλασματικού θραύσματος (p130) και ενός εκκρινόμενου τμήματος (s100), ο προηγούμενος μηχανισμός οδηγεί στη δημιουργία ενός κυτταροπλασματικού τμήματος μόνο (το οποίο ανιχνεύεται στα κυτταρικά λύματα) χωρίς όμως παραγωγή εκκρινόμενου θραύσματος. Επίσης, η δημιουργία του θραύσματος των 160 kDa είναι αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF. Παράλληλα, αντίστοιχες μελέτες αναφέρουν την έκκριση ενός εξωκυτταρικού τμήματος του VEGFR2 μοριακού βάρους 160 kDa το οποίο είναι αποτέλεσμα της σχάσης του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη⁸⁰⁻⁸². Ωστόσο, το εκκρινόμενο αυτό θραύσμα των 160 kDa, αν και ανιχνεύθηκε στα πειράματά μας, αντιπροσωπεύει ένα μικρό ποσοτικά προϊόν σε σύγκριση με το εκκρινόμενο τμήμα των 100 kDa το οποίο αποτελεί και το κυρίαρχο προϊόν της μελέτης μας. Επίσης, από τα δύο παραπάνω εκκρινόμενα τμήματα του VEGFR2, μόνο η παραγωγή του θραύσματος s100 υφίσταται ρύθμιση από την ενδοκυττάρωση του VEGFR2. Επιπλέον, το μοριακό βάρος των 100 kDa του εκκρινόμενου θραύσματος του VEGFR2 που ανιχνεύσαμε στα υπερκείμενα των κυττάρων είναι απόλυτα συμπληρωματικό του μοριακού βάρους του θραύσματος p130 που ανιχνεύθηκε στα κυτταρικά λύματα. Τέλος, είναι σημαντικό να ειπωθεί πως η σχέση του VEGFR2 που αναλύθηκε στις προηγούμενες εργασίες είχε θετικό ρόλο στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος του υποδοχέα^{81,82}.

Απεναντίας, στην παρούσα μελέτη, ησχάση του υποδοχέα αποδείχθηκε ότι οδηγεί σε αναστολή της ενεργοποίησης της ERK1/2 και κατ' επέκταση, της σηματοδότησης του VEGFR2. Τα αποτελέσματα αυτά σε συμφωνία με το γεγονός ότι ο κερματισμός του VEGFR2 και η απελευθέρωση του s100 οδηγεί στην απώλεια της περιοχής σύνδεσης του υποδοχέα με τον VEGF. Συμπερασματικά, ο μηχανισμόςσχάσης του VEGFR2 που μελετήθηκε εδώ φέρει χαρακτηριστικά τα οποία τον καθιστούν καινοτόμο, σε σύγκριση με τους προηγουμένως γνωστούς μηχανισμούς.

Η επαγόμενη από την αναστολή της ενδοκυττάρωσηςσχάση του VEGFR2 φαίνεται να έχει διπλό ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα. Όχι μόνο μειώνει τα ολικά πρωτεϊνικά επίπεδα του VEGFR2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και συνεπώς, το δυναμικό απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πολλαπλασιαστικά σήματα του VEGF, αλλά οδηγεί και στη μείωση του διαθέσιμου συνδέτη μέσω αλληλεπίδρασης του εκκρινόμενου τμήματος με τον VEGF. Η διπτή αυτή λειτουργία του μηχανισμούσχάσης του VEGFR2 θα μπορούσε να δρα συνεργιστικά στην αρνητική ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος του υποδοχέα. Σε συνδυασμό με τη ρύθμιση τηςσχάσης του VEGFR2 από την πυκνότητα ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων, ο μηχανισμός αυτός παρέχει πιθανά ένα επιπλέον επίπεδο ρύθμισης της κυτταρικής σηματοδότησης.

Το σύνολο των δεδομένων μας έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες οι οποίες αναφέρουν ότι η αναστολή της ενδοκυττάρωσης καθιστά ένα σύνολο πρωτεϊνών (CX₃CL1, APP, pro-amphiregulin) επιρρεπή σε πρωτεολυτικήσχάση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη¹²²⁻¹²⁵. Συνεπώς, η παρούσα μελέτη προσθέτει τον VEGFR2 στο περιορισμένο σύνολο των πρωτεϊνών οι οποίες μέσω ενδοκυττάρωσης προστατεύονται από αποικοδόμηση στη μεμβράνη. Όμως, σύμφωνα με την υπάρχουσα γνώση, ο VEGFR2 αναδεικνύεται ως ο πρώτος υποδοχέας του οποίου ησχάση ρυθμίζεται από την ενδοκυττάρωση.

Ενδοκυττάρωση και ρύθμιση της σηματοδότησης του VEGFR2

Προηγούμενες μελέτες οι οποίες εστιάζονταν στην αποσαφήνιση του ρόλου της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 στη μεταγωγή του σήματος του υποδοχέα οδήγησαν σε ένα σύνολο αντικρουόμενων συμπερασμάτων. Στις εργασίες αυτές,

η αναστολή της κυκλοφορίας του υποδοχέα επιτεύχθηκε με μεθόδους που οδηγούν είτε σε παρατεταμένη αναστολή της ενδοκυττάρωσης (knockouts, siRNAs, υπερεκφράσεις)^{69,72,73,75,94}, είτε σε σύντομη και ταχεία παρεμπόδιση της ενδοκυττάρωσης μέσω χρήσης χημικών αναστολέων, όπως ο αναστολέας dynasore^{74,95}. Ανάλογα της μεθοδολογίας που εφαρμόστηκε, η τροποποίηση της ενδοκυττάρωσης οδήγησε σε αναστολή ή ενεργοποίηση της σηματοδότησης, ή δεν είχε καμία επίδραση στη μεταγωγή του σήματος του VEGFR2. Ο λόγος των αντίθετων αυτών αποτελεσμάτων μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η παρατεταμένη αναστολή της ενδοκυττάρωσης από ένα συγκεκριμένο μονοπάτι οδηγεί στην προσαρμογή των κυττάρων και στην επαγωγή εναλλακτικών μονοπατιών ενδοκυττάρωσης τα οποία παρακάμπτουν την αρχική αναστολή¹⁰⁴. Επίσης, οι παραπάνω πειραματικές διατάξεις μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβολές των ολικών πρωτεϊνικών επιπέδων είτε λόγω σχάσης του υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (όπως και αποδείχθηκε στην παρούσα μελέτη) είτε εξαιτίας της παρατεταμένης αναστολής της αποικοδόμησης, τόσο του VEGFR2^{75,94}, όσο και άλλων σηματοδοτικών μορίων, λόγω της καίριας σημασίας της ενδοκυττάρωσης στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Απεναντίας, η σύντομη αναστολή της ενδοκυττάρωσης μέσω της αναστολής της δυναμίνης (διαμέσου του αναστολέα dynasore), ελέγχει την ενεργότητα και την ενδοκυτταρική κυκλοφορία της PLCγ (το οποίο αποδείχθηκε για πρώτη φορά στην παρούσα εργασία), ενός καίριου μορίου της σηματοδότησης του VEGFR2, οδηγώντας σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων σχετικά με τον ρόλο της ενδοκυττάρωσης στη μεταγωγή του σήματος του υποδοχέα. Παρά το ετερογενές σύνολο των μέχρι τώρα δεδομένων, η επικρατούσα άποψη στη βιβλιογραφία είναι ότι ο VEGFR2 σηματοδοτεί από το μονοπάτι της δυναμίνης. Εδώ, πραγματοποιώντας ταχεία αναστολή της εξαρτώμενης από τη δυναμίνη ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και εφαρμόζοντας ένα πρωτόκολλο το οποίο μας επιτρέπει να διαχωρίσουμε τη σημασία της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του υποδοχέα από την κυκλοφορία άλλων μορίων αποδείξαμε πως, αντίθετα με την κοινή πεποίθηση, η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμίνης δεν είναι αναγκαία για τη μεταγωγή του σήματος του VEGFR2. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και μέσω αναστολής της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 από το μονοπάτι της κλαθρίνης και των caveolae, τα δύο μονοπάτια ενδοκυττάρωσης που ελέγχονται από τη

δυναμίνη. Τα δεδομένα μας αποκαλύπτουν ότι, προκειμένου να επιτευχθεί η μεταγωγή του σήματος, απαιτείται η μακροπυκνότητα του VEGFR2 και η διαμεσολαβούμενη από την δυναμίνη ενδοκυτταρική κυκλοφορία της PLCγ, όπως αποδείχθηκε τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* πειράματα. Συνεπώς, είναι η πρώτη φορά που ο ρόλος της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του VEGFR2 στη σηματοδότηση του VEGF αναλύθηκε διεξοδικά και επιπλέον, η παρούσα εργασία αντιπροσωπεύει την πρώτη μελέτη η οποία λαμβάνει υπόψη της τόσο την κυκλοφορία του υποδοχέα όσο και την κυκλοφορία των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, στην αποσαφήνιση του μηχανισμού ρύθμισης της μεταγωγής του σήματος.

Μια πρωτοποριακή μελέτη στο πεδίο της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των υποδοχέων¹²⁶ στην οποία πραγματοποιήθηκε αναστολή της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) μέσω της υπερέκφρασης μεταλλαγμάτων της δυναμίνης που καθιστούν την πρωτεΐνη ανενεργή, έδειξε πως η αναστολή της δυναμίνης, παρότι ανέστειλε τη διαμεσολαβούμενη από τον EGF ενδοκυτταρική κυκλοφορία του EGFR και την ενεργοποίηση της ERK1/2, οδήγησε σε ισχυρή φωσφορυλίωση της PLCγ. Ωστόσο, ο μηχανισμός μέσω του οποίου η αναστολή της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας οδήγησε στα αντίθετα αυτά αποτελέσματα παρέμεινε ανεξερεύνητος. Εδώ, αν και σε διαφορετικό υπό μελέτη σύστημα, λάβαμε αντίστοιχα αποτελέσματα (δηλαδή αναστολή της ERK1/2 και ενεργοποίηση της PLCγ). Ωστόσο, σε αντίθεση με την παραπάνω εργασία, στην παρούσα μελέτη αποσαφήνισαμε τον μηχανισμό μέσω του οποίου η δυναμίνη ελέγχει τη σηματοδότηση του VEGFR2.

Ο ρόλος της δυναμίνης στην ενδοκυτταρική κυκλοφορία και ενεργοποίηση της PLCγ

Η διαμεσολαβούμενη από τη δυναμίνη αναστολή της ERK1/2, ανεξάρτητα από τον καθιερωμένο ρόλο της πρωτεΐνης στη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας, καθώς και η ισχυρή ενεργοποίηση της PLCγ, προκαλούν έκπληξη. Επίσης, ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι, υπό την αναστολή της δυναμίνης, αν και η PLCγ είναι ήδη ενεργοποιημένη (απουσία VEGF και άρα απουσία ενεργοποίησης του VEGFR2), η ενεργοποιημένη PLCγ δεν μπορεί να μεταγάγει το σήμα καθότι πιθανά βρίσκεται εντοπισμένη σε λάθος θέση (σε περι-πυρηνικές και

ινώδεις δομές έναντι του κανονικού, κυστιδικού εντοπισμού της). Δεδομένου ότι η δυναμίνη συνδέεται και ελέγχει το σχηματισμό των μικροσωληνίσκων¹²⁷⁻¹³⁴ (στην πραγματικότητα ανιχνεύθηκε αρχικά ως μία πρωτεΐνη η οποία συν-απομονώνεται με μικροσωληνίσκους εγκεφαλικών κυττάρων ^{127,131}) και έχει βρεθεί να αλληλεπιδρά απευθείας με την PLCγ ¹³⁵, είναι πιθανό η αλληλεπίδραση της PLCγ με τη δυναμίνη να επάγει τον εντοπισμό της στις ινώδεις αυτές δομές, οι οποίες πιθανά αντιπροσωπεύουν δομές του κυτταροσκελετού. Η PLCγ επάγει την έκκριση του ασβεστίου μέσω της σχάσης στην κυτταροπλασματική μεμβράνη της φωσφατίδυλο-4,5-διφωσφορικής ινοσιτόλης (PIP₂) σε διάκυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃). Η IP₃ στη συνέχεια ενεργοποιεί ειδικούς υποδοχείς στο ενδοπλασματικό δίκτυο οι οποίοι επάγουν την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Κατά συνέπεια, υπό την αναστολή της δυναμίνης, η PLCγ μπορεί να εντοπίζεται σε περιοχές οι οποίες είναι φτωχές σε PIP₂ καθιστώντας την πρωτεΐνη, αν και ενεργοποιημένη, μη ικανή να επάγει την δημιουργία IP₃, η οποία είναι αναγκαία για την απελευθέρωση του ασβεστίου και την ενεργοποίηση της ERK1/2. Επιπλέον, δεν μπορεί να αποκλειστεί το γεγονός ότι η δυναμίνη, εφόσον έχει αποδειχθεί να αλληλεπιδρά απευθείας με την PLCγ, πιθανά να εμπλέκεται άμεσα στη ρύθμιση της ενεργότητας ή της σηματοδότησης της PLCγ, ανεξάρτητα του ρόλου της ως ρυθμιστικό μόριο της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας ¹³⁶. Ανεξαρτήτως του ακριβούς μηχανισμού δράσης, τα δεδομένα μας αναδεικνύουν τη σημασία της χωροταξικής ρύθμισης της σηματοδότησης. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι καθιερωμένες προσεγγίσεις για τη διερεύνηση του ρόλου της πρωτεϊνικής κυκλοφορίας σε οποιαδήποτε κυτταρική λειτουργία περιλαμβάνουν τροποποιήσεις της λειτουργίας βασικών μορίων που ελέγχουν την κυτταρική κυκλοφορία, η ανάγκη της ανάλυση του εντοπισμού όχι μόνο των υποδοχέων αλλά και των σηματοδοτικών μορίων που εμπλέκονται στη μεταγωγή του σήματος στο υπό μελέτη σύστημα, κρίνεται επιτακτική για την ορθή απόδοση του μηχανισμού ρύθμισης της σηματοδότησης.

Η σημασία της μακροπινोकυττάρωσης στη σηματοδότηση του VEGFR2

Ένα γενικότερο ερώτημα το οποίο προκύπτει από τα ευρήματα αυτής της εργασίας είναι γιατί ο ενεργοποιημένος VEGFR2 μπορεί να σηματοδοτήσει μόνο

από το μονοπάτι της μακροπυκνωτικής και όχι από το μονοπάτι της δυναμικής το οποίο αποτελεί επίσης ένα βασικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα. Εφόσον υπό την αναστολή της μακροπυκνωτικής ο ενεργοποιημένος VEGFR2 ενδοκυττάρωνεται από το εξαρτώμενο από τη δυναμική μονοπάτι ενδοκυττάρωσης και παρόλα αυτά δεν μπορεί να επάγει τη μεταγωγή του σήματος, είναι πιθανό ότι, μέσω της ενδοκυττάρωσης του από το μονοπάτι της δυναμικής, ο υποδοχέας συναντά έναν αναστολέα της σηματοδότησής του. Ο μηχανισμός αυτός θα μπορούσε να διασφαλίσει ότι, (α) κατά την ανακύκλωση του VEGFR2 υπό κατάσταση ηρεμίας (απουσία VEGF), δεν λαμβάνει χώρα κανένα γεγονός σηματοδότησης (π.χ. λόγω μη ειδικής ενεργοποίησης του VEGFR2 απουσία του συνδέτη του) και (β) η σύνδεση του VEGF επάγει την ενδοκυττάρωση του υποδοχέα μέσω της μακροπυκνωτικής, αποφεύγοντας έτσι τον αναστολέα που θα συναντούσε από το μονοπάτι της δυναμικής, επιτρέποντας τελικά τη μεταγωγή του σήματος. Εναλλακτικά, είναι πιθανό οι ενδοκυτταρικοί σταθμοί στους οποίους οδηγείται ο VEGFR2 από το μονοπάτι της δυναμικής να είναι ελλιπείς σε καθοδικά σηματοδοτικά μόρια τα οποία είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση της ERK1/2. Σε αυτή την περίπτωση, η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 από το μονοπάτι της μακροπυκνωτικής και ο εντοπισμός του στα μακροπυκνωτικά επιτρέπει το σχηματισμό ειδικών πρωτεϊνικών σηματοδοτικών συμπλόκων. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από τα αποτελέσματά μας σύμφωνα με τα οποία ο VEGFR2 συνεντοπίζεται με καθοδικά σηματοδοτικά μόρια (MEK1/2) του καταρράκτη της ERK1/2 στα μακροπυκνωτικά.

Ο υποχρεωτικός εντοπισμός του VEGFR2 στα μακροπυκνωτικά φαίνεται να είναι αναγκαίος και για την προώθηση της σηματοδότησης. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η αναστολή της μακροπυκνωτικής δεν εμπόδισε τη διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση της PLCγ και την απελευθέρωση του ασβεστίου. Ωστόσο, ανέστειλε πλήρως την ενεργοποίηση της ERK1/2 υποδεικνύοντας πως, αν και η έναρξη της σηματοδότησης λαμβάνει χώρα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, η ενδοκυττάρωση του VEGFR2 είναι απαραίτητη για την εξέλιξη της μεταγωγής του σήματος, σε συμφωνία με το γεγονός ότι η αναστολή της ενδοκυττάρωσης του υποδοχέα (και από τα δύο μονοπάτια), ανέστειλε πλήρως τη φωσφορυλίωσή του. Η απουσία φωσφατασών στα

ενδοκυτταρικά διαμερίσματα πιθανά επιτρέπει την παρατεταμένη φωσφορυλίωση του VEGFR2^{73,98} η οποία θα μπορούσε να είναι η αιτία για την παράταση της σηματοδότησης που θα επέτρεπε την ενεργοποίηση των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων.

Στο γενικότερο πεδίο της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των υποδοχέων επικρατεί σύγχυση σε ό,τι αφορά τη σημασία της ενδοκυττάρωσης στη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης^{63,137,138}. Τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ο λόγος αυτής της αντιπαράθεσης οφείλεται σε ένα μεγάλο βαθμό στις διαφορετικές πειραματικές διατάξεις που ακολουθήθηκαν και οι οποίες οδήγησαν σε τροποποίηση της κυκλοφορία όχι μόνο των υποδοχέων αλλά και άλλων μορίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγωγής του σήματος, οδηγώντας σε παρερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μεθοδολογία που εφαρμόσαμε στην παρούσα εργασία αποκάλυψε ότι, προκειμένου να λάβει χώρα η σηματοδότηση του VEGFR2, απαιτείται συνεργιστική κυκλοφορία τόσο του υποδοχέα όσο και των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων. Η μεθοδολογία αυτή μπορεί πλέον να εφαρμοστεί και για άλλους υποδοχείς ώστε να επαναπροσδιοριστεί η σημασία της ενδοκυττάρωσης στη σηματοδότησή τους. Τέλος, δεδομένου ότι η αναστολή τόσο της δυναμίνης όσο και της μακροππινοκυττάρωσης, μέσω της χρήσης χημικών αναστολέων, οδήγησε σε αναστολή της αγγειογένεσης στα ποντίκια και στα κουνέλια, όπως αποδείχθηκε στα *in vivo* πειράματα, η παρεμπόδιση της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των πρωτεϊνών ανοίγει νέους δρόμους στην εφαρμογή αντί-καρκινικών θεραπειών και στη θεραπεία άλλων ασθενειών που σχετίζονται με μη φυσιολογική αγγειογένεση.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αγγειακό σύστημα αντιπροσωπεύει ένα από τα πρώιμα συστήματα που σχηματίζονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αποτελείται από ένα πολύπλοκο δίκτυο αιμοφόρων αγγείων το οποίο διατρέχει όλα τα όργανα και τους ιστούς. Η βασική κυτταρική μονάδα του αγγειακού συστήματος είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία οργανώνουν τη δομή και ελέγχουν τη λειτουργία των αγγείων. Η ακεραιότητα του ενδοθηλίου είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ομαλή ροή του αίματος, τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στους υποκείμενους ιστούς και την απομάκρυνση των μεταβολιτών. Η αγγειογένεση, η διαδικασία κατά την οποία νέα αγγεία δημιουργούνται από προϋπάρχοντα, μέσω αποδιοργάνωσης της συνέχειας του ενδοθηλίου, αποτελεί μια αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία και ενεργοποιείται υπό συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις όπως η φλεγμονή, η επούλωση των τραυμάτων και η υποξία. Η ομοιοστασία του ενδοθηλίου ρυθμίζεται από την ισορροπία της απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων στους αγγειογενετικούς παράγοντες. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας σχετίζεται με ένα σύνολο ασθενειών όπως η ανάπτυξη και προώθηση του καρκίνου όπου η μη φυσιολογική αγγειογένεση αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση για την εξέλιξη της ασθένειας. Παρά την πολυπλοκότητα της ρύθμισης του αγγειακού συστήματος, η λειτουργία του ενδοθηλίου ελέγχεται κυρίως από την απόκριση των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πολλαπλασιαστικά μηνύματα του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα VEGF.

Ο VEGF αντιπροσωπεύει έναν από τους κυριότερους αγγειογενετικούς παράγοντες και κύριο ρυθμιστή της παθοφυσιολογίας του αγγειακού συστήματος. Εκκρίνεται από την πλειοψηφία των κυττάρων και εμφανίζει υψηλή ικανότητα σύνδεσης με τον υποδοχέα του, τον VEGFR2, μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη η οποία εκφράζεται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η σύνδεση του VEGF στην εξωκυτταρική περιοχή του VEGFR2 επάγει τη φωσφορυλίωση της ενδοκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα έχοντας ως αποτέλεσμα τη συστράτευση και φωσφορυλίωση καθοδικών σηματοδοτικών μορίων και την ενεργοποίηση πλήθους σηματοδοτικών καταρρακτών. Η διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση της σηματοδότησης οδηγεί σε αλλαγές της λειτουργίας του ενδοθηλίου επάγοντας την

επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς και την έκκριση αγγειο-δραστικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην πήξη του αίματος, στη φλεγμονή και στην αγγειακή διαπερατότητα. Η σημασία του VEGF και του VEGFR2 στη φυσιολογική και παθολογική λειτουργία του αγγειακού συστήματος είναι αδιαμφισβήτητη. Η γονιδιακή αποσιώπηση, τόσο του VEGF, όσο και του VEGFR2 οδηγεί σε μη ομαλή αγγειογένεση και πρόωμη θανάτωση των εμβρύων ενώ η επαγωγή της έκφρασης και των δύο πρωτεϊνών αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό των μεταστατικών όγκων. Δεδομένου της καίριας σημασίας στη ρύθμιση της λειτουργίας του αγγειακού συστήματος, η αποσαφήνιση των μηχανισμών που διέπουν το σύστημα του VEGF-VEGFR2 αποτελούν επιτακτική ανάγκη για την κατανόηση της φυσιολογίας του αγγειακού συστήματος και για την εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών σε παθολογικές καταστάσεις.

Στο κυτταρικό επίπεδο, η απόκριση των κυττάρων στα εξωκυτταρικά ερεθίσματα ρυθμίζεται μέσω της διαμερισματοποίησης και της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των ενεργοποιημένων υποδοχέων. Η ενδοκυτταρική κυκλοφορία, όχι μόνο των υποδοχέων αλλά και των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, και ο εντοπισμός τους σε συγκεκριμένες ενδοκυτταρικές δομές, τα ενδοσώματα, έχει αναδειχθεί ως αναπόσπαστο κομμάτι της ρύθμισης της σηματοδότησης καθώς ελέγχει την ένταση, τη διάρκεια και την εξειδίκευση της μεταγωγής του σήματος. Σήμερα γνωρίζουμε τουλάχιστον 5 εναλλακτικά μονοπάτια ενδοκυττάρωσης, τα οποία καθορίζουν τον ενδοκυτταρικό προορισμό και τους διαφορετικούς ενδοκυτταρικούς σταθμούς των υποδοχέων και κατά συνέπεια, καθορίζουν την εξειδίκευση της μεταγωγής του σήματος. Κατά αντιστοιχία με άλλους υποδοχείς, μέχρι σήμερα πιστεύεται ότι ο ενεργοποιημένος VEGFR2 ενδοκυττάρωνεται μέσω ενός και μόνο μονοπατιού ενδοκυττάρωσης, το εξαρτώμενο από την πρωτεΐνη κλαθρίνη μονοπάτι ενδοκυττάρωσης. Το μονοπάτι αυτό ελέγχεται επίσης από τη δυναμίνη, μια μικρή πρωτεΐνη η οποία επάγει την αποκοπή των πρωτογενών κυστιδίων κλαθρίνης από την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μετά την ενδοκυττάρωσή του, ο VEGFR2 ακολουθεί το κανονικό πρότυπο ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας των υποδοχέων. Οδηγείται αρχικά στα πρώιμα ενδοσώματα, τον πρώτο ενδοκυτταρικό σταθμό από όπου θα καθοριστεί μετέπειτα η τύχη του: είτε θα ανακυκλωθεί στην κυτταροπλασματική μεμβράνη για ένα νέο κύκλο

ενεργοποίησης, είτε θα οδηγηθεί στα όψιμα ενδοσώματα και τελικά στα λυσοσώματα προς αποικοδόμηση και παύση της σηματοδότησης.

Αδιαμφισβήτητα, η σημασία του μεμβρανικού εντοπισμού και της ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 αναδεικνύεται από τις γνωστές μέχρι σήμερα ιδιαιτερότητες της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του και τη σηματοδότησή του. Σε αντίθεση με άλλους υποδοχείς, απουσία του VEGF, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται συνεχώς μεταξύ της μεμβράνης και των ενδοσωμάτων, μια διαδικασία η οποία θα μπορούσε να ρυθμίζει τα επίπεδα του υποδοχέα τα οποία είναι διαθέσιμα για ενεργοποίηση στην κυτταροπλασματική μεμβράνη. Επίσης, η διαμεσολαβούμενη από τον VEGF ενεργοποίηση του VEGFR2 επάγει την ενδοκυττάρωση και τον ενδοσωματικό εντοπισμό του υποδοχέα ο οποίος φαίνεται ότι είναι απαραίτητος για τη μεταγωγή του σήματος. Τέλος, η ανακύκλωση του ενεργοποιημένου VEGFR2 στην κυτταροπλασματική μεμβράνη ανανεώνει το δυναμικό απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων στα πολλαπλασιαστικά μηνύματα του VEGF.

Αν και έχουν προηγηθεί αρκετές μελέτες της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του VEGFR2, ο εγγενής ρόλος της ενδοκυττάρωσης στη ρύθμιση της σηματοδότησης του υποδοχέα παραμένει ασαφής. Η αναστολή του εξαρτώμενου από κλαθρίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης, είτε μέσω αναστολής της κλαθρίνης είτε της δυναμίνης, οδήγησε σε ένα σύνολο αντικρουόμενων αποτελεσμάτων σε ό,τι αφορά τη ρύθμιση της σηματοδότησης, το πρότυπο φωσφορλίωσης και την αποικοδόμηση του VEGFR2. Επιπλέον, αντίστοιχα με παρόμοιες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για άλλους υποδοχείς, παραμένει άγνωστο εάν η επίδραση στη σηματοδότηση του VEGFR2, λόγω αναστολής της ενδοκυττάρωσης, είναι αποτέλεσμα της αναστολής της κυτταρικής κυκλοφορίας του ίδιου του υποδοχέα ή λόγω αναστολής της κυκλοφορίας των καθοδικών μορίων που συμμετέχουν στη σηματοδότηση. Τέλος, παραμένει άγνωστη η ύπαρξη εναλλακτικών της κλαθρίνης μονοπατιών ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 ενώ δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να υποστηρίζουν σαφή διαχωρισμό της σηματοδότησης μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων.

Προκειμένου να διαλευκάνουμε τη σημασία της ενδοκυτταρικής κυκλοφορίας του VEGFR2 στη ρύθμιση της σηματοδότησής του και να αποσαφηνίσουμε το εν λόγω πεδίο, πραγματοποιήσαμε μια συστηματική ανάλυση ώστε να χαρτογραφήσουμε όλα τα μονοπάτια ενδοκυττάρωσης του VEGFR2 και

ελέγξαμε τη λειτουργική σημασία τους, τόσο σε *in vitro*, όσο και σε *in vivo* πειράματα. Τα αποτελέσματα μας αποκάλυψαν ότι, μόνον απουσία του VEGF, ο VEGFR2 ανακυκλώνεται μεταξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και των ενδοσωμάτων αποκλειστικά μέσω του εξαρτώμενου από την κλαθρίνη και τη δυναμίνη μονοπατιού ενδοκυττάρωσης. Αντίθετα με την ευρέως αποδεκτή άποψη ότι η ενδοκυττάρωση έχει μόνον αποικοδομητικό ρόλο, μέσω της πρωτεόλυσης των υποδοχέων στα λυσοσώματα, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι οι συνεχόμενοι κύκλοι ενδοκυττάρωσης και ανακύκλωσης του VEGFR2 λειτουργούν ως ένας προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στη σχάση του υποδοχέα στη μεμβράνη (shedding), διατηρώντας τα πρωτεϊνικά επίπεδα του υποδοχέα μέχρι τη στιγμή της ενεργοποίησης από τον συνδέτη του. Η ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον VEGF εισαγάγει ένα εναλλακτικό μονοπάτι ενδοκυττάρωσης του VEGFR2, τη μακροπιννοκυττάρωση. Πειραματικές διατάξεις οι οποίες μας επέτρεψαν να διαχωρίσουμε τη σημασία της κυτταρικής κυκλοφορίας του VEGFR2 από την κυκλοφορία των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων, στη ρύθμιση της σηματοδότησης, αποκάλυψαν ότι, αντίθετα με την μέχρι σήμερα αντίληψη, το μονοπάτι ενδοκυττάρωσης που ελέγχεται από τη δυναμίνη δεν είναι αναγκαίο για τη μεταγωγή του σήματος του VEGFR2. Προκειμένου να λάβει χώρα η σηματοδότηση απαιτείται τόσο η επαγόμενη από τον VEGF μακροπιννοκυττάρωση του VEGFR2 όσο και η ελεγχόμενη από τη δυναμίνη κυτταρική κυκλοφορία της PLCγ, ενός καίριου καθοδικού μορίου της σηματοδότησης του VEGFR2. Τα δεδομένα αυτά αποκαλύπτουν για πρώτη φορά πως η μεταγωγή του σήματος προϋποθέτει τη συνδυαστική κυτταρική κυκλοφορία των υποδοχέων και των καθοδικών σηματοδοτικών μορίων. Τέλος, τα ευρήματά μας ερμηνεύουν τις μέχρι σήμερα αντιφάσεις της βιβλιογραφίας και αναθεωρούν την αντίληψή μας για τον ακριβή ρόλο της ενδοκυττάρωσης στη ρύθμιση της κυτταρικής σηματοδότησης.

SUMMARY

The vascular system represents one of the primitive systems formed in a developing organism, embracing all tissues and organs. It consists of a complex tubular network of blood vessels comprised of endothelial cells (ECs), the main cellular unit that orchestrates the formation of the vascular plexus. The integrity of endothelium necessitates the delivery of oxygen and nutrients to the tissues as well as the removal of metabolites through blood flow. Angiogenesis, the establishment of new vessels from preexisting vasculature, as well as disruption of EC monolayer barrier, are highly regulated processes in adult organisms which are limited primarily to the development and remodeling of the ovarian tissue and to certain pathologic conditions, such as inflammation, wound repair and tissue hypoxia. The homeostasis of endothelium and thus, the transition from quiescence to angiogenesis, and vice versa, is balanced by the response of ECs to angiogenic stimuli. Aberration of this tightly controlled program is linked to a variety of disorders, with abnormal angiogenesis being a hallmark of cancer progression and metastasis. Despite their diversity and complexity, ECs functions are predominantly directed by the interplay between vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs) and their ligand, VEGF.

VEGF is the most potent pro-angiogenic cytokine and a key molecular player in the pathophysiology of vascular system. It is secreted by the vast majority of cell types and exhibits high affinity for its receptor, VEGFR2, which is expressed dominantly in vascular ECs. VEGFR2 is a transmembrane glycoprotein and structurally related member of the receptor tyrosine kinases (RTKs) family. Binding of VEGF to the extracellular domain of VEGFR2 promotes the orientation and dimerization of receptor monomers that triggers the activation of the intracellular kinase domain. The phosphorylation of catalytic tyrosine residues creates docking sites for the recruitment and activation of downstream molecules and subsequent initiation of signalling cascades that propagate ECs survival, proliferation, migration, differentiation and activation of exocytosis of vasoactive proteins implicated in blood coagulation, inflammation, vascular permeability and stem cell mobilization. The importance of VEGF and VEGFR2 in vascular homeostasis and pathogenesis is undeniable. Genetic ablation of either VEGF or

VEGFR2 results in defective vascularization and early embryonic lethality in mice while up-regulation of both proteins is a common feature of metastatic tumors. Given the broad spectrum of action and the pivotal role in the regulation of ECs biology, unraveling of the underlying mechanisms that govern the VEGF-VEGFR2 system is imperative for the comprehension of vascular pathophysiology and for targeted therapy application.

At the cellular level, the response to extracellular stimulants is fine-tuned through the coordinated regulation of the cellular compartmentalization and the intracellular trafficking of activated receptors. Similarly to other RTKs, stimulated VEGFR2 has been shown to follow primarily the clathrin mediated internalization pathway that is regulated by the function of dynamin, a small molecule that drives the formation of clathrin-coated vesicles. Upon endocytosis, VEGFR2 enters the canonical RTKs endocytic route. It is sorted to early endosomes from where the fate of the receptor is decided: either it is recycled back to the plasma membrane for a new cycle of activation or it is routed to late endosomes and subsequently for degradation and signal termination. The endosomal trafficking has emerged as an essential component of the RTKs signalling with endosomes serving as signalling platforms that control the specificity, the amplitude and the duration of signalling events. Nonetheless, the receptors endocytic destination is dependent on the plasma membrane distribution that orients specific signalling sub-domains and allocates the sites of internalization that moderate the vesicular trafficking and thus, the signalling of endocytosed receptors. Unambiguously, the significance of membrane localization is set by the intrinsic trafficking and signalling of VEGFR2. Following VEGF stimulation, recycling of VEGFR2 to the plasma membrane regenerates cells activation potential while the induction of Golgi residing VEGFR2 exocytosis and metalloproteinases mediated shedding of cell surface receptor acts as an auto-regulatory mechanism of VEGFR2 membrane availability. Moreover, unlike other RTKs, quiescent VEGFR2 shuffles between plasma membrane and endocytic compartments, a process that could mediate the adjustment of the receptor levels that is available for activation at the plasma membrane. However, the inherent role of endocytic trafficking in the regulation of VEGFR2 signal propagation is ill-defined. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis via either inhibition of clathrin or direct blockage of dynamin, exert a differential role in

downstream signalling molecules activation, the phosphorylation profile and the protein levels of VEGFR2. Moreover, similarly to studies in other growth factor receptors, it is unclear whether the effects in signalling are due to interference with transport of the receptor itself or due to concomitant modulation of the trafficking of other molecules that participate in the signalling process. Intriguingly, there is no direct evidence of signal segregation between plasma membrane and endosomes or the existence of alternative membrane processes that moderate the signalling and the degradation of VEGFR2.

To shed light on the above limitations and contradictions, we employed a comprehensive screening to map all possible internalization routes of VEGFR2 and tested their functional significance *in vitro* and *in vivo*. Our data revealed that, in the absence of ligand, VEGFR2 follows solely dynamin-dependent endocytosis, via which the receptor escapes from plasma membrane shedding and preserves its functional state until ligand activation. The presence of VEGF introduces macropinocytosis as an alternative internalization route for VEGFR2. Experimental approaches that uncouple signalling from trafficking revealed that VEGFR2 internalization via macropinocytosis is critical for ERK1/2 activation by VEGF, while, despite the current view, dynamin-mediated endocytosis of VEGFR2 is not essential. However, dynamin-dependent trafficking of downstream components of the VEGFR2 cascade, such as PLC γ , is a prerequisite for macropinocytosis-mediated signal propagation, both *in vitro* and *in vivo*. These data reveal that propagation of growth factor receptor signalling requires coordinated trafficking of both the receptor and downstream signalling molecules. Our findings explain long lasting inconsistencies and revise our understanding of how endocytosis regulates growth factor receptor signalling.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2002;34:1508-12.
2. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *British journal of anaesthesia* 2004;93:105-13.
3. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. The endothelial surface layer. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2000;440:653-66.
4. van der Wouden JM, Maier O, van ISC, Hoekstra D. Membrane dynamics and the regulation of epithelial cell polarity. *International review of cytology* 2003;226:127-64.
5. Papanikolaou A, Papafotika A, Murphy C, et al. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:26406-14.
6. Sagripanti A, Carpi A. Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2000;54:107-11.
7. Bautista LE. Inflammation, endothelial dysfunction, and the risk of high blood pressure: epidemiologic and biological evidence. *Journal of human hypertension* 2003;17:223-30.
8. Cook-Mills JM, Deem TL. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of leukocyte biology* 2005;77:487-95.
9. Trepels T, Zeiher AM, Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 2006;13:423-9.
10. Dudley AC. Tumor endothelial cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012;2:a006536.
11. Polverini PJ. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of dental education* 2002;66:962-75.
12. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 2004;109:II27-33.
13. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 2005;438:937-45.
14. Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs* 1997;79:233-69.
15. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine* 2003;9:669-76.
16. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine* 2003;9:677-84.
17. 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.
18. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The oncologist* 2000;5 Suppl 1:3-10.

19. Roskoski R, Jr. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical reviews in oncology/hematology* 2007;62:179-213.
20. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
21. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling* 2007;19:2003-12.
22. Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/Fik-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1997;14:2079-89.
23. Leppanen VM, Prota AE, Jeltsch M, et al. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:2425-30.
24. Napione L, Pavan S, Veglio A, et al. Unraveling the influence of endothelial cell density on VEGF-A signaling. *Blood* 2012;119:5599-607.
25. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7:359-71.
26. Stuttfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB life* 2009;61:915-22.
27. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999;13:9-22.
28. Kliche S, Waltenberger J. VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB life* 2001;52:61-6.
29. Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R. Clathrin-dependent endocytosis. *The Biochemical journal* 2004;377:1-16.
30. Ehrlich M, Boll W, Van Oijen A, et al. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 2004;118:591-605.
31. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry* 2009;78:857-902.
32. Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 2010;327:46-50.
33. Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *Journal of lipid research* 2003;44:655-67.
34. Leslie M. Mysteries of the cell. Do lipid rafts exist? *Science* 2011;334:1046-7.
35. Munro S. Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 2003;115:377-88.
36. Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745:273-86.
37. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:185-94.
38. Nichols B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *Journal of cell science* 2003;116:4707-14.
39. de Laurentiis A, Donovan L, Arcaro A. Lipid rafts and caveolae in signaling by growth factor receptors. *The open biochemistry journal* 2007;1:12-32.
40. Miaczynska M, Pelkmans L, Zerial M. Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Current opinion in cell biology* 2004;16:400-6.

41. Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P. Dynamin and its partners: a progress report. *Current opinion in cell biology* 1998;10:504-12.
42. Warnock DE, Schmid SL. Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 1996;18:885-93.
43. McNiven MA, Cao H, Pitts KR, Yoon Y. The dynamin family of mechanoenzymes: pinching in new places. *Trends in biochemical sciences* 2000;25:115-20.
44. Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends in cell biology* 1995;5:424-8.
45. Amyere M, Mettlen M, Van Der Smissen P, et al. Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *International journal of medical microbiology : IJMM* 2002;291:487-94.
46. Kerr MC, Teasdale RD. Defining macropinocytosis. *Traffic* 2009;10:364-71.
47. Cao H, Chen J, Awoniyi M, Henley JR, McNiven MA. Dynamin 2 mediates fluid-phase micropinocytosis in epithelial cells. *Journal of cell science* 2007;120:4167-77.
48. Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA. Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cellular signalling* 2009;21:1-6.
49. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nature cell biology* 2009;11:510-20.
50. Jones AT. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *Journal of cellular and molecular medicine* 2007;11:670-84.
51. Perret E, Lakkaraju A, Deborde S, Schreiner R, Rodriguez-Boulan E. Evolving endosomes: how many varieties and why? *Current opinion in cell biology* 2005;17:423-34.
52. Palfy M, Remenyi A, Korcsmaros T. Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends in cell biology* 2012;22:447-56.
53. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 2005;122:735-49.
54. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation. *The EMBO journal* 2011;30:3481-500.
55. Schwartz SL, Cao C, Pylypenko O, Rak A, Wandinger-Ness A. Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* 2007;120:3905-10.
56. Jovic M, Sharma M, Rahajeng J, Caplan S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and histopathology* 2010;25:99-112.
57. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 1999;397:621-5.
58. Schnatwinkel C, Christoforidis S, Lindsay MR, et al. The Rab5 effector Rabankyrin-5 regulates and coordinates different endocytic mechanisms. *PLoS biology* 2004;2:E261.
59. Piper RC, Luzio JP. Late endosomes: sorting and partitioning in multivesicular bodies. *Traffic* 2001;2:612-21.
60. Sadowski L, Pilecka I, Miaczynska M. Signaling from endosomes: location makes a difference. *Experimental cell research* 2009;315:1601-9.

61. Wiley HS, Burke PM. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by endocytic trafficking. *Traffic* 2001;2:12-8.
62. Gould GW, Lippincott-Schwartz J. New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009;10:287-92.
63. Sorkin A, von Zastrow M. Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009;10:609-22.
64. Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, Bunnett NW. Endosomes: a legitimate platform for the signaling train. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:17615-22.
65. Polo S, Di Fiore PP. Endocytosis conducts the cell signaling orchestra. *Cell* 2006;124:897-900.
66. Takamori S, Holt M, Stenius K, et al. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 2006;127:831-46.
67. Blondeau F, Ritter B, Allaire PD, et al. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:3833-8.
68. Gampel A, Moss L, Jones MC, Brunton V, Norman JC, Mellor H. VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* 2006;108:2624-31.
69. Jopling HM, Odell AF, Hooper NM, Zachary IC, Walker JH, Ponnambalam S. Rab GTPase regulation of VEGFR2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1119-24.
70. Manickam V, Tiwari A, Jung J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 trafficking and angiogenesis by Golgi localized t-SNARE syntaxin 6. *Blood* 2011;117:1425-35.
71. Jopling HM, Howell GJ, Gamper N, Ponnambalam S. The VEGFR2 receptor tyrosine kinase undergoes constitutive endosome-to-plasma membrane recycling. *Biochem Biophys Res Commun* 2011.
72. Bruns A, Herbert S, Odell A, et al. Ligand-Stimulated VEGFR2 Signaling is Regulated by Co-Ordinated Trafficking and Proteolysis. *Traffic* 2009.
73. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol* 2006;174:593-604.
74. Gourlaouen M, Welti JC, Vasudev NS, Reynolds AR. Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2013;288:7467-80.
75. Pasula S, Cai X, Dong Y, et al. Endothelial epsin deficiency decreases tumor growth by enhancing VEGF signaling. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:4424-38.
76. Ewan LC, Jopling HM, Jia H, et al. Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic* 2006;7:1270-82.
77. Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Béliveau R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Mol Biol Cell* 2003;14:334-47.

78. Cho C-H, Lee CS, Chang M, et al. Localization of VEGFR-2 and PLD2 in endothelial caveolae is involved in VEGF-induced phosphorylation of MEK and ERK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H1881-8.
79. Ikeda S, Ushio-Fukai M, Zuo L, et al. Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res* 2005;96:467-75.
80. Ebos JML, Bocci G, Man S, et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res* 2004;2:315-26.
81. Swendeman S, Mendelson K, Weskamp G, et al. VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ Res* 2008;103:916-8.
82. Donners MMPC, Wolfs IMJ, Olieslagers S, et al. A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:2188-95.
83. Tallant C, Marrero A, Gomis-Ruth FX. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:20-8.
84. Lanahan AA, Hermans K, Claes F, et al. VEGF Receptor 2 Endocytic Trafficking Regulates Arterial Morphogenesis. *Dev Cell* 2010.
85. Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE, Berger P. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 2011.
86. Labrecque L, Royal I, Surprenant DS, Patterson C, Gingras D, Béliveau R. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 activity by caveolin-1 and plasma membrane cholesterol. *Molecular biology of the cell*;14:334-47.
87. Cho C, Lee CS, Chang M, et al. Localization of VEGFR-2 and PLD2 in endothelial caveolae is involved in VEGF-induced phosphorylation of MEK and ERK. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2004;286:H1881-8.
88. Sonveaux P, Martinive P, DeWever J, et al. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 2004;95:154-61.
89. Bauer PM, Yu J, Chen Y, et al. Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:204-9.
90. Lin MI, Yu J, Murata T, Sessa WC. Caveolin-1-deficient mice have increased tumor microvascular permeability, angiogenesis, and growth. *Cancer Res* 2007;67:2849-56.
91. van der Meer AD, Kamphuis MM, Poot AA, Feijen J, Vermes I. Lowering caveolin-1 expression in human vascular endothelial cells inhibits signal transduction in response to shear stress. *International journal of cell biology* 2009;2009:532432.
92. Liao Wx, Feng L, Zhang H, Zheng J, Moore TR, Chen Db. Compartmentalizing VEGF-Induced ERK2/1 Signaling in Placental Artery Endothelial Cell Caveolae: A Paradoxical Role of Caveolin-1 in Placental Angiogenesis in Vitro. *Molecular Endocrinology* 2009;23:1428-44.

93. Tahir SA, Park S, Thompson TC. Caveolin-1 regulates VEGF-stimulated angiogenic activities in prostate cancer and endothelial cells. *Cancer Biol Ther* 2009;8:78-88.
94. Bhattacharya R, Kang-Decker N, Hughes DA, et al. Regulatory role of dynamin-2 in VEGFR-2/KDR-mediated endothelial signaling. *FASEB J* 2005;19:1692-4.
95. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 2010;465:487-91.
96. Anderson SM, Shergill B, Barry ZT, et al. VEGF internalization is not required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF. *Integrative Biology* 2011;3:887-96.
97. Dougher M, Terman BI. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* 1999;18:1619-27.
98. 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.
99. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26:3113-21.
100. Galperin E, Sorkin A. Endosomal targeting of MEK2 requires RAF, MEK kinase activity and clathrin-dependent endocytosis. *Traffic* 2008;9:1776-90.
101. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annual review of cell and developmental biology* 2000;16:483-519.
102. Sever S, Damke H, Schmid SL. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 2000;1:385-92.
103. Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell* 2006;10:839-50.
104. Damke H, Baba T, van der Blik AM, Schmid SL. Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *The Journal of cell biology* 1995;131:69-80.
105. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422:37-44.
106. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology* 2003;161:673-7.
107. Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Molecular biology of the cell* 2000;11:3341-52.
108. Bucci C, Parton RG, Mather IH, et al. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 1992;70:715-28.
109. McLauchlan H, Newell J, Morrice N, Osborne A, West M, Smythe E. A novel role for Rab5-GDI in ligand sequestration into clathrin-coated pits. *Current biology : CB* 1998;8:34-45.
110. Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *The EMBO journal* 1994;13:1287-96.
111. Somsel Rodman J, Wandinger-Ness A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *Journal of cell science* 2000;113 Pt 2:183-92.

112. Fagotto F, Gumbiner BM. Cell contact-dependent signaling. *Developmental biology* 1996;180:445-54.
113. D'Amore PA. Mechanisms of endothelial growth control. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1992;6:1-8.
114. Vinals F, Pouyssegur J. Confluence of vascular endothelial cells induces cell cycle exit by inhibiting p42/p44 mitogen-activated protein kinase activity. *Molecular and cellular biology* 1999;19:2763-72.
115. Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, et al. Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature cell biology* 2013;15:249-60.
116. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Fik-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 2001;20:2768-78.
117. Salikhova A, Wang L, Lanahan AA, et al. Vascular endothelial growth factor and semaphorin induce neuropilin-1 endocytosis via separate pathways. *Circulation research* 2008;103:e71-9.
118. Anderson SM, Shergill B, Barry ZT, et al. VEGF internalization is not required for VEGFR-2 phosphorylation in bioengineered surfaces with covalently linked VEGF. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro* 2011;3:887-96.
119. Bruns AF, Yuldasheva N, Latham AM, et al. A heat-shock protein axis regulates VEGFR2 proteolysis, blood vessel development and repair. *PloS one* 2012;7:e48539.
120. Sorkin A, Goh LK. Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* 2009;315:683-96.
121. Scott A, Mellor H. VEGF receptor trafficking in angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2009;37:1184-8.
122. Huang Y-W, Su P, Liu GY, et al. Constitutive endocytosis of the chemokine CX3CL1 prevents its degradation by cell surface metalloproteases. *J Biol Chem* 2009;284:29644-53.
123. Chyung JH, Selkoe DJ. Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:51035-43.
124. Fukuda S, Nishida-Fukuda H, Nakayama H, Inoue H, Higashiyama S. Monoubiquitination of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding. *Biochemical and biophysical research communications* 2012;420:315-20.
125. Carey RM, Balcz BA, Lopez-Coviella I, Slack BE. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC cell biology* 2005;6:30.
126. Vieira AV, Lamaze C, Schmid SL. Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science* 1996;274:2086-9.
127. Obar RA, Collins CA, Hammarback JA, Shpetner HS, Vallee RB. Molecular cloning of the microtubule-associated mechanochemical enzyme dynamin reveals homology with a new family of GTP-binding proteins. *Nature* 1990;347:256-61.
128. Herskovits JS, Shpetner HS, Burgess CC, Vallee RB. Microtubules and Src homology 3 domains stimulate the dynamin GTPase via its C-terminal domain.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993;90:11468-72.

129. Maeda K, Nakata T, Noda Y, Sato-Yoshitake R, Hirokawa N. Interaction of dynamin with microtubules: its structure and GTPase activity investigated by using highly purified dynamin. *Molecular biology of the cell* 1992;3:1181-94.

130. Scaife R, Margolis RL. Biochemical and immunochemical analysis of rat brain dynamin interaction with microtubules and organelles in vivo and in vitro. *The Journal of cell biology* 1990;111:3023-33.

131. Shpetner HS, Vallee RB. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 1989;59:421-32.

132. Shpetner HS, Vallee RB. Dynamin is a GTPase stimulated to high levels of activity by microtubules. *Nature* 1992;355:733-5.

133. Thompson HM, Cao H, Chen J, Euteneuer U, McNiven MA. Dynamin 2 binds gamma-tubulin and participates in centrosome cohesion. *Nature cell biology* 2004;6:335-42.

134. Tanabe K, Takei K. Dynamic instability of microtubules requires dynamin 2 and is impaired in a Charcot-Marie-Tooth mutant. *The Journal of cell biology* 2009;185:939-48.

135. Fish KN, Schmid SL, Damke H. Evidence that dynamin-2 functions as a signal-transducing GTPase. *The Journal of cell biology* 2000;150:145-54.

136. Schmid SL, Frolov VA. Dynamin: functional design of a membrane fission catalyst. *Annual review of cell and developmental biology* 2011;27:79-105.

137. Werry TD, Sexton PM, Christopoulos A. "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2005;16:26-33.

138. Le Bras S, Loyer N, Le Borgne R. The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signaling pathway. *Traffic* 2011;12:149-61.