

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000265251





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”**

**ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ:  
ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟ  
ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ VEGF ΣΤΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**

**ΣΟΦΙΑ ΜΠΕΛΛΟΥ  
ΦΥΣΙΚΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2008**



«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)».



**Ένταξη για εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών «Βιοτεχνολογία» της κ. Μπέλλου Σοφίας: 2-10-2002**

**Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής: 2-10-2002 σύμφωνα με απόφαση της Ειδικής Διατμηματικής Επιτροπής του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία», έγγραφο του Επιστημονικού Υπευθύνου κ. Ιωάννη Λαζαρίδη Αναπληρωτή Καθηγητή Γενικής Βιολογίας.**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Φώτης Θεόδωρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου**

**• Ιωαννίνων επιβλέπων**

**Παπαμαρκάκη Θωμαή Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος**

**Carol Murphy Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών, μέλος**

**Ορισμός Θέματος: 2-10-2002**

***«Μοριακοί μηχανισμοί της αγγειογένεσης: Γονιδιακή ρύθμιση από τον αγγειογενετικό παράγοντα VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα»***

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Γεωργάτος Σπυρίδων**

**Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Μιχάλης Λάμπρος**

**Καθηγητής Καρδιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Φώτης Θεόδωρος**

**Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Παπαμαρκάκη Θωμαή**

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Κούκλης Παναγιώτης**

**Επίκουρος Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Χριστοφορίδης Σάββας**

**Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων**

**Carol Murphy**

**Ερευνήτρια Β' Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών**



Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 24-1-2008

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Γουδέβενος Ιωάννης**

**Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας**



Η Γραμματέας της Σχολής

62m

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ



*Στους γονείς μου,  
Πέτρο και Μάρθα*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Θεόδωρου Φώτση και χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ: «Υποτροφίες έρευνας με προτεραιότητα στη βασική έρευνα» του προγράμματος ΕΠΕΑΕΚ ΙΙ του 3<sup>ου</sup> Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ.

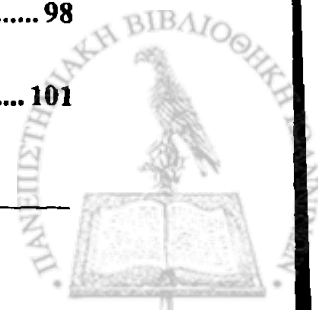
Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επαβλέποντα καθ. Θεόδωρο Φώτση για την ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω τον κόσμο της βιολογίας και βιοχημείας, καθώς και για την έμπνευση και την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της διατριβής. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την συνεπιβλέπουσα ερευνήτρια Β' Carol Murphy για την σημαντική μετάδοση γνώσεων που μου πρόσφερε με μεγάλη υπομονή καθ'όλη την διάρκεια αυτής της εργασίας. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στο τρίτο μέλος της εξεταστικής επιτροπής, Αν. καθ. Θωμαΐς Παπαμαρκάκη για τις επιστημονικές συζητήσεις που κάναμε αλλά, κυρίως, για τις συμβουλές που μου έδωσε σε κρίσιμες στιγμές κατά τη διάρκεια των τελευταίων χρόνων. Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που στην κρίση τους υποβάλλεται αυτή η διατριβή, ευχαριστώ θερμά για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας που ήταν συμπαραστάτες και συνοδοιπόροι όλα αυτά τα χρόνια, δημιουργώντας ευχάριστη και δημιουργική καθημερινότητα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κατερίνα Πανοπούλου και την Μπέττυ Χατζή γιατί με στήριξαν και με βοήθησαν ουσιαστικά όποτε τις χρειάστηκα αλλά, κυρίως, γιατί με τίμησαν με την εμπιστοσύνη και τη φιλία τους από την αρχή της γνωριμίας μας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά την Ελένη Μπαγκλή για όλα όσα μου έμαθε στα πρώτα μου βήματα στο εργαστήριο και για τη στήριξη που μου παρείχε μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής. Ευχαριστώ ιδιαίτερα την Τάνια Παπανικολάου για τη συμπαράσταση και κατανόηση που έδειξε καθώς και για τις ατελείωτες συζητήσεις που κάναμε μέσα και έξω από το χώρο του εργαστηρίου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Γιώργο Σφλώμο, την Εύη Καραλή και τη Λαμπρινή Κύρκου γιατί η παρουσία τους στο εργαστήριο έκανε τις ώρες να περνούν ευχάριστα.

*Ευχαριστώ τους γονείς μου Πέτρο και Μάρθα γιατί έκαναν τις δικές μου αγωνίες  
δικές τους και τα δικά μου όνειρα δικά τους*



2.6. Τίτλοποίηση ιών και συνθήκες μόλυνσης κυττάρων .....	61
2.7. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης .....	61
2.7.1. Καλλιέργεια κυττάρων και απομόνωση RNA .....	61
2.7.2. Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του RNA .....	62
2.7.3. Η τεχνολογία των cDNA μικροσυστοιχιών .....	62
2.7.4. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης- qRT- PCR .....	63
2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western .....	66
2.9. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης .....	67
2.10. Αποδόμηση πρωτεϊνών .....	67
2.11. Έμμεσος ανοσοφθορισμός .....	67
2.12. Διαμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων .....	68
2.13. Κυτταρική κλασματοποίηση .....	68
2.14. Μεταφορά ενέργειας συντονισμού κατά Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) σε συνδυασμό με μικροσκοπία απεικόνισης χρόνου ζωής φθορισμού (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) .....	69
2.14.1. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής FRET .....	69
2.14.2. FRET σε συνδυασμό με FLIM .....	70
2.14.3. Η λήψη των μετρήσεων FLIM .....	70
2.15. Φασματοσκοπία σχετικού συσχετισμού φθορισμού (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, FCCS) .....	71
2.15.1. Η αρχή των μετρήσεων FCS και FCCS .....	72
2.15.2. Σύγκριση των τεχνικών FRET και FCCS .....	73
2.15.3. Η λήψη των μετρήσεων FCCS .....	74
2.16. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVE με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης .....	75
2.17. Δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων HUVE .....	76
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	77
3.1. Ο VEGF επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων <i>DUSP1</i> και <i>DUSP5</i> στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	77
3.2. Η πρωτεΐνη <i>DUSP1</i> εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων .....	81
3.3. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης <i>DUSP1</i> , μετά από επαγωγή με VEGF-A, προκύπτουν από την ισορροπία μεταξύ πρωτεϊνικής σύνθεσης και αποικοδόμησης .....	83
3.4. Ο VEGF-A ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση και την κυτταρική εντόπιση της p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	86
3.5. Ο ρόλος των πρωτεϊνών <i>DUSP1</i> και <i>DUSP5</i> στη ρύθμιση της VEGF-επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	91
3.6. Συνεντόπιση των πρωτεϊνών p38 MAPK και <i>DUSP1</i> στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	93
3.7. Ο VEGF ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση και την κυτταρική εντόπιση των ERK1/2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	94
3.8. Ο ρόλος των πρωτεϊνών <i>DUSP5</i> και <i>DUSP1</i> στη ρύθμιση της VEGF-επαγόμενης φωσφορυλίωσης των ERK1/2 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	98
3.9. Η φωσφατάση <i>DUSP5</i> προκαλεί την πυρηνική αγκυροβόληση και συσώρευση των ERK1/2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα .....	101





<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Αγγειογένεση</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση .....	1
1.1.2. Αγγειογένεση και καρκίνος.....	4
1.1.2.1. Γενικά.....	4
1.1.2.2. Υποξία και αγγειογένεση όγκων.....	6
1.1.2.3. Γενετικές μεταλλάξεις και αγγειογένεση.....	6
<b>1.2. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 Τα μέλη της οικογένειας του VEGF.....	8
1.2.2. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF .....	10
1.2.3. Οι υποδοχείς του VEGF .....	10
1.2.3.1. VEGFR-1, μία πολύπλοκη ρύθμιση .....	13
1.2.3.2. Η σηματοδότηση από τον VEGFR-2 και η αγγειακή του λειτουργία .....	15
1.2.3.2.1. Ο VEGFR-2 ενεργοποιεί τις PLC-γ και PI3K: .....	16
1.2.3.2.2. Παράγοντες εμπλεκόμενοι στην κυτταρική μετανάστευση .....	17
1.2.3.3. Η σηματοδότηση από τον VEGFR-3 και η λεμφατική του λειτουργία .....	18
1.2.3.4. Νευροπιλίνες (Neutropilin 1 & 2, NRP1 & NRP2).....	20
1.2.4. Ρύθμιση της VEGF σηματοδότησης από μόρια προσκόλλησης .....	20
<b>1.3. Οι κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο και ο VEGF</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 Η δομή των MAPKs.....	24
1.3.2 Η μεταγωγή σήματος από τις MAPKs .....	25
1.3.2.1 Οι κινάσες ERK1/2.....	25
1.3.2.1.1 Οι ενεργοποιητές των ERK1/2 .....	27
1.3.2.1.2 Καθοδικοί στόχοι των ERK1/2.....	28
1.3.2.2 Η οικογένεια των p38 κινασών.....	28
1.3.2.2.1 Οι ενεργοποιητές των p38 MAPKs.....	29
1.3.2.2.2. Καθοδικοί στόχοι των p38 MAPKs.....	31
1.3.3 Η κυτταρική εντόπιση των ERK και p38 MAPKs .....	31
1.3.3.1 Κυτταρική διαμερισματοποίηση των ERKs .....	31
1.3.3.2. Κυτταρική διαμερισματοποίηση των p38 MAPKs.....	33
1.3.4. VEGF και MAPKs σε ενδοθηλιακά κύτταρα.....	35
1.3.4.1. VEGF, ERK1/2 και πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων .....	35
1.3.4.2. VEGF, p38 MAPK και μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων.....	37
1.3.5. Η στόχευση του VEGF και των MAPKs για θεραπευτικούς σκοπούς .....	35
<b>1.4. Οι φωσφατάσες και ο ρόλος τους στη ρύθμιση της σηματοδότησης των MAP κινασών</b> .	<b>41</b>
1.4.1. Η υπεροικογένεια των τυροσινικών φωσφατασών.....	41
1.4.2. Οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (Dual Specificity Phosphatases, DUSPs) με στόχο τις MAP κινάσες .....	41
1.4.3. Διαφορετικές φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης για διαφορετικούς τύπους κυττάρων .....	41
1.4.4. Ρύθμιση της έκφρασης και δραστηριότητας των DUSPs.....	41
1.4.5. Υποστρώματα των DUSPs .....	5
1.4.6. Μηχανισμός αναγνώρισης και κατάλυσης των MAPKs από τις DUSPs .....	5
1.4.7. Ο φυσιολογικός ρόλος των DUSPs .....	5
1.4.8. DUSPs – Προοπτικές και προκλήσεις.....	5
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	<b>5</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. Υλικά</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2. Κυτταροκαλλιέργειες</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3. Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4. Κατασκευές DNA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.5. Κατασκευή και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών</b> .....	<b>5</b>



3.10. Συμπληρωματική δράση των φωσφατάσων DUSP1 και DUSP5 στην αποφωσφορύλιωση των ERK1/2 παρουσία VEGF .....	103
3.11. Η υπερέκφραση της DUSP1 αναστέλλει την προκαλούμενη από τον VEGF-A επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων .....	105
3.12. Ο ρόλος της DUSP1 και DUSP5 στην προκαλούμενη από τον VEGF επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων .....	106
3.13. Οι MAPK p38 και ERK2 αλληλεπιδρούν με τις φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5 σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα .....	108
3.14. Ο VEGF επηρεάζει την αλληλεπίδραση των p38 με DUSP1 και ERK2 με DUSP5 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων .....	110
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>115</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ .....</b>	<b>125</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY) .....</b>	<b>127</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>129</b>



## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- Ad (Adenovirus):** αδενοϊός.
- AdLacZ (Adenovirus control expressing  $\beta$ -galactoside):** Αδενοϊός μάρτυρας (εκφράζει  $\beta$ -γαλακτοσιδάση)
- Ang1-2 (Angiopoitin 1-2):** Αγγειοποιητίνη 1-2
- Akt/PKB (Protein Kinase B):** Πρωτεϊνική κινάση B
- CDK (Cyclin dependent kinase):** κυκλινοεξαρτώμενη κινάση
- DTT (dithiothreitol):** διθειοθρεϊτόλη
- DUSPs (Dual Specificity Phosphatases):** Φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης
- EGF (Epidermal Growth Factor):** Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
- eNOS (Endothelial Nitric Oxide Synthetase):** Ενδοθηλιακή συνθετάση του μονοξειδίου του αζωτου
- EPCs (Endothelial Progenitor Cells):** πρόγονα ενδοθηλιακά κύτταρα.
- ERK1/2 (Extracellular Regulated Kinases 1/2):** Εξωκυττάρια ρυθμιζόμενες κινάσες 1 και 2
- FAK (Fokal Adhesion Kinase):** Κινάση των εστιακών προσφύσεων
- FBS (Fetal Bovine Serum):** ορός εμβρύου βοός.
- FCCS (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy):** Φασματοσκοπία σχετικού συσχετισμού φθορισμού
- FGF (Fibroblast Growth Factor):** Αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών
- FITC (Fluorescein Isothiocyanate):** ισοθειοκυανική φλουορεσκεΐνη.
- FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging):** Απεικόνιση χρόνου ζωής φθορισμού
- GFP (Green Fluorescent Protein):** πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.
- GST (Glutathione-S-Transferase):** τρανσφεράση της γλουταθειόνης.
- HGF (Hepatocyte Growth Factor):** Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας
- HIF (Hypoxia Induced Factor):** Παράγοντας επαγόμενος από την υποξία
- HRE (Hypoxia Response Element):** στοιχείο ανταπόκρισης σε υποξία.
- HRP (Horse Raddish Peroxidase):** ραφανιδική υπεροξειδάση.
- HSCs (Haematopoietic Stem Cells):** αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα.
- Hsp90 (Heat Shock protein 90):** Πρωτεΐνη θερμικού σοκ 90
- HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells):** Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου
- ICAM (Intracellular Adhesion Molecule):** Ενδοκυττάριο μόριο συγκόλλησης
- IGF-1 (Insulin Growth Factor):** Αυξητικός παράγοντας της Ινσουλίνης



**IL-1 $\beta$**  (Interleukin-1 $\beta$ ): Ιντερλευκίνη-1 $\beta$

**MAPK** (Mitogen-Activated Protein Kinase): Κινάση ενεργοποιημένη από μιτογόνο

**MKK3/6** (MAPK kinase 3/6): MAPK κινάση 3/6

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

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

**Mowiol**: πολυβινυλική αλκοόλη.

**NGF** (Neuronal Growth Factor): Νευρικός αυξητικός παράγοντας

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

**NES** (Nuclear Export Signal): σήμα εξόδου από τον πυρήνα

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

**NP-1** (Neuropilin 1): Νευροπιλίνη 1

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

**PDGF** (Platelet-Derived Growth Factor): αυξητικός παράγοντας προερχόμενος από τα αιμοπετάλια

**PECAM-1** (Platelet/endothelial Cell Adhesion Molecule-1): Συγκολλητικό μόριο αιμοπεταλίων/ενδοθηλιακών κυττάρων I

**PI3K** (Phosphatidylinositol 3'-kinase): 3-Φωσφατιδυλινοσιτολ κινάση

**PIGF** (Placental Growth Factor): Αυξητικός παράγοντας του πλακούντα

**PKC**, Protein Kinase C: Πρωτεϊνική κινάση B

**PLC $\gamma$**  (phospholipase C- $\gamma$ ): Φωσφολιπάση C- $\gamma$

**PMSF** (Phenylmethylsulfonyl fluoride): Φαινυλο-μεθυλο-σουλφονυλο φθορίδιο

**RT-PCR** (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction): Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης

**SAPK** (Stress-Activated Protein Kinase): Πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιημένη από το στρες

**SDS** (Sodium Dodecyl Sulfate): θειικό δωδεκυλικό νάτριο

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

**TGF- $\beta$**  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ): Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού- $\beta$ .

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

**TSP** (thrombospondin): θρομβοσποντίνη.

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

**VCAM-1** (Vascular Cell Adhesion Molecule-1): Συγκολλητικό μόριο αγγειακών κυττάρων

**VEGFR1,2,3** (VEGF Receptor 1,2,3): Υποδοχείς του VEGF1,2,3

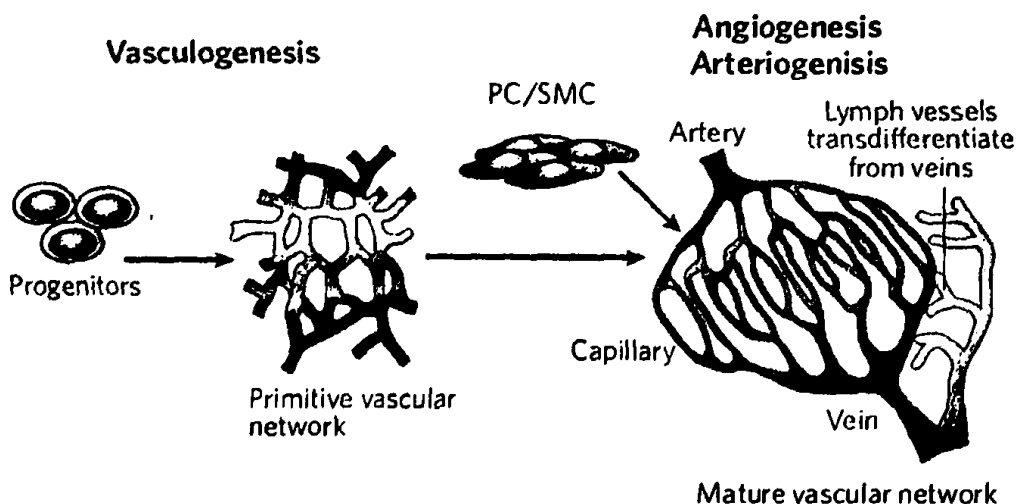


## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Αγγειογένεση

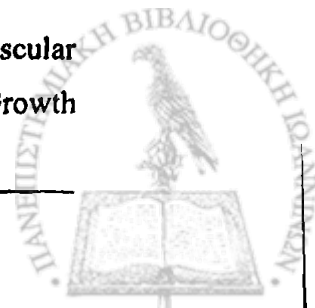
#### 1.1.1. Αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση

Η ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος είναι ένα από τα πρώιμα γεγονότα της οργανογένεσης. Στα θηλαστικά, τα πρώτα αιμοφόρα αγγεία του εμβρύου και του λεκιθικού σάκου αναπτύσσονται *de-novo* από διαφοροποίηση αρχέγονων ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλαστών) *in situ* με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός άωρου πλέγματος, μία διαδικασία γνωστή ως αγγειακή διαφοροποίηση (vasculogenesis). Στη συνέχεια, το πρώιμο αγγειακό δίκτυο σταδιακά εξαπλώνεται με διαδικασίες όπως η εκβλάστηση, ωρίμανση και αναδιαμόρφωση των αγγείων που οδηγούν στην ανάπτυξη ενός αυστηρά οργανωμένου και επαναλαμβανόμενου δικτύου, το οποίο αποτελείται από μεγαλύτερα αγγεία διακλαδιζόμενα σε τριχοειδή (Εικόνα 1). Η επικάλυψη από περικύτταρα/λεία μυϊκά κύτταρα παρέχουν σταθερότητα και ρυθμίζουν την αγγειακή στεγανότητα. Η παραπάνω διαδικασία δημιουργίας νέων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία ονομάζεται αγγειογένεση [1].



**Εικόνα 1:** Ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος. Κατά την αγγειακή διαφοροποίηση, ένα άωρο αγγειακό πλέγμα αρτηριών και φλεβών αναπτύσσεται από αρχέγονα ενδοθηλιακά κύτταρα (αγγειοβλάστες). Στη συνέχεια, κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, το πλέγμα επεκτείνεται, περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα καλύπτουν τα αναπτυσσόμενα αγγεία με αποτέλεσμα ένα οργανωμένο και σταθερό αγγειακό δίκτυο. [1].

Τα μέλη της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) και οι υποδοχείς τους (Vascular Endothelial Growth

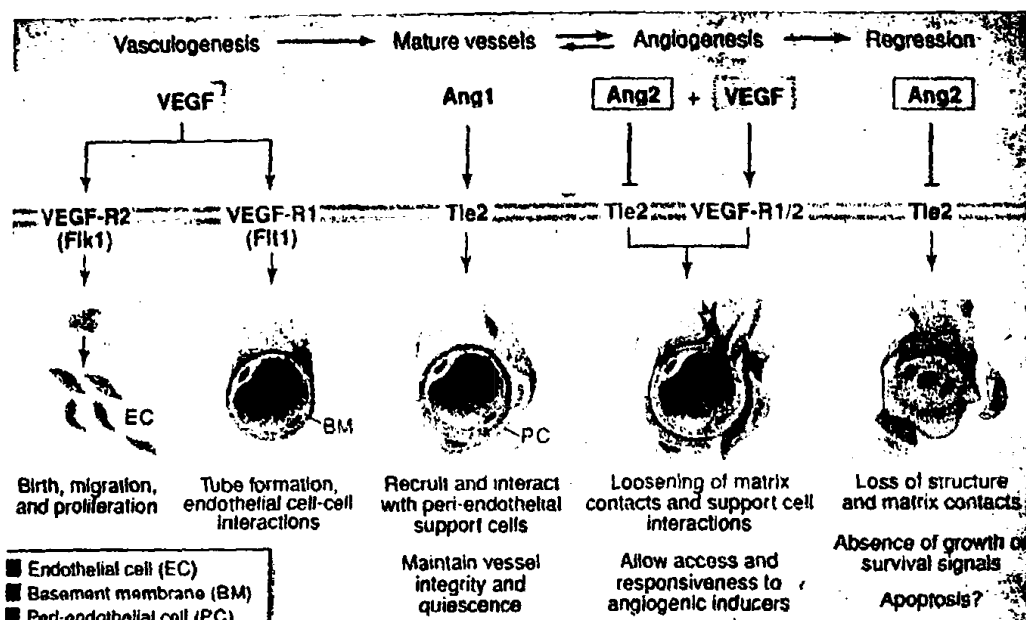


Factor Receptor-1/2/3, VEGFR-1/2/3) αποτελούν τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση, καθώς είναι απαραίτητοι στη δημιουργία πρώιμων αγγείων κατά την αγγειακή διαφοροποίηση και στην αγγειογένεση του εμβρύου και στον ενήλικα. Ο κεντρικός ρόλος του VEGF στην εμβρυϊκή ανάπτυξη των αγγείων αποδεικνύεται από το γεγονός ότι αδρανοποίηση ενός αλληλίου του γονιδίου *VEGF-A* στα ποντίκια προκαλεί θανατηφόρα διακοπή της αγγειακής ανάπτυξης και τα ποντίκια δεν επιβιώνουν πέραν της εμβρυϊκής ημέρας 11 [2-4]. Επίσης, απενεργοποίηση του γονιδίου *VEGFR-2* σε ποντίκια έχει σαν αποτέλεσμα τη θνησιμότητα των εμβρύων μεταξύ της 8.5 και 9.5 εμβρυϊκής ημέρας, εξαιτίας της μειωμένης ανάπτυξης αγγειακού δικτύου και του ελάχιστου αριθμού αιμοποιητικών και ενδοθηλιακών κυττάρων [5].

Η εφρίνη-B2 και η αγγειοποιητίνη-1 (Angiopoietin-1, Ang-1) συμβάλλουν στην αγγειακή διαμόρφωση και ωρίμανση των πρώιμων αγγείων, με την εφρίνη-B2 να είναι ιδιαίτερα σημαντική στο διαχωρισμό της ανάπτυξης αρτηριών και φλεβών [6]. Οι Ang1-2 κατέχουν κύριο ρόλο στη διαμόρφωση και ωρίμανση του αρχικά ανώριμου αγγείου. Αντίθετα με τους *VEGF-A*<sup>-/-</sup> και *VEGFR-2*<sup>-/-</sup> εμβρυϊκούς ποντικούς, τα έμβρυα που στερούνται την Ang-1 ή τον υποδοχέα της, Tie-2, αναπτύσσουν φυσιολογική πρωτογενή αγγείωση [6, 7]. Ωστόσο, τα νέα αγγεία αποτυγχάνουν να διαμορφωθούν αποτελεσματικά σε ώριμα και λειτουργικά αγγεία. Ειδικότερα, η Ang1 μέσω φωσφορυλίωσης του Tie-2 υποδοχέα της είναι χημειοτακτική για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλεί εκβλάστηση των κυττάρων, ισχυροποιεί τη δράση του VEGF και ενεργοποιεί τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενδοθηλιακών και περιενδοθηλιακών κυττάρων [6]. Χαμηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης του Tie-2 έχουν επίσης ανιχνευθεί στο μη ενεργοποιημένο αγγειακό δίκτυο υποδεικνύοντας συμμετοχή του Tie-2 στη διατήρηση των αγγείων.

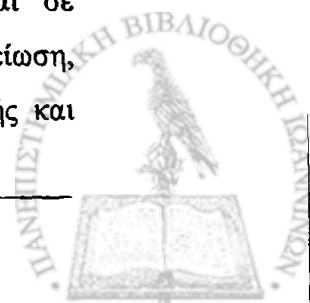
Η αγγειοποιητίνη 2 (Angiopoietin-2, Ang-2), ένα άλλο μέλος της οικογένειας των αγγειοποιητινών, είναι αναστολέας της μεταγωγής του σήματος από τον Tie-2 και ένας φυσικός ανταγωνιστής της Ang-1. Η Ang-2 εμφανίζεται στις περιοχές νεοαγγείωσης και αγγειακής αναδιαμόρφωσης και ενέχεται στη μείωση των επαφών μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων, την απώλεια επαφής τους από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τη χαλάρωση της εξωκυττάριας ουσίας, η οποία επιτρέπει την πρόσβαση των διεγερτών της αγγειογένεσης, αλλά και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [8, 9]. Κατά συνέπεια, η Ang2 παρουσία διεγερτών της αγγειογένεσης είναι αγγειογενετική, απουσία όμως διεγερτών προκαλεί αποσταθεροποίηση του αγγείου που οδηγεί σε υποστροφή του (regression) [9] (Εικόνα 2).





**Εικόνα 2:** Συμβολή των αγγειοποιητινών και του VEGF στην αγγειακή διαμόρφωση και στην αγγειογένεση. Μοντέλο ρύθμισης του αγγειακού ενδοθηλίου από τον VEGF και τις Ang1-2. Τα προσδέματα ενεργοποιούν υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης (Receptor Tyrosine Kinase, RTK). Ωστόσο, τα καθοδικά σήματά τους προκαλούν διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις. Η ενεργοποίηση του VEGFR-2 από τον VEGF κατά την εμβρυογένεση προκαλεί τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αντίθετα, η πρόσδεση του VEGF στον VEGFR-1 έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη δημιουργία τριχοειδών, μία διαδικασία που ακολουθεί στενά τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων. Στη συνέχεια, η πρόσδεση της Ang1 στον υποδοχέα Tie-2 στρατολογεί περικύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του νέου αγγείου. Η Ang-2 δεν ενεργοποιεί τον Tie-2, αλλά, αντίθετα, προσδένεται και σταματά την ενεργοποίηση της κινάσης στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η αρνητική σηματοδότηση της Ang-2 προκαλεί χαλάρωση των αγγειακών δομών, μείωση των επαφών μεταξύ των κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας και αποδέσμευση των περικυττάρων. Αυτή η χαλάρωση καθιστά τα ενδοθηλιακά κύτταρα προσβάσιμα και ανταποκρινόμενα στον VEGF και σε άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες. Τελικά, η έκφραση της Ang-2 είναι υψηλή κατά την αγγειακή υποστροφή, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αγγειακή χαλάρωση και η ταυτόχρονη απουσία αυξητικού παράγοντα οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο [10].

Στο έμβryo, τα αιμοφόρα αγγεία προμηθεύουν τα αναπτυσσόμενα όργανα με το απαραίτητο οξυγόνο για να αναπτυχθούν. Μετά τη γέννηση, η αγγειογένεση συνεισφέρει ακόμη στην ανάπτυξη των οργάνων, αλλά, κατά τη διάρκεια της ενηλικίωσης, τα αιμοφόρα αγγεία παραμένουν αδρανή και αγγειογένεση παρατηρείται μόνο στο ενδομήτριο της γυναίκας κατά τη διάρκεια του γενετήσιου κύκλου και στη δημιουργία του πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Ωστόσο, τα ενδοθηλιακά κύτταρα διατηρούν την αξιοσημείωτη ικανότητα τους να διαιρούνται ταχύτατα, καθώς ανταποκρίνονται σε φυσιολογικούς διεγέρτες, όπως η υποξία. Με αυτόν τον τρόπο η επαγόμενη νεοαγγείωση, μετά από τραυματισμό ενός ιστού, αποτελεί κρίσιμη συνιστώσα της επιδιορθωτικής και



επουλωτικής διαδικασίας. Στην περίπτωση όμως που η αγγειογενετική διαδικασία χάσει τον αυτοπεριοριστικό της χαρακτήρα έχουμε την ανάπτυξη και την πρόοδο πολλών ασθενειών, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ψωρίαση και μια πλειάδα νοσημάτων του οφθαλμού. Η πιο μελετημένη περίπτωση ενεργοποίησης της αγγειογένεσης είναι η νεοπλασματική αγγειογένεση κατά την οποία καρκινικοί όγκοι προάγουν την ανάπτυξη και διασπορά τους (μετάσταση) με τη βοήθεια αιμοφόρων αγγείων, τα οποία αναπτύσσονται και ωριμάζουν σε γειτνιάζουσες περιοχές των ίδιων των όγκων.

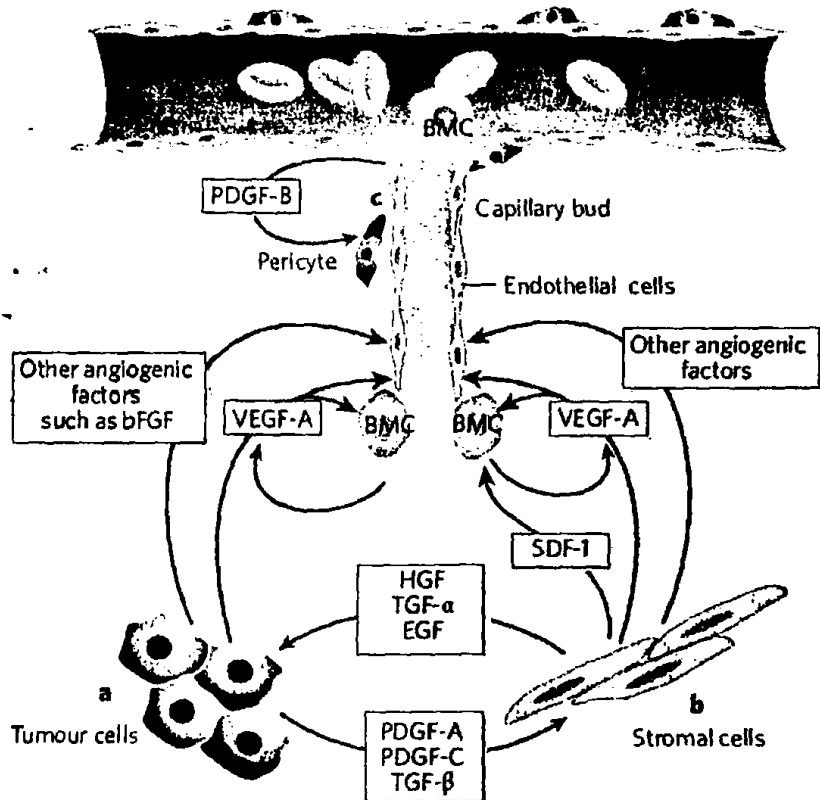
### **1.1.2. Αγγειογένεση και καρκίνος**

#### **1.1.2.1. Γενικά**

Οι πρώτες παρατηρήσεις ότι η ανάπτυξη ενός όγκου συνοδεύεται από αυξημένη αγγείωση πραγματοποιήθηκαν στις αρχές του προηγούμενου αιώνα. Οι ερευνητές πρότειναν ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξέλιξη του καρκίνου ήταν η «ασθένεια» των αγγείων στην ευρύτερη περιοχή. Η έκκριση αγγειογενετικών παραγόντων από καρκινικά κύτταρα παρατηρήθηκε και επιβεβαιώθηκε πριν από τουλάχιστον 65 χρόνια. Είναι πλέον γνωστό ότι οι περισσότεροι όγκοι προέρχονται από μικρές μη αγγειωμένες μάζες που στη συνέχεια επάγουν την ανάπτυξη και τον σχηματισμό νέων αγγείων, όταν η διάμετρος του όγκου ξεπεράσει το μέγεθος των  $2 \text{ mm}^3$  [6]. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι οι όγκοι δεν προέρχονται μόνο από μη αγγειωμένες μάζες. Τα καρκινικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται την ύπαρξη ήδη προϋπαρχόντων αγγείων (co-option) για να ξεκινήσουν τη δημιουργία ενός καλά αγγειωμένου όγκου [11]. Οι όγκοι που θα καταφέρουν να αναπτυχθούν είναι αυτοί που θα έχουν ξεπεράσει τη διαδικασία υποστροφής των αγγείων επάγοντας εκ νέου την αγγειογένεση. Το 1971 προτάθηκε για πρώτη φορά ο σημαντικός ρόλος της αναστολής της αγγειογένεσης (antiangiogenesis) στη θεραπεία του καρκίνου και εκτεταμένες έρευνες για την ανακάλυψη διεγερτών και αναστολέων ξεκίνησαν. Ορισμένα από τα μόρια που εμπλέκονται στην αγγείωση ενός όγκου παρουσιάζονται στην εικόνα 3.







**Εικόνα 3:** Ορισμένα μέρη και είδη κυττάρων που συμβάλλουν στην αγγειογένεση όγκου. (a) Καρκινικά κύτταρα εκκρίνουν VEGF-A και άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF), οι αγγειοποιητίνες, η ιντερλευκίνη-8, ο αυξητικός παράγοντας του πλακούντα (Placental Growth Factor, PLGF) και ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας-C (Vascular endothelial growth factor-C, VEGF-C). Αυτοί οι παράγοντες ενεργοποιούν τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. (b) Αγγειογενετικοί παράγοντες προέρχονται και από τον περιβάλλοντα ιστό (stroma), ο οποίος αποτελείται από ινοβλάστες και ανοσοκύτταρα. Συγκεκριμένα οι ινοβλάστες παράγουν κυτοκίνες όπως η SDF-1, η οποία πιθανώς είναι υπεύθυνη για τη στρατολόγηση αγγειογενετικών κυττάρων προερχόμενων από τον μυελό των οστών (bone-marrow-derived angiogenic cells, BMC). BMC στρατολογούνται επίσης από τους παράγοντες VEGF-A και PLGF. Οι ινοβλάστες συμβάλλουν στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων εκκρίνοντας παράγοντες επιβίωσης, όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (Epidermal Growth Factor, EGF) και ο ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (Hepatocyte Growth Factor, HGF). (c) Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν PDGF-B, ο οποίος προάγει τη στρατολόγηση των περικυττάρων με αποτέλεσμα την ωρίμανση των νεοαγγείων [12].

Παρά το γεγονός ότι αρκετές κλινικές δοκιμές είχαν αρνητικά αποτελέσματα, σημαντική πρόοδος έχει πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια στη στόχευση της αγγειογένεσης για τη θεραπεία του ανθρώπινου καρκίνου. Το Φεβρουάριο του 2004, η οργάνωση τροφίμων και φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών (US Food and Drug Administration, FDA) ενέκρινε το bevacizumab, ένα μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του VEGF-A, για τη θεραπεία του μεταστατικού καρκίνου του παχέος εντέρου σε συνδυασμό με

χημειοθεραπεία [12, 13]. Το Δεκέμβριο του ίδιου χρόνου η FDA ενέκρινε το regartiniib, ένα εφαστομερές (aptamer) που αναστέλλει τη δράση του VEGF-A, για τη θεραπεία της ηλικιακής εκφύλισης της ωχράς [14]. Τα παραπάνω επιτεύγματα επιβεβαίωσαν την αντίληψη ότι η αγγειογένεση είναι ένας σημαντικός στόχος για τη θεραπεία του καρκίνου και άλλων ασθενειών. Ωστόσο, μεγαλύτερη πρόοδος είναι απαραίτητη σε ορισμένα κρίσιμα ζητήματα. Για παράδειγμα, πώς επιτυγχάνεται ο αποτελεσματικότερος συνδυασμός αντι-αγγειογενετικών θεραπειών και χημειοθεραπείας, πώς επιλέγονται οι ασθενείς που είναι πιο πιθανό να ανταποκριθούν στη θεραπεία και ποιοι είναι οι λόγοι της αντίστασης σε αυτές τις θεραπείες;

#### 1.1.2.2. Υποξία και αγγειογένεση όγκων

Η αύξηση του καρκινικού όγκου εξαρτάται από τη μεταφορά οξυγόνου από τα τριχοειδή στο μικροπεριβάλλον της κακοήθειας. Αρχικά τα κύτταρα προσλαμβάνουν το απαραίτητο οξυγόνο μέσω απλής διάχυσης. Όταν όμως το μέγεθος του όγκου αυξάνεται πέρα από το όριο διάχυσης του οξυγόνου, η υποξία διεγείρει τη νεοαγγείωση μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) [15, 16]. Ο HIF-1 με τη σειρά του ενεργοποιεί πολλά αγγειογενετικά γονίδια, αλλά η επαγωγή του γονιδίου του VEGF είναι ίσως η πιο αξιοσημείωτη (μέχρι και 30 φορές, μέσα σε λίγα λεπτά) [17]. Ειδικότερα, ο HIF-1 λειτουργεί σε συνέργια με το προϊόν του ογκοκατασταλτικού γονιδίου von Hippel-Lindau (VHL) και είναι ο κύριος ρυθμιστής της παραπάνω λειτουργίας. Σε φυσιολογικές συνθήκες η πρωτεΐνη VHL στοχεύει τον υδροξυλιωμένο-σε-δύο-προλίνες HIF-1 και τον οδηγεί σε αποδόμηση [17]. Η αποδόμηση εμποδίζει το διμερισμό του HIF-1 και την πρόσδεση του συμπλόκου στον υποκινητή του VEGF-γονιδίου. Με αυτόν τον τρόπο δεν επάγεται η παραγωγή του VEGF και η αγγειογένεση. Αντίθετα, σε καταστάσεις υποξίας, η VHL δεν είναι ικανή να οδηγήσει τον HIF-1 σε αποδόμηση με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του VEGF-υποκινητή και την παραγωγή του VEGF-A. Μετάλλαξη στο γονίδιο *VHL* που καθιστά μη λειτουργική την πρωτεΐνη είχε ως αποτέλεσμα παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονταν από υψηλά επίπεδα VEGF και πρόκληση καρκίνου των νεφρών με τοπικά αυξημένη αγγείωση [18].

#### 1.1.2.3. Γενετικές μεταλλάξεις και αγγειογένεση

Είναι γνωστό ότι η ογκογένεση είναι μια διαδικασία με πολλά στάδια στην οποία συσσωρεύονται πολλές γενετικές αλλαγές. Σχεδόν όλοι οι τύποι όγκων παρουσιάζουν μία πολυπλοκότητα και μια πληθώρα αλλαγών στην δράση γονιδίων. Έτσι, η ενεργοποίηση

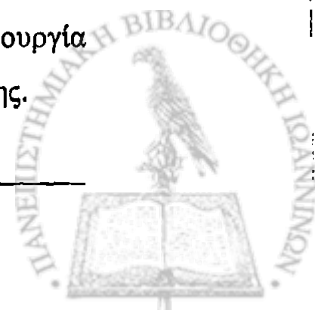
ογκογονιδίων ή η απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανεξέλεγκτη αύξηση των όγκων. Μεταλλάξεις σε ογκογονίδια καθιστούν δυνατή την επαγωγή διεγερτών της αγγειογένεσης ή την αναστολή αντι-αγγειογενετικών πρωτεϊνών από τα καρκινικά κύτταρα [19] (Πίνακας 1). Ενεργοποίηση του ογκογονιδίου *ras* (*Kras* και *Hras*) για παράδειγμα έχει σαν αποτέλεσμα την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα VEGF και αναστολή της έκφρασης του αναστολέα της αγγειογένεσης, θρομβοσποντίνης (TSP1) [20]. Παρόμοια, μεταλλάξεις στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο p53 επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να επάγουν την αγγειογένεση. Η φυσιολογική πρωτεΐνη p53 αναστέλλει την αγγειογένεση στους όγκους αφού επάγει τον αναστολέα της αγγειογένεσης TSP1 και την αποδόμηση του επαγόμενου παράγοντα της υποξίας HIF, ενώ ταυτόχρονα καταστέλλει την μεταγραφή του παράγοντα VEGF και της πρωτεΐνης που συνδέεται με τον αυξητικό παράγοντα FGF-2. Έτσι, η απουσία ή μετάλλαξη του γονιδίου του p53 διαταράσσει την ισορροπία μεταξύ αναστολέων και διεγερτών της αγγειογένεσης με αποτέλεσμα την αυξημένη αγγείωση των όγκων.

Πίνακας 1: Ογκογονίδια που επηρεάζουν την αγγειογένεση

Ογκογονίδιο	Προ-αγγειογενετική δράση	Αναφορά
Kras, Hras	Επαγωγή VEGF, αναστολή TSP-1	[21, 22]
SRC	Επαγωγή VEGF, αναστολή TSP-1	[23-25]
c-MYC	Αναστολή TSP-2	[26]
n-MYC	Αγγειογενετικές ιδιότητες στο νευροβλάστωμα	[27, 28]
c-MYC	Αγγειογενετικές ιδιότητες στην επιδερμίδα	[29]
ERBB2	Επαγωγή VEGF	[30]
EGFR	Επαγωγή VEGF, bFGF και IL-8	[31]
FOS	Έκφραση VEGF	[32]
tkB	Αναστολή VEGF	[33]
HPV-16	Έκκριση VEGF και IFN-α	[34, 35]
BCL2	Επαγωγή VEGF	[36]

## 1.2. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας VEGF

Για παραπάνω από μία δεκαετία ο ρόλος του VEGF στη ρύθμιση της αγγειογένεσης αποτέλεσε αντικείμενο έντονης έρευνας [37]. Πρόσφατα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η ανάπτυξη και ωρίμανση νέων αγγείων είναι εξαιρετικά πολύπλοκες και συντονισμένες διαδικασίες, οι οποίες απαιτούν τη συνεχή ενεργοποίηση μιας σειράς υποδοχέων από πολυάριθμα προσδέματα [6, 38, 39]. Ωστόσο η μεταγωγή σήματος του VEGF αντιπροσωπεύει ένα κρίσιμο βήμα στον έλεγχο της ταχύτητας της φυσιολογικής αγγειογένεσης, αλλά και η υπερέκφραση του παίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία παθολογικής αγγειογένεσης ανατρέποντας την ισορροπία διεγερτών και αναστολέων της.



Μία πολύ καλά μελετημένη *in vitro* δραστηριότητα του VEGF είναι η ικανότητα του να προάγει την ανάπτυξη των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από αρτηρίες, φλέβες και λεμφικά αγγεία [40]. Ειδικότερα, ο VEGF προάγει την αγγειογένεση σε τρισδιάστατα *in vitro* μοντέλα, επάγοντας τα μικροαγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα να εισβάλλουν σε πολυμερισμένο κολλαγόνο και να δημιουργήσουν δομές που μοιάζουν με τριχοειδή (capillary-like structure) [41, 42]. Ο VEGF επάγει ισχυρή αγγειογενετική απόκριση σε ποικιλία *in vivo* μοντέλων (440, 9, 10), όπως στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύων ορνίθων [43] και στον κερατοειδή χιτώνα οφθαλμού κονίκλων [44, 45]. Επίσης, η παρουσία του VEGF ενισχύει την λεμφαγγειογένεση στους ποντικούς, τουλάχιστον σε ορισμένες περιπτώσεις [46, 47].

Ο VEGF είναι παράγοντας επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλα [48, 49]. *In vitro*, ο VEGF εμποδίζει την απόπτωση που επάγεται από τη στέρηση ορού μέσω της εξαρτώμενης από την PI3K ενεργοποίησης της αντιαποπτωτικής κινάσης Akt/PKB (Gerber et al., 1998b). Επίσης, ο VEGF επάγει την έκφραση των αντιαποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A1, οι οποίες αναστέλλουν την ενεργοποίηση των κασπασών και αυξάνουν με τη σειρά τους την έκφραση δύο μελών της οικογένειας IAP (Inhibitors of Apoptosis), τη survivin και του XIAP [50]. *In vivo*, η αναστολή του VEGF έχει ως αποτέλεσμα εκτεταμένες αποπτωτικές αλλαγές στην αγγείωση οργάνων του νεογνού, αλλά όχι του ενήλικα, ποντικού [51]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η εξάρτηση των ενδοθηλιακών κυττάρων των νέων σχηματιζόμενων αγγείων από VEGF. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα των ώριμων αγγείων, τα οποία έχουν επικαλυφθεί από περικύτταρα, παρουσιάζουν έλλειψη εξάρτησης από τον VEGF [52].

Ο VEGF είναι γνωστός και ως παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας, λόγω της ικανότητας του να επάγει την αγγειακή διαρροή [53]. Είναι πλέον πολύ καλά αποδεδειγμένο ότι αυτή η δραστηριότητα της αύξησης της διαπερατότητας αποτελεί σημαντικό χαρακτηριστικό του VEGF και του προσδίδει καίριο ρόλο σε φλεγμονές και άλλες παθολογικές καταστάσεις. Ο VEGF επάγει μία αύξηση στην υδραυλική αγωγιμότητα απομονωμένων μικροαγγείων μέσω της αυξημένης εισροής ασβεστίου [54].

### 1.2.1 Τα μέλη της οικογένειας του VEGF

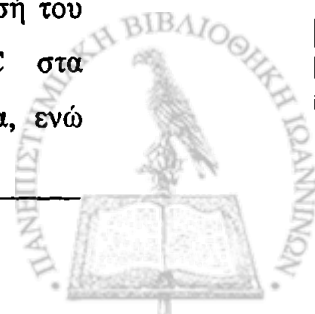
Στα θηλαστικά, η οικογένεια VEGF αποτελείται από 5 μέλη, τα VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D και τον αυξητικό παράγοντα του πλακούντα (Placental Growth Factor, PLGF) [55]. Ο VEGF-A, ο οποίος έχει μελετηθεί πιο εκτεταμένα, είναι μια διμερής 36-46kd γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με μια περιοχή σύνδεσης με την ηπαρίνη. Ο ανθρώπινος VEGF-A

αποτελείται από 8 εξόνια, τα οποία διαχωρίζονται από 7 εσόνια [56]. Από εναλλακτικό μάτισμα προκύπτουν τέσσερις ισομορφές του VEGF-A, γνωστές ως VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> και VEGF<sub>206</sub> με αντίστοιχα μοριακά βάρη 121, 165, 189 και 206kDa. Η επικρατούσα ισομορφή του VEGF, ο VEGF<sub>165</sub>, στερείται των καταλοίπων που κωδικοποιούνται από το εξόνιο 6, ενώ ο VEGF<sub>121</sub> στερείται των καταλοίπων που κωδικοποιούνται από τα εξόνια 6 και 7 [37]. Λιγότερα συχνά έχουν αναφερθεί και άλλες ισομορφές από εναλλακτικό μάτισμα, όπως ο VEGF<sub>145</sub> και ο VEGF<sub>183</sub> [57]. Οι ιδιότητες του φυσικού (native) VEGF αντιστοιχούν στενά με εκείνες του VEGF<sub>165</sub> [58].

Η ισομορφή VEGF<sub>121</sub> είναι η μόνη που δε συνδέεται με την ηπαρίνη. Ενώ ο VEGF<sub>121</sub> είναι μία ελεύθερα διαχύσιμη πρωτεΐνη, οι VEGF<sub>189</sub> και VEGF<sub>206</sub> βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά απομονωμένες στην εξωκυττάρια ουσία. Ο VEGF<sub>165</sub> έχει ενδιάμεσες ιδιότητες, καθώς εκκρίνεται, αλλά ένα σημαντικό ποσοστό παραμένει συνδεδεμένο με την κυτταρική επιφάνεια και την εξωκυττάρια ουσία [59]. Η απώλεια του υπεύθυνου τομέα για την πρόσδεση της ηπαρίνης προκαλεί την απώλεια της μιτογόνου δράσης του VEGF [60]. Τέλος, η σπουδαιότητα του τομέα πρόσδεσης των ισομορφών του VEGF με την ηπαρίνη αναδεικνύεται και με την αναφορά αποτελεσμάτων που δείχνουν ότι το 50% των ποντικών που εκφράζουν αποκλειστικά την ισομορφή VEGF<sub>121</sub>, και στερούνται των μακρύτερων ισομορφών που συνδέονται με την ηπαρίνη, πεθαίνουν σύντομα μετά τον τοκετό, ενώ το υπόλοιπο 50% πεθαίνει μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων λόγω αιμορραγίας και ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας [61].

Ο VEGF-B έχει ενδοθηλιακή μιτογόνα δράση παρόμοια με του VEGF. Κυρίως εκφράζεται στο αναπτυσσόμενο μυοκάρδιο και σε μικρότερο βαθμό στους αναπτυσσόμενους μυς, οστά, πάγκρεας, επινεφρίδια και λεία μυϊκά κύτταρα των μεγάλων αγγείων [62]. Η έκφρασή του δεν επηρεάζεται από την υποξία. Ποντίκια στα οποία έγινε απαλοιφή του γονιδίου του VEGF-B ήταν υγιή και γόνιμα, αλλά είχαν μικρότερες καρδιές και παρουσίαζαν αγγειακή δυσλειτουργία μετά από πειραματική στεφανιαία απόφραξη, καθώς και προβληματική ανάρρωση μετά από πειραματική καρδιακή ισχαιμία [63].

Ο VEGF-C διεγείρει τη μενάστευση και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και *in vivo* και αναστέλλει την επαγόμενη από τον PDGF μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων [64]. Στους ενήλικες εκφράζεται κυρίως στην καρδιά, τον πλακούντα, τους πνεύμονες, τα νεφρά, τους μυς, τις ωοθήκες και το λεπτό έντερο. Ο VEGF-C φαίνεται να ρυθμίζει τη λεμφαγγειογένεση, όπως υποδηλώνει η αυξημένη έκφρασή του στα λεμφαγγεία. Διαγονιδιακά ποντίκια, τα οποία υπερεκφράζαν VEGF-C στα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας παρουσίαζαν διογκωμένα δερματικά λεμφαγγεία, ενώ



υπερέκφραση VEGF<sub>165</sub> στην ίδια περιοχή έδειξε μόνο υπερπλασία των αιμοφόρων αγγείων [65].

Τέλος, ο VEGF-D, ο οποίος αρχικά απομονώθηκε από ινοβλάστες ποντικών μετά από αποσιώπηση του γονιδίου c-fos, επάγεται από το c-fos και εντοπίζεται περισσότερο σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία μετά από στέρηση ορού [66]. Εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες, την καρδιά, το λεπτό έντερο, τα νεφρά, το ήπαρ και το δέρμα. Παρόλο που δομικές ομοιότητες με τον VEGF-C υποδηλώνουν παρόμοιες λειτουργίες, τα μοτίβα έκφρασής τους διαφέρουν και ο ακριβής ρόλος του VEGF-D στην αγγειακή ανάπτυξη και στην παθολογική αγγειογένεση παραμένει άγνωστος.

### 1.2.2. Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του VEGF

Η έκφραση του VEGF ρυθμίζεται από πλήθος διεγερτών, όπως τα οιστρογόνα και το νιτρικό οξύ καθώς και από αυξητικούς παράγοντες, όπως FGF, PDGF, EGF, ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF) και ο μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας  $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) [67]. Συνεπώς με το ρόλο του στην αγγειογένεση όγκων, η έκφραση του VEGF αυξάνεται από κοινά γενετικά γεγονότα που οδηγούν στον κακοήγη μετασχηματισμό, συμπεριλαμβανομένης της απώλειας αποκαταστατικών γονιδίων όγκων, όπως το p53, και της ενεργοποίησης ογκογονιδίων, όπως τα *ras*, *v-src* και *HER2* [19]. Επιπλέον, η έκφραση του VEGF είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην παρουσία οξυγόνου, καθώς αυξάνεται ταχύτατα από την υποξία που χαρακτηρίζει πολλούς όγκους [68].

### 1.2.3. Οι υποδοχείς του VEGF

Οι υποδοχείς του VEGF, VEGF Receptor 1-3, μοιράζονται μηχανισμούς ρύθμισης με άλλους πολύ καλά μελετημένους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης (Receptor Tyrosine Kinase, RTKs), όπως ο PDGFR και ο υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). Οι παραπάνω μηχανισμοί περιλαμβάνουν διμερισμό και ενεργοποίηση της τυροσινικής κινάσης, όπως επίσης τη δημιουργία θέσης ελλιμενισμού (docking site) για σηματοδοτικά μόρια. Επιπλέον, οι υποδοχείς των VEGFs, επάγουν κυτταρικές αποκρίσεις που είναι κοινές μεταξύ πολλών υποδοχέων αυξητικών παραγόντων, όπως η μετανάστευση, η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός. Ωστόσο, οι υποδοχείς των VEGFs φαίνεται να είναι μοναδικοί, για παράδειγμα, όσον αναφορά στην ικανότητά τους να μετάγουν σήματα που καταλήγουν στη δημιουργία τρισδιάστατων αγγειακών σωλήνων, αλλά



και στη ρύθμιση της αγγειακής διαπερατότητας που οδηγεί στο οίδημα και στη διόγκωση των ιστών [53, 55].

Οι VEGFRs ανήκουν στην υπερικογένεια των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης και ανήκουν στην ίδια κατηγορία με τους υποδοχείς των PDGFs και FGFs. Οι VEGFRs έχουν ένα εξωκυττάριο τμήμα των 750 περίπου αμινοξέων, το οποίο είναι οργανωμένο σε 7 περιοχές με μορφή ανοσοσφαιρίνης (Ig). Στον VEGFR-3, η τρίτη Ig περιοχή έχει αντικατασταθεί από δισουλφιδική γέφυρα. Το εξωκυττάριο τμήμα ακολουθείται από μία υδροφοβική διαμεμβρανική περιοχή και μια συντηρημένη ενδοκυττάρια περιοχή τυροσινικής κινάσης. Η κρυσταλλική δομή ενός εξωκυττάριου τμήματος του VEGFR-1, απουσία ή παρουσία προσδέματος, έδειξε ότι η Ig περιοχή-2 αποτελεί την πλευρά του υποδοχέα στην οποία προσδέεται ο VEGF. Επιπλέον, βιοχημικές αναλύσεις έδειξαν ότι η Ig περιοχή-3 του VEGFR-2 είναι πολύ σημαντική για την ειδικότητα της πρόσδεσης των διαφορετικών προσδεμάτων [69]. Παρόλο που αρχικά οι VEGFRs αναγνωρίστηκαν στα αγγειακά συστήματα, περισσότερο ευαίσθητες μεθοδολογίες μαζί με βελτιωμένα αντιδραστήρια επέτρεψαν την ανίχνευση των παραπάνω υποδοχέων και σε μη-ενδοθηλιακά κύτταρα. Ωστόσο, γενετικά μοντέλα, όπως φαίνονται στον πίνακα 2, υποδηλώνουν ότι η πιο σημαντική λειτουργία των VEGF/ VEGFRs είναι στα διάφορα αγγειακά συστήματα.

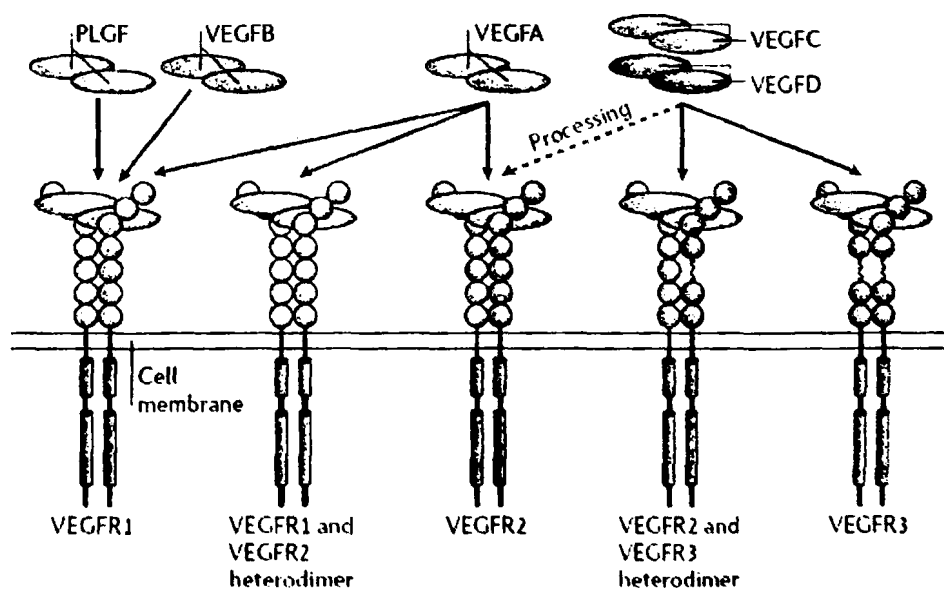
**Πίνακας 2:** Λειτουργίες των VEGFA-D/VEGFR1-3 καθορισμένες από γονιδιακή στόχευση [55]

<i>Γονότυπος</i>	<i>Φαινότυπος</i>
<i>VEGF-A<sup>+/-</sup></i>	Θάνατος κατά την εμβρυϊκή μέρα 11-12. Ελαττωματική αγγειακή ανάπτυξη.
<i>VEGF-A<sup>-/-</sup></i>	Θάνατος κατά την εμβρυϊκή μέρα 9,5-10,5. Σοβαρότερες ατέλειες στην αγγειακή ανάπτυξη συγκριτικά με το ετεροζυγωτό μοντέλο.
<i>VEGF-A<sup>120/120</sup></i>	50% πέθαναν αμέσως μετά τον τοκετό εξαιτίας αιμορραγίας σε πολλά όργανα, και τα υπόλοιπα πέθαναν την 14 <sup>η</sup> μέρα μετά τον τοκετό λόγω καρδιακής ανεπάρκειας. Ατελής μυοκαρδιακή αγγειογένεση, ισχαιμική καρδιοπάθεια, σκελετικές ανωμαλίες, ανωμαλίες στην αγγειακή ανάπτυξη και στη μορφή του αμφιβληστροειδούς.
<i>VEGF-A<sup>164/164</sup></i>	Βιώσιμα. Υγιή.
<i>VEGF-A<sup>188/188</sup></i>	Ελαττωματική ανάπτυξη αμφιβληστροειδικών αρτηριών, νανισμός, ατελής επιφυσιακή αγγείωση, ατελής ανάπτυξη δευτερογενών κέντρων οστεοποίησης, knee-joint δυσπλασία.
<i>VEGF-B<sup>+/-</sup></i>	Μειωμένο καρδιακό μέγεθος, μη λειτουργική στεφανιαία αγγείωση, προβληματική ανάκαμψη από καρδιακή ισχαιμία.
Υπερέκφραση <i>vegf-c</i>	Υπερπλασία λεμφαγγείων.
<i>VEGF-C<sup>+/-</sup></i>	Προγεννητικός θάνατος εξαιτίας οιδήματος και έλλειψης λεμφαγγείων.
<i>VEGF-C<sup>-/-</sup></i>	Δερματική λεμφική υποπλασία, οίδημα.
<i>VEGF-D<sup>+/-</sup></i>	Φυσιολογική ανάπτυξη, μικρή μείωση λεμφαγγείων πλευρικών στα βροχιόλια του πνεύμονα
<i>VEGFR-1<sup>+/-</sup></i>	Θάνατος κατά την εμβρυϊκή μέρα 8,5-9. Αγγειακή αποδιοργάνωση εξαιτίας υπερανάπτυξης ενδοθηλιακών κυττάρων.



<i>VEGFR-1</i> (τμήμα τυροσινικής κινάσης) <sup>-/-</sup>	Φυσιολογική ανάπτυξη, μειωμένη μετανάστευση μακροφάγων επαγόμενη από τον VEGF, καταστολή αγγειογένεσης όγκων.
<i>VEGFR-1</i> (τμήμα τυροσινικής κινάσης-διαμεμβρανικό τμήμα) <sup>-/-</sup>	50% των ποντικών πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, εξαιτίας αγγειακής δυσμορφίας
<i>VEGFR-2</i> <sup>-/-</sup>	Θάνατος κατά την εμβρυϊκή μέρα 8,5-9,5. Ατελής αγγειακή διαφοροποίηση ( <i>vasculogenesis</i> ).
<i>VEGFR-3</i> <sup>-/-</sup>	Εμβρυϊκός θάνατος πριν τη δημιουργία λεμφαγγείων εξαιτίας καρδιακής ανεπάρκειας. Τα έμβρυα παρουσιάζουν ατελή αγγειακή αναδιαμόρφωση και συσσώρευση περικαρδιακού υγρού.

Σύμφωνα με τις ιδιότητες των διαφορετικών προσδεμάτων, οι VEGFRs σχηματίζουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή (Εικόνα 4). Οι ιδιότητες της σηματοδότησης από τα ομοδιμερή σε σύγκριση με τα ετεροδιμερή παραμένουν ακόμη ασαφείς. Ο διμερισμός των υποδοχέων συνοδεύεται από τη δραστικότητα υποδοχέα κινάσης που οδηγεί στην αυτοφωσφορυλίωση των υποδοχέων. Οι φωσφορυλιωμένοι υποδοχείς στρατολογούν αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες και επάγουν την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που περιλαμβάνουν ένα σύνολο αγγελιοφόρων μορίων, όπως περιγράφεται στη συνέχεια.



**Εικόνα 4:** Οι υποδοχείς του VEGF και τα προσδέματά τους. Τα μέλη της οικογένειας του VEGF προσδέονται στους τρεις υποδοχείς με δράση τυροσινικής κινάσης VEGFRs, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ομοδιμερών και ετεροδιμερών VEGFR. Πρωτεόλυση των VEGF-C και VEGF-D επιτρέπει την πρόσδεσή τους στον VEGFR-2 [55].

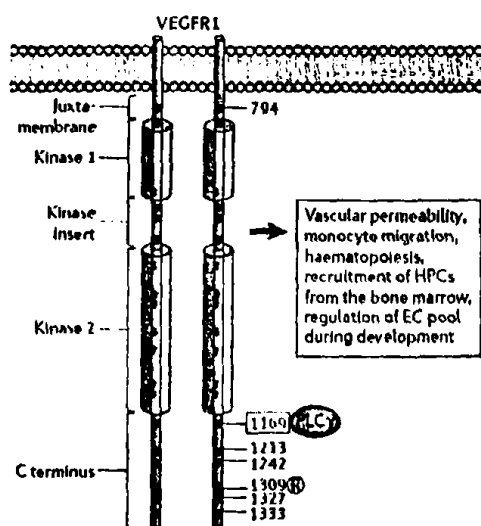
Θα πρέπει να τονίσουμε ότι η αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης είναι σημαντική για τον περιορισμό των αποκρίσεων του κυττάρου-στόχου. Για παράδειγμα, η επαγωγή της δραστικότητας κινάσης αντισταθμίζεται από την ταχύτατη αποφωσφορυλίωση



των υποδοχέων από ειδικές τυροσινικές φωσφατάσες. Έχει δειχθεί ότι η δραστηριότητα του VEGFR-2 ρυθμίζεται αρνητικά από την φωσφοτυροσινική φωσφατάση Src-homology phosphatase-1 (SHP1) και SHP2 [70, 71]. Επίσης, η δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης των υποδοχέων αναστέλλεται μέσω της αποικοδόμησης τους στο λυσόσωμα. Ειδικότερα, η ενδοκυττάρωση και αποδόμηση του VEGFR-2 εξαρτάται από την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (Protein Kinase C, PKC) και την ακόλουθη φωσφορυλίωση του καρβολουτελικού άκρου του υποδοχέα [72]. Ωστόσο, η λεπτομερής ανάλυση της τύχης του ενεργοποιημένου VEGFR2 δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμη και ο ρόλος της αποδόμησης μέσω του πρωτεοσώματος δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως μέχρι σήμερα.

#### • 1.2.3.1. VEGFR-1, μία πολύπλοκη ρύθμιση

Ο VEGFR-1 παρουσιάζει όλα τα συντηρημένα μοτίβα που είναι απαραίτητα για τη δραστηριότητα κινάσης. Εν τούτοις, τα επίπεδα φωσφορυλίωσής του, ανταποκρινόμενος στον VEGF-A, είναι χαμηλά [73] και μπορούν να ανιχνευτούν μόνο μετά από υπερέκφραση σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Η καταστολή της δραστηριότητας κινάσης πιθανώς να συμβαίνει μέσω της αναδίπλωσης του ενδοκυττάριου τμήματος του VEGFR-1 με τέτοιο τρόπο που να εμποδίζεται η έκθεση της αλληλουχίας που ρυθμίζει την ενεργότητα κινάσης. Προς υποστήριξη αυτής της θεωρίας, το τυροσινικό κατάλοιπο του τμήματος κινάσης, το οποίο κατέχει θέση που αντιστοιχεί στο κλασικό κατάλοιπο τυροσίνης Tyr416 με θετική ρύθμιση της κινάσης Src, δεν είναι φωσφορυλιωμένο στον ενεργό VEGFR-1 [74]. Το αντίστοιχο κατάλοιπο στους υποδοχείς VEGFR-2 και 3 έχει αναγνωριστεί ως θέση φωσφορυλίωσης και έχει εμπλακεί στην ενεργοποίηση της δραστηριότητας κινάσης.



Εικόνα 5: Θέσης φωσφορυλίωσης του VEGFR-1 [55].



Πολλές θέσεις τυροσινικής φωσφορυλίωσης του VEGFR-1 και των πιθανών αλληλεπιδρώσεων συνεταίρων τους έχουν περιγραφεί σε διάφορα μοντέλα υπερέκφρασης (Εικόνα 5). Σε αυτές τις πρωτεΐνες περιλαμβάνεται η 3-Φωσφατιδυλινοσιτολ κινάση (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K), η φωσφολιπάση C-γ (phospholipase C, PLC-γ), η SHP2, η δεσμευμένη σε υποδοχέα αυξητικού παράγοντα-2 (growth factor receptor bound-1, Grb2) και η Nck [75]. Ωστόσο, παρά τις πιθανές αλληλεπιδράσεις του VEGFR-1 που έχουν αναφερθεί, η καθοδική ρύθμιση των γεγονότων θα πρέπει να καθοριστεί. Για παράδειγμα, είναι ασαφής ο τρόπος με τον οποίο ενεργοποιείται η σηματοδότηση σε πρωτογενή κύτταρα, στα οποία είναι γνωστό ότι ο VEGFR-1 ασκεί σημαντική βιολογική απόκριση, όπως σε μακροφάγα κύτταρα που μεταναστεύουν ανταποκρινόμενα στον VEGF μέσω του VEGFR-1 [76].

Μία ακόμη σημαντική παρατήρηση για την ανάλυση των αποκρίσεων που τοποθετούνται καθοδικά του VEGFR-1 είναι ότι η αντικατάσταση της πιθανής φωσφοτυροσίνης του VEGFR-1 από το κατάλοιπο της φενυλαλανίνης οδήγησε σε εσφαλμένη αναδίπλωση του ενδοκυττάριου τμήματος του VEGFR-1 και μη ειδική απενεργοποίηση κινάσης [77]. Η παραπάνω παρατήρηση ενισχύει την άποψη ότι η αναδίπλωση του ενδοκυττάριου τμήματος του VEGFR-1 είναι ειδική και διαφορετική από εκείνη των υπόλοιπων VEGFRs, για τους οποίους η μετάλλαξη μίας θέσης για αντικατάσταση του κατάλοιπου φωσφοτυροσίνης είναι συμβατή με άθικτη ενεργότητα κινάσης. Ακόμη μία ενδιαφέρουσα αλλά ασαφής ιδιότητα του VEGFR-1 είναι ότι τα διαφορετικά προσδέματα του (VEGFA, VEGFB και PLGF, βλ. εικόνα 4) μετάγουν διακριτές βιολογικές αποκρίσεις. Σε μία προσπάθεια να κατανοήσει τους δυνατούς μηχανισμούς που βρίσκονται κάτω από αυτές τις διαφορετικές αποκρίσεις, η ομάδα του Autiero et al. (2003) έδειξε ότι οι παράγοντες VEGF και PLGF ενδεχομένως προκαλούν διαφορετικά μοτίβα θέσεων φωσφορυλίωσης στον VEGFR-1. Για παράδειγμα, το κατάλοιπο τυροσίνης 1309 φωσφορυλιώνεται μόνο από την παρουσία του PLGF και έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της AKT/protein kinase B (PKB) [78].

Ο αγγειακός φαινότυπος των *VEGFR-1*<sup>-/-</sup> εμβρύων υποδηλώνει σθεναρά ότι ο VEGFR-1 είναι ο αρνητικός ρυθμιστής των δεξαμενών των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά είναι φανερό ότι δεν είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων *per se*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι απάλειψη του τμήματος με δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης του VEGFR-1 είναι συμβατή με φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη, όπως επιδεικνύεται από το φαινότυπο των *VEGFR-1(TK)*<sup>-/-</sup> ποντικών [79]. Επομένως, ο VEGFR-1

φαίνεται να λειτουργεί ως «παγίδα» για τον VEGFR-A κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης ρυθμίζοντας την προσέγγισή του στον VEGFR-2 σε αναπτυσσόμενα αιμοφόρα αγγεία. Η αγκυροβόληση του εξωκυττάριου τμήματος του VEGFR-1 στην κυτταρική μεμβράνη είναι σημαντική, καθώς το 50% των ποντικών που στερούνται και το τμήμα με δράση τυροσινικής κινάσης και το διαμεμβρανικό τμήμα πεθαίνουν κατά την 8,5-9 εμβρυϊκή μέρα, εξαιτίας αγγειακής δυσμορφίας. Ενδιαφέρον ωστόσο, παρουσιάζει το γεγονός ότι το υπόλοιπο 50% αναπτύσσεται κανονικά [80].

Το βιολογικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του VEGFR-1 ενδεχομένως να επηρεάζεται και από την ενεργοποίηση του VEGFR-2. Πολλές ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι ο VEGFR-1 ρυθμίζει αρνητικά τη σηματοδότηση του VEGFR-2. Ο επαγόμενος από τον VEGFR-2 πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων μπορεί να κατασταλεί από τον VEGFR-1 και αυτή η επίδραση ρυθμίζεται από την PI3K [81]. Επιπλέον, εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα που στερούνται του VEGFR-1 παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης του VEGFR-2 [82]. Ωστόσο, υπάρχουν άλλα ερευνητικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι ενδεχομένως ο VEGFR-1 ενισχύει παρά αναστέλλει τη σηματοδότηση από τον VEGFR-2, όπως για παράδειγμα κατά τη διάρκεια παθολογικών καταστάσεων [83]. Ενεργοποίηση του VEGFR-1 από τον PLGF οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση του VEGFR-2 [84], πιθανώς μέσω της εκτόπισης του VEGFA που είναι προσδεμένο στον VEGFR-1 και τη μετέπειτα πρόσδεση του στον VEGFR-2 [55]. Κατά πόσον αυτές οι φαινομενικά αντίθετες επιδράσεις του VEGFR-1 στη δραστηριότητα του VEGFR-2 πραγματοποιούνται κάτω από διαφορετικές συνθήκες ή σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων παραμένει αντικείμενο έρευνας μέχρι σήμερα.

#### 1.2.3.2. Η σηματοδότηση από τον VEGFR-2 και η αγγειακή του λειτουργία

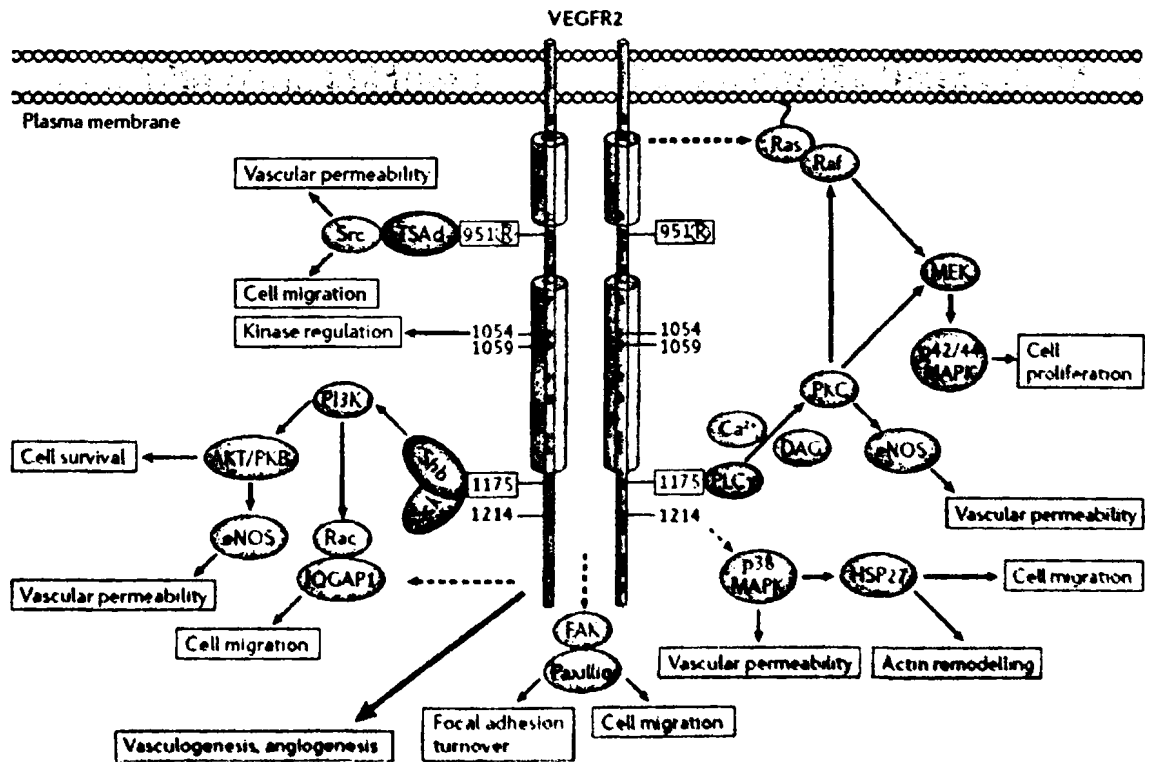
Ο VEGFR-2 προσδένει τον VEGF με Kd μεταξύ 75-125pM [85]. Ο καταλυτικός ρόλος του υποδοχέα στην αναπτυξιακή αγγειογένεση αποδεικνύεται από την έλλειψη της διαφοροποίησης αγγείων (vasculogenesis) και την ανεπιτυχή ανάπτυξη αιματικών νησίδων και οργανωμένων αιμαγγείων σε *VEGFR-2<sup>-/-</sup>* ποντικούς, με αποτέλεσμα το θάνατό τους κατά την 8,5-9,5 εμβρυϊκή μέρα [5]. Είναι πλέον αποδεκτό ότι ο VEGFR-2 είναι ο κύριος μεσολαβητής των μιτογόνων και αγγειογενετικών αποτελεσμάτων, καθώς και της ενίσχυσης της αγγειακής διαπερατότητας που προκαλεί ο VEGF [37]. Αντίθετα του VEGFR-1, η αυτοφωσφορυλίωση του VEGFR-2 από τον VEGF είναι άμεσα ανιχνεύσιμη και οι θέσεις φωσφορυλίωσης των διάφορων τυροσινικών καταλοίπων έχουν ήδη χαρτογραφηθεί (Εικόνα



6). Από αυτές τις θέσεις, η φωσφορυλίωση των Tyr1054 και Tyr1059 είναι απαραίτητη για μέγιστη δραστηριότητα κινάσης [86].

#### 1.2.3.2.1. Ο VEGFR-2 ενεργοποιεί τις PLC- $\gamma$ και PI3K:

Μόνο λίγα μόρια που περιέχουν το SH2-domain έχουν δείχθει ότι αλληλεπιδρούν άμεσα με τον VEGFR-2. Η PLC- $\gamma$  προσδένεται στο φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο Tyr1175 (Tyr1173 στους ποντικούς) και διαχειρίζεται την ενεργοποίηση του καταρράκτη των κινασών ενεργοποιημένων από μιτογόνο (Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)/κινασών ρυθμιζόμενων από εξωκυττάρια σήματα (extracellular-signal-regulated-kinase-1/2, ERK1/2) και του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων [86]. Η PLC- $\gamma$  ενεργοποιεί με τη σειρά της την PKC μέσω της δημιουργίας διακυλογλυκερόλης και αυξημένων συγκεντρώσεων του ενδοκυττάριου ασβεστίου. Ποντικοί που εκφράζουν το μεταλλαγμένο VEGFR-2 (Tyr1173Phe VEGFR-2), το οποίο δεν προσδένει την PLC- $\gamma$ , πεθαίνουν κατά την 8,5-9,5 εμβρυϊκή μέρα εξαιτίας ατελούς αγγείωσης που θυμίζει το φαινότυπο των *VEGFR-2*<sup>-/-</sup> ποντικών [87]. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν μία θεμελιώδη λειτουργία του καταλοίπου Tyr1173 κατά την αγγειακή ανάπτυξη.



Εικόνα 6: Οι θέσεις φωσφορυλίωσης και η σηματοδότηση του VEGFR-2 [55].

Εκτός από την PLC- $\gamma$ , το μόριο-προσαρμοστής Shb δένεται στο φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο Tyr1175 [88]. Η επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση και ενεργοποίηση της PI3K αναστέλλεται από τη χρήση siRNA για την απόλειψη του Shb σε ενδοθηλιακά κύτταρα [88]. Πράγματι, σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες, το κατάλοιπο Tyr1175 έχει συνδεθεί με την ενεργοποίηση της PI3K από τον VEGF [89]. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης AKT/PKB ενεργοποιείται καθοδικά της PI3K και καθορίζει την επιβίωση των ενδοθηλιακών κυττάρων [45, 90]. Η κινάση AKT/PKB ρυθμίζει επίσης την παραγωγή του μονοξειδίου του αζώτου (NO) μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (Endothelial Nitric Oxide Synthetase, eNOS).

Ο VEGF δε φαίνεται να επάγει ισχυρά μιτογόνα σήματα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και η σπουδαιότητα του κλασικού μονοπατιού Ras-Raf-MEK-MAPK καθοδικά του VEGFR-2 είναι ασαφής. Ωστόσο, VEGF επάγει την ενεργοποίηση της Ras σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) και η Ras έχει εμπλακεί στον αγγειογενετικό φαινότυπο των ενδοθηλιακών κυττάρων [91]. Από την άλλη πλευρά, ενεργοποίηση του μονοπατιού Raf-MEK-MAPK ανεξάρτητη της Ras, αλλά μέσω της PLC- $\gamma$ -ενεργοποιημένης PKC από τον VEGF, έχει παρατηρηθεί σε κολποειδικά ενδοθηλιακά κύτταρα [92].

#### 1.2.3.2.2. Παράγοντες εμπλεκόμενοι στην κυτταρική μετανάστευση

Μία ακόμη σημαντική θέση φωσφορυλίωσης του VEGFR-2 είναι το κατάλοιπο Tyr951 (Tyr949 στους ποντικούς), το οποίο αποτελεί θέση πρόσδεσης για το σηματοδοτικό προσαρμογέα TSA $\Delta$  (T-cell-specific adaptor, επίσης γνωστός και ως VEGF receptor-associated protein (VRAP)). Το μονοπάτι φωσφο-Tyr951-TSA $\Delta$  έχει δείξει να ρυθμίζει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Μειωμένη αγγείωση και ανάπτυξη όγκων σε TSA $\Delta$  ποντικούς έδειξε ότι αυτό το μονοπάτι είναι σημαντικό για ενδοθηλιακά κύτταρα απασχολούμενα σε ενεργή αγγειογένεση [93]. Ο VEGFA επάγει τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ TSA $\Delta$  και Src, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο TSA $\Delta$  ενδεχομένως να ρυθμίζει τη δραστηριότητα της Src και, επομένως, τη διαπερατότητα καθοδικά του VEGFR-2.

Ποντικοί που εκφράζουν τη μετάλλαξη Tyr1212Phe (αντιστοιχεί στο ανθρώπινο κατάλοιπο Tyr1214) VEGFR-2 είναι βιώσιμα και γόνιμα. Η φωσφορυλίωση της Tyr1212/1214 έχει εμπλακεί στην επαγόμενη από τον VEGF αναδιαμόρφωση της ακτίνης μέσω της ενεργοποίησης των μορίων Cdc42 και p38 MAPK [94]. Αναστολή της p38 MAPK αύξησε την επαγόμενη από τον VEGF αγγειογένεση στην χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη



εμβρύων ορνίθων, χωρίς να συνοδεύεται από αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα [95]. Επιπλέον, η p38 MAPK προκαλεί τη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης θερμικού σοκ 27 (Heat shock protein 27, Hsp27), μιας πρωτεΐνης-συνοδού που ρυθμίζει θετικά την επαγόμενη από τον VEGF αναδιαμόρφωση της ακτίνης και μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [96, 97].

Άλλα μόρια που έχουν εμπλακεί στην επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση μέσω του VEGFR-2 περιλαμβάνουν τα μέλη της οικογένειας των κινασών των εστιακών προσφύσεων, δηλαδή την κινάση των εστιακών προσφύσεων (Focal Adhesion Kinase, FAK) και τη σχετική με την FAK τυροσινική κινάση /τυροσινική κινάση εμπλουτισμένη σε προλίνες 2 (Related focal adhesion tyrosine kinase/proline-rich tyrosine kinase 2, RAFTK/Pyk2). Ειδικότερα ο VEGF, μέσω της ενεργοποιημένης κινάσης εξαρτώμενης από την πρωτεΐνη Rho (Rho-dependent kinase, ROCK), φωσφορυλιώνει τη FAK στο κατάλοιπο της σερίνης 732. Η φωσφορυλίωση της Ser732 έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης της FAK καθιστώντας την προσβάσιμη στην Pyk2. Έτσι, η ενεργοποιημένη Pyk2 φωσφορυλιώνει τη FAK στο κατάλοιπο της τυροσίνης 407 με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών παξιλλίνης και βινκουλίνης στις εστιακές προσφύσεις και την επαγωγή της μετανάστευσης των κυττάρων [98].

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενδεχομένως να ρυθμίζεται και από ένα τελευταία αναγνωρισμένο μόριο-προσδέτη στον VEGFR-2, το IQGAP1, το οποίο δένεται και ενεργοποιεί την Rac1, μέσω της αναστολής της δραστηριότητας GTPάσης [99]. Η πρωτεΐνη IQGAP1 συνεντοπίζεται με το φωσφορυλιωμένο VEGFR-2 στο οδηγούσα όψη (leading edge) των μεταναστευτικών ενδοθηλιακών κυττάρων και απάλειψη του IQGAP1 με siRNA εμπόδισε την επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση [100].

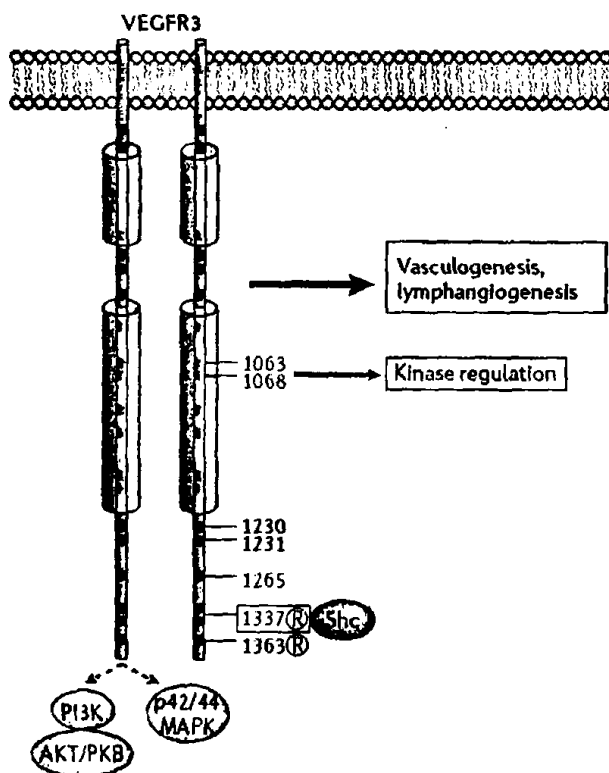
### 1.2.3.3. Η σηματοδότηση από τον VEGFR-3 και η λεμφατική του λειτουργία

Η ανάλυση ενός φάσματος γενετικών μοντέλων δηλώνουν σθεναρά την άμεση σχέση του VEGFR-3 με την εγκαθίδρυση και τη διατήρηση των λεμφαγγείων. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι ο VEGFR-3 είναι ο μόνος υποδοχέας του VEGF για τον οποίο έχουν παρατηρηθεί φυσικά προερχόμενες μεταλλάξεις. Επομένως, δυσλειτουργία των λεμφαγγείων ενδεχομένως να οφείλεται σε εκ γενετής μεταλλάξεις που προκαλούν την απενεργοποίηση του VEGFR-3 [101].

Η δράση κινάσης του VEGFR-3 πιθανώς να ρυθμίζεται από τη φωσφορυλίωση συντηρημένων κατάλοιπων στο αντίστοιχο τμήμα (Tyr1063 και Tyr1068). Η φωσφορυλίωση

του κατάλοιπου Tyr1337 απαιτείται για τη σύνδεση του συμπλόκου Shc-Grb2 στον VEGFR-3 [102], ενώ ο ρόλος άλλων θέσεων φωσφορυλίωσης (Tyr1230, Tyr1231, Tyr1265, Tyr1337 και Tyr1363) στη σηματοδότηση καθοδικά του VEGFR-3 είναι ακόμη ασαφής (Εικόνα 7). Ο VEGFR-3 δημιουργεί ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με τον VEGFR-2 παρουσία του προσδέματος VEGFC [103]. Οι ετεροδιμερείς υποδοχείς ίσως να σχηματίζονται *in vivo* σε λεμφικά ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και σε συγκεκριμένα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως στα τριχοειδή με παραθυρώσεις (fenestrated capillaries), τα οποία εκφράζουν και τους δύο τύπους υποδοχέων [104]. Θα πρέπει να τονιστεί ότι ανάλογα με το συνέταιρο διμερισμού εξαρτώνται και οι πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης, οι οποίες καθορίζουν τα καθοδικά υποστρώματα. Έτσι, κατά τη δημιουργία ετεροδιμερούς, ο VEGFR-3 δε φωσφορυλιώνεται στο κατάλοιπο Tyr1337, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόσδεση της Shc, και στο Tyr1363 [103].

Έχει αναφερθεί ότι ο VEGFR-3 προκαλεί την ενεργοποίηση των ERK1/2 μέσω της PKC αλλά και την ενεργοποίηση του PI3K-AKT/PKB μονοπατιού [105]. Τα



Εικόνα 7: Ο VEGFR-3 και τα υπεύθυνα κατάλοιπα για την καθοδική του σηματοδότηση [55]

παραπάνω μονοπάτια ενδεχομένως να είναι σημαντικά κατά την εμβρυακή ανάπτυξη, όταν ο VEGF καθορίζει τη μετανάστευση και εκβλάστηση των πρόδρομων λεμφικών ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενων από περιορισμένες περιοχές θεμελιωδών φλεβών [106]. Άλλα



μόρια μεταγωγής σήματος που πιθανώς να χρησιμοποιεί ο VEGFR-3 είναι η PLC- $\gamma$ , η SHP2 και οι μεταγραφικοί παράγοντες STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) και STAT5 [107]. Τέλος, η σηματοδότηση του VEGFR-3 εξαρτάται και από την παρουσία συν-υποδοχέων (co-receptor), όπως η νευροπιλίνη 2. Ο κρίσιμος ρόλος αυτής της αλληλεπίδρασης έχει δειχθεί από τον φαινότυπο ποντικών *Neuropilin-2<sup>-/-</sup>*, τα οποία αδυνατούν να σχηματίσουν φυσιολογικά λεμφαγγεία και τριχοειδή [108].

#### 1.2.3.4. Νευροπιλίνες (Neuropilin 1 & 2, NRP1 & NRP2)

Ερευνητικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι συγκεκριμένοι όγκοι και τύποι ενδοθηλιακών κυττάρων εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόρια πρόσδεσης του VEGF διαφορετικής συγγένειας και μοριακής μάζας από τους γνωστούς υποδοχείς τυροσινικής κινάσης του VEGF [109]. Η ισομορφή VEGF<sub>121</sub> δεν προσδένεται σε αυτά τα μόρια υποδηλώνοντας ότι η κωδικοποιούμενη περιοχή από το εξόνιο 7 είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στους θεωρούμενους υποδοχείς [109]. Το 1998 ο παραπάνω υποδοχέας με ειδικότητα ισομορφής του VEGF αναγνωρίστηκε ως νευροπιλίνη 1 (Neuropilin 1, NRP1), ένα μόριο που προσδένει την οικογένεια των σεμαφορινών που εμπλέκεται στη νευρωνική καθοδήγηση (neuronal guidance) [110]. Όταν συνεκφράζεται με τον VEGFR-2, η NRP1 ενισχύει την πρόσδεση του VEGF<sub>165</sub> στον VEGFR-2 [111]. Έχει προταθεί ότι η NRP1 παρουσιάζει τον VEGF<sub>165</sub> στον VEGFR-2 με τέτοιο τρόπο που αυξάνει την αποτελεσματικότητα σηματοδότησης από τον VEGFR-2 [111]. Η πρόσδεση της NRP1 εξηγεί, εν μέρει, τη μεγαλύτερη μιτογόνα δραστηριότητα του VEGF<sub>165</sub> σε σχέση με τον VEGF<sub>121</sub>. Ο ρόλος της NRP1 στην ανάπτυξη του αγγειακού συστήματος έχει δειχθεί από μελέτης γονιδιακής στόχευσης τεκμηριώνοντας εμβρυϊκή θνησιμότητα *NRP<sup>-/-</sup>* ποντικών [112]. Η έκφραση της NRP1 σε καρκινικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τη μεγέθυνση όγκων με ουσιαστικά ενισχυμένη αγγειογένεση του όγκου [113], το οποίο υποδεικνύει ότι οι νευροπιλίνες σταθεροποιούν το σηματοδοτικό σύμπλοκο VEGF/VEGFR, όταν εκφράζονται σε παρακείμενα κύτταρα.

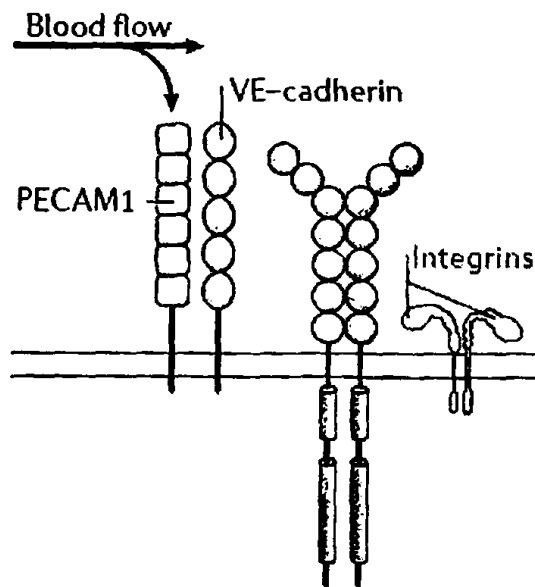
#### **1.2.4. Ρύθμιση της VEGF σηματοδότησης από μόρια προσκόλλησης**

Εκτός από τις μοριακές αλληλεπιδράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω, οι υποδοχείς του VEGF διαμορφώνουν σύμπλοκα με σύνολο μορίων που είτε λειτουργούν είτε όχι ως συν-υποδοχείς των VEGF. Η ροή αίματος και το shear stress επηρεάζουν την αγγειακή ανάπτυξη και αναδιαμόρφωση, τουλάχιστον μερικώς μέσω της δημιουργίας ενός συμπλόκου αισθητήριου μηχανισμού που περιλαμβάνει τον VEGFR-2, το συγκολλητικό μόριο αιμοπεταλίων/ενδοθηλιακών κυττάρων 1 (Platelet-endothelial-cell-adhesion molecule 1,



PECAM1) και την αγγειακή ενδοθηλιακή καδερίνη (vascular endothelial (VE)-cadherin), το οποίο λειτουργεί ανοδικά της ενεργοποίησης των ιντεγκρινών (Εικόνα 8) [114]. Η VE-cadherin, η οποία εντοπίζεται στα σημεία διασύνδεσης μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων, δημιουργεί σύμπλοκο με τον VEGFR-2 και με τις κυτταροπλασματικές κινάσες τυροσίνης Src και Yes *in vitro* και *in vivo* ρυθμίζοντας την αγγειακή διαπερατότητα μέσω χαλάρωσης των συνδέσεων [115].

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθούμε στην οικογένεια των ιντεγκρινών που εμπλέκεται είτε άμεσα είτε έμμεσα στη ρύθμιση των ενδοθηλιακών κυτταρικών λειτουργιών [116]. Στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων η σύγκλιση σηματοδότησης μεταξύ αυξητικών παραγόντων και ιντεγκρινών είναι απαραίτητη, για παράδειγμα, στη ρύθμιση της αναδιοργάνωσης των εστιακών προσφύσεων. Οι VEGFs, όπως και οι FGFs, ενδεχομένως να ενεργοποιούν τις ιντεγκρίνες μέσω της επαγωγής του σηματοδοτικού μονοπατιού PI3K-AKT [116]. Οι ιντεγκρίνες ενδέχεται να επηρεάζουν και τη δραστηριότητα των υποδοχέων τυροσινικής κινάσης. Καλλιέργεια ενδοθηλιακών κυττάρων σε βιτρονεκτίνη (vitronectin), το πρόσδεμα των  $\alpha_v\beta_3$  ιντεγκρινών, οδήγησε στην ενίσχυση της ενεργοποίησης του VEGFR-2 και στη μετάδοση σήματος μέσω του PI3K-AKT μονοπατιού [117]. Επιπλέον, η απάλειψη της αλυσίδας  $\beta_3$  σε ποντικούς προκάλεσε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του VEGFR-2 [117]. Τα παραπάνω δεδομένα τονίζουν τη σημαντικότητα της εξισορροπημένης συνεργασίας μεταξύ των αυξητικών παραγόντων και των ιντεγκρινών στη μετάδοση σημάτων.



Εικόνα 8: Ρύθμιση της σηματοδότησης από τον VEGF από μόρια προσκόλλησης [55]



### 1.3. Οι κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο και ο VEGF

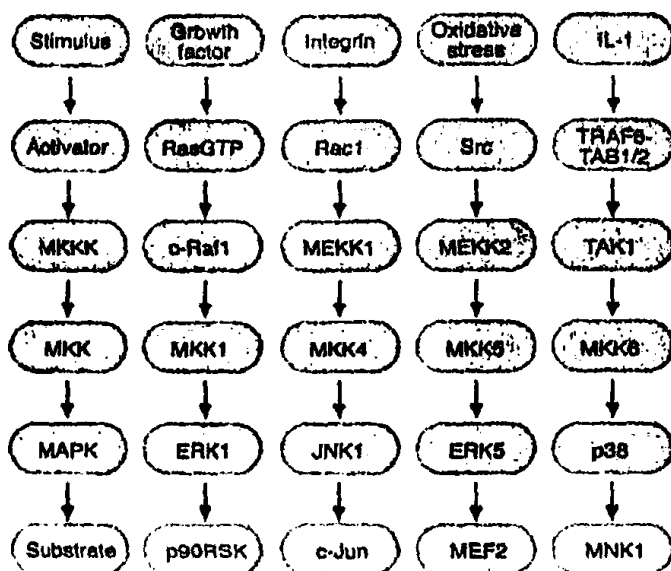
Οι κινάσες ενεργοποιημένες από μιτογόνο (Mitogen Activated Protein Kinases, MAPKs) συνθέτουν μία οικογένεια πρωτεϊνικών κινάσων, των οποίων η λειτουργία και ρύθμιση έχει διατηρηθεί κατά την εξέλιξη του μονοκύτταρου οργανισμού σε πολυκύτταρους οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος [118]. Οι MAPKs φωσφορυλιώνουν ειδικές σερίνες και θρεονίνες των πρωτεϊνών-στόχων και ρυθμίζουν κυτταρικές αποκρίσεις, όπως η γονιδιακή έκφραση, η μίτωση, η μετακίνηση, ο μεταβολισμός και ο προγραμματισμένος θάνατος [119]. Έτσι, οι MAPKs έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης με σκοπό τον καθορισμό των λειτουργιών τους στη φυσιολογία και στην ανθρώπινη παθολογία. Η φωσφορυλίωση των MAPKs-υποστρωμάτων λειτουργεί ως φυσικός διακόπτης διεγείροντας ή καταστέλλοντας τη δραστηριότητα των καθοδικών πρωτεϊνών-στόχων. Στα υποστρώματα περιλαμβάνονται πρωτεϊνικές κινάσες, φωσφολιπάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και πρωτεΐνες κυτταροσκελετού. Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες απαμακρύνουν το φώσφορο από την πρωτεΐνη-στόχο με αποτέλεσμα να επέρχεται η ισορροπία στο σύστημα. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι η δράση των MAPKs και των φωσφατασών μεταβάλλουν αμοιβαία και ταχύτητα τη συμπεριφορά των κυττάρων, καθώς ανταποκρίνονται σε περιβαλλοντικές αλλαγές [119].

Οι MAPKs αποτελούν μέρος ενός καταρράκτη που ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα και περιλαμβάνει τρεις διαδοχικά-ενεργοποιημένες κινάσες οι οποίες, όπως τα υποστρώματά τους, οι MAPKs, ρυθμίζονται από τη φωσφορυλίωσή τους (Εικόνα 9) [120]. Οι MAPKs αποτελούν υποστρώματα φωσφορυλίωσης για τις MAPK κινάσες (Mitogen Activated Kinase Kinases, MAPKK ή MKK ή MEK). Οι MEKs είναι εξειδικευμένες στη φωσφορυλίωση συγκεκριμένων MAPKs. Οι MAPK κινάση κινάσες (Mitogen Activated Kinase Kinase Kinases, MAPKKK ή MKKK) αποτελούν την τρίτη συνιστώσα του σηματοδοτικού καταρράκτη. Οι MKKK περιέχουν ξεχωριστά μοτίβα στις αλληλουχίες τους, υπεύθυνα για τη δραστηριότητα τους και ανταποκρινόμενα σε διαφορετικούς διεγέρτες. Καθώς το κύτταρο ανταποκρίνεται σε διαφορετικά ερεθίσματα, ένα αποτέλεσμα της ύπαρξης πολλών MKKKs είναι η δυνατότητα δημιουργίας συμπλόκων με συγκεκριμένα MKK-MAPK μόρια, έτσι ώστε τα κύτταρα να ανταποκρίνονται σε ποικιλία διεγερτών με την ενεργοποίηση συγκεκριμένων MAPK-μονοπατιών.

Στους ανθρώπους, υπάρχουν τουλάχιστον 11 μέλη της υπεροικογένειας των MAPKs, τα οποία μπορούν να κατανεμηθούν σε 6 ομάδες, σύμφωνα με ομοιότητες στην αλληλουχία [121, 122]:



- i. Εξωκυττάρια ρυθμιζόμενες κινάσες 1 και 2 (Extracellular regulated kinases 1 and 2, ERK1/2, ERK1/2 ή p42 και p42 MAPK)
- ii. c-Jun N-terminal kinases (JNK1, JNK2 & JNK3)
- iii. p38s (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  & p38 $\delta$ )
- iv. ERK5
- v. ERK3s (ERK3, p97 MAPK & ERK4)
- vi. ERK7s (ERK7 & ERK8)



Εικόνα 9: Ο καταρράκτης των MAPKs. Οι υπομονάδες των καταρρακτών που παρουσιάζονται είναι αντιπροσωπευτικές για το αντίστοιχο MAPK-μονοπάτι. Υπάρχουν διάφορες MKKKs, MKKs και MAPKs για κάθε μονοπάτι. Για παράδειγμα, υπάρχουν τρεις πρωτεΐνες Raf (c-Raf1, B-Raf, A-Raf), δύο MKKs (MKK1 και MKK2) και δύο ERKs (ERK1 και ERK2), οι οποίες μπορούν να συνθέσουν τον καταρράκτη των MAPKs που ανταποκρίνεται στους αυξητικούς παράγοντες [119].

Μεταξύ των μονοπατιών MAPKs, οι μηχανισμοί που ελέγχουν την ενεργοποίηση των ERKs έχουν μελετηθεί εκτενώς, καθώς η αναστολή της λειτουργίας των ERKs σταματά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που επάγεται από αυξητικούς παράγοντες [123], ενώ αντίθετα η υπερδιέγερσή τους είναι ικανή να μετασχηματίσει κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια [124]. Πράγματι, η αφθονία των διαθέσιμων βιοχημικών, βιοφυσικών και δομικών πληροφοριών σχετικά με το μηχανισμό και τη φύση της ενεργοποίησης των ERKs έχει οδηγήσει στη χρήση θεωρητικών και υπολογιστικών προσεγγίσεων για τη μελέτη της διέγερσης των MAPKs, καθιστώντας τις ERKs πρότυπα μελέτης για το αναπτυσσόμενο πεδίο της βιολογίας συστημάτων (systems biology) [125].



Για την πλήρη ενεργοποίηση των MAPKs απαιτείται η διπλή φωσφορυλίωση σε δύο συντηρημένα κατάλοιπα θρεονίνης (Threonine, Thr) και τυροσίνης (Tyrosine, Tyr) [122, 126]. Οι δύο θέσεις φωσφορυλίωσης χωρίζονται από ένα μόνο αμινοξύ, ορίζοντας ένα τριπεπτιδικό μοτίβο, Thr-X-Tyr. Ιστορικά, το αμινοξύ που παρεμβάλλεται μεταξύ των δύο θέσεων λήψης φωσφόρου καθόρισε τις διαφορετικές ομάδες των MAPKs. Για παράδειγμα η ERK2 παρουσιάζει το μοτίβο Thr-Glu-Tyr στο βρόγχο ενεργοποίησης, ενώ στην ισομορφή p38 παρεμβάλλεται η γλυκίνη (Glycine, Gly) μεταξύ θρεονίνης και τυροσίνης [118]. Θα πρέπει να τονίσουμε ότι η ικανότητα των MAPKs να αναγνωρίζει διαφορετικές MAPKs εξαρτάται εν μέρει από αυτό το τριπεπτιδικό μοτίβο, συνεισφέροντας στην ειδικότητα των μηχανισμών με τους οποίους ενεργοποιούνται οι MAPKs. Έτσι εξασφαλίζεται η ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται σε διαφορετικά εξωκυττάρια ερεθίσματα [121].

### 1.3.1 Η δομή των MAPKs

Τα δομικά και βιοφυσικά χαρακτηριστικά των MAPKs έχουν μελετηθεί λεπτομερώς τα τελευταία χρόνια. Μέλη των ομάδων ERK, p38 και JNK έχουν κρυσταλλογραφηθεί μόνα ή με την παρουσία υποστρωμάτων, αναστολέων και ικρωμάτων [127]. Ειδικότερα, οι κινάσες ERK και p38 αποτελούνται από δύο περιοχές, με μικρές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Η αμινοτελική περιοχή αποτελείται κυρίως από β-πτυχωτές επιφάνειες και δύο έλικες, αC και αL16. Το καρβοξυ-τελικό άκρο αποτελείται κυρίως από α-έλικες με τέσσερις βραχείς β-αλυσίδες που περιλαμβάνουν αρκετά κατάλοιπα υπεύθυνα για την κατάλυση [128]. Ένας εύκαμπτος συνδέτης επιτρέπει στα δύο τμήματα να περιστρέφονται είτε χωριστά για να αποδεσμεύσουν τα πιθανά υποστρώματα είτε μαζί για να κλείσουν το ενεργό κέντρο. Το ενεργό κέντρο περιέχει τις θέσεις φωσφορυλίωσης, δηλ. τα κατάλοιπα της θρεονίνης (στην ERK: Thr183) και της τυροσίνης (στην ERK: Tyr185), τα οποία πρέπει να φωσφορυλιωθούν και τα δύο για την πλήρη ενεργοποίηση του ενζύμου [126]. Μία ένθεση 50 αμινοξέων, η MAPK ένθεση, που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο διαχωρίζει τις MAPKs από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της υπερικογένειας των κινασών [128].

Οι MAPKs δένουν τους ανοδικούς και καθοδικούς ρυθμιστές και τους καθοδικούς στόχους τους με επιφανειακές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται μέσω μοτίβων ελλειψοειδούς θέσεων πρόσδεσης εντοπισμένων εκτός του καταλυτικού τμήματος [129]. Πιο συγκεκριμένα, έχειδειχθεί ότι τμήμα του καρβοξυ-τελικού άκρου των MAPKs χρησιμοποιείται κοινά από τους ανοδικούς ενεργοποιητές MAPKs, τους καθοδικούς στόχους-πρωτεΐνες ενεργοποιημένες από τις MAPKs (MAPK-activated protein kinases, MAPKAPKs) και τις φωσφατάσες-ρυθμιστές [130]. Αυτό το τμήμα ονομάζεται κοινό τμήμα

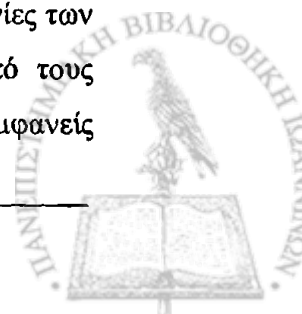
ελλιμενισμού (Common docking domain, CD domain), χαρακτηρίζεται από αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα (Asp316 & Asp319 στην ERK2 και Asp315 & Asp316 στην p38α) και εντοπίζεται σε θέση απέναντι από το ενεργό κέντρο στη στερεοχημική δομή του μορίου [131]. Οι αντίστοιχες θέσεις πρόσδεσης των MAPKs στις MAPKKs, MAPKAPKs και φωσφατάσες βρίσκονται εκτός του καταλυτικού τμήματος τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι παραπάνω αλληλεπιδράσεις δεν είναι προσωρινές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος μέσω του ενεργού κέντρου. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις ονομάζονται αλληλεπιδράσεις ελλιμενισμού (docking interactions) και πιθανώς να ρυθμίζουν την αποτελεσματικότητα και την ειδικότητα των ενζυματικών αντιδράσεων [132]. Επιπλέον έχει αναγνωριστεί και μία ακόμη περιοχή, η ονομαζόμενη ED περιοχή (Glu160 & Asp161 της p38α και Thr156 & Thr157 της ERK2) (ED site), που συνεισφέρει τουλάχιστον στην αναγνώριση και ενεργοποίηση των καθοδικών στόχων-πρωτεϊνών των MAPKs [131].

### 1.3.2 Η μεταγωγή σήματος από τις MAPKs

Οι MAPKs ενεργοποιούνται από πληθώρα διεγερτών, αλλά, ειδικότερα, οι ERKs ενεργοποιούνται κυρίως από αυξητικούς παράγοντες και φορβολεστέρες ενώ, αντίθετα, οι κινάσες p38 και JNK ανταποκρίνονται περισσότερο σε στρεσογόνες καταστάσεις που περιλαμβάνουν το οσμωτικό σοκ, την ιονίζουσα ακτινοβολία και τη διέγερση από κυτοκίνες [122].

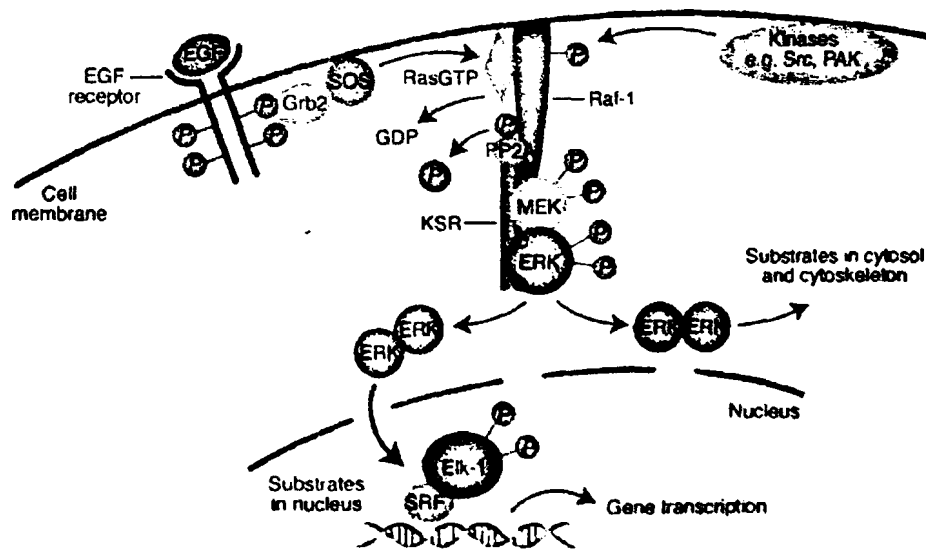
#### 1.3.2.1 Οι κινάσες ERK1/2

Το τυπικό μοντέλο των ERK1/2 στα θηλαστικά, γνωστό και ως κλασικός μιτογόνος καταρράκτης κινασών, αποτελείται από τις MAPKKKs A-Raf, B-Raf και Raf-1, τις MAPKKs MEK1 και MEK2 και τις MAPKs ERK1 και ERK2. Οι ERK1 και ERK2, 44 και 42kD αντίστοιχα, έχουν 83% ομοιότητα (identity) αμινοξέων κυρίως εκτός του ενεργού κέντρου [133]. Εκφράζονται σε διαφορετικές ποσότητες σε όλους τους ιστούς και έχει εκτιμηθεί ότι η συγκέντρωσή τους σε ιστούς που εκφράζονται σε αφθονία κυμαίνεται από 100 μέχρι 500nM [128]. Στους ινοβλάστες ενεργοποιούνται ισχυρά από αυξητικούς παράγοντες, ορό και φορβολεστέρες και σε μικρότερο βαθμό από προσδέματα που ενεργοποιούν υποδοχείς που συνδέονται με GAP (πρωτεΐνη ενεργοποιημένη από GTP, GTP-activated protein) πρωτεΐνες, κυτοκίνες, TGFs και οσμωτικό στρες. Κατά την κυτταρική διαφοροποίηση ενεργοποιούνται από διεγέρτες που ρυθμίζουν συγκεκριμένες λειτουργίες των ιστών, όπως για παράδειγμα από την γλυκόζη στα παγκρεατικά νησίδια και από τους διαβιβαστές στον εγκέφαλο [128]. Οι *Erk1*<sup>-/-</sup> ποντικοί είναι γόνιμοι, χωρίς εμφανείς



ανωμαλίες. Ωστόσο, έχουν κατά δύο φορές μειωμένο τον αριθμό των ώριμων θυμοκυττάρων και ο πολλαπλασιασμός των T-κυττάρων παρουσία διεγερτών είναι περιορισμένος [134].

Η ERK2 εντοπίζεται ευρέως στα αδρανή κύτταρα, ενώ με την ενεργοποίηση της αποδεσμεύονται από την ανοδική κινάση MEK, με αποτέλεσμα ένας σημαντικός πληθυσμός να μεταφέρεται στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση της ERK2 αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για αυτή τη μεταφορά, αλλά και ο διμερισμός των κινασών συνεισφέρει στην πυρηνική τους εντόπιση [135, 136]. Η μετατόπιση της ERK2 από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα πραγματοποιείται είτε με διάχυση είτε με ενεργή μεταφορά, η οποία εξαρτάται από την πρωτεΐνη Ran [136]. Θα πρέπει ωστόσο να τονίσουμε ότι μόνο ένα μέρος της φωσφορυλιωμένης ERK2 μεταβαίνει στον πυρήνα, ενώ έχει και κυτταροπλασματικά υποστρώματα με εξίσου σημαντικό ρόλο, σχετικά με τα πυρηνικά υποστρώματα, στη φυσιολογία του κυττάρου [137]. Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η ενεργοποίηση του καταρράκτη Raf-MEK-ERK από τον EGF.



**Εικόνα 10:** Ενεργοποίηση του μονοπατιού Raf-MEK-ERK από τον EGF. Η πρόσδεση του EGF επάγει το διμερισμό του υποδοχέα και την αυτο-φωσφορυλίωση (P) τυροσινικών καταλοίπων. Αυτές οι φωσφο-τυροσίνες δρουν ως θέσεις ελλειμνισμού για σηματοδοτικά μόρια, όπως το σύμπλοκο Grb2-SOS, το οποίο ενεργοποιεί τη μικρή G-πρωτεΐνη Ras. Στην ενεργοποιημένη Ras (RasGTP) προσδένεται η Raf-1, με αποτέλεσμα να στρατολογείται από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη και να ενεργοποιείται. Η ενεργοποίηση της Raf-1 περιλαμβάνει την αποφωσφορυλίωση ανασταλτικών θέσεων από την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (Protein phosphatase 2A, PP2A), όπως επίσης και φωσφορυλίωση θέσεων ενεργοποίησης από την κινάση ενεργοποιημένη από την p21 (p21-activated kinase, PAK), την οικογένεια Src και από άλλες, άγνωστες μέχρι σήμερα, κινάσες. Η ενεργοποιημένη Raf-1 φωσφορυλιώνει τη MEK, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί την ERK. Η πρωτεΐνη KSR έχει το ρόλο ικρώματος. Η ενεργοποιημένη ERK έχει πλήθος υποστρωμάτων, τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα [138]

### 1.3.2.1.1 Οι ενεργοποιητές των ERK1/2

Η διπλή φωσφορυλίωση των ERK1/2 και, επομένως, η ενεργοποίησή τους, παραγματοποιείται από τις ανοδικές MAPKKs, MEK1 και MEK2, τα πρώτα αγνωρισμένα μέλη της οικογένειας των διπλής εξειδίκευσης πρωτεϊνικών κινασών. Όπως συμβαίνει και με τις MAPKs, η διπλή φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των MEK1/2 προκαλεί την αύξηση της δραστηριότητάς τους κατά 1000-φορές [126, 139]. Ωστόσο, οι δύο φωσφορυλίωσεις πραγματοποιούνται σε κατάλοιπα σερίνης (Ser217 και Ser221), καθένα από τα οποία θα αυξήσει μερικώς τη δραστηριότητα των MEK1/2 [139]. Οι MEKs έχουν στο αμινοτελικό άκρο τους σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear export signal, NES), υπεύθυνο για την κυτταροπλασματική τους εντόπιση. Ωστόσο, ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι οι MEKs έχουν τη δυνατότητα εισαγωγής στον πυρήνα με διάχυση. Στη συνέχεια, προσδένουν την αποφωσφορυλιωμένη ERK και εξέρχονται ως σύμπλοκο από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα, με σκοπό τη διέγερση τους εκ νέου [140].

Γενικότερα, η οικογένεια των MEK είναι ανάμεσα στις πιο εκλεκτικές πρωτεϊνικές κινάσες καθώς είναι γνωστό ότι φωσφορυλιώνουν περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων. Ειδικότερα για τις MEK1/2, τα μόνα υποστρώματα που έχουν αναγνωριστεί είναι οι ERK1/2, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν περισσότερες από 70 καθοδικές πρωτεΐνες [137]. Εν τούτοις, το μέλος της οικογένειας των MEKs MEK4, έχει δειχθεί ότι ενεργοποιεί τουλάχιστον μία πρωτεΐνη εκτός των MAPKs, υποδηλώνοντας ότι άλλα μέλη της MEK-οικογένειας ενδεχομένως να έχουν υποστρώματα που δεν είναι MAPKs [141]. Οι *Mek1*<sup>-/-</sup> ποντικοί καταλήγουν στην εμβρυϊκή θνησιμότητα εξαιτίας ατελούς ανάπτυξης του πλακούντα. Επιπλέον, η παρατήρηση ότι οι *Mek1*<sup>-/-</sup> ινοβλάστες παρουσιάζουν ανεπαρκή μετανάστευση παρουσία φιβρονεκτίνης, παρόλο που η ενεργοποίηση των MEK2 και ERK2 ήταν φυσιολογική, υποδηλώνει ότι η MEK1 ενδεχομένως να έχει πρόσθετους ρόλους, εκτός της ενεργοποίησης των ERK1/2 [142].

Η διπλή φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των MEK1/2 πραγματοποιείται από τις ανοδικές MAPKKKs A-Raf, B-Raf και Raf-1 (Rapid growing fibrosarcomas, Raf). Η Raf-1 εκφράζεται ευρέως, ενώ η A-Raf εντοπίζεται κυρίως στους ουρογενετικούς ιστούς και η B-Raf δείχνει αυξημένη έκφραση στα νεύρα και στους όρχεις [143]. Η Raf-1 είναι το πιο εκτενώς μελετημένο προϊόν της οικογένειας των raf γονιδίων και έχει αποτελέσει στόχο για την ανάπτυξη πολλών αντικαρκινικών θεραπειών [138]. Οι πρωτεΐνες Raf ρυθμίζουν τη μετάδοση του σήματος μέσω του μονοπατιού Raf-MEK-ERK δρώντας ως κινάση έναρξης στον καταρράκτη των κινασών. Επομένως, η δραστηριότητα των Rafs αποτελεί στόχο αυστηρά ρυθμιζόμενης ρύθμισης. Η ενεργοποίηση της Raf περιλαμβάνει στρατολόγηση στην



κυτταρική μεμβράνη και πρόσδεση στη Ras-GTP, αποφωσφορυλίωση μιας ανασταλτικής θέσης (inhibitory site) (Ser259) και στη συνέχεια φωσφορυλίωση του καταλοίπου Ser338 και/ή Tyr341 του ενεργού κέντρου της Raf [144]. Οι κύριες φωσφατάσες PP1 και PP2A συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της Raf-1, αποφωσφορυλιώνοντας το κατάλοιπο Ser259 [145-148]. Αρκετές κινάσες, όπως η PAK3, οι τυροσινικές κινάσες της οικογένειας Src και ενδέχομένως κινάσες που δεν έχουν αναγνωριστεί ακόμη, φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν την Raf-1 [138]. Τέλος, πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα αναδεικνύουν τη φωσφατάση PP5 υπεύθυνη για την αποφωσφορυλίωση του καταλυτικά ενεργού καταλοίπου Ser338 της Raf-1 και την επακόλουθη απενεργοποίηση της σε *in vivo* δοκιμασίες [148]. Αρκετά μοντέλα έχουν μελετηθεί με σκοπό να καθοριστεί ο ρόλος των Raf πρωτεϊνών. Οι *a-raf*<sup>-/-</sup> ποντικοί επιβιώνουν μέχρι τη γέννηση, αλλά πεθαίνουν μετά από 7-21 ημέρες εξαιτίας νευρολογικών και γαστροεντερικών προβλημάτων [149]. Οι *B-RAF*<sup>-/-</sup> και *C-RAF*<sup>-/-</sup> ποντικοί πεθαίνουν μεταξύ των εμβρυϊκών ημερών 10.5-12.5. Τα *B-RAF*<sup>-/-</sup> έμβρυα δείχνουν καθυστερημένη ανάπτυξη και ανωμαλίες στο αγγειακό και νευρολογικό σύστημα, ενώ τα *C-RAF*<sup>-/-</sup> έμβρυα πεθαίνουν εξαιτίας μαζικής απόπτωσης ηπατικών κυττάρων [150, 151].

#### 1.3.2.1.2 Καθοδικοί στόχοι των ERK1/2

Οι ERKs φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης ακολουθούμενα από προλίνη. Η πιο χαρακτηριστική ακολουθία είναι Pro-Leu-Ser/Thr-Pro [152]. Στα υποστρώματα των ERKs περιλαμβάνονται μεβρανικές πρωτεΐνες (CD120A, Syk και calnexin), πυρηνικές πρωτεΐνες (SRC-1, Rax6, NF-AT, Elk-1, MEF2, c-Fos, c-Myc και STAT3), πρωτεΐνες κυτταροσκελετού (neurofilaments και paxillin) και αρκετές πρωτεΐνες ενεργοποιημένες από τις MAPKs (MAPK-activated kinases proteins, MAPKAPKs ή MKs) [153]. Οι πρωτεΐνες RSKs, MSKs και MNKs αντιπροσωπεύουν τρεις οικογένειες κινασών που ενεργοποιούνται από τις ERK1/2 και εμπλέκονται στον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων [154]. Οι καθοδικοί στόχοι των ERK1/2 και η σχέση τους με την τοπολογία των κινασών θα αναπτυχθεί αναλυτικά στη συνέχεια.

#### 1.3.2.2 Η οικογένεια των p38 κινασών

Το p38 είναι το αρχέτυπο μέλος της δεύτερης οικογένειας των MAPKs στα θηλαστικά. Το σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποίησης του p38 περιλαμβάνει:

- i. πολλές MAPKKKs, όπως τις MEKK1-4, MLK2 και 3, DLK, ASK1, Trp2 και TAK1,
- ii. τις MAPKKs MEK3 και MEK6 (επίσης γνωστές ως MKK3 και MKK6) και





- iii. τις ισομορφές του p38: p38α (επίσης γνωστή ως SAPK2a, Mxi2 ή MPK2), p38β (SAPKb), p38γ(SAPK3) και p38δ(SAPK4).

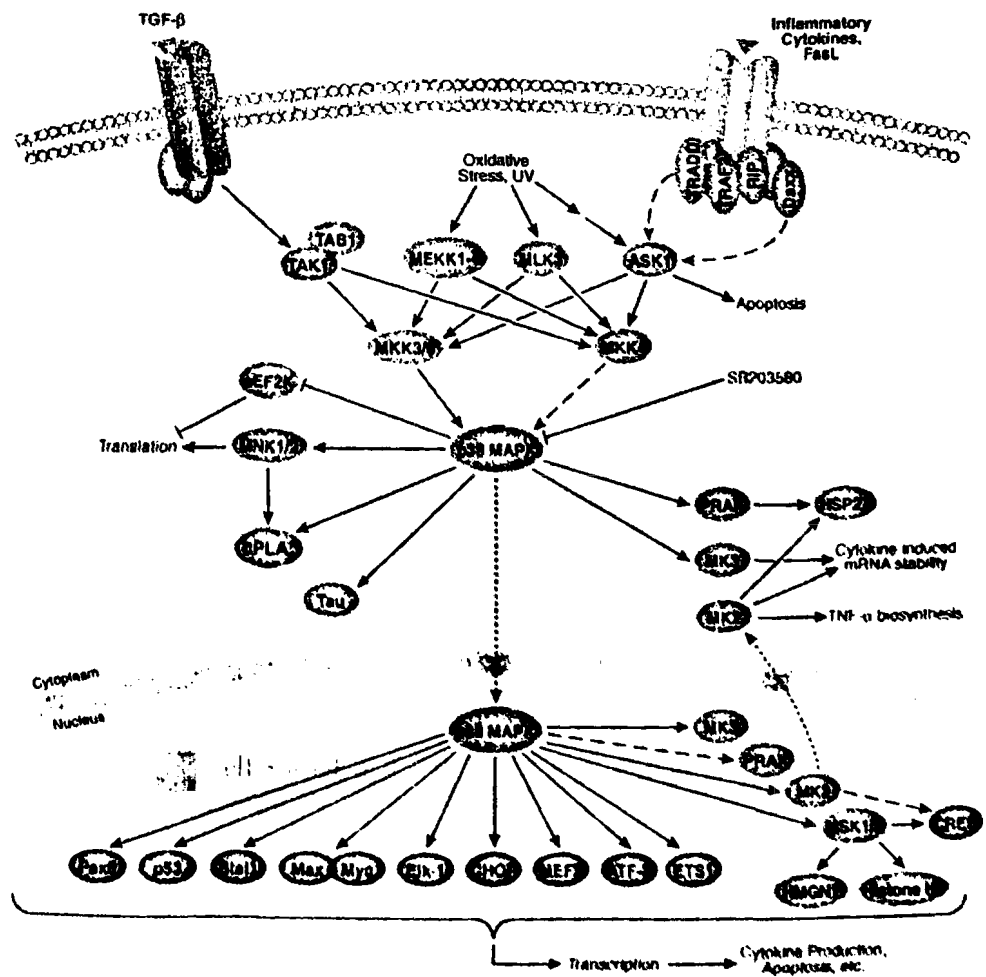
Οι p38α και p38β εκφράζονται ευρύτατα, ενώ οι p38γ και p38δ έχουν διακριτά μοτίβα έκφρασης. Η ισομορφή p38γ (επίσης γνωστή ως ERK6) εκφράζεται κυρίως στο σκελετικό μυ και η έκφραση της αυξάνεται κατά τη μυϊκή διαφοροποίηση [155]. Η ισομορφή p38δ εκφράζεται κυρίως στους πνεύμονες, νεφρούς, στα ενδοκρινή όργανα και στο λεπτό έντερο [156]. Στα κύτταρα θηλαστικών, οι ισομορφές της p38 ενεργοποιούνται ισχυρά από περιβαλλοντικό στρες και φλεγμονώδεις κυτοκίνες και λιγότερο από μιτογόνα ερεθίσματα. Οι περισσότεροι διεγέρτες είναι κοινοί για τις p38 και JNK πρωτεΐνες. Ωστόσο, μόνο οι p38 MAPKs αναστέλλονται από το αντι-φλεγμονώδες φάρμακο SB203580, το οποίο έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμο στη σκιαγράφιση των p38 λειτουργιών [153]. Οι p38α<sup>-/-</sup> ποντικοί παρουσιάζουν εμβρυϊκή θνησιμότητα περίπου την 10,5 ημέρα, καθιστώντας την p38α MAPK απαραίτητη κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη των θηλαστικών. Ωστόσο, παρόλο που εκφράζεται ευρέως στο έμβryo, η p38α εμφανίζεται να είναι κρίσιμη αποκλειστικά στην οργανογένεση του πλακούντα [157].

#### 1.3.2.2.1 Οι ενεργοποιητές των p38 MAPKs

Οι MEK3 και MEK6 θεωρούνται οι κύριες κινάσες για την ενεργοποίηση της p38 σε κύτταρα [158]. Η MEK4 επίσης παρουσιάζει δραστικότητα έναντι της p38 (Σχήμα 11). Η MEK6 είναι κοινός διεγέρτης για όλες τις ισομορφές της p38, ενώ η MEK3 ενεργοποιεί τις p38α, p38γ και p38δ. Επιπλέον, οι MEK3/6 παρουσιάζουν αυξημένη ειδικότητα προς τις p38, καθώς δεν ενεργοποιούν τις ERK1/2 και JNKs. Οι MEK3/6 βρίσκονται και στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα των κυττάρων, παρόλ'αυτά, δεν είναι γνωστό το κυτταρικό διαμέρισμα στο οποίο πραγματοποιείται η ενεργοποίηση της p38 MAPK. Αντίστοιχα με τις MEK1/2, το αμινοτελικό άκρο των MEK3/6 είναι υπεύθυνο για την αλληλεπίδρασή τους με τις p38 MAPKs. Ειδικότερα, η MEK6 ανταγωνίζεται για την πρόσδεση της στο καρβοξυτελικό άκρο της p38α με τη φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης MKP5/DUSP10 και την πρωτεΐνη-στόχο του p38α, MNK1, μέσω της περιοχής KIM [130]. Οι MEK3/6 φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται από πληθώρα MEKKs, αλλά οι λεπτομέρειες της συνεισφοράς τους στο σηματοδοτικό μονοπάτι της p38 παραμένουν άγνωστες. Οι MEKK1-3 έχουν εμπλακεί στην ενεργοποίηση της p38, παρόλο που κυρίως έχουν ενεργό ρόλο στη διέγερση των ERKs και JNKs [159, 160]. Επίσης, η οικογένεια των MLKs (mixed lineage kinases, MLKs) έχει χαρακτηριστεί ως υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της p38 MAPK [161]. Για παράδειγμα, η MLK3 εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της p38 MAPK από τον



TGF- $\beta$  με αποτέλεσμα την αυξημένη απόπτωση των ηπατοκυττάρων [162]. Άλλες κινάσες υπεύθυνες για την ενεργοποίηση της p38 MAPK είναι οι TAK1 και ASK1. Η πρώτη με τη συνέργια της TAB1 (TAK1-binding protein 1) αυξάνει τη δραστικότητα της MEK3 και επομένως της p38 MAPK, παρουσία του TGF- $\beta$  [163]. Από την άλλη πλευρά, η TAB1 έχει τη δυνατότητα να προσδένει απευθείας την p38 MAPK, προκαλώντας την αυτοφωσφορυλίωση και, επομένως, την ενεργοποίηση της, ανεξάρτητα της MEK3 [164, 165]. Τέλος, η ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase) είναι ακόμη μία MAPKKK που ενεργοποιεί την p38 MAPK, παρουσία  $H_2O_2$  και TNF. Πειράματα σε *ASK1*<sup>-/-</sup> ποντικούς οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η παρουσία της ASK1 είναι απαραίτητη για την παρατεταμένη ενεργοποίηση της p38 MAPK παρουσία οξειδωτικού στρες που καταλήγει στον κυτταρικό θάνατο [166]. Επίσης έχει δειχθεί οι *ASK1*<sup>-/-</sup> είναι λιγότερο ευαίσθητοι από τους *ASK1*<sup>+/+</sup> εμβρυϊκούς ινοβλάστες στον κυτταρικό θάνατο που επάγει η παρουσία των παραπάνω στρεσογόνων παραγόντων [167].



Εικόνα 11: Το σηματοδοτικό μονοπάτι του p38 MAPK.  
([www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK\\_p38.jsp](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/MAPK_p38.jsp))



#### 1.3.2.2. Καθοδικοί στόχοι των p38 MAPKs

Η ενεργοποιημένη από MAPK πρωτεϊνική κινάση 2 (MAPK-activated protein kinases 2, MAPKAP-2 ή MK2) είναι το πρώτο αναγνωρισμένο υποστρώμα της p38 MAPK. Η φωσφορυλίωση της MK2 από την p38 MAPK οδηγεί και στην ενεργοποίησή της. Διαδοχικά, η συγγενεύουσα πρωτεΐνη MK3 αναγνωρίστηκε επίσης ως καθοδικός στόχος της p38 MAPK. Επιπλέον, οι διεγερμένες MK2 και MK3 φωσφορυλιώνουν διάφορα υποστρώματα, όπως η πρωτεΐνη θερμικού σοκ 27 (Heat shock protein 27, Hsp27), cAMP response element-binding protein (CREB), ο μεταγραφικός παράγοντας ATF1 και η τυροσινική υδροξυλάση [168]. Η συνδεδεμένη στη MAPK πρωτεϊνική κινάση 1 (MAPK-interacting kinase 1, MNK1), και όχι η ισομορφή της MNK2, προσδένεται και φωσφορυλιώνεται από την p38 MAPK. Καθώς η MNK1 μπορεί να φωσφορυλιώσει τον ευκαρυωτικό παράγοντα έναρξης-4E (eukaryotic initiation factor-4E, eIF-4E) *in vitro*, υποδεικνύεται ένας ρόλος της p38 MAPK στην έναρξη της μετάφρασης [169]. Σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια η p38 MAPK φωσφορυλιώνει την κυτταροπλασματική φωσφολιπάση A2 (cytosolic phospholipase A2, cPLA2) παρουσία ομοκυστεΐνης [170]. Επίσης, η ενεργοποίηση της συνδεδεμένης με τη μικροτουμπουλίνη πρωτεΐνης (microtubulin-associate protein, tau) από την p38 MAPK έχει συνδεθεί με την ασθένεια Alzheimer. Ωστόσο είναι ασαφές αν η tau πρωτεΐνη ενεργοποιείται απευθείας από την p38 MAPK ή διαμεσολαβεί ένα τρίτο μόριο [171]. Τέλος, η p38 MAPK προάγει τη δραστηριότητα πολλών μεταγραφικών παραγόντων, όπως οι ATF-1/2, MEF2C, Elk-1, NF-Kb, Ets-1 και p53 [128].

#### 1.3.3 Η κυτταρική εντόπιση των ERK και p38 MAPKs

Ο εξαιρετικά μεγάλος αριθμός των MAPK-υποστρωμάτων και η ποικιλία των βιολογικών διαδικασιών που ρυθμίζουν εγείρουν ερωτήματα σχετικά με τον τρόπο που καθορίζεται η εξειδίκευση των MAPKs προς τα υποστρώματά τους. Μία ελκυστική εξήγηση είναι η διαμερισματοποίηση ενώ, και ο ρόλος της χωρικής οργάνωσης των σηματοδοτικών μονοπατιών στη δυναμική ρύθμιση των λειτουργιών των MAPKs αποτελεί αντικείμενο έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η σπουδαιότητα της κυτταρικής εντόπισης των MAPKs αντικατροπίζεται στην αφθονία των μηχανισμών που διεκπεραιώνουν.

##### 1.3.3.1 Κυτταρική διαμερισματοποίηση των ERKs

Οι ERK1/2 εντοπίζονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα απουσία διεγέρτη, πιθανώς λόγω της συνεχούς αλληλεπίδρασης με τις MEK1/2, οι οποίες περιέχουν σήμα εξαγωγής από τον πυρήνα (Nuclear export signal, NES) και εντοπίζονται εκτός πυρήνα ανεξαρτήτως της



κατάστασης τους [172]. Μετά τη φωσφορυλίωση τους οι ERK1/2 αποδεσμεύονται από τις MEK1/2 και μεταβαίνουν στον πυρήνα [173]. Ωστόσο οι MEK1/2 έχουν χαρακτηριστεί ως υπεύθυνες και για την εξαγωγή των ERK1/2 από τον πυρήνα. Ενώ η εξαγωγή των MEK1/2 αποδίδεται στην αλληλουχία NES στο αμινοτελικό τους άκρο, η εισαγωγή τους πιθανώς να πραγματοποιείται με παθητική διάχυση [140]. Παρεμπόδιση της πυρηνικής μετατόπισης των ERKs σε ινοβλάστες επηρεάζει την επαγόμενη από τις ERKs γονιδιακή ρύθμιση και τις μιτογόνες αποκρίσεις [174]. Επομένως, δεν προκαλεί καμία εντύπωση το γεγονός ότι η ενδοκυττάρια διανομή των ERKs έχει χρησιμοποιηθεί για τη γενικότερη ρύθμιση των λειτουργιών τους.

Η μετακίνηση των ενεργοποιημένων ERK1/2 στον πυρήνα έχει αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης τα τελευταία χρόνια. Η πυρηνική συσσώρευση της ERK2 εξαρτάται από την κατάσταση φωσφορυλίωσής της παρά από τη δραστηριότητά της ως κινάση. Η ενεργοποιημένη ERK2 δημιουργεί διμερή με φωσφορυλιωμένα ή μη-φωσφορυλιωμένα μόρια ERK2, ενώ η διάσπαση του συμπλόκου μειώνει τη συσσώρευση της ERK2 στον πυρήνα [135]. Επιπλέον, πρόσφατα αναγνωρίστηκαν και πρωτεΐνες που συνεισφέρουν στην πυρηνική εντόπιση των ERKs. Η πυρηνική πρωτεΐνη Mxi2 είναι μια ισομορφή της κινάσης p38α, με την οποία διαφέρει μόνο στα 17 τελευταία αμινοξέα του καρβοξυ-τελικού άκρου. Η Mxi2 δένεται άμεσα με τις ERK1/2 παρατείνοντας την ενεργοποίηση και το διάστημα παραμονής τους στον πυρήνα. Αυτή η αλληλεπίδραση επιδρά στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ δεν επηρεάζει τα κυτταροπλασματικά υποστρώματα των ERK1/2 [175].

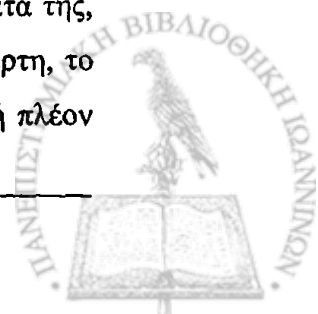
Η φωσφοπρωτεΐνη PEA-15 (15kDa), η οποία εκφράζεται ευρέως σε διαφορετικούς ιστούς και είναι υψηλά συντηρημένη στα θηλαστικά, έχει την ικανότητα να προσδένει την ERK και να τη διατηρεί στο κυτταρόπλασμα παρουσία TNF [176]. Ο μηχανισμός είναι μέχρι σήμερα ασαφής. Ωστόσο έχει προταθεί ότι η επίδραση αυτή ίσως οφείλεται στην αλληλουχία NES της PEA-15 και επομένως τη διατήρηση του συμπλόκου στο κυτταρόπλασμα ή στην παρεμβολή της PEA-15 στην αλληλεπίδραση της ERK2 με τις νουκλεοπορίνες [177, 178]. Ως αποτέλεσμα, η PEA-15 επιδρά στον πολλαπλασιασμό και οι PEA-15<sup>-/-</sup> ποντικοί παρουσιάζουν υπερπολλαπλασιασμό των ηπατικών και λεμφικών ιστών [178]. Επίσης, μια ακόμη πρωτεΐνη που διατηρεί την ERK2 στο κυτταρόπλασμα είναι η αρρεστίνη-2 (arrestin-2). Η αρρεστίνη-2 σε ρόλο κριώματος οδηγεί τις κινάσες ERK2 και MEK1 μαζί με τον GPC (G-protein coupled) υποδοχέα τύπου 1α της αγγειοτενσίνης II στα πρώιμα ενδοσώματα με αποτέλεσμα η σηματοδότηση από την ERK2 να αποκλείεται από τον πυρήνα, πιθανώς λόγω του NES της αρρεστίνης-2 [179]. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι η αγγειοτενσίνη II ενεργοποιεί την κινάση Akt, η οποία στη συνέχεια προσδένει και

σταθεροποιεί την PEA-15. Μέσω λοιπόν της Akt και στη συνέχεια της PEA-15, η αγγειοτενσίνη II ελέγχει την πυρηνική εντόπιση της ERK2 και τον επαγόμενο πολλαπλασιασμό [180]. Μία ακόμη πρωτεΐνη που διατηρεί την ενεργοποιημένη ERK στο κυτταρόπλασμα είναι η SEF (Similar to *fgf* genes) παρουσία των αυξητικών παραγόντων FGF ή EGF. Η SEF δένεται στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο MEK/ERK, αναστέλλει την αποδέσμευση της ERK από το σύμπλοκο και με αυτόν τον τρόπο εμποδίζει τη μεταφορά της στον πυρήνα [181].

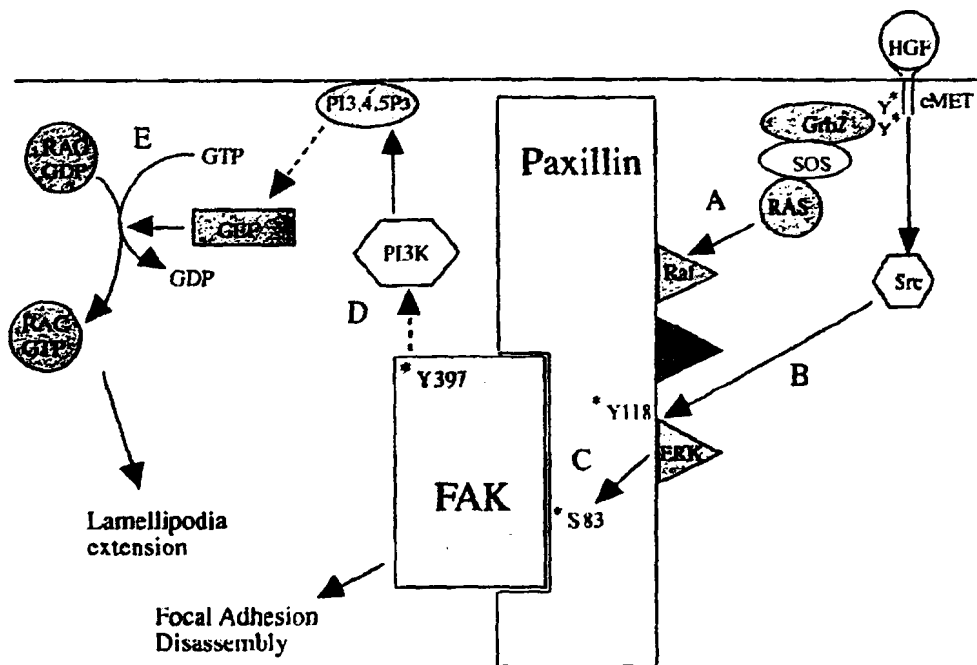
Το μονοπάτι των ERK1/2 ρυθμίζει τη δυναμική του κυτταροσκελετού, η οποία καθορίζεται από τη συντονισμένη συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων, και την κυτταρική μετακίνηση μέσω διαφόρων μορίων [182]. Η πρωτεΐνη παξιλλίνη (paxillin) συντονίζει την εξάπλωση και μετακίνηση του κυττάρου μέσω του κείριου ρόλου της στη δημιουργία των θέσεων προσκόλλησης του κυττάρου με την εξωκυττάρια ουσία, τις ονομαζόμενες εστιακές προσφύσεις (focal adhesions) [183]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι η παξιλλίνη λειτουργεί ως κείριωμα οργανώνοντας τις MAPK πρωτεΐνες Raf, MEK και ERK στις εστιακές προσφύσεις μετά από ενεργοποίηση με HGF [184]. Ειδικότερα, ο HGF στρατολογεί την ενεργοποιημένη Raf-1 και την ανενεργή ERK στην παξιλλίνη, πιθανώς με σκοπό να εξασφαλίσει την ενεργοποίηση της ERK ειδικά σε εκ νέου σχηματιζόμενες εστίες συγκόλλησης. Εφόσον η ERK έχει προσδέσει την παξιλλίνη, την φωσφορυλιώνει στο κατάλοιπο της σερίνης 83, το οποίο προάγει την πρόσδεση και της FAK στην παξιλλίνη και τελικά την ενεργοποίηση της GTPase Rac [184]. Η FAK επάγει την τοπική αποσυναρμολόγηση των εστιακών προσφύσεων, ενώ η Rac ξεκινά τη μετακίνηση μέσω της επέκτασης των πτυχωτών προεκτάσεων στο μπροστινό άκρο του κυττάρου. Επομένως, η παξιλλίνη συντονίζει το ρυθμό μετατροπής (turnover) των εστιακών προσφύσεων και τη μετακίνηση των κυττάρων λειτουργώντας ως κείριωμα υπεύθυνο για την εντοπισμένη σύνδεση μεταξύ των ERK και FAK σηματοδοτικών μονοπατιών (Εικόνα 12) [137].

#### 1.3.3.2. Κυτταρική διαμερισματοποίηση των p38 MAPKs

Η κυτταρική εντόπιση της p38 MAPK και η μετακίνηση της μετά την ενεργοποίησή της δεν είναι πλήρως κατανοητή μέχρι σήμερα. Έχει δείχθει ότι, σε αντίθεση με τις ERK1/2, η p38 MAPK βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα των μη-ενεργοποιημένων κυττάρων. Στα πρώτα λεπτά της φωσφορυλίωσης της ενδεχομένως να ενεργοποιεί τα πυρηνικά υποστρώματα της, όπως οι μεταγραφικοί παράγοντες ATF1 & 2. Μετά από 10 λεπτά παρουσίας διεγέρτη, το μεγαλύτερο μέρος της p38 MAPK εξάγεται από τον πυρήνα. Η κυτταροπλασματική πλέον



p38 MAPK είναι ενεργή και η δραστικότητα κινάσης αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την εξαγωγή της από τον πυρήνα [185]. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η MK2 είναι το πρώτο αναγνωρισμένο υπόστρωμα της p38 MAPK. Στην αλληλουχία της MK2 εντοπίζεται ένα NLS στο καρβοξυ-τελικό άκρο της, υπεύθυνο για την πυρηνική εντόπιση της πρωτεΐνης. Ωστόσο, μετά από φωσφορυλίωση



**Εικόνα 12: Μοντέλο της επαγόμενης από τον HGF σηματοδότησης από παξιλλίνη-MAPK στις εστιακές προσφύσεις.** Η παξιλλίνη, σε ρόλο τοπικού ικρίωματος για τη στρατολόγηση και ενεργοποίηση της ERK, είναι η ίδια υπόστρωμα της φωσφορυλιωμένης ERK. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεση της παξιλλίνης και της FAK, και την εντοπισμένη ενεργοποίηση της PI3-K. Έτσι, η ενεργοποίηση της Rac και της αναδιοργάνωσης των εστιακών προσφύσεων, η οποία εξαρτάται από την FAK, ρυθμίζονται χωρικά στη γειτνιάζουσα περιοχή του υποδοχέα [186].

της MK2 από την p38 MAPK στον πυρήνα, η αλληλουχία NLS της MK2 πιθανώς καλύπτεται και ταυτόχρονα αποκαλύπτεται μια αλληλουχία NES, η οποία είναι και τελικά υπεύθυνη για την κυτταροπλασματική εντόπιση του συμπλόκου p38-MK2 και την ενεργοποίηση των υποστρωμάτων τους [187]. Επιπλέον, έχει δείχθει ότι η ενεργοποιημένη p38 MAPK συνεντοπίζεται με την ενεργοποιημένη Hsp27 στη βάση των πτυχωτών προεκτάσεων του κυττάρου επιτρέποντας τον πολυμερισμό της ακτίνης και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού [188].

Τέλος, θα πρέπει να τονίσουμε ότι η ενεργοποιημένη κυτταροπλασματική p38 MAPK ρυθμίζει την ενδοκύτωση παρουσία στρεσογόνων παραγόντων για το κύτταρο. Οι GTP πρωτεΐνες Rab ρυθμίζουν την ενδοκυττάρια μεταφορά των μεμβρανικών υποδοχέων [189]. Έχει δείχθει ότι η p38 MAPK φωσφορυλιώνει τις EEA1 και Rabenosyn-5, δύο πρωτεΐνες-

τελεστές της Rab5, επηρεάζοντας τη μεμβρανική εντόπιση τους [190]. Έτσι λοιπόν, αναδεικνύεται ο ρόλος της p38 MAPK στην ενδοκύτωση μέσω της ενεργοποίησης του κυτταροπλασματικού κύκλου της Rab5.

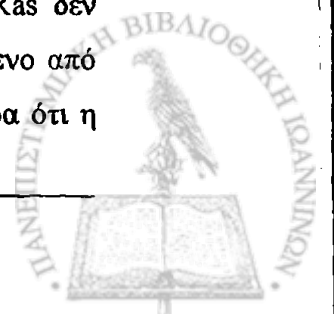
#### 1.3.4. VEGF και MAPKs σε ενδοθηλιακά κύτταρα

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, ο VEGF κατέχει κύριο ρόλο σε δύο βασικά στάδια της αγγειογένεσης, τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων [68, 97], οι MAPKs έχουν καθοριστικό ρόλο. Στη συνέχεια θα αναπτυχθεί η ρύθμιση των δύο βασικών κυτταρικών αποκρίσεων από τον VEGF και ο τρόπος με τον οποίο οι MAPKs κινάσες καθορίζουν το τελικό αποτέλεσμα.

##### 1.3.4.1. VEGF, ERK1/2 και πολλαπλασιασμός ενδοθηλιακών κυττάρων

Από τα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας είναι γνωστό ότι οι *VEGFR-2*<sup>-/-</sup> ποντικοί πεθαίνουν εξαιτίας της μειωμένης ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της προβληματικής δημιουργίας αγγείων. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει το σημαντικότερο ρόλο του VEGFR-2 στη ρύθμιση του μιτογόνου σήματος του VEGF κατά την εμβρυογένεση. Είναι καθολικά αποδεκτό ότι το μονοπάτι των MAPKs που είναι υπεύθυνο για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνει την MAPKKK Raf-1, τις MAPKKs MEK1/2 και τις MAPKs ERK1/2 [92]. Ο αναστολέας της MEK1/2, PD98059 αναστέλλει και την επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση των ERK1/2 καθώς και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ενώ για πολλούς αυξητικούς παράγοντες, όπως EGF, PDGF και NGF, έχει δείχθει ότι η Raf κινάση ενεργοποιείται από την GTPάση Ras, αντικρουόμενα πειραματικά δεδομένα έχουν δημοσιευτεί για τα μόρια που χρησιμοποιεί ο VEGF με σκοπό να διαδώσει το μιτογόνο του σήμα.

Από το 1997 και με μία σειρά δημοσιεύσεων η ομάδα Takahashi et al., τοποθέτησε στο σηματοδοτικό μονοπάτι του VEGF που εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων τα μόρια με το σημαντικότερο ρόλο. Αρχικά δείχτηκε ότι η PLC-γ είναι το άμεσο και κύριο υπόστρωμα του ενεργοποιημένου VEGFR-2 [191]. Στη συνέχεια δείχτηκε ότι ο VEGFR-2 ενεργοποιεί την PLC-γ, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τον καταρράκτη των μορίων PKC-Raf1-MEK-ERK1/2 με αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επίσης, η πρωτεΐνη Ras δεν ενεργοποιήθηκε από τον VEGF στο ίδιο σύστημα κυττάρων και η υπερέκφραση της καταλυτικά ανενεργής μορφής της Ras δεν προκάλεσε καμία μορφολογική αλλαγή στα κύτταρα και δεν επηρέασε τον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό [92]. Δύο χρόνια αργότερα δείχτηκε από την ίδια ομάδα ότι η



PLC- $\gamma$  προσδένεται στον VEGFR-2 μέσω του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου της τυροσίνης 1775 (Y1175) στο καρβοξυ-τελικό άκρο του υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση του συγκεκριμένου καταλοίπου παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην αλληλεπίδραση της PLC- $\gamma$  με τον VEGFR-2 αλλά και στον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [86]. Συγκριτικές έρευνες μεταξύ των VEGF και FGF έδειξαν ότι η συμμετοχή των PLC- $\gamma$  και  $Ca^{2+}$  στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ενεργοποιείται μόνο από τον VEGF και όχι από τον FGF [192]. Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι η PLC- $\gamma$  ενεργοποιείται και έμμεσα από τον VEGFR-2 μέσω της πρωτεΐνης PKD. Η κινάση σερίνης/θρεονίνης PKD ανήκει στην οικογένεια των PKC πρωτεϊνών, ωστόσο οι δομικές και ρυθμιστικές ιδιότητές της διαφέρουν από εκείνες των υπολοίπων μελών της οικογένειας. Η PKD φωσφορυλιώνεται από τον VEGF, μέσω του VEGFR-2, σε δύο κατάλοιπα σερίνης και ένα κατάλοιπο τυροσίνης. Η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη της PKD είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση της PLC- $\gamma$  και τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου λώρου παρουσία VEGF. Επιπλέον, η PKD προσδένει την PLC- $\gamma$  ακόμη και απουσία του VEGF. Ενδιαφέρον ωστόσο παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο του VEGFR-2 που επάγει την ενεργοποίηση της PKD είναι η τυροσίνη 463 και όχι η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 1175, στην οποία προσδένεται απευθείας η PLC- $\gamma$  [193].

Από την άλλη πλευρά, δημοσιευμένες έρευνες αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη Ras έχει καθοριστικό ρόλο στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έχει δειχθεί ότι σε ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου ο VEGF ενεργοποιεί την Ras σε διάστημα 3-5 λεπτών. Υπερέκφραση ανενεργής μορφής της Ras στα ίδια κύτταρα προκάλεσε την καθολική αναστολή του επαγόμενου κυτταρικού πολλαπλασιασμού από τον VEGF [91]. Ωστόσο, η υπερέκφραση της ανενεργής μορφής της Ras δεν προκάλεσε την πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 παρουσία VEGF, ίσως λόγω της ενεργοποίησης των ανοδικών πρωτεϊνών PLC- $\gamma$  και PKC. Επίσης, και η ομάδα Takahashi προσδίδει σημαντικό ρόλο στην Ras στην αγγειογένεση και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, πιθανώς συμμετέχοντας στη σηματοδότηση μηχανικού στρες. Είναι άλλωστε αποδεδειγμένο ότι η Ras ενεργοποιείται παρουσία διατμητικής τάσης και με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κινάσες Jun στα ενδοθηλιακά κύτταρα [194]. Έτσι, οι συγγραφείς καταλήγουν ότι οι πρωτεΐνες Ras ευθύνονται για τη μετάδοση μιτογόνων σημάτων σε επιθηλιακά κύτταρα και ινοβλάστες, για τη μετάδοση σημάτων διαφοροποίησης και πολλαπλασιασμού σε νευρικά κύτταρα και τουλάχιστον μηχανικά σήματα σε ενδοθηλιακά κύτταρα [92].





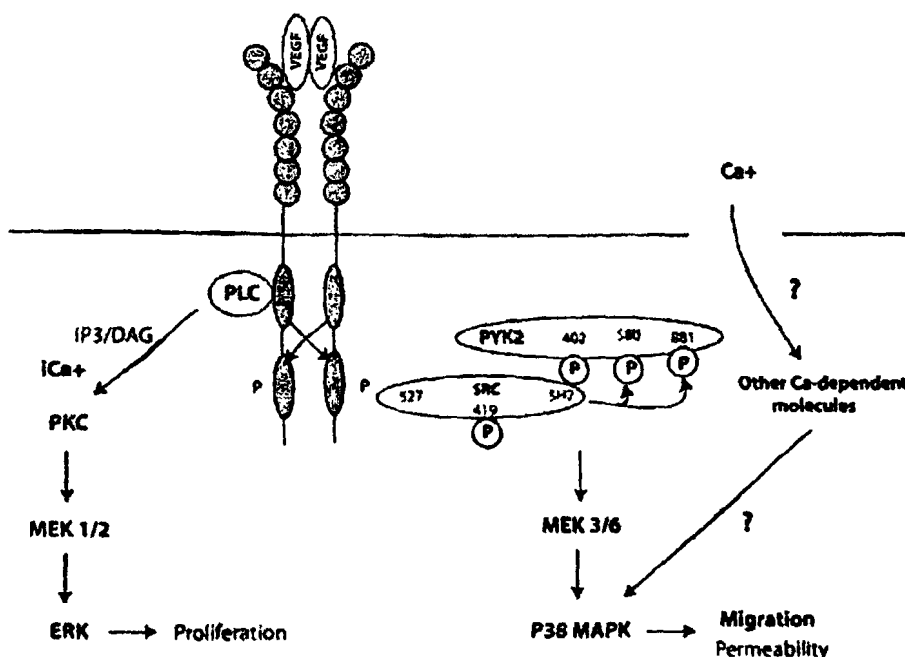
#### 1.3.4.2. VEGF, p38 MAPK και μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων αποτελεί στάδιο της αγγειογένεσης και επάγεται από τον VEGF. Στη μετανάστευση των κυττάρων βασικό ρόλο έχει η p38 MAPK. Ο VEGF, μέσω του VEGFR-2, ενεργοποιεί τις MAPKK MEK3/6, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την p38 MAPK σε ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr180) και ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Tyr182) με αποτέλεσμα τη διέγερση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων [96]. Η φωσφορυλίωση της p38 MAPK παρουσιάζει μέγιστο μεταξύ 5 και 10 λεπτών παρουσία του VEGF και η συνάρτησή της με τη συγκέντρωση του VEGF έχει καμπανοειδή μορφή, με ανώτατη ενεργοποίηση από 5ng VEGF ανά ml θρεπτικού μέσου, σε *in vitro* δοκιμασίες [97]. Καθοδικά της p38 MAPK και παρουσία VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποιούνται κυτταροπλασματικά και πυρηνικά υποστρώματα, όπως η Hsp27 και ο μεταγραφικός παράγοντας ATF-2 [96]. Η χρήση του ειδικού αναστολέα SB203580 (0,5μM) είναι ικανή να αναστείλει περίπου κατά 80% την επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ειδικότερα, η παρουσία του VEGF προκάλεσε δραματική αναδιοργάνωση της ακτίνης, όπως χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία ινιδίων στρες, τα οποία διασχίζουν εγκάρσια το κύτταρο και παρουσιάζονται μόλις 10 λεπτά μετά από επαγωγή από τον VEGF. Επίσης, ο VEGF προκάλεσε τη συγκέντρωση βινκουλίνης στις εστιακές προσφύσεις του κυττάρου. Αντίθετα, η αναστολή της p38 MAPK από το SB203580 εμπόδισε τη δημιουργία ινιδίων στρες, τη συγκέντρωση βινκουλίνης στις εστιακές προσφύσεις και επομένως τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, αναδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο της p38 MAPK [97].

Παρόλο που έχει μελετηθεί εκτενώς το βιολογικό αποτέλεσμα της επαγωγής της p38 MAPK από τον VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα, ο ακριβής μηχανισμός και τα μόρια που εμπλέκονται στη διαδικασία της μετανάστευσης δεν είναι πλήρως γνωστά. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι πρωτεΐνες της οικογένειας των κινασών εστιακών προσφύσεων, FAK και Pyk2, ενεργοποιούνται από τον VEGFR-2, προσδένουν Src κινάσες μέσω του SH2-τμήματος και ενεργοποιούν τη μετανάστευση των κυττάρων [195]. Αναστολή της φωσφορυλίωσης της FAK δεν επηρεάζει την ενεργοποίηση της p38 MAPK από τον VEGF, υποδηλώνοντας ότι η FAK δεν είναι ανοδικά της p38 MAPK. Αντίθετα, αναστολή της Pyk2 κινάσης ανέστειλε καθολικά τη φωσφορυλίωση της p38 MAPK και την επαγόμενη μετανάστευση των κυττάρων από τον VEGF [196]. Το γεγονός ότι η καταλυτικά ανενεργή μορφή της p38 MAPK αναστέλλει μερικώς τη μετανάστευση, υποδηλώνει ότι και άλλα μόρια εμπλέκονται στη μετανάστευση των κυττάρων που δε συσχετίζονται με την ενεργοποίηση της p38 MAPK, όπως για παράδειγμα η FAK [98]. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η κινάση Pyk2 ενεργοποιείται



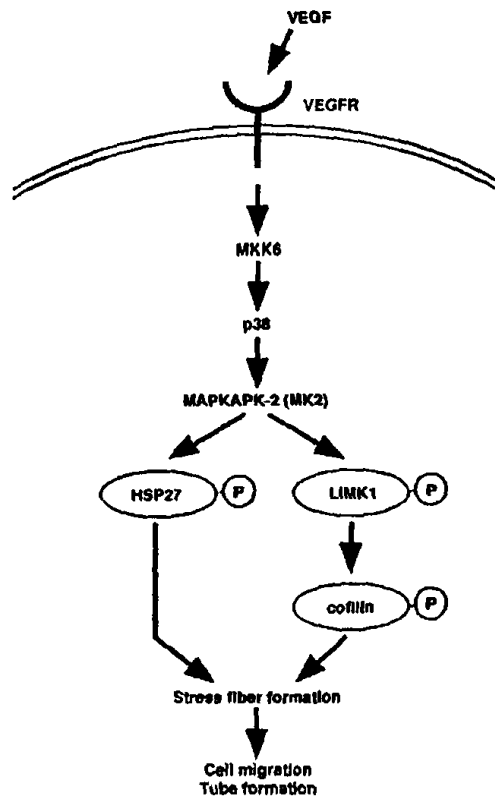
από τον VEGFR-2, προσδένει την Src κινάση μέσω του τμήματος SH2, ενεργοποιεί τις MEK3/6, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν την p38 MAPK. Η φωσφορυλιωμένη p38 MAPK ενεργοποιεί την MK2 και τελικά φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται η Hsp27, επάγοντας τη μετανάστευση του κυττάρου (Εικόνα 13).



**Εικόνα 13: Μοντέλο ενεργοποίησης του p38 MAPK από τον VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα.** Ενεργοποίηση των υποδοχέων VEGFRs μπορεί να διεγείρει την ενεργοποίηση των RAFTK/Pyk2 και Src. Στη συνέχεια, η Src προσδένεται στη γνωστή θέση Tyr402 της Pyk2 και φωσφορυλιώνει τα τυροσινικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της Pyk2. Έτσι, η δραστηριότητα της p38 MAPK αυξάνεται και, τελικά, ρυθμίζεται η κυτταρική μετανάστευση και διαπερατότητα με έναν μηχανισμό που δεν έχει καθοριστεί πλήρως. Επίσης, ο VEGF επάγει την εισροή εξωκυττάριου ασβεστίου, το οποίο είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση της p38 MAPK. Αντίθετα, η ενεργοποίηση της PLC-γ από τον VEGFR-2 προκαλεί την απελευθέρωση των ενδοκυττάριων αποθεμάτων ασβεστίου και την επακόλουθη ενεργοποίηση της ERK, η οποία ρυθμίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [196].

Πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα προσθέτουν και άλλα μόρια στο σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της p38 MAPK και οδηγεί στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων παρουσία VEGF. Η κινάση LIMK1 ρυθμίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης μέσω φωσφορυλίωσης και απενεργοποίησης του παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης/κοφιλίνης (Actin polymerizing factor ADF/cofilin) [197]. Έχει αναφερθεί ότι η LIMK1 ενεργοποιείται από τον VEGF σε ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ενός νέου σηματοδοτικού μονοπατιού που περιλαμβάνει τα μόρια p38 MAPK-MK2-LIMK1, όπου η MK2 ενεργοποιεί την LIMK1 φωσφορυλιώνοντάς την στο κατάλοιπο της σερίνης 323. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της LIMK1 από MK2 αποδεικνύεται κρίσιμη για τη δημιουργία

ινιδίων στρες, την κυτταρική μετανάστευση και τη δημιουργία αγγειακών σωλήνων από τον VEGF (Εικόνα 14) [198].



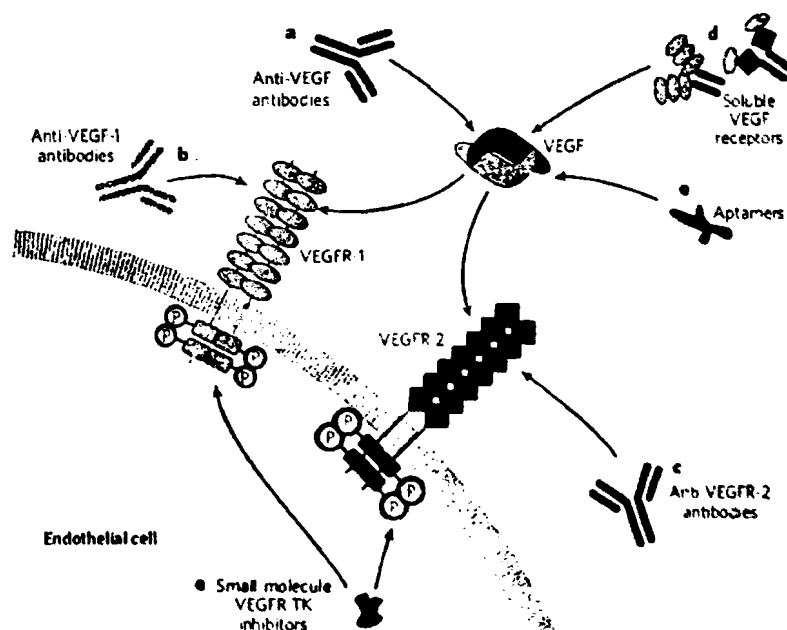
**Εικόνα 14:** Η φωσφορυλίωση της LIMK1 και ο πολυμερισμός της ακτίνης από τον VEGF. Ο VEGF επάγει την ενεργοποίηση της MK2 μέσω των MKK6 και p38 MAPK. Η MK2 ενεργοποιεί την LIMK1, μέσω φωσφορυλίωσης της Ser323, η οποία με τη σειρά της διεγείρει τη φωσφορυλίωση της κοφιλίνης. Μαζί με τη φωσφορυλιωμένη Hsp27 από την MK2, η φωσφορυλιωμένη κοφιλίνη προκαλεί τη ανάπτυξη ινιδίων στρες, την κυτταρική μετανάστευση και τη δημιουργία σωλήνων [198].

### 1.3.5. Η στόχευση του VEGF και των MAPKs για θεραπευτικούς σκοπούς

Στη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας εντατικές προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την ανάπτυξη στρατηγικών είτε για την προαγωγή νεοαγγείωσης ισχαιμικών ιστών είτε για την αναστολή της αγγειογένεσης καρκινικών όγκων. Δυστυχώς, κλινικές δοκιμές για την προ-αγγειογενετική δυναμική των VEGF και FGF δεν έφεραν τα επιθυμητά αποτελέσματα [199]. Παρά το γεγονός ότι μέρος της αποτυχίας αποδίδεται στις προβληματικές μεθόδους παράδοσης, η διέγερση ανάπτυξης ώριμων και λειτουργικών αγγείων αποτελεί μεγαλύτερη πρόκληση απ'ό,τι είχε αρχικά προβλεφθεί. Καινούριες στρατηγικές, όπως η μεταμόσχευση κυττάρων προερχόμενων από το μυελό των οστών ή προγονικών ενδοθηλιακών κυττάρων και η μεταφορά γονιδίων που κωδικοποιούν

αγγειογενετικούς αυξητικούς παράγοντες, αποτελούν τις πλέον υποσχόμενες θεραπείες με σκοπό τη διέγερση νεοαγγείωσης σε ισχαιμικούς ιστούς.

Από την άλλη πλευρά, η αναστολή της αγγειογένεσης έχει αποτελέσει στόχο ερευνητικών και κλινικών μελετών, καθώς αυξημένη νεοαγγείωση στο περιβάλλον ενός καρκινικού όγκου έχει συνδεθεί με την ταχύτερη ανάπτυξη του αλλά και με μεταστάσεις. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, αντι-VEGF θεραπείες έχουν εγκριθεί και εφαρμοστεί τα τελευταία χρόνια με επιτυχία, ωστόσο τα κλινικά αποτελέσματα δημιούργησαν νέα ερωτήματα. Για παράδειγμα, η χρήση του αντισώματος έναντι του VEGF (Avastin, Genetech) εξασφαλίζει αυξημένη επιβίωση ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου, μαστού και πνεύμονα μόνο όταν εφαρμοστεί σε συνδυασμό με τη συμβατική χημειοθεραπεία. Είναι ακόμη άγνωστος ο λόγος για τον οποίο η VEGF μονοθεραπεία ήταν αποτελεσματική μόνο στους ποντικούς και όχι στον άνθρωπο. Στην εικόνα 15, παρουσιάζεται το σύνολο των αντι-αγγειογενετικών θεραπειών που είτε έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται σε ασθενείς είτε βρίσκονται στο τελικό στάδιο των κλινικών δοκιμών.

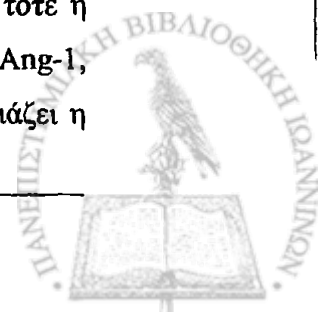


**Εικόνα 15: Στρατηγικές αναστολής της σηματοδότησης του VEGF.** Σε αυτές περιλαμβάνονται μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του VEGF-A (a) ή των υποδοχέων του VEGF (b, c). d. Χημικοί διαλυτοί υποδοχείς, όπως η «παγίδα-VEGF», επίσης υποβάλλονται σε κλινικές δοκιμές. e. Εξωκυττάρια αναστολείς-aptamers, οι οποίοι προσδένονται στο τμήμα πρόσδεσης της ηπαρίνης του VEGF<sub>165</sub> (pegaptanib). Επίσης ελέγχεται ποικιλία μικρών μορίων με ανασταλτική δράση για τους υποδοχείς τυροσινικής κινάσης εμποδίζοντας την αυτοφωσφορύλιση των VEGFR-1,2 [12].

Πλήθος επιστημονικών ομάδων έχει δείξει ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPKs παρουσιάζεται ενεργοποιημένο τόσο σε καταστάσεις ισχαιμίας (όπως στην καρδιακή ισχαιμία) [200], όσο και σε κύτταρα ενός ευρέου φάσματος ανθρώπινων όγκων [201]. Γι'αυτό το λόγο, η δραστικότητα των MAPKs έχει αποτελέσει στόχο ρύθμισης για την αντιπετώπιση πλήθος ασθενειών. Ενδεικτικά θα αναφερθούμε στον αναστολέα των MEK (διεγέρτες των ERK1/2), PD0325901. Ο PD0325901 έχει  $IC_{50}$  1nM έναντι των ενεργοποιημένων MEK1 και MEK2. Η χρήση του σε πειράματα *in vivo* οδήγησαν στην αναστολή της ανάπτυξης των έξι από τα επτά μοντέλα ανθρώπινων καρκίνων που δοκιμάστηκαν [201]. Κλινικές δοκιμές πρώτης φάσης με αυτόν τον παράγοντα πραγματοποιούνται με στόχο ασθενείς με συμπαγείς όγκους, όπου αναμένεται ενεργοποιημένο το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAPK.

Αντίθετα, στις περιπτώσεις ισχαιμίας η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των ERK είναι ευεργητική, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην παρεμπόδιση της απόπτωσης και της νέκρωσης του μυοκαρδίου [200]. Ειδικότερα, σε *in vivo* μοντέλα καρδιακής ισχαιμίας η ταυτόχρονη χρήση των ERK αναστολέων, RD98059 και U0126, αύξησε σημαντικά το μέγεθος της καρδιακής έμφραξης στο μυοκάρδιο χοίρων και ενίσχυσε την απόπτωση των καρδιακών μυοκυττάρων [202, 203]. Ο ρόλος του σηματοδοτικού μονοπατιού της p38 MAPK κατά την καρδιακή ισχαιμία έχει μελετηθεί εκτενώς, με σκοπό να καθοριστεί αν η ενεργοποίηση του καταρράκτη είναι απλά ένα επιφανόμενο ή αποτελεί αίτιο της μυοκαρδιακής νέκρωσης και/ή της απόπτωσης. Η χρήση των ειδικών αναστολέων της p38 MAPK, SB203580, SB202190 και SB242719 πριν και κατά τη διάρκεια παρατεταμένης ισχαιμίας καθυστέρησε την εμφάνιση εμφραγμάτων [204, 205], μείωσε τη μυοκαρδιακή απόπτωση [204, 206] και βελτίωσε την επαναφορά της καρδιακής λειτουργίας μετά από ισχαιμικά επεισόδια σε πολλά μοντέλα ζώων [200, 207].

Ωστόσο, η χρήση αγγειογενετικών αλλά και αντι-αγγειογενετικών θεραπειών με σκοπό την αντιμετώπιση πληθώρας ασθενειών συνοδεύεται από ένα μεγάλο φάσμα παρενεργειών. Σχετικά με τις προ-αγγειογενετικές θεραπείες, η υπόταση είναι ίσως η πιο αναγνωρισμένη παρενέργεια που παρατηρείται κατά τη διαχείριση του VEGF, και σε μικρότερη έκταση, του FGF-2. Επίσης μία παρενέργεια ειδικά στην αυξημένη παρουσία του VEGF είναι το οίδημα. Δεν είναι ακόμη γνωστό εάν το οίδημα είναι αποτέλεσμα της αυξημένης αγγειακής διαπερατότητας, μία βασικής ιδιότητας του VEGF, ή σχετίζεται με την αδυναμία των νέων VEGF-επαγόμενων αγγείων να ωριμάσουν. Σε περίπτωση που ισχύει το τελευταίο, τότε η ταυτόχρονη χρήση παραγόντων που ενισχύουν την ωρίμανση των αγγείων, όπως η Ang-1, πιθανώς να οδηγήσουν σε μείωση του οιδήματος. Επίσης, έντονη ανησυχία παρουσιάζει η



επαγωγή «off-target» αγγειογένεσης, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη καρκινικών όγκων, αμφιβληστροειδοπαθήσεων και ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών πλακών. Παρόλ'αυτά, σε περισσότερους από 900 ασθενείς που έχουν λάβει μέρος σε δοκιμές γονιδιακής και κυτταρικής αγγειογενετικής θεραπείας, δεν παρατηρήθηκαν αυξημένα ποσοστά κακοηθειών, αμφιβληστροειδοπαθήσεων ή επιτάχυνση ανάπτυξης αθηροσκληρωτικών πλακών [208, 209]. Σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις, στις οποίες η ύπαρξη ενός προϋπάρχοντος όγκου δεν είχε γίνει αντιληπτή, η διαχείριση ενός αυξητικού παράγοντα οδήγησε σε επιτάχυνση της ανάπτυξης του όγκου.

Σχετικά με τις αντι-αγγειογενετικές θεραπείες, πολλές παρενέργειες έχουν παρατηρηθεί κατά τη χρήση του αντισώματος έναντι του VEGF, bevacizumab. Αυτές περιλαμβάνουν υπέρταση, θρόμβωση, πρωτεϊνουρία (με νεφρωτικό σύνδρομο) και ρινορραγία, καθώς και επεισόδια αιμόπτυσης σε ασθενείς με non-small cell καρκίνο του πνεύμονα. Η εμφάνιση υπέρτασης υποδηλώνει ότι πιθανώς ο VEGF ρυθμίζει τη βασική πίεση αίματος. Η εμφάνιση της θρόμβωσης δεν έχει εξηγηθεί μέχρι σήμερα, αλλά ενδεχομένως να οφείλεται στη μειωμένη παραγωγή του NO. Μία πιο πρόσφατα αναγνωρισμένη παρενέργεια είναι ο αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης θρομβοεμβολικών επεισοδίων, όπως εγκεφαλικά επεισόδια, παροδικά ισχαιμικά γεγονότα και στηθάγχη.

Παρόλες τις παρενέργειες είναι σήμερα αποδεδειγμένο ότι οι αντι-αγγειογενετικές θεραπείες, κυρίως όταν συνδυάζονται με χημειοθεραπεία, αυξάνουν το χρόνο ζωής ασθενών με συμπαγείς όγκους. Η νωρίτερη έναρξη αυτών των θεραπειών πιθανώς να οδηγούσε και σε αυξημένα κλινικά οφέλη, σε συμφωνία με προ-κλινικές δοκιμές [12]. Επίσης, πρόσφατα κλινικά αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η χρήση αντι-αγγειογενετικών φαρμάκων σε συνδυασμό με τη χημειοθεραπεία στην περίπτωση καρκίνου του μαστού σε πρώιμο στάδιο μειώνει κατά 52% τον κίνδυνο επανεμφάνισης του καρκίνου [210]. Ωστόσο περισσότερες και μακροχρόνιες κλινικές δοκιμές θα πρέπει να πραγματοποιηθούν έως ότου η επιστημονική κοινότητα μπορέσει να εκμεταλλευτεί τη ρύθμιση της αγγειογένεσης ως θεραπευτικό μέσο.

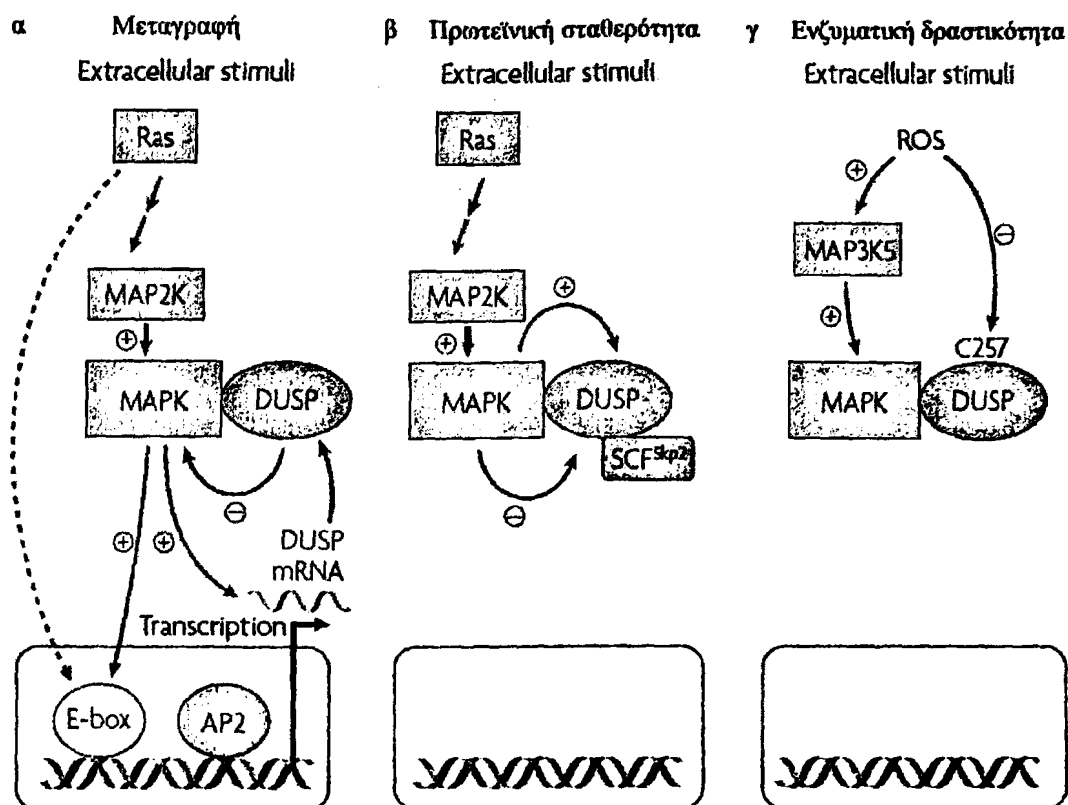
#### **1.4. Οι φωσφατάσες και ο ρόλος τους στη ρύθμιση της σηματοδότησης των MAP κινασών**

Μέχρι πρόσφατα, οι πρωτεϊνικές κινάσες, παρά οι φωσφατάσες, αποτελούσαν το κύριο αντικείμενο μελέτης και έρευνας ως σημαντικοί ρυθμιστές των σηματοδοτικών καταρρακτών σε διάφορα είδη κυττάρων. Το γεγονός ότι οι κινάσες ανακαλύφθηκαν 10 χρόνια νωρίτερα από τις φωσφατάσες μπορεί να ερμηνεύσει, τουλάχιστον μερικά, το εκτεταμένο ενδιαφέρον από μέρους των ερευνητών. Ωστόσο σήμερα, οι φωσφατάσες αναγνωρίζονται ως ισχυροί και,

ακόμη περισσότερο, ως οι βασικοί ρυθμιστές πολλών βιολογικών διαδικασιών. Για παράδειγμα, εξαιτίας της ιδιότητας τους να αποφωσφορυλιώνουν και τα δύο κατάλοιπα, οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (Dual specificity phosphatases, DUSPs) αναγνωρίζονται ως οι πρωτεΐνες με καθοριστικό ρόλο στην απενεργοποίηση των MAP κινασών. Παρόλο που οι φωσφατάσες θεωρούνταν απλοί «διακόπτες ασφαλείας», έχει παρατηρηθεί ότι οι κινάσες απενεργόποιούνται ακόμη και συνεχούς παρουσίας διεγέρτη. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει τη σημαντικότητα των φωσφατασών στη ρύθμιση της διάρκειας και της έντασης της ενεργοποίησης των κινασών. Από βιοχημική πλευρά, η ενζυματική ισχύς των φωσφατασών είναι 100 με 1000 φορές μεγαλύτερη από την ισχύ των κινασών, καθώς οι κινάσες χρειάζονται ATP και επομένως χρησιμοποιούν αντίδραση δεύτερης τάξης, ενώ η αποφωσφορυλίωση είναι άμεση. Επομένως, γίνεται αντιληπτό ότι η μετάδοση σήματος δε συμβαίνει αποκλειστικά μέσω ενεργοποίησης κινασών αλλά, πιθανώς, και μέσω ρύθμισης της έκφρασης και της δραστηριότητας των φωσφατασών. Σε υποστήριξη των παραπάνω, οι φωσφατάσες, και όχι οι κινάσες, εμφανίζονται με μεγαλύτερη δυναμική στη ρύθμιση τόσο της έκφρασης όσο και της ενεργότητάς τους. Η ισχυρή μεταγραφική επαγωγή και σταθεροποίηση της πρωτεΐνης των φωσφατασών, ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των MAP κινασών (43-47) [211-215], καθώς και η ρύθμιση της ενεργότητάς τους από αντιστρεπτή οξειδωση [216] παρουσιάζονται στην εικόνα 16.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει μία υπολογιστική ανάλυση των συστημάτων των MAP κινασών, η οποία προτείνει ότι οι DUSPs, και όχι οι κινάσες, καθορίζουν την έκταση της φωσφορυλίωσης των MAP κινασών που ακολουθεί την κυτταρική ενεργοποίηση [217]. Τέλος, ο ρόλος των DUSPs δεν περιορίζεται στη διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης, καθώς ορισμένες εισέρχονται και εξέρχονται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα ή κρατούν τις MAP κινάσες σε κάποιο κυτταρικό διαμέρισμα [218, 219].





**Εικόνα 16: Ρύθμιση των DUSPs από τις MAP κινάσες.** Αντίθετα από τις MAPKs, η έκφραση και δραστηριότητα των DUSPs ρυθμίζονται ισχυρά από τρεις κύριους μηχανισμούς. (α) Την ισχυρή μεταγραφική επαγωγή των DUSPs από διάφορα ερεθίσματα, είτε μέσω άμεσων αποκρινόμενων γονιδίων (DUSP1, DUSP2, DUSP4 και DUSP7) είτε μέσω άλλων μεταγραφικών παραγόντων (DUSP6, DUSP8, DUSP9 και DUSP10), ως αποτέλεσμα της δραστηριότητας των ίδιων των MAPKs. (β) Η πρωτεϊνική σταθερότητα και ενζυματική δραστηριότητα των DUSPs ρυθμίζεται μέσω της πρόσδεσής τους σε υποστρώματα των MAPKs τόσο με θετικό όσο και με αρνητικό τρόπο. Η πρόσδεση των MAPKs στις DUSPs έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να παρέχει αρνητική ανάδραση στην ενεργότητα των MAPKs. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως στην αλληλεπίδραση της DUSP1 και ERK2, η πρόσδεση της MAPK έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της σταθερότητας της φωσφατάσης, τη διέγερση της αποδόμησής της μέσω της λιγάσης SCF<sup>Skp2</sup> και τη διατήρηση της δραστηριότητας των MAPKs. (γ) Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ROS, που ρυθμίζουν ορισμένες ανοσοαποκρίσεις και ενεργοποιούν την MKKK, ASK1, απενεργοποιούν άμεσα το κατάλοιπο της κυστεΐνης στο καρβοξυτελικό άκρο των φωσφατασών, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενζυματική τους δράση [220].

#### 1.4.1. Η υπεροξεικογένεια των τυροσινικών φωσφατασών

Οι φωσφατάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν το φωσφοεστερικό δεσμό των πρωτεϊνών, λιπιδίων ή μικρών μορίων-υποστρωμάτων. Πολλές φωσφατάσες έχουν τη δυνατότητα να αποφωσφορυλιώνουν το ένα ή και τα δύο φωσφορυλιωμένα αμινοξέα των MAP κινασών, με αποτέλεσμα να ελέγχουν τόσο την ένταση όσο και τη διάρκεια της δραστηριότητάς τους. Σε κύτταρα, η αποφωσφορυλίωση και απενεργοποίηση των MAP κινασών συμβαίνει σε χρονική κλίμακα που κυμαίνεται από μερικά λεπτά μέχρι αρκετές ώρες, καθώς σημαντικό ρόλο έχει



το είδος των κυττάρων και του ενεργοποιητή [221]. Η οικογένεια των πρωτεϊνικών τυροσινικών φωσφατασών (Protein Tyrosine Phosphatases, PTPs) αποτελείται από 106 γονίδια στον άνθρωπο και περιλαμβάνει το μοτίβο C(X)<sub>5</sub>R στη δραστική πλευρά τους.

Οι φωσφατάσες που έχουν την ικανότητα να απενεργοποιούν τις MAP κινάσες περιλαμβάνουν τις:

i. Πρωτεϊνικές φωσφατάσες της τυροσίνης (Protein Tyrosine Phosphorylation, PTPs) που υδρολύουν φωσφοτυροσινικά κατάλοιπα σε ενεργοποιημένες MAP κινάσες

ii. Φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης (Protein Phosphatase, PPs) που αποφωσφορυλιώνουν θρεονικά κατάλοιπα

iii. Διπλής εξειδίκευσης φωσφατάσες (Dual Specificity Phosphatases, DUSPs), γνωστές και ως MAPK φωσφατάσες (MAPK phosphatases, MKPs), οι οποίες αποφωσφορυλιώνουν φωσφο-τυροσινικά και φωσφο-θρεονικά κατάλοιπα που βρίσκονται στην ίδια MAP κινάση [221-223].

Ιστορικά, οι φωσφατάσες σερίνης/θρεονίνης ήταν ανάμεσα στις πρώτες φωσφατάσες που αναγνωρίστηκαν κατά τη δεκαετία του 1970. Στη συνέχεια αναγνωρίστηκαν οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες της τυροσίνης (δεκαετία 1990) και, τέλος, οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (από το 1993 μέχρι σήμερα). Γι' αυτό το λόγο οι γνώσεις μας για το μηχανισμό δράσης των DUSPs αλλά και για την επιλογή των υποστρωμάτων τους είναι περιορισμένη, παρόλο που τα τελευταία χρόνια αποτελούν αντικείμενο μελέτης για συνεχώς αυξανόμενο αριθμό ερευνητικών ομάδων.

#### **1.4.2. Οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (Dual Specificity Phosphatases, DUSPs) με στόχο τις MAP κινάσες.**

Σύμφωνα με τη δομή και τη λειτουργία τους, οι DUSPs αποτελούν ξεχωριστή κατηγορία ανάμεσα στο μεγάλο αριθμό πρωτεϊνικών φωσφατασών που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Οι DUSPs ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των MAP κινάσων μέσω αποφωσφορυλίωσης του «TXY-μοτίβου» και παρουσιάζονται ως ιδιαίτερος αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης των MAP κινάσων [221, 224]. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 16 φωσφατάσες θηλαστικών με δράση αποφωσφορυλίωσης προς τις MAP κινάσες (Πίνακας 3).



Πίνακας 3: Οι DUSPs που ρυθμίζουν τις MAP κινάσες [220]

DUSP	Other names	Subcellular localization	Substrate specificity in vitro	MAPK activity in KO mice	Phenotype of KO mice	Human disease	Small-molecule inhibitors (indication; phase)
DUSP1	MKP1, CL100 (REF. 82), hVH1, 3CH134 (REF. 144), PTPN10 <i>erp</i>	Nuclear	p38, JNK, ERK <sup>145,246</sup>	No change in ERK, JNK and p38 in fibroblasts, ↑ p38 and JNK in macrophages, no change in ERK in macrophages	Normal development <sup>108,109</sup> , ↑ cytokines (↓ IL-12), ↑ sepsis and CIA <sup>96,97,110,111</sup> , metabolic phenotype <sup>112</sup>	↑ Breast cancer <sup>99</sup> , ↓ prostate and ovarian cancer, affects growth of other tumours <sup>98,147-149</sup>	MX-7091 (cancer; discontinued preclinical), sangulinarine, cheleythrine, NU-126 (REFS 150,151)
DUSP2	PAC-1	Nuclear	ERK, p38 > JNK <sup>61,63,74</sup>	↓ ERK and p38 in macrophages and mast cells, ↑ JNK in macrophages and mast cells	↓ Cytokines, ↓ survival of mast cells, ↓ arthritis <sup>51</sup>	↑ Ovarian carcinoma, ↑ leukaemia <sup>101,102</sup>	ND
DUSP3	VHR <sup>98</sup>	Not determined	Inactive towards MAPKs	↑ ERK and JNK (RNAi studies) in HeLa cells	Cell-cycle arrest at G1-S and G2-M <sup>70</sup>	ND	NU-126 (REF. 151), 4-isoavenacioldide <sup>152</sup> , RK-682 (REF. 153)
DUSP4	MKP2, hVH2 (REF. 154), TYP1 (REF. 155)	Nuclear	ERK > JNK > p38	ND	ND	ND	ND
DUSP5	hVH3, B23 (REF. 156)	Nuclear	ERK <sup>157</sup>	ND	ND	ND	ND
DUSP6	MKP3, Pyst1, hVH6 (REF. 158)	Cytosolic	ERK > JNK = p38 (REFS 85,86)	↑ ERK in embryos	Postnatal lethality, skeletal dwarfism, coronal craniosynostosis, hearing loss <sup>159</sup>	Hyper-methylated in pancreatic cancer <sup>160</sup>	NSC 45382, NSC 295642, NSC 357756 (REF. 160)
DUSP7	MKP-X, Pyst2 (REF. 80), B59	Cytosolic	ERK > p38α (REF. 80)	ND	ND	↑ In acute and myeloid leukaemia <sup>102,109</sup>	ND
DUSP8	hVH5 (REF. 161), M3/6 (REF. 75), HB5	Nuclear and cytosolic	JNK > p38 > ERK <sup>71,82</sup>	ND	ND	ND	ND
DUSP9	MKP4 (REF. 77), Pyst3	Nuclear and cytosolic	ERK > JNK = p38	No change in ERK, JNK and p38 in embryo placentas and ES cells	Placental defects, embryonic lethal <sup>98</sup>	ND	ND
DUSP10	MKP5 (REF. 163)	Nuclear and cytosolic	JNK = p38 > ERK <sup>99</sup>	↑ JNK in T cells, no change in p38 in T cells	↑ Cytokines in macrophages and T cells, ↓ proliferation in T cells, ↓ EAE <sup>24</sup>	ND	ND
DUSP12	YVH1 (REF. 164)	Nuclear	ND	ND	ND	ND	ND
DUSP14	MKP6	Nuclear and cytosolic	ERK, JNK, p38 (REF. 165)	ND	ND	ND	ND
DUSP16	MKP7	Cytosolic	JNK2, JNK3, p38α, β (REF. 92)	ND	ND	ND	ND
DUSP18	N/A	Nuclear and cytosolic	JNK, no activity towards p38 or ERK1 (REF. 166)	ND	ND	ND	ND
DUSP22	JKAP, JSP1, VHX, MKPX	ND	JNK (activated) <sup>106,107</sup>	ND	DUSP22-deficient ES cells, ↓ JNK activation <sup>108</sup>	ND	JSP1 inhibitor produced by Cepxyr (inflammation; preclinical)
DUSP26	MKP8, SKRP3, NEAP	Nuclear and cytosolic	p38, ERK <sup>102,109</sup>	ND	ND	Promotes growth of certain cancer cells <sup>108</sup>	ND

Από τις παραπάνω DUSPs, οι 11 είναι «τυπικές» φωσφατάσες έναντι των MAP κινασών (MKPs) και μοιράζονται κοινά δομικά χαρακτηριστικά, καθώς αποτελούνται από μία αμινοτελική μη-καταλυτική περιοχή και μία καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή. Το αμινοτελικό τους άκρο περιέχει μία δέσμη (cluster) από βασικά αμινοξέα ως μέρος του

μοτίβου αλληλεπίδρασης με την κινάση (kinase interacting motif, KIM). Το KIM προσδίδει ειδικότητα προς το υπόστρωμα και είναι η λιγότερο ομόλογη περιοχή μεταξύ των DUSPs επιδεικνύοντας επιλεκτικότητα για διαφορετικά υποστρώματα [225]. Η καταλυτική περιοχή των DUSPs περιλαμβάνει μία χαρακτηριστική εξαρτώμενη-από-κυστεΐνη αλληλουχία δράσης τυροσινικής φωσφατάσης I/VHCXAGXXR (extended active-site motif), η οποία παρουσιάζει υψηλή ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή της τυροσινικής πρωτεΐνης VH1 που αρχικά απομονώθηκε από ιό δαμαλίτιδας [221]. Ανάλογα με τις ομοιότητες στην αλληλουχία τους και στην ειδικότητα έναντι των υποστρωμάτων τους, οι παραπάνω φωσφατάσες χωρίζονται σε 3 υποκατηγορίες [225, 226]. Η πρώτη υποκατηγορία περιλαμβάνει τις DUSP1, DUSP2, DUSP4 και DUSP5. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία εντοπίζονται στον πυρήνα των κυττάρων και επάγονται από αυξητικούς παράγοντες και στρεσογόνα σήματα. Οι πρωτεΐνες αυτής της κατηγορίας αποτελούνται από 4 εξόνια, των οποίων οι θέσεις είναι υψηλά συντηρημένες. Επίσης το μοτίβο δράσης (active site motif) και των τεσσάρων DUSPs κωδικοποιείται από το τέταρτο εξόνιο και το μήκος του τρίτου εξονίου τους είναι ακριβώς το ίδιο, υποδηλώνοντας κοινό προγονικό γονίδιο [225]. Υποστρώματά τους αποτελούν οι ERK1/2, η JNK και η p38 MAPK ανάλογα με το σύστημα μελέτης. Η δεύτερη υποκατηγορία περιλαμβάνει τις DUSP6, DUSP7 και DUSP9, οι οποίες αποτελούνται από 3 εξόνια, είναι κυτταροπλασματικές και αναγνωρίζουν ως υποστρώματα τις ERK1 και ERK2 *in vitro*. Οι DUSP8, DUSP10 και DUSP16 δημιουργούν την τρίτη υποκατηγορία φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης και αναγνωρίζουν κυρίως ως υποστρώματά τους την JNK ή την p38 ή και τις δύο MAP κινάσες [226, 227].

Από τις «άτυπες» DUSPs, πολλές από τις οποίες μοιάζουν με τις CDC14 φωσφατάσες κυτταρικού κύκλου, έξι παρουσιάζουν δράση έναντι των MAP κινάσεων. Η DUSP3 (επίσης γνωστή ως VHR) στερείται του αμινοτελικού άκρου απαραίτητου για την αλληλεπίδρασή της με τις MAP κινάσες και, πράγματι, εμφανίζεται σχετικά ανενεργή έναντι των MAP κινάσεων *in vitro* [228]. Ωστόσο η αποσιώπηση του γονιδίου *DUSP3* επέδρασε στον, εξαρτώμενο από τις κινάσες JNK και ERK, κυτταρικό κύκλο υποδηλώνοντας έμμεση επίδραση της DUSP3 στη δράση των MAPKs [229]. Ένα ακόμη μέλος αυτής της υποκατηγορίας των DUSPs είναι η φωσφατάση που ρυθμίζει την κινάση JNK και ονομάζεται SKRP1 (Stress-activated protein kinase pathway-regulating phosphatase 1). Η SKRP1 στερείται του τομέα CDC25, αλλά περιέχει τη διατηρημένη αλληλουχία δράσης (conserved active-site sequence) και μπορεί να αδρανοποιήσει την JNK μέσω της αλληλεπίδρασής της με την ανοδική κινάση MKK4/7, υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της JNK [230, 231].



### 1.4.3. Διαφορετικές φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης για διαφορετικούς τύπους κυττάρων

Πολλαπλές DUSPs ενδεχομένως δρουν συμπληρωματικά σε διαφορετικά είδη κυττάρων για να ρυθμίσουν τη δράση των MAP κινασών. Για παράδειγμα, ενεργοποιημένα μακροφάγα κύτταρα εκφράζουν διάφορες DUSPs [232]. Ωστόσο, επειδή πολλές DUSPs παρουσιάζουν διαφορετικό τρόπο έκφρασης, μεταγραφικής ρύθμισης, κυτταρικής εντόπισης και ειδικότητας ως προς τα υποστρώματα, είναι φανερό ότι διαφορετικές DUSPs ρυθμίζουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις σε συγκεκριμένα είδη κυττάρων. Η έκφραση ορισμένων μελών της οικογένειας των DUSPs περιορίζεται σε ορισμένες κυτταρικές σειρές. Έτσι η DUSP2 εκφράζεται σημαντικά σε αιματοποιητικά κύτταρα [233] ενώ η DUSP8 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο, στην καρδιά και στο σκελετικό μυ [234]. Η DUSP10 εκφράζεται ευρέως, αλλά είναι άφθονη κυρίως στην παρεγκεφαλίδα, στο σκελετικό μυ και στο μυελό των οστών και ρυθμίζεται μεταγραφικά στα μακροφάγα κύτταρα [235]. Τέλος, η DUSP9 εντοπίζεται αποκλειστικά στον πλακούντα, τους νεφρούς και το εμβυϊκό ήπαρ [236, 237].

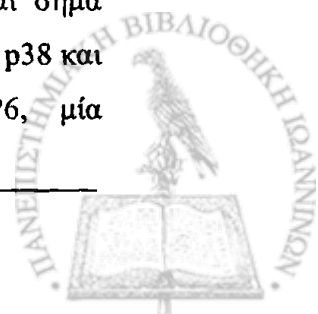
### 1.4.4. Ρύθμιση της έκφρασης και δραστικότητας των DUSPs

Ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον χαρακτηριστικό των DUSPs είναι η έντονη και πολλές φορές ταχύτατη μεταγραφική επαγωγή τους από αυξητικούς παράγοντες ή από παράγοντες που ενισχύουν το κυτταρικό στρες. Πολλές DUSPs κωδικοποιούνται από επαγόμενα γονίδια, καθώς τα βασικά επίπεδα mRNA των DUSPs είναι χαμηλά σε κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία [225]. Οι πυρηνικές DUSPs (DUSP1, DUSP2, DUSP4 και DUSP5) είναι εκείνες που δείχνουν την πιο έντονη μεταγραφική ρύθμιση [233]. Ορισμένες DUSPs συμπεριφέρονται ως άμεσα αποκρινόμενα γονίδια μετά από επαγωγή. Πιο συγκεκριμένα, τα γονίδια των φωσφατασών DUSP1, DUSP2, DUSP4 και DUSP7 επηρεάζονται ταχύτατα από την παρουσία ορού. Επιπλέον, αυτή η επαγωγή εξαρτάται από την ενεργοποίηση των MAP κινασών και θεωρείται ως ο υπεύθυνος μηχανισμός για την αρνητική ρύθμιση του μιτογόνου σήματος των αυξητικών παραγόντων [211, 213]. Αντίθετα, οι φωσφατάσες DUSP6, DUSP8, DUSP9 και DUSP10 δεν κωδικοποιούνται από άμεσα αποκρινόμενα γονίδια [220, 238]. Επίσης, διαφορετικές DUSPs ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα. Για παράδειγμα, η DUSP1 επάγεται από μιτογόνα, οξειδωτικό στρες, θερμικό σοκ και υποξία [239], ενώ η DUSP7 επάγεται ασθενώς μόνο από την παρουσία ορού και όχι από κυτταρικό στρες [240]. Επιπλέον, ενώ η έκφραση της DUSP6 δεν επηρεάζεται από μιτογόνα ή κυτταρικό στρες [241, 242], η έκφρασή της μπορεί να αυξηθεί από παράγοντες που προάγουν τη νευρωνική

διαφοροποίηση [238]. Από την άλλη πλευρά, η DUSP2 ρυθμίζεται μεταγραφικά σε μεγάλο βαθμό, ωστόσο εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ένας συμπληρωματικός μηχανισμός με τον οποίο ρυθμίζονται οι DUSPs είναι μέσω της σταθεροποίησης των πρωτεϊνικών επιπέδων που ρυθμίζονται άμεσα από τις MAP κινάσες. Για παράδειγμα, η DUSP1 αποδομείται μετά από επαγωγή. Ωστόσο, μέσω ενός αρνητικού μηχανισμού ανάδρασης (negative-feedback mechanism), η ERK μπορεί να επάγει τη σταθεροποίηση της DUSP1 με απευθείας φωσφορυλίωση με αποτέλεσμα τη μειωμένη ουβικιτίνωση και πρωτεοσωμική αποδόμηση [214]. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει και η παρατήρηση του αντίθετου μηχανισμού. Πιο συγκεκριμένα, έχει δείχθει ότι η ERK, σε συνεργασία με τη λιγάση ουβικιτίνης SCF<sup>Skp2</sup>, ενισχύουν την πολυουβικιτίνωση και πρωτεόλυση της DUSP1 ως μέρος ενός θετικού μηχανισμού ανάδρασης [212]. Επίσης, μερικές DUSPs ενεργοποιούνται μετά από την πρόσδεσή τους στα αντίστοιχα υποστρώματά τους. Η καταλυτική ενεργότητα της DUSP6 αυξάνεται κατά 25 φορές, όταν βρίσκεται στο ίδιο σύμπλοκο με το φωσφορυλιωμένο υπόστρωμά της, την ERK2 [243]. Ομοίως, η DUSP1 ενεργοποιείται καταλυτικά μέσω της πρόσδεσής της με τα υποστρώματα ERK2, JNK1 και p38 σε *in vitro* πειράματα [244]. Τέλος, η ενζυματική δραστηριότητα της DUSP2, η οποία είναι ανενεργή όταν βρίσκεται μόνη *in vitro*, ενισχύεται με την αλληλεπίδραση της με την ERK2 μέσω του αμινοτελικού της άκρου [245]. Αντίθετα, η ενζυματική απενεργοποίηση των φωσφατασών μπορεί να συμβεί και με τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) που έχουν δείχθει ότι οξειδώνουν αντιστρεπτά τη συντηρημένη κυστεΐνη του καταλυτικού μέρους των τυροσινικών φωσφατασών (protein tyrosine phosphatases, PTPs) και απενεργοποιούν την ενζυματική τους δράση [246]. Πράγματι, ο επαγόμενος από τον TNF κυτταρικός θάνατος προάγεται από τα ROS, τα οποία αναστέλλουν τη δράση της καταλυτικά ενεργούς κυστεΐνης των DUSPs, με αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της JNK [216]. Έτσι, με ανάλογο τρόπο της αντιστρεπτής φωσφορυλίωσης, η αντιστρεπτή οξείδωση παρέχει έναν εναλλακτικό τρόπο ενεργοποίησης ή απενεργοποίησης των πρωτεϊνών παρουσία συγκεκριμένων κυτταρικών διεγερτών.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθούμε στην κυτταρική εντόπιση των DUSPs ως χαρακτηριστικό εξαιρετικής σημασίας που καθορίζει τη δράση τους προς τα υποστρώματά τους. Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι ορισμένες DUSPs ρυθμίζουν την είσοδο και έξοδο των MAP κινάσων από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και αντίστροφα. Η DUSP16, η οποία περιέχει σήμα πυρηνικού εντοπισμού (nuclear localization signal, NLS) αλλά και σήμα εξόδου από τον πυρήνα (nuclear export signal, NES) μπορεί να μεταφέρει τις κινάσες p38 και JNK από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα [218]. Παρομοίως η DUSP6, μία



κυτταροπλασματική DUSP που περιέχει σήμα εξόδου από τον πυρήνα αλλά και τομέα πρόσδεσης των MAP κινασών (KIM), προκαλεί την παραμονή της ERK2 στο κυτταρόπλασμα [219]. Οι παραπάνω αρχικές ανακαλύψεις είναι πιθανό να διαφωτίσουν το μηχανισμό ρύθμισης της κυτταρικής εντόπισης των MAP κινασών και δίνουν έμφαση στο γεγονός ότι οι DUSPs έχουν και άλλο ρόλο εκτός από την αποφωσφορυλίωση των MAP κινασών.

#### 1.4.5. Υποστρώματα των DUSPs

Η πρώτη DUSP για την οποία δείχθηκε ότι παρουσιάζει ειδικευση ως προς μία συγκεκριμένη MAPK ήταν η DUSP6, καθώς απενεργοποιεί τις ERK1/2 *in vitro* και *in vivo*, ενώ επιδεικνύει περιορισμένη δράση έναντι των JNK και p38 MAPK. Συγκεκριμένα, η DUSP6 είναι 100 φορές πιο ενεργή έναντι της ERK, συγκριτικά με τις κινάσες p38 και JNK [234, 241, 242]. Παρομοίως η DUSP9 παρουσιάζει επιλεκτικότητα προς την ERK από τις άλλες MAP κινάσες [236]. Στη συνέχεια δείχθηκε ότι άλλες DUSPs, όπως η DUSP8, DUSP10 και DUSP16 είναι ικανές να αποφωσφορυλιώνουν ειδικά τις JNK και p38 MAPK αλλά όχι τις ERK1/2, ενώ άλλες, όπως η DUSP1 ρυθμίζουν και τις τρεις ομάδες των MAPKs [234, 244, 247, 248]. Οι παραπάνω αναφορές που στηρίζονται κυρίως σε *in vitro* δοκιμασίες θα πρέπει να αντιμετωπιστούν με προσοχή καθώς, όπως προαναφέρθηκε, διαφορετικοί τύποι κυττάρων και διεγερτών ρυθμίζουν την ενεργότητα διαφορετικών MAP κινασών. Επομένως, η ρύθμιση των MAP κινασών από τις DUSPs πιθανώς να εξαρτάται επίσης από τον τύπο των κυττάρων και διεγερτών [249]. Επιπρόσθετα, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στη δραστικότητα δύο φωσφατασών έναντι της ίδιας MAP κινάσης. Για παράδειγμα, παρόλο που και η DUSP2 και η DUSP4 δείχνουν προτίμηση προς την ERK σε *in vitro* δοκιμασίες, η DUSP4 αποφωσφορυλιώνει την ERK πολύ πιο αποτελεσματικά από την DUSP2 [224].

Έτσι, ενώ τα *DUSP10*<sup>-/-</sup> Τ κύτταρα έχουν αυξημένα επίπεδα ενεργότητας της JNK (σύμφωνα και με τα *in vitro* πειράματα), δεν παρατηρήθηκε καμία αλλαγή στη δραστικότητα της p38. Σε μακροφάγα κύτταρα *DUSP1*<sup>-/-</sup> εμφανίζονται υψηλά επίπεδα p38 και JNK ενεργοποίησης, αλλά δεν παρατηρείται καμία διαφορά στα επίπεδα της ERK. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με αποτελέσματα *in vitro* δοκιμασιών σύμφωνα με τα οποία η DUSP1 παρουσιάζει ισάξια προτίμηση και για τις τρεις κινάσες [224, 232, 250, 251]. Η DUSP3 έχει περιορισμένη δράση προς τις MAP κινάσες *in vitro*, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένη ενεργοποίηση των ERK και JNK μετά από πειράματα RNA interference [229]. Τέλος, σε *DUSP2*<sup>-/-</sup> μακροφάγα κύτταρα δείχθηκε εντυπωσιακή μείωση της δραστικότητας των ERK και p38 κινασών αλλά αυξημένη δραστικότητα της JNK, τονίζοντας τη σημασία της

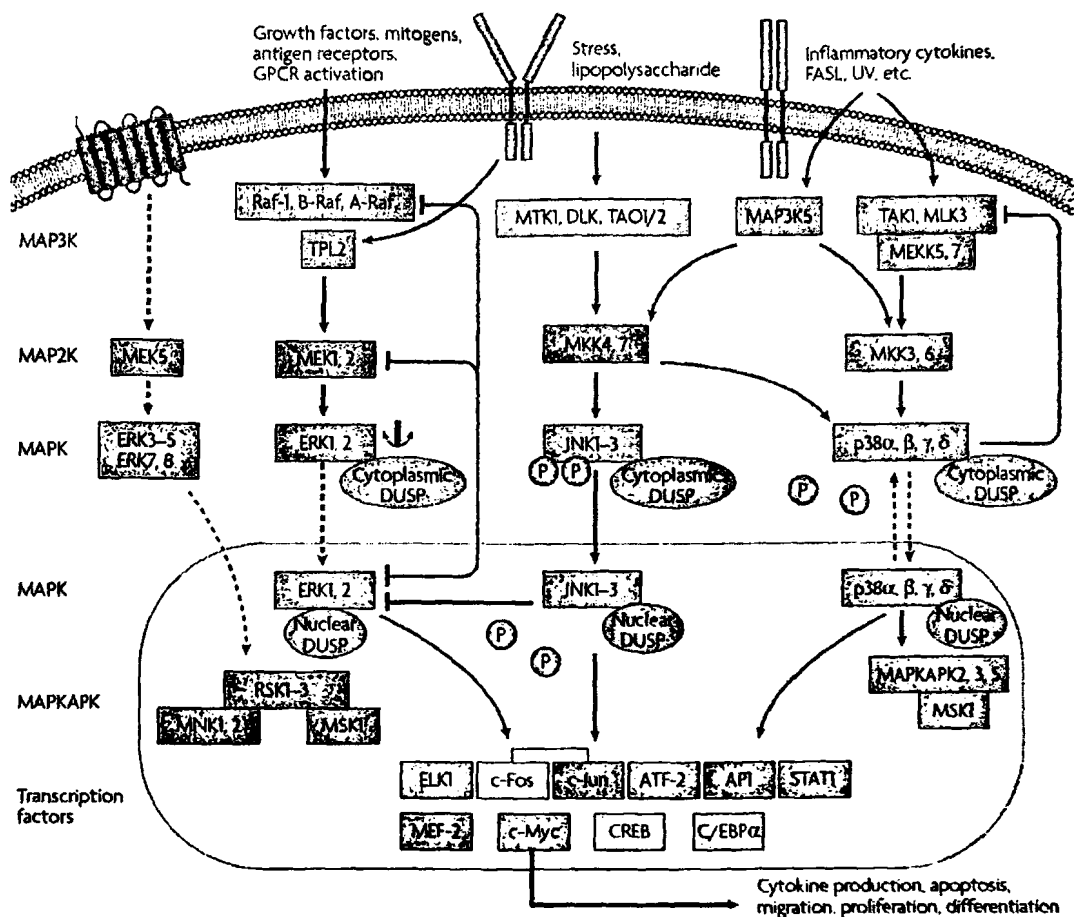
συνέργειας ορισμένων DUSPs καθώς και την ισχυρή επιρροή της στιχομυθίας των MAP κινασών [233]. Ο ρόλος των DUSPs στα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAPKs παρουσιάζεται στην εικόνα 17.

#### 1.4.6. Μηχανισμός αναγνώρισης και κατάλυσης των MAPKs από τις DUSPs

Η αναγνώριση και πρόσδεση της ERK2 από την DUSP6 πραγματοποιείται από ένα συντηρημένο τμήμα στο αμινοτελικό μη-καταλυτικό άκρο της φωσφατάσης και συνοδεύεται από αξιοσημείωτη αύξηση της καταλυτικής δράσης της DUSP6 *in vitro* [215]. Βασισμένη σε αυτήν την παρατήρηση, η καταλυτική ενεργοποίηση προτάθηκε ως ο γενικός μηχανισμός που ελέγχει την επιλεκτικότητα του υποστρώματος για τις DUSPs. Αυτή η θεωρία ενισχύθηκε από διαδοχικές έρευνες, σύμφωνα με τις οποίες η καταλυτική δράση και άλλων DUSPs, όπως η DUSP1, DUSP4, DUSP7 και DUSP9, αυξάνεται κατά την πρόσδεση των MAPKs υποστρωμάτων [252]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι η καταλυτική δράση της DUSP1 αυξάνεται κατά τη πρόσδεση των ERK, JNK και p38 υποδηλώνοντας την ικανότητα της συγκεκριμένης φωσφατάσης να αναγνωρίζει και να απενεργοποιεί και τις τρεις κύριες ομάδες των MAPKs [244].

Ο προσδιορισμός της κρυσταλλικής δομής της καταλυτικής περιοχής της DUSP6 απουσία υποστρώματος εξήγησε τον τρόπο της ενεργοποίησης των DUSPs κατά την πρόσδεση των MAPKs. Συγκεκριμένα, ο βρόγχος που περιέχει ένα από τα δύο καταλυτικά αμινοξέα (Asp262) είναι τοποθετημένος 5.5 μακριά από τη βέλτιστη θέση για κατάλυση, σε σχέση με τη θέση του αντίστοιχου καταλοίπου της φωσφατάσης VHR [253].





**Εικόνα 17: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια των MAP κινάσων και ο ρόλος των DUSPs.** Πολλαπλές DUSPs αποφωσφορυλιώνουν ειδικά τα κατάλοιπα της θρεονίνης και τυροσίνης των MAPKs, με αποτέλεσμα τη διατήρησή τους σε ανενεργή κατάσταση είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα. Επίσης, οι DUSPs βοηθούν στην είσοδο και έξοδο των MAPKs από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και αντίστροφα, όπως επίσης και στην αγκυροβόληση των MAPKs με αποτέλεσμα τη ρύθμιση της δραστηριότητάς τους. Τα κόκκινα βέλη δηλώνουν ανάδραση ή στιχομυθία μεταξύ των μονοπατιών MAPKs. [220]

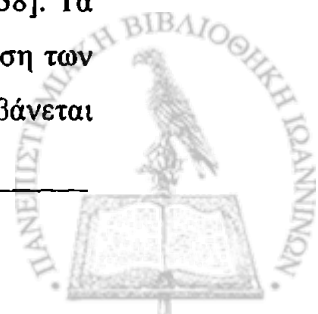
Πιο πρόσφατα έγιναν γνωστές οι δομές των DUSP5 και DUSP10. Αντίθετα προς την DUSP6, κανένα από τα δύο ένζυμα δεν ενεργοποιούνται κατά την πρόσδεση των MAPKs και στη δομή τους ο βρόγχος που περιέχει το γενικό όξινο κατάλοιπο (general acid residue) βρίσκεται ήδη στη ευνοϊκότερη θέση για κατάλυση [254]. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με βιοχημικά αποτελέσματα που δείχνουν ότι η καταλυτική δραστηριότητα της DUSP5 είναι σταθερή και ιδιαίτερα ισχυρή σε σχέση με τη δραστηριότητα της DUSP6, ανεξάρτητα από την παρουσία του υποστρώματος, ERK2 [255]. Έτσι, ορισμένες DUSPs ενδεχομένως να βασίζονται στην αναγνώριση και πρόσδεση των MAPKs για την επιλεκτικότητα των υποστρωμάτων παρά σε δομικές αλλαγές του καταλυτικού τους κέντρου. Πώς εξηγείται ωστόσο το γεγονός ότι φωσφατάσες όπως οι DUSP1 και DUSP6 αναγνωρίζουν και προσδέουν διαφορετικές



MAPKs; Επίσης, με ποιο τρόπο η δημιουργία συμπλόκου μεταξύ φωσφατάσης και κινάσης οδηγεί σε δομικές αλλαγές της καταλυτικής περιοχής ορισμένων φωσφατασών;

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στο αμινοτελικό μη-καταλυτικό άκρο των DUSPs περιέχεται ένα σύμπλεγμα από θετικά φορτισμένα κατάλοιπα που ανήκουν στην περιοχή αλληλεπίδρασης με την κινάση (kinase interacting motif, KIM). Το KIM εμφανίζεται να αλληλεπιδρά με το αρνητικά φορτισμένο κοινό τμήμα ελλιμενισμού (Common docking domain, CD domain) των MAPKs, το οποίο είναι κοινό για τους ανοδικούς διεγέρτες, καθοδικές πρωτεΐνες-στόχους και φωσφατάσες-ρυθμιστές των κινασών [130]. Μεταλλάξεις των καταλοίπων Arg64-65 του KIM στη DUSP6 οδήγησαν στην αναστολή της αποφωσφορυλίωσης της ERK2 από την DUSP6 [256]. Περαιτέρω εξέταση της παρακείμενης περιοχής της KIM (Arg53, 54 και 55) στη DUSP1 αποκάλυψε ένα δεύτερο μοτίβο που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα Arg72 και 74 και περιβάλλεται από υδροφοβικά κατάλοιπα. Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης στόχευσης (side-directed mutagenesis) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η συγκεκριμένη περιοχή είναι πιθανώς υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση της φωσφατάσης με το αρνητικά φορτισμένο τμήμα των MAPKs ED, το οποίο συμβάλλει στην αναγνώριση υποστρωμάτων των κινασών [257]. Ανάμεσα από τις περιοχές KIM Arg72/74 της DUSP1 αναγνωρίστηκε μία τρίτη συντηρημένη περιοχή στις DUSPs, η οποία αποτελείται κυρίως από υδροφοβικά κατάλοιπα. Και αυτή η περιοχή, σύμφωνα με πειράματα μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης στόχευσης, κατέχει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση των κινασών JNK και p38 από την DUSP1. Από τα παραπάνω ερευνητικά αποτελέσματα γίνεται κατανοητό ότι η περιοχή αλληλεπίδρασης που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο των DUSPs αποτελείται από μικρότερες περιοχές και ότι οι παραλλαγές στην αλληλουχία, σε σχέση με τη θέση, τον αριθμό και το είδος των φορτισμένων καταλοίπων σε κάθε περιοχή, καθορίζουν την ικανότητα κάθε φωσφατάσης να προσδένει διαφορετικές MAPKs [252].

Ιδιαίτερη αναφορά θα πρέπει να κάνουμε σε ένα δεύτερο μοτίβο ελλιμενισμού της ERK στην DUSP1, το μοτίβο DEF (Docking site for ERK, EXFP). Το DEF αρχικά αναγνωρίστηκε σε καθοδικούς στόχους της ERK για φωσφορυλίωση που κωδικοποιούνται από γονίδια πρώιμης απόκρισης, όπως τα *c-fos* και *c-myc* [258, 259]. Η ενεργοποιημένη ERK παρουσιάζει ένα υδρόφοβο τμήμα για αλληλεπίδραση με το τμήμα DEF. Στην περίπτωση της *c-fos*, το DEF μοτίβο εκτίθεται μετά από αρχική φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου από την ERK, με αποτέλεσμα να διευκολύνει τη φωσφορυλίωση δύο καταλοίπων σερίνης, τα οποία σταθεροποιούν την πρωτεΐνη και προάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [258]. Τα τμήματα KIM και DEF μπορούν να δρουν ανεξάρτητα ή προσθετικά στην καθοδήγηση των MAPKs για τη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών στόχων [260]. Στην DUSP1 περιλαμβάνεται



τμήμα DEF με την αλληλουχία FNFP. Το DEF είναι απαραίτητο για τη σύνδεση της ERK2 στην DUSP1 που οδηγεί σε φωσφορυλίωση και αποδόμηση της φωσφατάσης, με αποτέλεσμα η ERK2 παρουσία ορού να παραμένει ενεργή [212]

Όπως γίνεται αντιληπτό, οι περισσότερες έρευνες σχετικά με την αλληλεπίδραση των DUSPs με τις MAPKs αναφέρονται κυρίως στην DUSP6 και ERK2. Επόμενος στόχος είναι να αποδειχθεί αν αυτό το μοντέλο αλληλεπίδρασης είναι γενικά εφαρμόσιμο για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των DUSPs και των υποστρωμάτων τους. Η τελική απάντηση στα περισσότερα ερωτήματα πιθανώς θα δοθεί όταν περισσότερες δομικές πληροφορίες για τα σύμπλοκα των DUSPs και MAPKs γίνουν γνωστές.

#### 1.4.7. Ο φυσιολογικός ρόλος των DUSPs

Παρόλο που οι DUSPs αποτελούν αντικείμενο εκτεταμένων μελετών τα τελευταία χρόνια, ο φυσιολογικός τους ρόλος παραμένει άγνωστος *in vivo*. Ερευνητικές ομάδες έχουν συσχετίσει τις φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης με πολλαπλά είδη καρκίνων στον άνθρωπο. Η υπερέκφραση της DUSP1, η οποία αποφωσφορυλιώνει τις ERK, JNK και p38 [224], έχει εντοπιστεί σε διάφορες κακοήθειες, όπως στον καρκίνο του μαστού [261]. Η DUSP6 είναι υπερ-μεθυλιωμένη στον καρκίνο του παγκρέατος, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς δρα ως καρκινικός καταστολέας [262], ενώ η DUSP2 είναι αυξημένη στον καρκίνο των ωοθηκών [263]. Η DUSP7 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στη μυελοειδή λευκαίμια [264, 265], ενώ η DUSP26 υπερεκφράζεται και προάγει την ανάπτυξη του καρκίνου του θυροειδούς [266]. Επίσης, η έκφραση της DUSP1 σχετίζεται με την απόπτωση [267], παρόλο που η απάλειψή της σε ποντικούς αρχικά δεν προκάλεσε φαινότυπο με φυσιολογική ανάπτυξη και ενεργοποίηση των MAP κινασών σε ινοβλάστες [268]. Ωστόσο, οι πρόσφατες μελέτες έδειξαν υψηλά επίπεδα δραστηριότητας της p38 σε κυψελιδικά μακροφάγα μετά από απάλειψη της DUSP1 [269], γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρόλος της φωσφατάσης πιθανώς να εξαρτάται από τον τύπο του κυττάρου. Η DUSP9 είναι απαραίτητη κατά την ανάπτυξη, καθώς οι *DUSP9<sup>-/-</sup>* ποντικοί πεθαίνουν ενδομήτρια από ανεπαρκή σχηματισμό του πλακούντα, αλλά η απουσία της δε φαίνεται να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των MAP κινασών [237]. Μελέτες για την DUSP10 έδειξαν το σημαντικό ρόλο της στην ανοσοαπόκριση, μέσω της εξασθένησης της JNK-ενεργοποίησης [235]. Παρόμοια με την DUSP1, ποντικοί μετά από απάλειψη της DUSP10 αποκάλυψαν πιθανή θετική αλλά και αρνητική ρύθμιση των κυτταρικών αποκρίσεων. Οι *DUSP10<sup>-/-</sup>* ποντικοί παρουσίασαν αναμενόμενη αύξηση στην παραγωγή κυτοκινών από μακροφάγα κύτταρα μετά από ενεργοποίηση με TLR, (Toll-like receptor), αλλά επιπλέον είχαν και απροσδόκητη μείωση

του πολλαπλασιασμού των T κυττάρων [235]. Επίσης, οι ποντικοί *DUSP2*<sup>-/-</sup> είχαν αναπάντεχο και σύνθετο φαινότυπο. Ενώ τα επίπεδα ενεργοποίησης των κινασών ERK και p38 ήταν μειωμένα απουσία της *DUSP2* σε διεγερμένα μακροφάγα και κύτταρα ιστιοκύτταρα (mast cells), τα επίπεδα της ενεργοποίησης της κινάσης JNK ήταν αυξημένα. Έτσι η *DUSP2* αναδεικνύεται ως καίριος ρυθμιστής της μεταγωγής σήματος της φλεγμονής, μέσω της ρύθμισης των επιπέδων ενεργοποίησης των κινασών JNK και ERK [235].

#### 1.4.8. DUSPs – Προοπτικές και προκλήσεις

Είναι γνωστό ότι οι φαρμακευτικοί αναστολείς των MAP κινασών έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν πολλές αποκρίσεις τόσο των ζωικών όσο και των ανθρώπινων πειραματικών μοντέλων. Ωστόσο, η ευρεία έκφραση των MAP κινασών αλλά και η εξαιρετικά πολύπλοκη μετάδοση του σήματος με crosstalk και βρόγχους ανάδρασης εγείρουν ανησυχία για τις πιθανές παρενέργειες της χρήσης των αναστολέων των MAP κινασών. Πράγματι, παρά τον αρχικό ενθουσιασμό διάφορων εταιρειών για την ανάπτυξη των παραπάνω αναστολέων, πολύ λίγες έχουν προχωρήσει στο τελευταίο στάδιο των κλινικών δοκιμών, με τους περισσότερους να προκαλούν ηπατοτοξικά προβλήματα. Έτσι, οι φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης, DUSPs, αναδεικνύονται ως ελκυστικοί στόχοι για την ανάπτυξη φαρμάκων. Οι αναστολείς των DUSPs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως διαχειριστές της ενεργοποίησης των MAP κινασών και, επομένως, των κυτταρικών αποκρίσεων. Ωστόσο, ο ρόλος των φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και σε πολλές βιολογικές αποκρίσεις θα πρέπει να καθοριστεί. Η κατανόηση των φυσιολογικών ρόλων των DUSPs είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη νέων θεραπειών του καρκίνου αλλά και για την πλήρη κατανόηση του ρόλου των MAP κινασών σε φυσιολογικές αποκρίσεις.



## ΣΚΟΠΟΣ

Η αγγειογένεση παίζει ουσιαστικό ρόλο στην αύξηση και μετάσταση των κακοηθών νεοπλασμάτων. Ένας από τους περισσότερο σημαντικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της αγγειογένεσης είναι ο VEGF-A. Οι περισσότεροι καρκίνοι εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το mRNA του VEGF-A, γεγονός το οποίο έχει σημαντική προγνωστική σημασία για την έκβαση της νόσου και επηρεάζει τις θεραπευτικές επιλογές. Οι υποδοχείς του VEGF-A έχουν δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και φωσφορυλιώνουν δευτερογενείς διαμεσολάβητες, οι οποίοι μετάγουν το σήμα στον πυρήνα, όπου και τροποποιούν το μεταγραφικό πρόγραμμα.

Με βάση τα παραπάνω οι στόχοι της διατριβής είναι:

- να ταυτοποιήσει γονίδια ρυθμιζόμενα από τον VEGF-A
- να προσδιορίσει το ρόλο τους στη ρύθμιση της μεταγωγής σήματος του VEGF-A στα ενδοθηλιακά κύτταρα
- να διευκάνει τη συμμετοχή τους σε συγκεκριμένες αγγειογενετικές ανταποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1. Υλικά

Ο ανθρώπινος αυξητικός παράγοντας VEGF165 που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα προήλθε από την ImmunoTools (ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Germany). Τα πολυκλωνικά αντισώματα αντι-φωσφο-ERK1/2, αντι-ERK1/2, αντι-φωσφο-MEK1/2, αντι-MEK1/2, αντι-φωσφο-p38, αντι-φωσφο-MEK3/6 και αντι-MEK3/6 ήταν από την εταιρία Cell Signaling Technology, Inc. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αντι-βινκουλίνη και αντι-βρωμοδεοξουριδίνη προήλθαν από τη SIGMA. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-HA ήταν από τη Roche (Roche Diagnostics GmbH, Germany). Τα πολυκλωνικά αντισώματα έναντι του p38 MAPK και της ακτίνης (SC-1616) αγοράστηκαν από τη Santa Cruz Biotechnology, Inc. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-β-κατενίνη προήλθε από τη Signal Transduction Laboratories (BD Biosciences, Palo Alto, CA). Όλα τα δευτερογενή αντισώματα ήταν από τη DIANOVA GmbH. Όλα τα μέσα καλλιέργειας ήταν από την Invitrogen (Invitrogen, GmbH, Karlsruhe, Germany). Το εκχύλισμα ενδοθηλιακής ανάπτυξης (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS) απομονώθηκε από εγκέφαλο βοός και ήταν ελεύθερο από ενδοτοξίνες.

### 2.2. Κυτταροκαλλιέργειες

Ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) απομονώθηκαν (βλέπε επόμενο εδάφιο) και καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία τα οποία είχαν πριν επωαστεί με κολλαγόνο αρουραίου τύπου I και πλυθεί με PBS. Το θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονταν ήταν M199 εμπλουτισμένο με 20% εμβρυϊκό ορό βοός (Fetal Calf Serum, FCS), 0.05mg/ml ECGS, 0.05IU ηπαρίνης/ml και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά των κυτάρων σε αραιώση 1 προς 4. Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα γενιάς 2-6. Ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού 293 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI εμπλουτισμένο με 10% εμβρυϊκό ορό βοός και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη και, όταν τα κύτταρα κάλυπταν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου, γινόταν διασπορά τους σε αραιώση 1 προς 4. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στις κυτταροκαλλιέργειες ήταν ελεύθερα ενδοτοξίνης. Ο χειρισμός των κυτάρων γινόταν σε εστία κάθετης νηματικής ροής και τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε επωαστικό κλίβανο, στον οποίο η θερμοκρασία διατηρούταν σταθερή στους 37°C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>.



### 2.3. Απομόνωση ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων προερχόμενα από φλέβα ομφάλιου λώρου

Σε φρέσκο ανθρώπινο ομφάλιο λώρο με τη βοήθεια μιας σύριγγας εντοπίστηκε με ψηλάφηση η φλέβα του λώρου και πλύθηκε με 20 ml PBS. Στη συνέχεια κρατήθηκε κλειστό το κάτω άκρο του λώρου, με τη βοήθεια αποστειρωμένων αιμοστατών, και διαποτίστηκε η φλέβα με 0.1% κολλαγενάση διαλυμένη σε θρεπτικό μέσο M199. Ακολούθησε επώαση του λώρου με PBS σε υδατόλουτρο στους 37°C για 12 λεπτά, πλύσιμο με 10 ml θρεπτικό υλικό M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στα 500g. Τέλος, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και επαναιωρήθηκε το κυτταρικό ίζημα σε πλήρες θρεπτικό υλικό M199 [270].

### 2.4. Κατασκευές DNA

Οι DNA κατασκευές σημασμένες με μία μικρή αλληλουχία *myc* στο καρβοξυτελικό τους άκρο, DUSP1wt (αγρίου τύπου) και DUSP1/CS (καταλυτικά ανενεργή) ήταν δώρο από τον καθ. Steve Kayse (Cancer Research UK, Biomedical Research Centre, Dundee, UK). Παρομοίως, οι DNA κατασκευές σημασμένες με *myc*, DUSP5wt (αγρίου τύπου) και DUSP5/CS (καταλυτικά ανενεργή) ήταν δώρο από τον καθ. Jack Dixon (University of California, La Jolla, CA). Οι DNA κατασκευές DUSP1-CFP and DUSP1-GFP δημιουργήθηκαν με PCR της κωδικεύουσας αλληλουχίας της DUSP1, η οποία κλωνοποιήθηκε στους φορείς pECFP-N3 και pEGFP-N3 αντίστοιχα, στις θέσεις BglII-Sall. Οι DNA κατασκευές CFP-DUSP5 και GFP-DUSP5 δημιουργήθηκαν μετά από κλωνοποίηση της DUSP5 στους φορείς pECFP-C1 και pEGFP-C1, αντίστοιχα, στις θέσεις BglII-XbaI. Οι DNA κατασκευές p38-YFP και p38-mCherry δημιουργήθηκαν με κλωνοποίηση του p38 στους φορείς pEYFP-N1 και pcDNA3-mCherry, αντίστοιχα, στις θέσεις HindIII-BamHI. Οι DNA κατασκευές YFP-Erk2 and Erk2-mCherry δημιουργήθηκαν από την αρχική κατασκευή HA-ERK2, από την οποία αφαιρέθηκε η μικρή αλληλουχία HA και, στη συνέχεια, η κωδικοποιούσα αλληλουχία του ERK2 κλωνοποιήθηκε στους φορείς pEYFP-C3 και pcDNA3-mCherry, αντίστοιχα, στις θέσεις HindIII-BamHI.

Ο θετικός μάρτυρας YFP-p38-CFP για τα πειράματα FLIM δημιουργήθηκε με την κλωνοποίηση των αλληλουχιών p38 και CFP στο φορέα pEYFP-C1 στις θέσεις HindIII-BamHI και BamHI-XbaI, αντίστοιχα. Ο θετικός μάρτυρας GFP-p38-mCherry για τα πειράματα FCCS δημιουργήθηκε με την κλωνοποίηση της αλληλουχίας GFP στο φορέα

pcDNA3.1(+) στις θέσεις NheI-HindIII. Στη συνέχεια, η αλληλουχία p38-mCherry κλωνοποιήθηκε στην παραπάνω κατασκευή στις θέσεις HindIII-EcoRV.

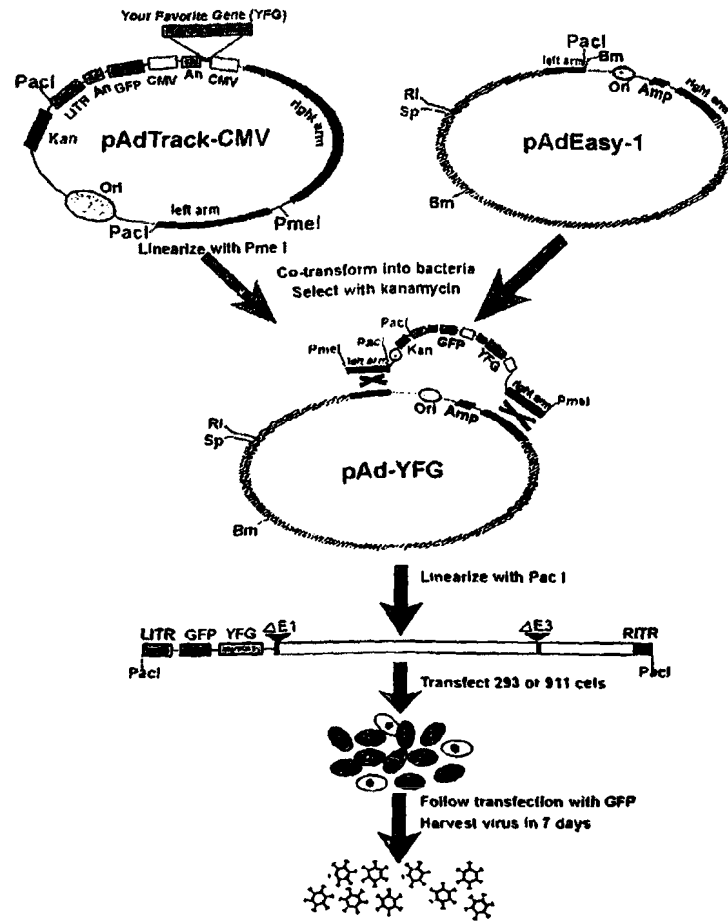
Όλοι οι φορείς ήταν απο την Invitrogen. Η κατασκευή-φορέας pRSET-B-mCherry ήταν δώρο από τον Roger Tsien (University of California, San Diego, CA, USA) και στη συνέχεια κλωνοποιήθηκε στο φορέα pcDNA3 από τον επίκουρο καθ. Παναγιώτη Κούκλη (Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα). Οι DNA κατασκευές HA-ERK2 και HA-p38 MAPK ήταν δώρο από τον J. Silvio Gutkind (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Όλες οι κατασκευές στάλθηκαν για αλληλούχηση και παράχθηκαν χρησιμοποιώντας την εμπορική συσκευασία Endo-Free από την Qiagen (Qiagen, GmbH, Germany) με σκοπό να αποφευχθεί η LPS στα ενδοθηλιακά κύτταρα.

### 2.5. Κατασκευή και αναπαραγωγή ανασυνδυασμένων αδενοϊών

Ανασυνδυασμένοι αδενοϊοί κατασκευάστηκαν σύμφωνα με την αναφορά [271] και η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στην ιστοσελίδα ([www.coloncancer.org/adeasy.htm](http://www.coloncancer.org/adeasy.htm)) (Εικόνα 18). Όλοι οι φορείς και τα στελέχη βακτηρίων για τη δημιουργία των αδενοϊών ήταν ευγενική προσφορά του Bert Vogelstein (The John Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD).

Οι αδενοϊοί που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σημασμένοι με μια μικρή αλληλουχία αμινοξέων myc και εξέφραζαν είτε την αγρίου τύπου μορφή της DUSP1 (AdDUSP1wt) ή της DUSP5 (AdDUSP5wt) είτε την καταλυτικά ανενεργή μορφή της DUSP1 (AdDUSP1/CS) ή της DUSP5 (AdDUSP5/CS), όπου μία κυστεΐνη υπεύθυνη για τη δράση της φωσφατάσης είχε μεταλλαχθεί σε σερίνη. Αναλυτικότερα, οι DUSP1wt-myc και DUSP1/CS-myc κλωνοποιήθηκαν στη θέση EcoRV του φορέα έκφρασης pADTrack-CMV. Οι DUSP5wt-myc και DUSP5/CS-myc κλωνοποιήθηκαν στις θέσεις KpnI-XbaI του φορέα έκφρασης pADTrack-CMV. Για τη δημιουργία ανασυνδυασμένων πλασμιδίων χρησιμοποιήθηκαν βακτήρια BJ5183. Έτσι, καθένα από τα παραπάνω πλασμίδια υποβλήθηκε σε πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI και αναμείχθηκε με το σκελετό-φορέα pAdEasy1 που περιέχει όλο το γονιδίωμα του αδενοϊού εκτός από τις περιοχές των πρώιμων γονιδίων E1 και E3. Η επιλογή των αποικιών έγινε με τη χρήση 50 μg/ml αντιβιοτικού καναμυκίνη (Sigma). Οι αποικίες αναλύθηκαν αρχικά σε πήγμα αγαρόζης ανάλογα με το υπερελικωμένο μέγεθος του DNA τους, αλλά και με ενδεικτικές πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες PacI και BamHI. Επίσης, ως αδενοϊός-μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο αδενοϊός που εξέφραζε την β-γαλακτοσιδάση (AdLacZ) και ήταν προσφορά του κ. Αριστεΐδη Μουστάκα (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden).





**Εικόνα 18: Σχηματική περιγραφή του συστήματος AdEasy.** Το γονίδιο προς μελέτη πρώτα κλωνοποιείται στον κατάλληλο παλινδρομικό φορέα (π.χ. pAdTrack-CMV). Το πλασμίδιο που δημιουργείται ευθυγραμμίζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI και χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό κυττάρων E.coli BJ5183 μαζί με πλασμίδιο που φέρει το γονιδίωμα του αδενοϊού (π.χ. pAdEasy-1) χωρίς τα γονίδια αναδυσπλασμού E1 και E3. Η επιλογή αποικιών με ανασυνδυασμένα πλασμίδια έγινε ανάλογα με την ανθεκτικότητά τους στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και ο ανασυνδυασμός ελέγχθηκε με περιοριστική ανάλυση με ενδονουκλεάσες. Τελικά, το ευθυγραμμισμένο με PacI ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση κυτταρικής σειράς πακεταρίσματος π.χ. 911 ή 293. Τα σημεία "left arm" και "right arm" αντιπροσωπεύουν τις περιοχές όπου γίνεται ο ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ του παλινδρομικού φορέα και του φορέα του αδενοϊού.

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



## **2.6. Τίτλοποίηση ιών και συνθήκες μόλυνσης κυττάρων**

Όλοι οι ιοί πολλαπλασιάστηκαν σε 293 κύτταρα και ο ιικός τίτλος προσδιορίστηκε με τη δοκιμασία ιικής πλάκας. 293 κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία έξι φρεατίων μέχρι να καλύψουν το 80-90% της επιφάνειας του τάπητα. Στη συνέχεια έγινε μόλυνση των κυττάρων με διαφορετικές αραιώσεις του κάθε ιού (εύρος από  $10^{-2}$ - $10^{-6}$ ) για 4 ώρες. Ακολούθως έγινε αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα κύτταρα και προσθήκη 4ml διαλύματος αγαρόζης (20mM HEPES, 12.5mM MgCl<sub>2</sub>, 1% αγαρόζη σε πλήρες θρεπτικό υλικό RPMI 1640) στο κάθε φρεάτιο και παρέμεινε 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει. Τέλος, προστέθηκε PBS στα μεσοδιαστήματα των φρεατίων (προκειμένου να μην ξεραθεί η παγωμένη αγαρόζη και σπάσει), το τρυβλίο σφραγίστηκε με μεμβράνη και ακολούθησε επώαση σε επωαστικό κλίβανο στο οποίο η θερμοκρασία ήταν σταθερή στους 37°C, επικρατούσαν συνθήκες υγρασίας και η ατμόσφαιρα ήταν εμπλουτισμένη με 5% CO<sub>2</sub>. Οι ιικές πλάκες αναπτύχθηκαν μετά από περίπου μία εβδομάδα και αναγνωρίστηκαν ως μεμονωμένες εστίες λύσης των κυττάρων. Από τον αριθμό των ιικών πλακών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά φρεάτια, τα οποία αντιστοιχούσαν σε διαφορετικές αραιώσεις του ιού, υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος (ικά σωματίδια/μl).

Προκειμένου να μολυνθούν και να εκφράσουν τις αντίστοιχες πρωτεΐνες, τα HUVE κύτταρα καλλιεργήθηκαν και επώαστηκαν με τον ανασυνδυασμένο ιό σε αναλογία ικών σωματίων/αριθμός κυττάρων (Multiplicity of infection, MOI) 200 ή 300 για 24 ή 36 ώρες. Η έκφραση των πρωτεϊνών ελεγχόταν κάθε φορά με ανοσοαποτύπωση κατά Western (βλ. παρακάτω), ενώ το ποσοστό των μολυσμένων κυττάρων εξεταζόταν με έμμεσο ανοσοφθορισμό (βλέπε παρακάτω). Για την ανίχνευση της β-γαλακτοσιδάσης, τα μολυσμένα κύτταρα πλύθηκαν με PBS, έγινε μονιμοποίηση με 3.7% παραφορμαλδεύδη για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, πλύση με PBS και επώαση στους 37°C με διάλυμα 5mM σιδηροκυανούχου καλίου, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.002%NP40, 0.01% δεοξυχολικού νατρίου-sodium deoxycholate και 1mg/ml X-Gal μέχρι να αναπτυχθεί το χρώμα. Έτσι τα μολυσμένα κύτταρα τα οποία εξέφραζαν β-γαλακτοσιδάση χρωματίστηκαν μπλε και αναγνωρίστηκαν κάτω από το οπτικό μικροσκόπιο.

## **2.7. Ανάλυση γονιδιακής έκφρασης**

### **2.7.1. Καλλιέργεια κυττάρων και απομόνωση RNA**

HUVE κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 6 ώρες σε θρεπτικό υλικό μειωμένου ορού (M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS). Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για διάφορα



χρονικά διαστήματα (3, 6, 12, 17 και 22 ώρες) με VEGF (30ng/ml). Ακολούθως, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με τρυψινοποίηση και απομονώθηκε το συνολικό RNA από το κάθε δείγμα με τη βοήθεια του εμπορικού προϊόντος Rneasy Midi kit (QIAGEN). Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση της γονιδιακής τους έκφρασης με την τεχνολογία των DNA μικροσυστοιχιών, τα δείγματα στάλθηκαν στο maf VIB MicroArray Facility στο Βέλγιο.

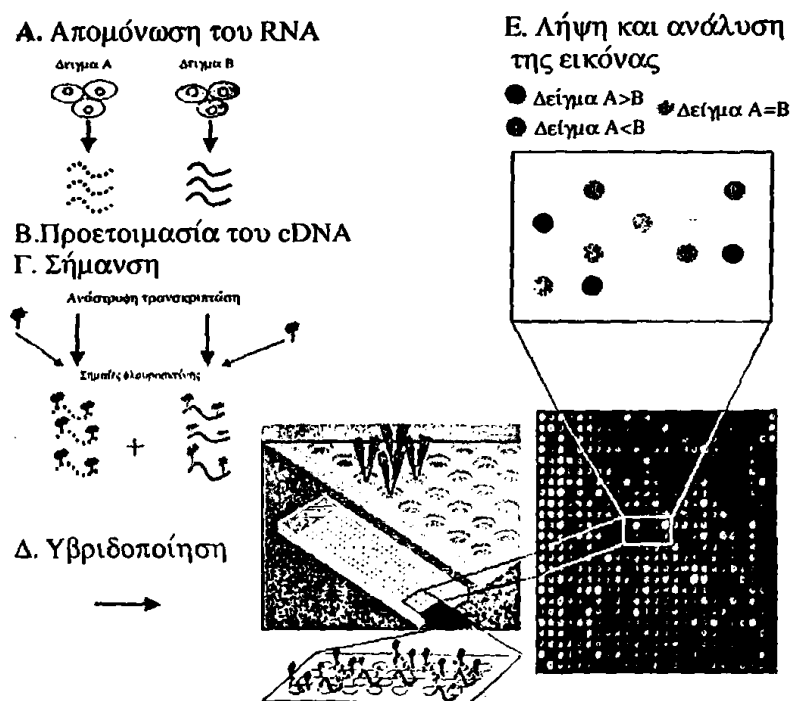
### 2.7.2. Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του RNA

Προκειμένου αρχικά να υπολογίσουμε την ποσότητα του RNA, ίσοι όγκοι από κάθε δείγμα φωτομετρήθηκαν στα 260nm. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε από τον τύπο: Συγκέντρωση RNA=40x A260xΣυντελεστή αραιώσης, όπου A260 είναι η απορρόφηση του δείγματος στα 260nm και συντελεστής αραιώσης είναι η αραιώση του δείγματος σε 1ml νερού στη γυάλινη κυβέτα φωτομέτρησης. Ως προς την αξιολόγηση της ποιότητας του RNA, το κάθε δείγμα φωτομετρήθηκε στα 260nm και 280nm και υπολογίστηκε ο λόγος A260/A280. Υψηλής ποιότητας RNA θεωρήθηκε μόνο αυτό που ο λόγος A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ήταν μεταξύ 1.8-2.1. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης (1.2% αγαρόζη, 0.02M MOPS, 6% Φορμαλδεύδη) και σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0.02M MOPS, 6%Φορμαλδεύδη). 5μg RNA από κάθε δείγμα ηλεκτροφορήθηκαν αφού προετοιμάστηκαν σε διάλυμα (44% Φορμαμίδιο, 5.8% φορμαλδεύδη, 0.025 M MOPS, Bromo Phenol Blue) και θερμάνθηκαν στους 65°C για 5 λεπτά. Φωτογραφία των RNA ελήφθηκε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

### 2.7.3. Η τεχνολογία των cDNA μικροσυστοιχιών

Η τεχνολογία των cDNA μικροσυστοιχιών κάνει εφικτό τον έλεγχο της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης σε δύο δείγματα RNA ανάμεσα σε ένα μεγάλο αριθμό γονιδίων με ένα και μόνο πείραμα. Συνοπτικά, η τεχνολογία συνίσταται στην ακινητοποίηση ενός μεγάλου αριθμού τμημάτων DNA (της τάξης των χιλιάδων), κάθε ένα από τα οποία αντιστοιχεί σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο, σε μια μικρή επιφάνεια το ένα δίπλα στο άλλο με τη βοήθεια της ρομποτικής. Τα δύο δείγματα RNA των οποίων η γονιδιακή έκφραση θα συγκριθεί, αφού μετατραπούν με την αντίστροφη μεταγραφάση σε cDNA, σημαίνονται με τα φλουροχρώματα Cy3 (πράσινο) για το δείγμα-μάρτυρα και Cy5 (κόκκινο) για το δείγμα που προέκυψε μετά από επώαση με VEGF. Στη συνέχεια, ίσες ποσότητες από το κάθε ένα αφήνονται κάτω από κατάλληλες συνθήκες να υβριδοποιηθούν πάνω στην επιφάνεια με τα ακινητοποιημένα τμήματα DNA. Κατ'αυτό τον τρόπο ανάλογα με την ποσοτική σχέση της έκφρασης ενός γονιδίου στα δύο δείγματα, στο σημείο της επιφάνειας που αντιστοιχεί σε αυτό το γονίδιο, η

υβριδοποίηση θα προκαλέσει έκλυση φωτός συγκεκριμένου φάσματος, το οποίο στη συνέχεια ανιχνεύεται, καταγράφεται και με τις κατάλληλες ομαλοποιήσεις υπολογίζεται ο λόγος της συγκέντρωσης του RNA για το κάθε γονίδιο στο ένα δείγμα σε σχέση με το άλλο (Εικόνα 19). Για να ελαχιστοποιηθούν οι διαφοροποιήσεις από τη σήμανση των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε για δεύτερη φορά η διαδικασία υβριδοποίησης με το δείγμα-μάρτυρα να φέρει το Cye5 και το δείγμα με Cye3 (color-flip).



Εικόνα 19: Η τεχνολογία των cDNA μικροσυστοιχιών ([www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm](http://www.fao.org/DOCREP/003/X6884E/x6884e03.htm)).

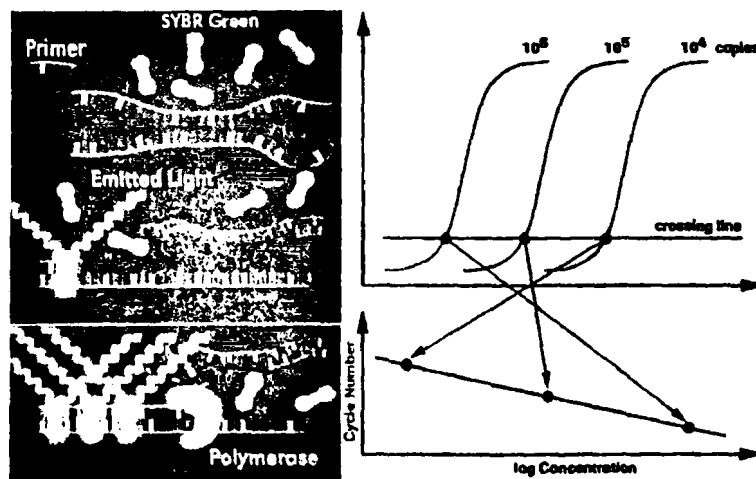
#### 2.7.4. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης- qRT-PCR

Η μέθοδος της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου (quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, qRT-PCR) επιτυγχάνει υπολογισμό της συγκέντρωσης του RNA ενός συγκεκριμένου γονιδίου σε ένα δείγμα. Η qRT-PCR πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της τυποποιημένης συσκευασίας δοκιμασίας (kit) QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) ενός σταδίου. Οι αντιδράσεις που γίνονται είναι οι ακόλουθες δύο:

A. Αντίστροφη μεταγραφή. Με την παρουσία ενός μίγματος ανάστροφων μεταγραφασών (Omniscript & Sensiscript) παράγεται το συμπληρωματικό DNA (cDNA) από το αγγελιοφόρο RNA (mRNA).



B. Πολλαπλασιασμός του τμήματος του DNA που αντιστοιχεί στο συγκεκριμένο γονίδιο με τη χρήση α) των κατάλληλων εκκινητών σύμφωνα με τις αρχές της απλής αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης καθώς και β) της HotStarTaq DNA πολυμεράσης. Η συγκεκριμένη DNA πολυμεράση έχει την ιδιότητα να παραμένει ανενεργή χωρίς καμία ενζυματική δράση στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το ένζυμο ενεργοποιείται από ένα 15-λεπτο βήμα επώασης στους 95°C, το οποίο προστίθεται πριν από το κλασικό πρόγραμμα της PCR. Επίσης, παρούσα είναι και η χρωστική SYBR Green I, η οποία δένεται στο δίκλωνο DNA και εκπέμπει φθορίζον σήμα. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να γίνει η ποσοτικοποίηση διαφορετικών στόχων χωρίς να χρειάζεται ανιχνευτής (probe) με ειδική αλληλουχία. Η διέγερση και η εκπομπή της SYBR Green I γίνεται στα 494nm και 521nm, αντίστοιχα. Ο κύκλος στον οποίο παρατηρείται φθορισμός μεγαλύτερος του βασικού φθορισμού (threshold cycle, Ct) εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου. Χρησιμοποιώντας, λοιπόν, γνωστές συγκεντρώσεις αρχικού RNA μπορεί να σχεδιαστεί μια πρότυπη καμπύλη φθορισμού,  $Ct = a \cdot \log(\text{συγκέντρωσης})$  και από αυτή την καμπύλη να υπολογιστεί και η συγκέντρωση του συγκεκριμένου RNA στο προς εξέταση δείγμα (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Η μέθοδος της PCR αντίστροφης μεταγραφάσης πραγματικού χρόνου. Κατά το πρώτο στάδιο της PCR, επειδή το DNA είναι μονόκλωνο, η SYBR Green I δε δένεται με το DNA και έτσι ο φθορισμός είναι χαμηλός. Κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης των εκκινητών στο DNA υπάρχουν μικρά τμήματα δίκλωνου DNA στα οποία συνδέεται η SyBR Green I και, καθώς αυξάνεται το δίκλωνο DNA κατά το στάδιο της επιμήκυνσης, αυξάνεται και το ποσό πρόσδεσής της και κατ'αυτόν τον τρόπο και ο φθορισμός. Κατά το τέλος δε αυτού του σταδίου, το ποσό του δίκλωνου DNA είναι το μέγιστο, το ίδιο και ο φθορισμός. Γι'αυτό το λόγο η καταγραφή του φθορισμού γίνεται κάθε φορά στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης και αυξανόμενα ποσά PCR προϊόντος μπορούν να καταγράφονται από κύκλο σε κύκλο. Η πρότυπη καμπύλη φθορισμού, προκύπτει από δείγματα με γνωστή αρχική συγκέντρωση εφαρμόζοντας τη σχέση  $Ct = a \cdot \log(\text{συγκέντρωσης})$ . Από αυτή την καμπύλη υπολογίζεται η συγκέντρωση του συγκεκριμένου RNA στο προς εξέταση δείγμα ([www.roche-applied-science.com/lightcycler](http://www.roche-applied-science.com/lightcycler))

Με βάση την ανωτέρω διαδικασία ελέγχθηκαν και επιβεβαιώθηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν για μερικά από τα γονίδια από το πείραμα των DNA μικροσυστοιχιών. Συγκεκριμένα, αρχικά σχεδιάστηκαν οι εκκινητές με τη βοήθεια του λογισμικού DnaStar και η σύνθεσή τους έγινε στην MWG (Γερμανία). Αντιπροσωπευτικά φαίνονται πιο κάτω οι εκκινητές, όπως σχεδιάστηκαν για τρία γονίδια, την *DUSP1*, *DUSP5* και *DUSP6* (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Αλληλουχίες εκκινητών για τα γονίδια *DUSP1*, *DUSP5* & *DUSP6*

GENE NAME	Primer sequence
<i>DUSP1</i>	Forward: 5'-GCT GGA CGA GGC CTT TGA GTT TGT-3' Reverse: 5'-AGC AGC TGG GAG AGG TCG TAA TGG-3'
<i>DUSP5</i>	Forward: 5'- CCT GCA GCA ACG TGG GAG AAA GAA-3' Reverse: 5'-CCA GGG GCA GGG AGG AAA ACA AT-3'
<i>DUSP6</i>	Forward: 5'-CTC GCC GCC GTT GCC AGT G-3' Reverse: 5'-TCC CAG CGT CCT CTC GAA GTC CAG-3'

Έτσι, σε έναν τελικό όγκο 10μl υπήρχαν 20ng RNA από το υπό εξέταση δείγμα, 0.3μM από τον κάθε εκκινητή, μίγμα δύο RNA πολυμερασών (Omniscrypt & Sensiscrypt), HotStart DNA πολυμεράση, μίγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων, SyBR Green I και MgCl<sub>2</sub>. Για την παρασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις RNA (από 1-200ng) προερχόμενου από μη ενεργοποιημένα HUVΕ κύτταρα. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου για το κάθε στάδιο για τα δύο γονίδια σχεδιάστηκαν όπως φαίνονται στον πίνακα 5, και η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο LightCycler 2.0 (Roche).

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις σε 50 κύκλους, ενώ η θερμοκρασία τήξης προκειμένου να ελέγξουμε την ειδικότητα του προϊόντος τέθηκε στους 60°C και για τα τρία γονίδια.

Πίνακας 5: Συνθήκες ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης για τα γονίδια *DUSP1*, *DUSP5* & *DUSP6*.

Συνθήκες της αντίδρασης	<i>DUSP1</i>	<i>DUSP5</i>	<i>DUSP6</i>
Αντίστροφη μεταγραφή	50°C για 20 λεπτά	50°C για 20 λεπτά	50°C για 20 λεπτά
Ενεργοποίηση της DNA πολυμεράσης & Πλήρης αποδιάταξη του cDNA	95°C για 15 λεπτά	95°C για 15 λεπτά	95°C για 15 λεπτά



1ο στάδιο PCR (άνοιγμα της διπλής έλικας)	95°C για 15sec	95°C για 30sec	95°C για 15sec
2 <sup>ο</sup> στάδιο PCR (πρόσδεσης των εκκινητών)	53°C για 20sec	58°C για 60sec	55°C για 11sec
3 <sup>ο</sup> στάδιο PCR (επιμήκυνσης του προϊόντος)	72°C για 15sec	72°C για 30sec	72°C για 15sec

### 2.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση κατά Western

Κυτταρικά εκχυλίσματα ελήφθησαν με διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (PBS) που περιείχε 1% SDS και 100μM αναστολέα πρωτεασών phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF). Στη συνέχεια, τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπέρηχους (Branson Digital Sonifier) τρεις φορές από 10 δευτερόλεπτα και βράστηκαν για 10 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 11.200g για 20 λεπτά απ' όπου συλλέχτηκε το υπερκείμενο.

Κυτταρικά εκχυλίσματα ηλεκτροφορήθηκαν σε SDS-πολυακρυλαμιδίου 12% και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης Schleicher and Schuell, σύμφωνα με τις πρότυπες διαδικασίες που αναφέρονται στο Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Maniatis *et.al.*, 1989). Για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της αποτύπωσης οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης βάφτηκαν με Ponceau S (0,1% σε οξικό οξύ 1%) για 1 λεπτό και ξεβάφτηκαν με νερό. Οι μεμβράνες επώαστηκαν σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western (1 M Tris pH 7,2, 0,1% Tween 20, και 150 mM NaCl) είτε σε θερμοκρασία δωματίου για μια ώρα είτε στους 4 °C ολονυχτίως υπό ανατάραξη για την δέσμευση των μη ειδικών θέσεων. Οι μεμβράνες επώαστηκαν με τα αρχικά αντισώματα είτε για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους 4 °C ολονυχτίως σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western. Στην συνέχεια ακολούθησαν δύο σύντομες πλύσεις σε διάλυμα Western, και τρεις πλύσεις των 10 λεπτών στο ίδιο διάλυμα. Τέλος, οι μεμβράνες επώαστηκαν με αντισώματα συζευγμένα με τη ραφανιδική υπεροξειδάση (Horse Raddish Peroxidase, HRP) για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε 5% άπαχο γάλα σκόνη σε διάλυμα Western και ακολούθησαν ίδιες ακριβώς πλύσεις, όπως αναφέρεται παραπάνω. Η εμφάνιση του σήματος έγινε με το εμπορικό αντιδραστήριο ενισχυμένης χημειοφωταύειας (Enhanced Chemiluminescence, ECL) της εταιρίας Amersham (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).



### 2.9. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης

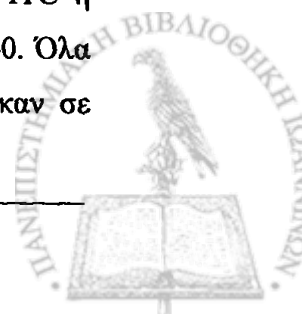
Για τη μέτρηση συγκέντρωσης συνολικής πρωτεΐνης στα κυτταρικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος BCA (bikinchromic acid, βικινχρωμικό οξύ, PIERCE). Για την πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις BSA (2μg/μl). Μετά από επώαση των δειγμάτων για 30 λεπτά στους 37°C, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 562nm.

### 2.10. Αποδόμηση πρωτεϊνών

Ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τρυβλία 6 φρεατίων μέχρι να καλύψουν το 80% του πυθμένα. Στη συνέχεια επώαστηκαν για 6h σε θρεπτικό υλικό μειωμένου ορού (M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS) και ακολούθως τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν για διάφορα χρονικά διαστήματα (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 και 6 ώρες) με VEGF (50ng/ml) απουσία ή παρουσία κυκλοεξιμιδίου (Cyclohexamide, CHX, 50ng/ml). Τέλος, η λύση των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με διάλυμα 1%SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Για να καθοριστεί ο ρυθμός αποδόμησης της DUSP1/MKP-1 ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι-DUSP1/MKP-1 αλλά και το αντι-τουμπουλίνη για ομαλοποίηση των ποσοτήτων των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκαν.

### 2.11. Έμμεσος ανοσοφθορισμός

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε καλυπτρίδες που είχαν προκαλυφθεί με κολλαγόνο τύπου 1 και στη συνέχεια επώαστηκαν στις διάφορες συνθήκες ανάλογα με το σχεδιασμό του πειράματος. Με το πέρας της επώασης έγινε πλύση των κυττάρων μια φορά με PBS και στη συνέχεια μονιμοποίηση σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 3.7% για 15 λεπτά. Ακολούθησε επώαση με 50mM NH<sub>4</sub>Cl (σε PBS) για 15 λεπτά για να μειωθεί ο αυτοφθορισμός και επώαση με Triton 0.1% (σε PBS) για 4 λεπτά προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητα της μεμβράνης. Ακολούθως, έγινε πλύση με PBS και επώαση με 10% FCS (που είχε πριν υπερφυγοκεντρηθεί) για 20 λεπτά προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων με το διάλυμα του πρώτου αντισώματος για 1 ώρα. Με το πέρας της επώασης, εφόσον γινόταν πλύση των κυττάρων μία φορά με PBS, γινόταν επώαση με το διάλυμα του 2ου αντισώματος. Τα δευτερογενή αντισώματα κόνικλου ή ποντικού συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRITC) προήλθαν από την εταιρία Dianova και χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε ορό 10% (10% FCS). Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε



αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με πηγή εκπομπής laser ακτινοβολίας (Argon-488), laser στερεάς κατάστασης 561 και λογισμικό Leica TCS.

### **2.12. Διαμόλυνση ενδοθηλιακών κυττάρων**

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν 24 ώρες πριν τη διαδικασία διαμόλυνσης, σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11mm και σε συγκέντρωση 40.000 κύτταρα/φρεάτιο. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκε το λιπίδιο METAFECTENE Pro σε αναλογία με το DNA 4:1 και σε διάλυμα M199, μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Το μίγμα διαμόλυνσης προστέθηκε στα κύτταρα, τα οποία βρίσκονταν σε υλικό καλλιέργειας M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS και διατήρηθηκε για 4h, πριν αντικατασταθεί με πλήρες μέσο καλλιέργειας ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν στις διάφορες πειραματικές διαδικασίες μετά από 24 ώρες επώασης σε κλίβανο 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.13. Κυτταρική κλασματοποίηση**

Πυρηνικά και κυτταροπλασματικά κλάσματα προετοιμάστηκαν από μη ενεργοποιημένα και ενεργοποιημένα κύτταρα από VEGF. Συγκεκριμένα, κύτταρα HUVE διεγέρθηκαν με VEGF (50ng/ml) μετά από δίωρη στέρηση ορού, για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (5-240λεπτά). Στη συνέχεια, τα κύτταρα πλύθηκαν με PBS και 500μl υποτονικού διαλύματος (20mM Tris-HCl, Ph7,5, 10mM NaCl, 1Mm DTT, 0,5% NP-40, 0,2mM EDTA, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10% γλυκερόλη, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50nM οκαδαϊκό οξύ (okadaic acid), 20mM β-γλυκερολ-φωσφορικό, 20μM φθοριούχο νάτριο (Sodium fluoride, NaF)) εμπλουτισμένου με αναστολείς πρωτεασών, προστέθηκαν στο τρυβλίο. Τα κύτταρα παρέμειναν στον πάγο για 5 λεπτά, συλλέχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 500g για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο διαχωρίστηκε (κυτταρόπλασμα) και το κυτταρικό ίζημα (πυρήνες) επαναιωρήθηκε σε υποτονικό διάλυμα (όπως προηγουμένως εμπλουτισμένο με 500mM χλωριούχο νάτριο). Ίσες ποσότητες των δύο κλασμάτων χρησιμοποιήθηκαν για ανοσοαποτύπωση κατά Western με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι των φώσφο-ERK1/2 και των συνολικών ERK1/2. Οι πρωτεΐνες N-myc και Rab5 χρησιμοποιήθηκαν ως πυρηνικός και κυτταροπλασματικός δείκτης, αντίστοιχα.



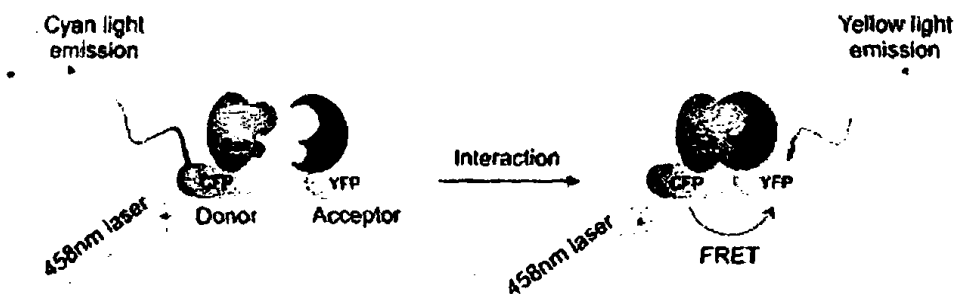


## 2.14. Μεταφορά ενέργειας συντονισμού κατά Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) σε συνδυασμό με μικροσκοπία απεικόνισης χρόνου ζωής φθορισμού (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM)

### 2.14.1. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής FRET

Η τεχνική FRET είναι μία φυσική διαδικασία κατά την οποία ενέργεια μεταφέρεται από ένα διεγερμένο φθορίζον μόριο (δότης) σε ένα άλλο φθορίζον μόριο (λήπτης). Η απόδοση της τεχνικής FRET εξαρτάται από την απόσταση δότη-λήπτη και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική, όταν τα δύο φθορισμογόνα βρίσκονται σε απόσταση ακτίνας Förster (η απόσταση στην οποία 50% της ενέργειας συντονισμού του δότη μεταφέρεται στο λήπτη, τυπικά 3-6nm). Η αποδοτικότητα της τεχνικής FRET εξαρτάται από το  $(\frac{1}{r^6})$ , όπου  $r$ : απόσταση μεταξύ δότη-λήπτη, που την καθιστά μία ιδιαίτερη ευαίσθητη τεχνική για τη μελέτη βιολογικών φαινομένων που προκαλούν αλλαγές στη μοριακή εγγύτητα (Εικόνα 21).

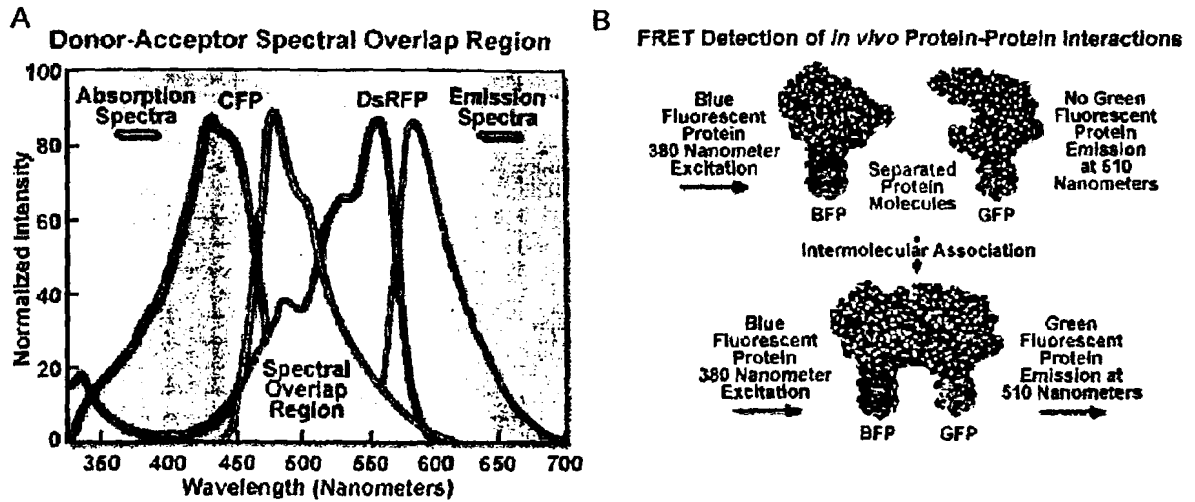
### Forster Resonance Energy Transfer (FRET)



Εικόνα 21: Η αρχή λειτουργίας του φαινομένου FRET.

Οι φασματικές ιδιότητες που θα πρέπει να έχουν τα φθορισμογόνα για αποτελεσματικό FRET περιλαμβάνουν:

- i. επαρκή διαχωρισμό στα φάσματα διέγερσης για επιλεκτική διέγερση του δότη
- ii. επικάλυψη 30% μεταξύ του φάσματος εκπομπής του δότη και του φάσματος διέγερσης του λήπτη για επιτυχή μεταφορά ενέργειας (Εικόνα 22)
- iii. ικανό διαχωρισμό μεταξύ των φασμάτων εκπομπής μεταξύ δότη και λήπτη για την αποτελεσματική μέτρηση του φθορισμού.



Εικόνα 22: Η τεχνική FRET. (A) Για επιτυχημένη μεταφορά ενέργειας από το δότη στον λήπτη είναι απαραίτητη η επικάλυψη κατά 30% του φάσματος εκπομπής του δότη και του φάσματος διέγερσης του λήπτη. Επίσης, τα φάσματα διέγερσης των δύο φθορισμογόνων πρέπει να διαχωρίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό. (B) Στην περίπτωση που οι πρωτεΐνες BFP και GFP βρίσκονται σε απόσταση μεγαλύτερη των 10nm δεν παρατηρείται εκπομπή στα 510nm (μήκος κύματος εκπομπής της GFP). Σε περίπτωση πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης η μεταξύ τους απόσταση μειώνεται και είναι δυνατή η διέγερση του φθορισμογόνου-λήπτη (GFP) από το φθορισμογόνο-δότη (BFP).

#### 2.14.2. FRET σε συνδυασμό με FLIM

Η μεταφορά ενέργειας από το δότη στο λήπτη (FRET) έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής του φθορισμού του δότη. Η τεχνική που καταγράφει τη μεταβολή στο χρόνο ζωής του φθορισμού εξαιτίας FRET ονομάζεται μικροσκοπία χρόνου ζωής φθορισμού (Fluorescence Lifetime Imaging, FLIM). Το πλεονέκτημα της μέτρησης του χρόνου ζωής των φθορισμών οφείλεται στο γεγονός ότι αυτή η παράμετρος εξαρτάται άμεσα από τη μεταφορά ενέργειας (FRET), αλλά είναι ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση φθορίζοντων μορίων και από το μονοπάτι που ακολουθεί το φως, καταστάσεις που είναι αδύνατο να τις ελέγξουμε σε ζωντανά κύτταρα. Τέλος, η ταχύτερη λήψη εικόνων χρόνου ζωής φθορισμού επιτρέπει την εφαρμογή της τεχνικής FLIM σε ζωντανά κύτταρα, χωρίς να προκαλείται καταστροφή του δείγματος.

#### 2.14.3. Η λήψη των μετρήσεων FLIM

Τα πειράματα FLIM πραγματοποιήθηκαν σε ζωντανά κύτταρα HUVE, τα οποία βρίσκονταν σε καλλιέργεια για 24h μετά από διαμόλυνση με τις κατασκευές DNA σύμφωνα με τις παραπάνω οδηγίες. Οι εικόνες FLIM ελήφθησαν με τη βοήθεια μικροσκοπίου Fluoview 1000 (Olympus, Germany) εφοδιασμένο με το καταμετρητή φωτονίων PicoHarp 300 (Picoquant, Germany). Το φθορισμογόνο eCFP διεγέρθηκε με δίοδο laser (diode laser)

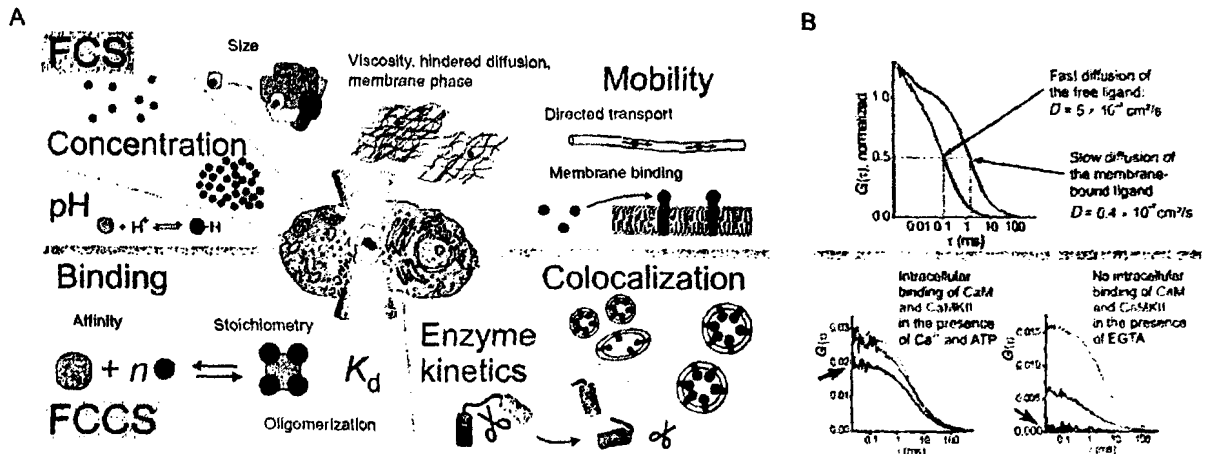
440nm (Seria II, Picoquant, Germany) ενισχυμένη 10 φορές από ένα φίλτρο πυκνότητας. Ο οπτικός φακός που χρησιμοποιήθηκε ήταν water immersion, 60x UplanSApo (N.A. 1.2). Το σήμα εκπομπής πέρασε από διχρωμικό κάτοπτρο 440/530 και η σχισμή ήταν ρυθμισμένη σε 1 Airy units. Ο φθορισμός οδηγήθηκε μέσω ίνας σε κουτί ανίχνευσης ενισχυμένο με φίλτρο HQ480DF40 και ανιχνευτή φωτονίων (SPAD, MPD, Italy).

Οι εικόνες με ανάλυση 256x256 pixels ελήφθησαν σε 4 λεπτά που αντιστοιχούσαν σε ένα εκατομμύριο περίπου φωτόνια. Οι εικόνες του φθορισμογόνου-δότη επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πακέτο SymPhoTime (v4.2, Picoquant, Germany) και αναλύθηκαν pixel-to-pixel χρησιμοποιώντας διπλό εκθετικό μοντέλο προσαρμογής. Οι χρόνοι ζωής φθορισμού των πληθυσμών των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν (θετικός μάρτυρας), καθώς και αυτών που δεν αλληλεπιδρούν (αρνητικός μάρτυρας), υπολογίστηκαν από τα αντίστοιχα δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν για την περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυση των αποτελεσμάτων.

### 2.15. Φασματοσκοπία σχετικού συσχετισμού φθορισμού (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, FCCS)

Η φασματοσκοπία συσχετισμού φθορισμού (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) εκμεταλλεύεται τις διακυμάνσεις φθορισμού, οι οποίες προκαλούνται από μικρό αριθμό σημασμένων μορίων που διαχέονται σε έναν εστιακό όγκο, με σκοπό την ανάλυση της συγκέντρωσης και κινητικότητάς τους (Εικόνα 23, πάνω μέρος). Η φασματοσκοπία FCS δύο χρωμάτων (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy, FCCS) παρακολουθεί και καταγράφει μοριακές αλληλεπιδράσεις και ενζυματικές αντιδράσεις καθώς και δυναμική συνεντόπιση, για παράδειγμα, ενός φορτίου (cargo) σε κυστίδια (small vesicles) (Εικόνα 23, κάτω μέρος).



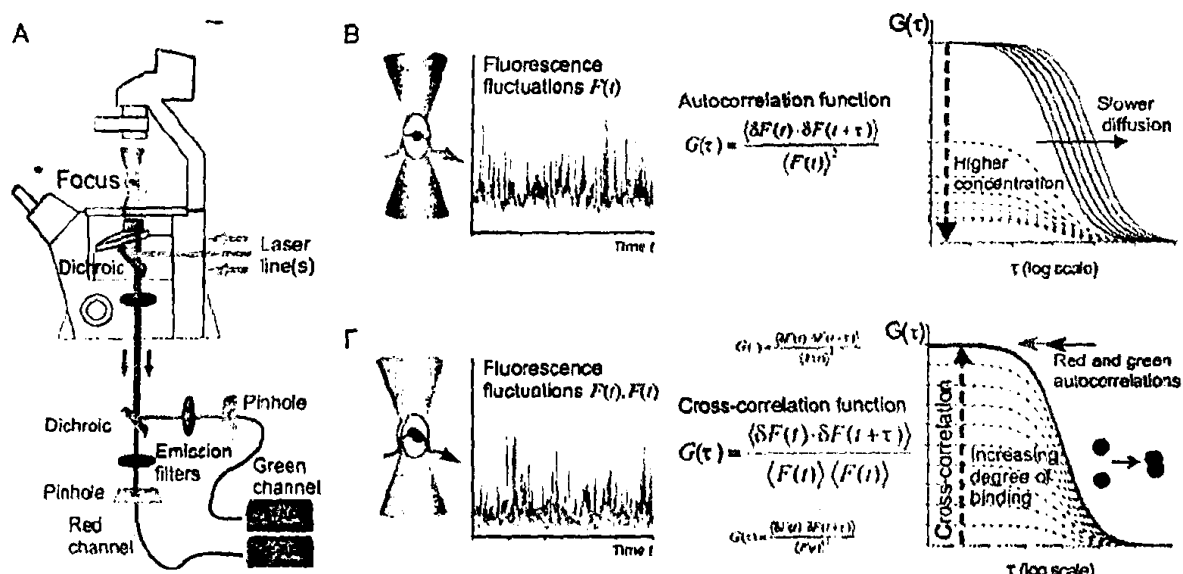


**Εικόνα 23:** Παράμετροι που καθορίζονται από τις τεχνικές FCS και FCCS. (A) Η τεχνική FCS (πάνω μέρος) μπορεί να καθορίσει τη συγκέντρωση και κινητικότητα σωματιδίων. Η κατευθυνόμενη κίνηση μπορεί να διαχωριστεί από την Brownian κίνηση από το σχήμα της καμπύλης αυτο-συσχετισμού. Στην τεχνική FCCS (κάτω μέρος) το πλάτος του σχετικού συσχετισμού σε συνδυασμό με το πλάτος του αυτοσυσχετισμού παρέχει πληροφορίες για πιθανή πρόσδεση, ενζυματική κινητική ή δυναμική συνεντόπιση σε κυστίδια. (B) Παραδείγματα πειραμάτων αυτοσυσχετισμού (πάνω) και σχετικού συσχετισμού (κάτω). Στα πειράματα αυτοσυσχετισμού, ο χρόνος διάχυσης ( $\tau_{diff}$ ) μπορεί να καθοριστεί από το μισό του μέγιστου  $G(t)$ . Το προσδεμένο μόριο στη μεμβράνη διαχέεται σημαντικά πιο αργά ( $\tau_{diff}=1,5ms$ ) από το ελεύθερο πρόσδεμα ( $\tau_{diff}=0,11ms$ ). Στα πειράματα σχετικού συσχετισμού, ένα μεγάλο πλάτος σχετικού συσχετισμού σε σχέση με το πλάτος αυτοσυσχετισμού υποδηλώνει σημαντική αλληλεπίδραση (κάτω, αριστερό μέρος). Σχεδόν μηδενικό πλάτος σχετικού συσχετισμού (κάτω, δεξιό μέρος) υποδηλώνει απουσία αλληλεπίδρασης [272].

### 2.15.1. Η αρχή των μετρήσεων FCS και FCCS

Οι τεχνικές μικροσκοπίας με τη χρήση ορατού φωτός είναι εφαρμόσιμες σε ζωντανά κύτταρα, αλλά περιορίζονται σημαντικά εξαιτίας της οπτικής ανάλυσης. Επομένως, διαδικασίες μεταξύ μορίων, μοριακών συμπλόκων και οργανιδίων, οι οποίες συμβαίνουν στην κλίμακα των nm μέχρι δέκατα του  $\mu m$ , δεν μπορούν να μελετηθούν άμεσα. Αυτές οι διαδικασίες είναι δυνατό να αναλυθούν μόνο με έμμεσες προσεγγίσεις, όπως οι τεχνικές FCS και FCCS. Για την εφαρμογή και των δύο αυτών τεχνικών είναι απαραίτητο ένα ειδικό συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 24, A). Καθώς οι φθορίζουσες πρωτεΐνες διαχέονται στο σημείο εστίασης, μία διακύμανση στο φθορισμό ανιχνεύεται και αυτο-συσχετίζεται άμεσα (Εικόνα 24, B). Από τις καμπύλες FCS λαμβάνονται πληροφορίες, όπως η συγκέντρωση και η σταθερά διάχυσης (diffusion coefficient) καθώς και άλλες παράμετροι σχετικές με τη μοριακή κίνηση, όπως η ταχύτητα, όταν προκειται για κατευθυνόμενη κίνηση. Στην περίπτωση της τεχνικής FCCS, δύο φθορισμογόνα με διακριτά φάσματα, π.χ. GFP και mCherry, χρησιμοποιούνται για τη σήμανση δύο μόριων των οποίων η πιθανή αλληλεπίδραση θα μελετηθεί (Εικόνα 24, Γ). Στην περίπτωση που τα δύο φθορισμογόνα

αλληλεπιδρούν, διαχέονται στον εστιακό όγκο με συγχρονισμένο τρόπο, με αποτέλεσμα να προκαλούν ταυτόχρονες διακυμάνσεις του φθορίζοντος σήματος και στα δύο κανάλια ανίχνευσης και, επομένως, ένα θετικό σχετικό συσχετισμό (positive cross correlation). Ο λόγος του πλάτους της σχετικής συσχέτισης προς το πλάτος της αυτοσυσχέτισης για το ένα χρώμα (relative cross correlation), αποτελεί την άμεση μέτρηση του βαθμού της μοριακής πρόσδεσης ή της δυναμικής συνεντόπισης κατά τη μετακίνηση.



**Εικόνα 24: Η αρχή των μετρήσεων FCS και FCCS.** (Α) Οι τεχνικές FCS και FCCS χρησιμοποιούν μία ειδική εγκατάσταση συνεστιακής μικροσκοπίας. Στην περίπτωση FCCS, δύο ξεχωριστές γραμμές laser χρησιμοποιούνται συνήθως για τη διέγερση δύο φθορισμογόνων με διακριτά φάσματα. Ο φθορισμός εκπομπής των δύο φθορισμογόνων διαχωρίζεται από διχρωϊκό φακό και χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί ανιχνευτές. Ο τελικός όγκος ανίχνευσης είναι μικρότερος από 1fl. (Β) FCS ενός χρώματος. Σημασμένα σωματίδια διαχέονται στον όγκο εστίασης προκαλώντας διακύμανση στο σήμα φθορισμού. Αυτό το ίχνος διακύμανσης φθορισμού υπόκειται σε αλγόριθμο αυτοσυσχετισμού παράγοντας την καμπύλη συσχετισμού,  $G(\tau)$ . Ο χαρακτηριστικός χρόνος ελάττωσης της  $G(\tau)$  δείχνει την κινητικότητα των σωματιδίων. Το αντίστροφο του πλάτους,  $G(0)$ , είναι ανάλογο της συγκέντρωσης των σωματιδίων. (Γ) Στην τεχνική FCCS (FCS δύο χρωμάτων), χρησιμοποιούνται δύο φθορισμογόνα με διακριτά φάσματα (π.χ. πράσινο και κόκκινο), τα οποία προκαλούν διακυμάνσεις στο σήμα φθορισμού στα αντίστοιχα κανάλια. Κάθε ίχνος διακύμανσης φθορισμού αυτοσυσχετίζεται (πράσινη και κόκκινη συνεχής γραμμή). Επιπλέον, υπολογίζεται η συνάρτηση σχετικού συσχετισμού ανάμεσα στο πράσινο και στο κόκκινο (μαύρες διακεκομμένες γραμμές). Το πλάτος της καμπύλης σχετικού συσχετισμού είναι ένα μέτρο του βαθμού πρόσδεσης ή της συνεντόπισης [272].

### 2.15.2. Σύγκριση των τεχνικών FRET και FCCS

Όπως είδαμε και προηγουμένως, η τεχνική που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την άμεση μελέτη αλληλεπιδράσεων σε ζωντανά κύτταρα είναι η τεχνική FRET. Συγκριτικά με την τεχνική FRET, η FCCS είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη για την ποσοτικοποίηση ισχυρών



αλληλεπιδράσεων μέσω των σταθερών τους, ιδιαίτερα υποσχόμενη για στοιχειομετρικές συμπλόκων [273]. Επιπλέον, υπάρχουν διαφορές μεταξύ FCCS και FRET σχετικά με τη χωρική και χρονική ανάλυση. Το γεγονός ότι η τεχνική FRET περιλαμβάνει ανάλυση εικόνων που ελήφθησαν διαδοχικά, την καθιστά προβληματική στις μετακινήσεις που συμβαίνουν μεταξύ των λήψεων. Αντίθετα, η τεχνική FCCS καταγράφει τις συγκεντρώσεις σημασμένων σωματιδίων με ένα και δύο χρώματα, παράλληλα. Ωστόσο, οι συνήθειες μετρήσεις FCCS ενός σημείου δεν παρέχουν ταυτόχρονα την κυτταρική εντόπιση των φθορισμογόνων (δηλ. μία εικόνα), όπως επίσης οι μετρήσεις FCCS διαταράσσονται από μετακινούμενες σημασμένες δομές (π.χ. πτυχωτές μεμβράνες), οι οποίες προκαλούν επιπρόσθετες διακυμάνσεις φθορισμού σε χρονική κλίμακα παρόμοια με εκείνη προς μελέτη διάχυση. Τέλος, μία θεμελιώδης διαφορά ανάμεσα στις δύο τεχνικές, FCCS και FRET, είναι η κλίμακα της απόστασης μεταξύ των δύο προς εξέταση σωματιδίων. Η τεχνική FRET εφαρμόζεται μόνο όταν τα αλληλεπιδρώντα μόρια βρίσκονται σε πολύ μικρή απόσταση μεταξύ τους (της τάξεων μερικών νανομέτρων) και τα φθορισμογόνα έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό. Έτσι είναι απαραίτητη η γνώση των πρωτεϊνικών δομών και η κατασκευή κατάλληλων συνδετών μεταξύ πρωτεΐνης-προς-μελέτη και φθορισμογόνου, ενώ η τεχνική FCCS μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς, όταν τα φθορισμογόνα βρίσκονται σε σχετικά μεγάλη απόσταση μεταξύ τους και σε οποιονδήποτε προσανατολισμό.

### 2.15.3. Η λήψη των μετρήσεων FCCS

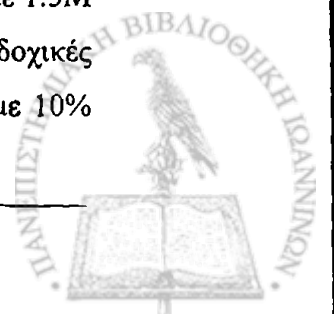
Στην παρούσα μελέτη η τεχνική FCCS πραγματοποιήθηκε με το σύστημα Zeiss Meta-Confocor 3 (Carl Zeiss GmbH, Germany). Η φθορίζουσα πρωτεΐνη eGFP διεγέρθηκε με αργόν laser μήκους κύματος 488nm ενώ η πρωτεΐνη mCherry με δίοδο laser μήκους κύματος 561nm. Η ισχύς του laser δεν υπερέβαινε  $2\text{kW}/\text{cm}^2$  (488nm) και  $3.2\text{kW}/\text{cm}^2$  (561nm) με σκοπό να περιοριστούν η φωτοδιάχυση (photobleaching) και οι πιθανές βλάβες στο κύτταρο. Η δέσμη διέγερσης εστιάστηκε στο δείγμα με αντικειμενικό φακό νερού (water immersion) C-Apochromat 40x (N.A. 1.2). Η δέσμη εκπομπής προσαρμόστηκε από σχισμή 1 Airy unit. Ένα διχρωϊκό φίλτρο, LP560, χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του φωτός σε δύο διαφορετικά κανάλια ανίχνευσης (BP500-550 & HQ638DF75 BP640DF75). Τα αρχικά δεδομένα έντασης που συγκεντρώθηκαν στα δύο κανάλια ανίχνευσης, για 60s συνήθως, χρησιμοποιήθηκαν για περαιτέρω ανάλυση με το λογισμικό FCS Dataprocessor 1.5 Software (SSTC, Belarussia). Δεδομένα που προέκυψαν μετά από φωτοδιάχυση ή ενδοκυττάρια μετακίνηση κάποιου σημαντικά μεγάλου συμπλέγματος μέσα στον όγκο εστίασης απορρίφθηκαν από τη συνολική ανάλυση. Οι καμπύλες προσαρμόστηκαν (fit) σύμφωνα με

ένα μοντέλο διάχυσης που περιελάμβανε τους φωτοφυσικούς όρους για τις φθορίζουσες πρωτεΐνες καθώς και μία παράμετρο offset. Η τελική συγκέντρωση που προέκυψε για κάθε πρωτεΐνη διορθώθηκε ως προς το crosstalk, τη διαφορά στο χρόνο ωρίμανσης του eGFP συγκριτικά με το mCherry αλλά και ως προς την ελλιπή επικάλυψη των δύο όγκων εστίασης.

Σε κάθε πείραμα FCCS χρησιμοποιήθηκε αρχικά ως θετικός μάρτυρας η πρωτεΐνη eGFP-p38-mCherry. Η μέση τιμή που έδειχνε το ποσό των πρωτεϊνών που βρίσκονταν στο σύμπλοκο υπολογίστηκε περίπου στο 67% σε 15 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Ο λόγος της αποτυχίας της ανίχνευσης για το σύνολο των φθοριοχρωμάτων που βρίσκεται στο σύμπλοκο, οφείλεται στη μερική επικάλυψη των δύο συνεστιακών όγκων στα αντίστοιχα μήκη κύματος. Οι μετρήσεις ελήφθησαν σε κύτταρα μετά από διαμόλυνση με διάφορες κατασκευές DNA και καλλιέργεια σε πλήρες μέσο για ενδοθηλιακά κύτταρα επί 24 ώρες. Στις περιπτώσεις που μελετήθηκε η επίδραση του VEGF, είχε προηγηθεί στέρηση ορού και καλλιέργεια σε M199 για 2 ώρες.

#### 2.16. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού κυττάρων HUVE με ενσωμάτωση βρωμοδεόξυ ουριδίνης

Ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο των 24 φρεατίων με καλυπτρίδες των 11 mm και σε συγκέντρωση 30.000 κύτταρα/φρεάτιο. Την επόμενη ημέρα υπέστησαν μόλυνση με τους αδενοϊούς αγρίου τύπου DUSP1wt ή DUSP5wt καθώς και με τις καταλυτικά ανενεργές μορφές AdDUSP1/CS ή AdDUSP5/CS. Τα κύτταρα, 24 ή 36 ώρες αργότερα, υπέστησαν στέρηση ορού για 18h, πριν επαχθούν με VEGF (50ng/ml) για 24 ώρες. Τις τελευταίες 6 ώρες προστέθηκε βρωμοδεόξυ ουριδίνη (BrdU) σε τελική συγκέντρωση 100μM. Στο τέλος της 6ωρης επώασης τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3% και η εξουδετέρωση της περίσσειας παραφορμαλδεΐδης πραγματοποιήθηκε με 50mM χλωριούχο αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Στην συνέχεια, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Triton X-100 0.1% για 4 λεπτά προκειμένου η κυτταρική μεμβράνη να καταστεί διαπερατή. Η δέσμευση των μη ειδικών σημείων έγινε με ορό 10% (10% FCS) για 30 λεπτά και ακολούθησε μια ώρα επώαση με το αντίσωμα αντι-Myc σε αραιώση 1:250. Έπειτα από πλύση με PBS έγινε επώαση με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική ροδαμίνη (TRITC) σε αραιώση 1:200 και για μια ώρα. Ακολούθησε μονιμοποίηση των αντισωμάτων με διάλυμα παραφορμαλδεΐδης 3% και επεξεργασία με 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Στη συνέχεια, τα κύτταρα επώαστηκαν για 10 λεπτά με 1.5M υδροχλωρικό οξύ (HCl) με σκοπό την αποδιάταξη του DNA, ακολούθησαν τρεις διαδοχικές πλύσεις των 10 λεπτών με PBS και κάλυψη των μη ειδικών θέσεων για 30 λεπτά με 10%



FCS. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν επωάσεις πρώτα με αντίσωμα έναντι στην βρωμοδεόξυ ουριδίνη σε αραιώση 1:100 και έπειτα με αντίσωμα συζευγμένο με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη (FITC) σε αραιώση 1:200. Όλα τα αντισώματα αραιώθηκαν σε 5% FCS. Τα δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με ισοθειοκυανική φλουερεσκεΐνη ή ροδαμίνη (FITC ή TRITC) προήλθαν από την εταιρία Dianova. Οι καλυπτρίδες τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες σε διάλυμα Mowiol (Sigma) που περιείχε 100 mg/ml diazabicyclo(2.2.2)octane (DAPCO) από την εταιρία Sigma και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) Leica TCS-SP, εξοπλισμένο με λέιζερ Argon/Krypton και λογισμικό Leica TCS.

### **2.17. Δοκιμασία μετανάστευσης κυττάρων HUVE**

Κύτταρα HUVE τοποθετήθηκαν σε τρυβλία 35mm έτσι ώστε να καλύπτουν όλη την επιφάνεια του ταπητίου. Έπειτα από 24 ώρες, η μονοστιβάδα των κυττάρων τραυματίστηκε με τη χρήση ενός πλαστικού και αποστειρωμένου ξύστη, πλύθηκε δύο φορές με PBS και καλλιεργήθηκε σε μέσο εμπλουτισμένο με 5% FCS απουσία ή παρουσία VEGF (10ng/ml) σε θάλαμο 5%CO<sub>2</sub> και 37°C. Εικόνες της τραυματισμένης περιοχής ελήφθησαν κάθε 10 λεπτά και για 16h με τη χρήση του μικροσκοπίου Leica DM IBRE, εξοπλισμένο με την κάμερα HRD060-NIK CCD (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) και το λογισμικό Metamorph. Τα κύτταρα που μετακινήθηκαν προς την τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά cm τραυματισμένης περιοχής. Η πειραματική δοκιμασία επαναλήφθηκε τρεις φορές.

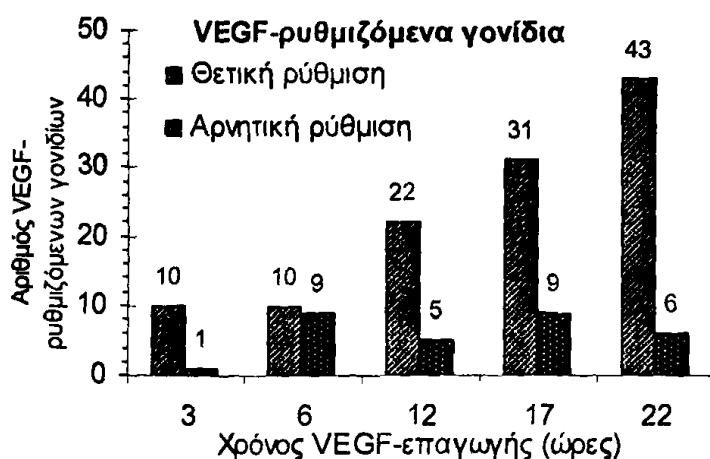




### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1. Ο VEGF επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων *DUSP1* και *DUSP5* στα ενδοθηλιακά κύτταρα

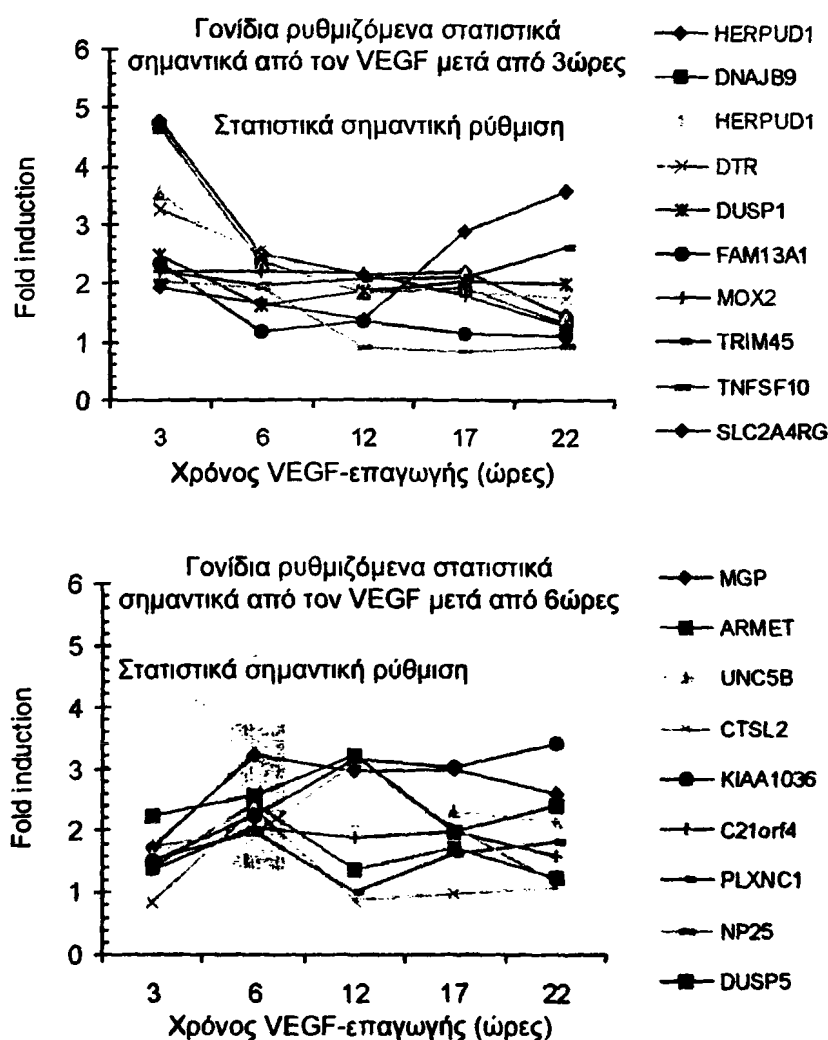
Οι μικροσυστοιχίες DNA έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια, με σκοπό τη μελέτη της έκφρασης μεγάλου αριθμού γονιδίων παρουσία διαφόρων επαγωγέων. Η παρούσα εργασία ξεκίνησε χρησιμοποιώντας τις μικροσυστοιχίες DNA για την αναγνώριση γονιδίων, των οποίων η έκφραση ρυθμίζεται από την παρουσία του VEGF-A. Με σκοπό να αποκτήσουμε πλήρη εικόνα της δράσης του VEGF-A στα ενδοθηλιακά κύτταρα, εξετάστηκε η έκφραση 22,000 γονιδίων παρουσία VEGF-A για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (3, 6, 12, 17, 22 ώρες). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν στατιστικά και θεωρήσαμε ότι ο VEGF-A ρυθμίζει θετικά ένα γονίδιο, όταν η έκφραση του ήταν αυξημένη τουλάχιστον 1.8-φορές σε σχέση με το δείγμα-μάρτυρα. Αντίθετα, η ρύθμιση θεωρούνταν αρνητική, όταν η έκφραση ενός γονιδίου μειωνόταν τουλάχιστον στο μισό, συγκριτικά με το δείγμα-μάρτυρα. Συνολικά, ο VEGF-A βρέθηκε να ρυθμίζει την έκφραση 146 γονιδίων από τα 22,000 ανθρώπινα γονίδια που ελέγχθηκαν με τη διαδικασία των μικροσυστοιχιών DNA. Ειδικότερα, 116 γονίδια ρυθμίστηκαν θετικά, ενώ 30 γονίδια ρυθμίστηκαν αρνητικά από τον VEGF-A (Εικόνα 25).



**Εικόνα 25:** Γονίδια που ρυθμίζονται από τον VEGF. Κύτταρα HUVE επωάστηκαν με VEGF-A (30 ng/ml), μετά από 6ωρη μείωση ορού και απουσία ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (3, 6, 12, 17 και 22 ώρες). Συνολικό RNA απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς τη γονιδιακή έκφραση με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA.



Όπως φαίνεται από το παραπάνω σχήμα, ο VEGF-A βρέθηκε να ρυθμίζει σημαντικό αριθμό γονιδίων σε όλα τα χρονικά διαστήματα που εξετάστηκαν. Αποφασίσαμε, ωστόσο, να εξετάσουμε τα γονίδια που ρυθμίζονται άμεσα από τον αγγειογενετικό παράγοντα και γ'αυτό το λόγο επικεντρωθήκαμε στα γονίδια των οποίων ο VEGF-A επηρέασε θετικά και στατιστικά σημαντικά την έκφραση τους μετά από 3 και 6 ώρες επαγωγής (Εικόνα 26).

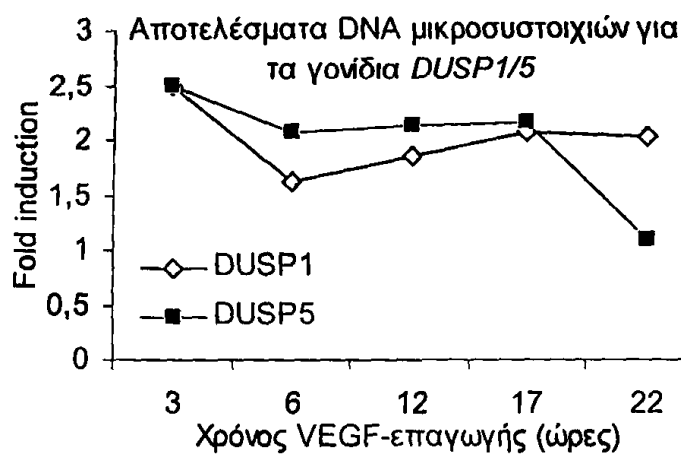


**Εικόνα 26:** Τα γονίδια που ρυθμίζονται θετικά μετά από 3 και 6 ώρες επαγωγής από τον VEGF-A. Κύτταρα HUVE επώαστηκαν με VEGF-A (30 ng/ml), μετά από 6ωρη μείωση ορού και απουσία ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (3, 6, 12, 17 και 22 ώρες). Συνολικό RNA απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς τη γονιδιακή έκφραση με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA. Παρουσιάζονται τα γονίδια που ρυθμίζονται στατιστικά σημαντικά μετά από 3 (πάνω γράφημα) ή 6 (κάτω γράφημα) ώρες παρουσίας VEGF-A.

Ανάμεσα στα γονίδια που ρυθμίστηκαν θετικά από τον VEGF-A ήταν γονίδια που ενεργοποιούνται όταν το ενδοπλασματικό δίκτυο βρίσκεται σε κατάσταση στρες (HERPUD1, DNAJ), επάγουν τον πολ/σμό λειών μυικών κυττάρων (DTR), ρυθμίζουν τη

φυσιολογία του κερατοειδούς χιτώνα (CTSL2) καθώς και γονίδια με άγνωστο ρόλο (C21orf4, NP25).

Μεταξύ των γονιδίων που παρουσίασαν στατιστικά σημαντική ρύθμιση μετά από 3 ή 6 ώρες ενεργοποίησης από τον VEGF-A ήταν δύο φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης, οι DUSP1/MKP-1/VH1 και DUSP5/VH3/B23/hVH3. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα mRNA της DUSP1 αυξήθηκαν κατά 2.48-φορές από τον VEGF μετά από 3ωρη επαγωγή, ενώ τα επίπεδα mRNA της DUSP5 παρέμειναν αυξημένα μετά από 6, 12 και 17 ώρες ενεργοποίησης από τον VEGF κατά 2-φορές συγκριτικά με το δείγμα-μάρτυρα (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Τα αποτελέσματα των πειραμάτων με μικροσυστοιχίες DNA για τα γονίδια DUSP1 και DUSP5. Κύτταρα HUVE επώαστηκαν με VEGF-A (30 ng/ml), μετά από 6ωρη μείωση ορού και απουσία ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (3, 6, 12, 17 και 22 ώρες). Συνολικό RNA απομονώθηκε και αναλύθηκε ως προς τη γονιδιακή έκφραση με την τεχνολογία των μικροσυστοιχιών DNA. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5.

Θα πρέπει να τονίσουμε ότι ανάμεσα στα 22,000 γονίδια που ελέγχθηκαν ήταν και άλλες φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (DUSP 2, 4, 7, 8, 9, 10 and 16), οι οποίες όμως δε ρυθμίστηκαν στατιστικά σημαντικά σε κανένα χρονικό διάστημα επαγωγής από τον VEGF (Πίνακας 6).

Πίνακας 6: Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης 19 φωσφατάσων διπλής εξειδίκευσης από τον VEGF-A με μικροσυστοιχίες DNA.

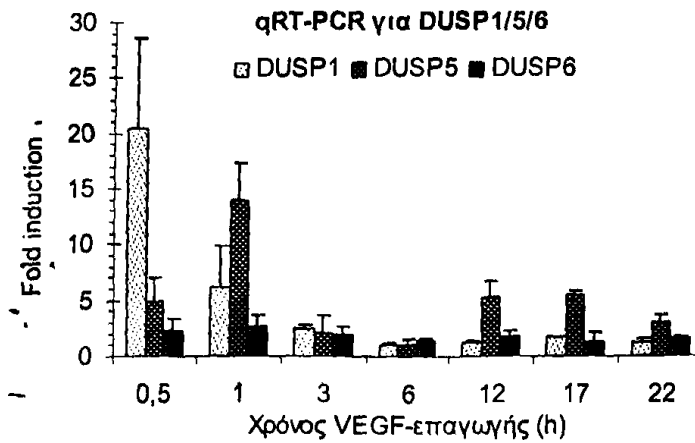
Όνομα φωσφατάσης	Διάρκεια επαγωγής με VEGF				
	3h	6h	12h	17h	22h
DUSP3	0.94	1.10	1.02	1.04	1.11



<b>DUSP3</b>	1.25	1.16	1.10	1.08	1.11
<b>DUSP4</b>	1.53	1.86	1.72	1.93	1.92
<b>DUSP7</b>	1.28	1.40	1.81	1.83	1.42
<b>DUSP8</b>	1.55	1.13	2.42	1.71	0.90
<b>DUSP8</b>	0.80	1.08	0.98	0.96	0.97
<b>DUSP10</b>	3.69	3.05	4.28	1.90	13.25
<b>DUSP10</b>	1.02	2.62	1.41	1.26	1.60
<b>DUSP11</b>	1.13	1.13	1.24	1.26	1.35
<b>DUSP12</b>	1.00	1.01	1.07	1.28	1.30
<b>DUSP13</b>	1.35	0.82	0.93	1.62	1.39
<b>DUSP14</b>	1.22	1.22	0.98	1.03	1.07
<b>DUSP16</b>	0.90	0.98	0.96	1.18	1.02
<b>DUSP16</b>	1.41	1.25	1.19	2.09	1.30
<b>DUSP18</b>	1.26	0.99	2.06	1.08	2.89
<b>DUSP19</b>	0.78	0.60	1.66	1.02	1.18
<b>DUSP21</b>	0.30	0.66	0.98	0.30	0.99
<b>DUSP22</b>	1.13	0.97	1.06	1.19	1.25
<b>DUSP22</b>	1.25	1.11	1.40	1.05	1.18

Είναι γνωστό ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν ορισμένες φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης είναι γονίδια πρώιμης απόκρισης (*early response genes*) [220]. Για το λόγο αυτό, απομονώσαμε για δεύτερη φορά RNA από ενδοθηλιακά κύτταρα μετά από επαγωγή με VEGF-A για τα σύντομα χρονικά διαστήματα των 30 λεπτών και 1 ώρας και ελέγξαμε την έκφραση των *DUSP1* και *DUSP5* στο σύνολο των χρονικών διαστημάτων, δηλ. από 30 λεπτά μέχρι 22 ώρες, με τη μέθοδο της ποσοτικής αλυσιδιωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφάσης (qRT-PCR). Πράγματι, τα επίπεδα mRNA των *DUSP1* και *DUSP5* αυξήθηκαν σχεδόν 20 και 10-φορές μετά από την παρουσία του VEGF-A για 30 λεπτά και 1 ώρα, αντίστοιχα (Εικόνα 28).



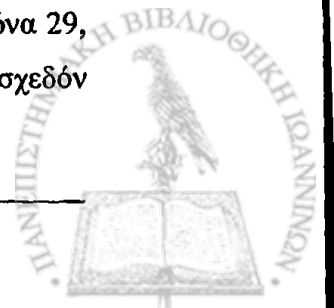


- **Εικόνα 28:** Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων *DUSP1/5/6* από τον VEGF-A. Κύτταρα HUVE επώαστηκαν με VEGF-A (30ng/ml), μετά από 6ωρη μείωση ορού και απουσία ECGS, για διάφορα χρονικά διαστήματα (0,5, 1, 3, 6, 12, 17 και 22 ώρες). Συνολικό RNA απομονώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε. Η έκφραση των γονιδίων *DUSP1/5/6* ελέγχθηκε με qRT-PCR. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση.

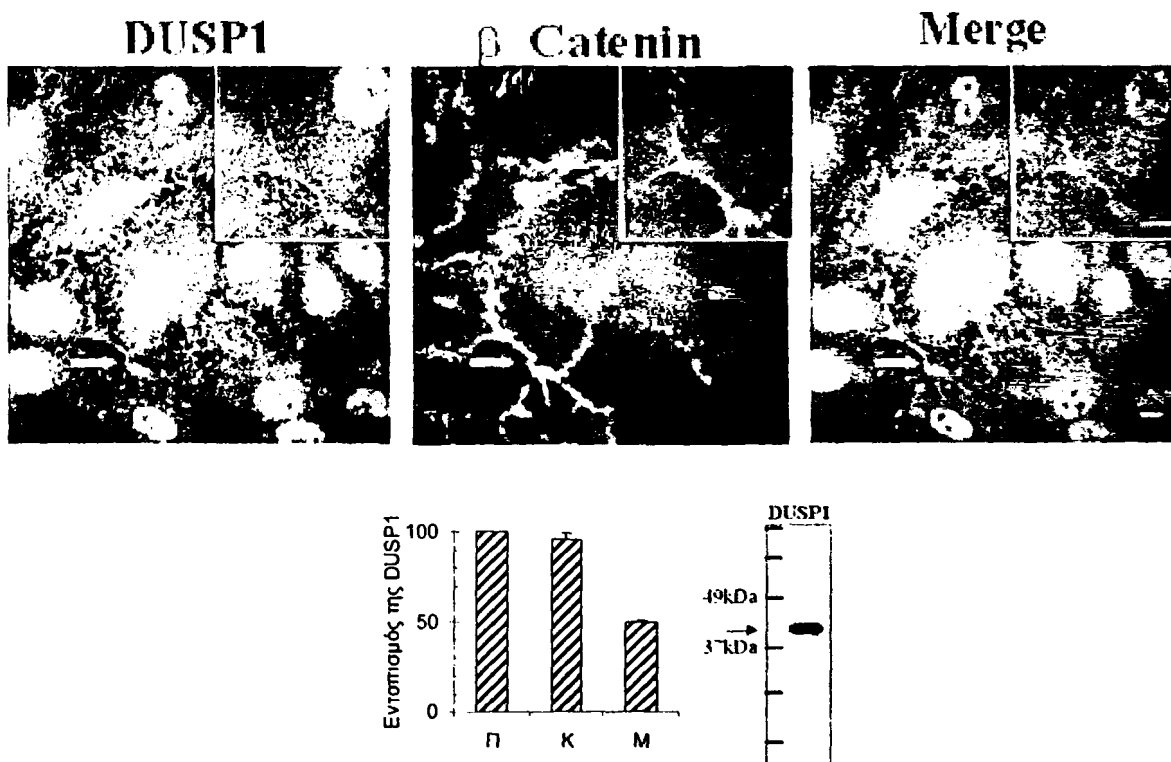
Μία από τις φωσφατάσες που ανήκει στην ίδια οικογένεια είναι η *DUSP6/MKP3*, για την οποία έχουν γίνει εκτεταμένες μελέτες και έχει δείχθει ότι είναι ειδική για την αποφωσφορυλίωση και απενεργοποίηση των ERK1/2. Δυστυχώς το γονίδιο της *DUSP6/MKP3* δεν περιλήφθηκε στα εξεταζόμενα γονίδια με την τεχνική των μικροσυστοιχιών DNA και, γι'αυτό το λόγο, εξετάστηκε η έκφρασή του με τη μέθοδο qRT-PCR. Όπως ήταν αναμενόμενο, καθώς το γονίδιο *DUSP6/MKP3* δεν είναι πρόιμα αποκρινόμενο, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική ρύθμιση από τον VEGF-A σε κανένα χρονικό διάστημα από 0,5 μέχρι και 22 ώρες (Εικόνα 28). Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι ο VEGF επάγει ειδικά τη μεταγραφή των *DUSP1* and *DUSP5* γονιδίων, κυρίως μετά από 0,5 και 1 ώρα, αντίστοιχα.

### **3.2. Η πρωτεΐνη DUSP1 εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων**

Η *DUSP1* είναι η φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης που έχει μελετηθεί εκτεταμένα τα τελευταία χρόνια. Είναι γνωστό ότι κωδικοποιείται από άμεσα αποκρινόμενο γονίδιο, επάγεται από διάφορα ερεθίσματα και εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων [220]. Ελέγξαμε με έμμεσο ανοσοφθορισμό, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ενδογενούς *DUSP1*, την κατανομή της φωσφατάσης σε κύτταρα HUVE. Όπως φαίνεται στην εικόνα 29, το μεγαλύτερο μέρος της *DUSP1* εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Ωστόσο, σχεδόν

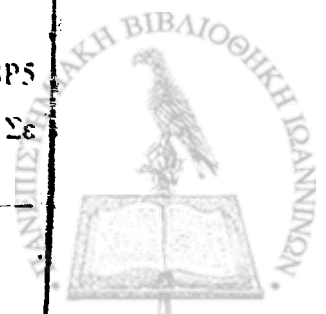


το σύνολο των κυττάρων (95%) παρατηρήθηκε σημαντικό ποσό της φωσφατάσης και στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον, στα μισά περίπου κύτταρα εντοπίστηκε DUSP1 και στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς η συνεστιακή μικροσκοπία έδειξε συνεντόπιση της DUSP1 με τη μεμβρανικά συνδεδεμένη β-κατενίνη (Εικόνα 29). Με σκοπό να διασφαλίσουμε την ειδικότητα του αντισώματος, κυτταρικό εκχύλισμα ενδοθηλιακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για ανοσοαποτύπωση κατά Western, όπου και αναγνώρισε μια μοναδική ζώνη που αντιστοιχεί στο αναμενόμενο μοριακό βάρος της DUSP1, δηλ, 40kDa (Εικόνα 29).

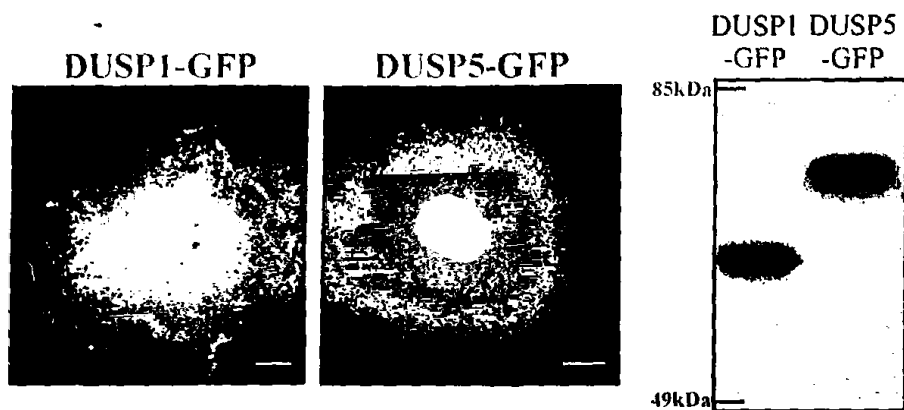


**Εικόνα 29: Κυτταρική εντόπιση της DUSP1.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες θρεπτικό υλικό. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της DUSP1 (πράσινο) και της β-κατενίνης (κόκκινο). Με τα βέλη υποδεικνύεται η μεμβρανική εντόπιση της DUSP1 (πάνω μέρος). Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό της DUSP1 που εντοπίζεται στον πυρήνα (Π), στο κυτταρόπλασμα (Κ) και στην κυτταρική μεμβράνη (Μ) (κάτω, δεξιό μέρος). Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε από τουλάχιστον 100 κύτταρα σε καθένα από τα τρία ανεξάρτητα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν. Εκχύλισμα από κύτταρα HUVE χρησιμοποιήθηκε για ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας το ίδιο ειδικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης που χρησιμοποιήθηκε και στον έμμεσο ανοσοφθορισμό (κάτω μέρος, δεξιά). Οι εικόνες είναι αντιπροσωπευτικές του πειράματος που πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές. Στο γράφημα παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10 μm.

Στη συνέχεια, ελέγξαμε την εντόπιση των δύο φωσφατάσων DUSP1 και DUSP5 συντηγμένων με την πρωτεΐνη GFP μετά από διαμόλυνση των κυττάρων HUVE. Σε



συμφωνία με την ενδογενή πρωτεΐνη, η DUSP1-GFP παρατηρήθηκε κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων, αλλά σημαντικά ποσά εντοπίστηκαν στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 30). Αντίθετα, η DUSP5 παρατηρήθηκε αποκλειστικά στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που έρχεται σε πλήρη συμφωνία με τη βιβλιογραφία (Εικόνα 30) [255].

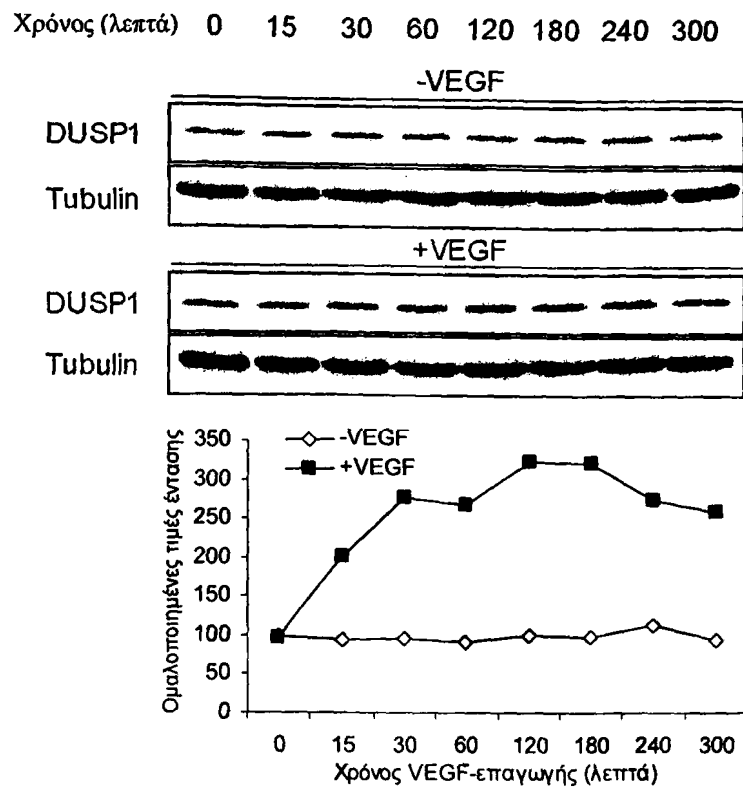


**Εικόνα 30: Κυτταρική εντόπιση των DUSP1-GFP και DUSP5-GFP.** Κύτταρα HUVE διαμολύνθηκαν με τις DNA κατασκευές DUSP1-GFP και DUSP5-GFP σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και παρατηρήθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο (Αριστερό μέρος). Η έκφραση των DNA κατασκευών ελέγχθηκε μετά από διαμόλυση κυττάρων HUVE, λήψη κυτταρικού εκχυλίσματος και ανοσοαποτύπωση κατά Western (Δεξιό μέρος). Στις εικόνες μικροκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.3. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης DUSP1, μετά από επαγωγή με VEGF-A, προκύπτουν από την ισορροπία μεταξύ πρωτεϊνικής σύνθεσης και αποικοδόμησης

Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του VEGF-A στα πρωτεϊνικά επίπεδα της DUSP1 σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Σε συμφωνία με την επαγωγή της μεταγραφής των γονιδίων *DUSP1* και *DUSP5*, ο VEGF-A προκάλεσε την αύξηση της πρωτεΐνης DUSP1 τρεις φορές μετά από 30 λεπτά, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες (0 λεπτά), φτάνοντας στο μέγιστο επίπεδο μετά από 2 ώρες και παρουσιάζοντας μία ασθενή ύφεση στη συνέχεια (Εικόνα 31). Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν τα αποτελέσματα, έγινε αρχικά πυκνομέτρηση κάθε ζώνης που προέκυψε από το αντίσωμα έναντι της DUSP1 χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Quantity One (BioRad). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε νορμαλοποίησή της με την τιμή της πυκνομέτρησης της ζώνης που προέκυψε χρησιμοποιώντας το αντίσωμα έναντι της τουμπουλίνης, η οποία δεν επηρεάζεται από τον VEGF-A και παραμένει σταθερή σε διάστημα 4 ωρών. Με στόχο να αποφύγουμε παρεκκλίσεις λόγω διαφορών στην έκθεση διαφορετικών μεμβρανών, χρησιμοποιήθηκε η πρώτη ζώνη κάθε μεμβράνης ως δείγμα-μάρτυρας, καθώς ήταν το ίδιο δείγμα και στις δύο ανοσοαποτυπώσεις. Οι τελικές τιμές παρουσιάζονται στο γράφημα (Εικόνα 31, κάτω μέρος).





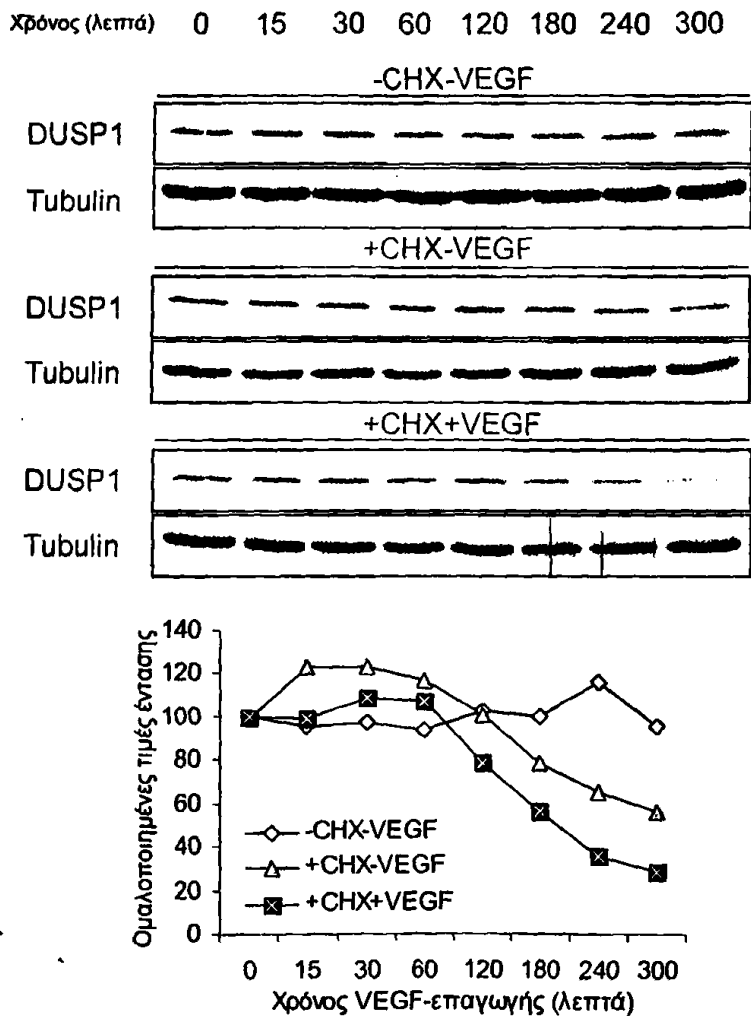
**Εικόνα 31: Επίδραση του VEGF-A στα επίπεδα της DUSP1 πρωτεΐνης.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε μέσο εμπλουτισμένο με 5% FCS και ηπαρίνη για 6 ώρες. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν από VEGF-A (50 ng/ml) για χρονικά διαστήματα από 15 λεπτά μέχρι 4 ώρες. Κυτταρικά εκχυλίσματα λήφθηκαν με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η πρόσδεση της φώσφο-ERK στην DUSP1 έχει ως αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση και την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της φωσφατάσης [212]. Έτσι λοιπόν μελετήσαμε την επίδραση του VEGF-A (και σαν συνέπεια των ενεργοποιημένων από τον VEGF-A MAPK) στο πρωτεϊνικό επίπεδο της DUSP1 παρουσία του αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης, κυκλοεξιμιδίου (Cycloheximide, CHX). Όπως φαίνεται στην εικόνα 32, στα κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία CHX, ο χρόνος ημιζωής της DUSP1 υπολογίστηκε περίπου στις 4 ώρες. Αντίθετα, όταν τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με CHX παρουσία VEGF-A, παρατηρήθηκε μείωση του χρόνου ημιζωής της φωσφατάσης DUSP1 από 4.5 στις 3 ώρες (Εικόνα 32). Για την ομαλοποίηση των τιμών έντασης χρησιμοποιήθηκε η τουμπουλίνη, της οποίας η έκφραση δεν επηρεάζεται από τον VEGF και ο χρόνος ημιζωής της είναι μεγαλύτερος από 4 ώρες. Όπως και προηγουμένως, για την ομαλοποίηση των τιμών μεταξύ διαφορετικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε η ένταση



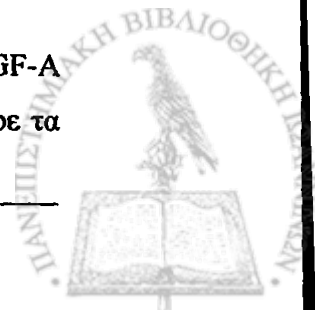
της πρώτης ζώνης ως δείγμα-μάρτυρας, καθώς είναι κοινό για κάθε σετ δειγμάτων. Οι τελικές τιμές παρουσιάζονται στο γράφημα (Εικόνα 32, κάτω μέρος).

Έτσι λοιπόν-μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DUSP1 μετά την προσθήκη του VEGF-A είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία ακολουθεί τη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου DUSP1, και της πρωτεολυτικής αποικοδόμησης που ακολουθεί την αλληλεπίδραση των MAPK με την DUSP1.



**Εικόνα 32: Προσδιορισμός του χρόνου ημιζωής της πρωτεΐνης DUSP1.** Κύτταρα HUVE καλλιιεργήθηκαν σε μέσο εμπλουτισμένο με 5% FCS και ηπαρίνη για 6 ώρες. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν από VEGF-A (50 ng/ml) απουσία ή παρουσία CHX (50 μg/ml) για χρονικά διαστήματα από 15 λεπτά μέχρι 4 ώρες. Κυτταρικό εκχύλισμα λήφθηκε με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της ενδογενούς DUSP1. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε τρεις ανεξάρτητες φορές.

Θελήσαμε να εξετάσουμε και τα επίπεδα της ενδογενούς DUSP5 παρουσία VEGF-A και, γι' αυτό το λόγο, έγινε προσπάθεια παραγωγής αντισώματος, γεγονός που δεν έφερε τα



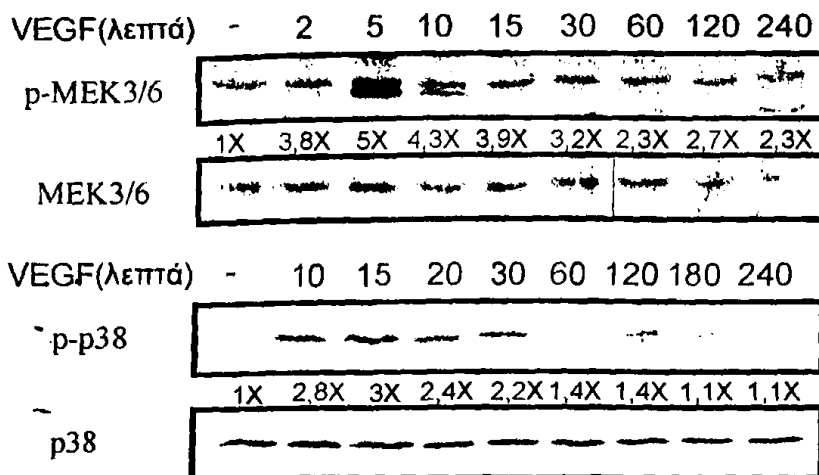
επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς το αντίσωμα δεν ήταν ειδικό έναντι της DUSP5. Επίσης, ελέγχθηκε και το μοναδικό εμπορικά διαθέσιμο αντίσωμα έναντι της DUSP5 με τα ίδια αρνητικά αποτελέσματα.

#### **3.4. Ο VEGF-A ρυθμίζει τη φωσφορυλίωση και την κυτταρική εντόπιση της p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα**

Η ενεργοποίηση της p38 MAPK από τον παράγοντα VEGF-A αποτελεί ένα από τα βασικά σηματοδοτικά μονοπάτια στα ενδοθηλιακά κύτταρα και έχει εμπλακεί στη μετανάστευση των κυττάρων κατά τη διαδικασία της αγγειακής εκβλάστησης. Μελετήσαμε την κινητική της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK και των ανοδικών διεγερτών της MEK3/6, από τον VEGF-A στα ενδοθηλιακά κύτταρα, χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων μορφών των κινασών. Η ισοφόρτωση των MEK3/6 και της p38 MAPK στις διάφορες χρονικές περιόδους επιβεβαιώθηκε με τη χρήση ειδικού αντισώματος έναντι των συνολικών MEK3/6 και p38 MAPK. Ο λόγος της ενεργοποίησης των κινασών από τον VEGF κάθε χρονική στιγμή προς το δείγμα-μάρτυρα (0 λεπτά) εμφανίζεται ενδιάμεσα των ανοσοοποτυπώσεων της φωσφορυλιωμένης και συνολικής μορφής των MEK3/6 και p38 MAPK (Εικόνα 33).

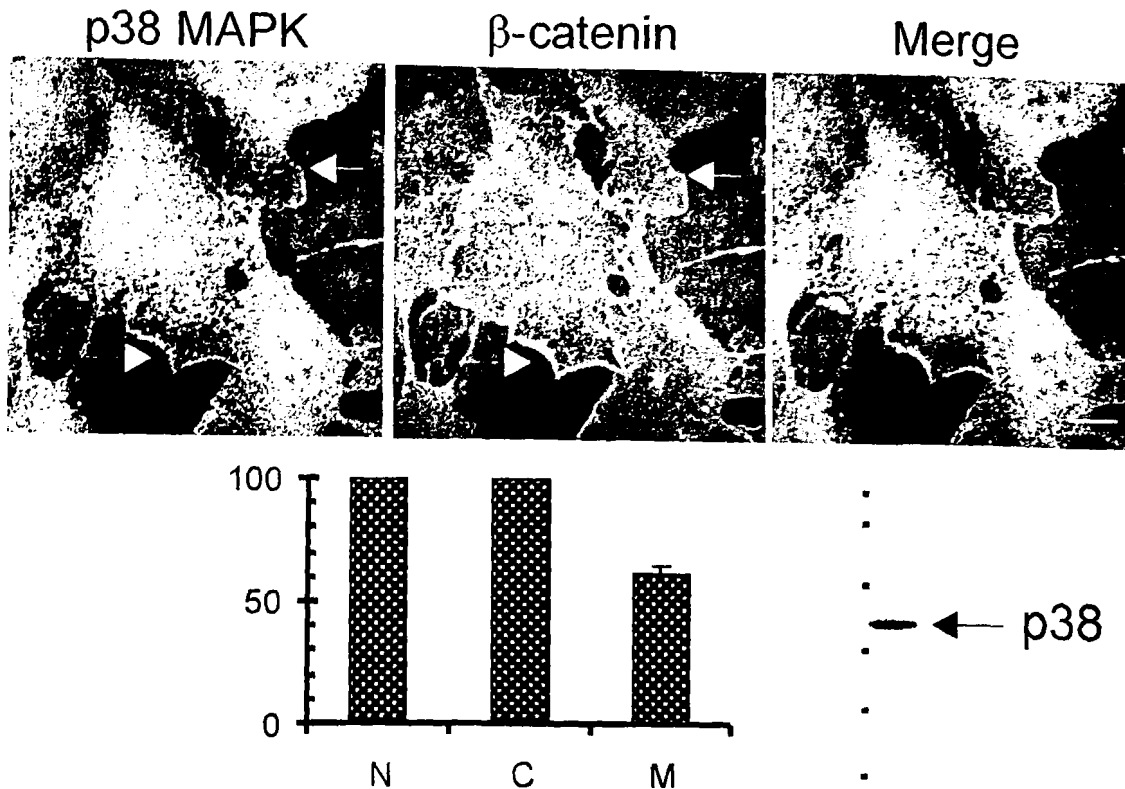
Ο VEGF-A προκαλεί έντονη ενεργοποίηση της κινασών MEK3/6, η οποία βρίσκεται ανοδικά της p38 MAPK, παρουσιάζοντας μέγιστο μετά από 5 λεπτά διέγερσης. Τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των MEK3/6 διατηρούνται σε υψηλά επίπεδα ακόμη και μετά από 4 ώρες παρουσίας του VEGF-A (Εικόνα 33, πάνω μέρος). Αντίθετα, η φωσφορυλίωση της p38 MAPK δεν παρουσιάζει την ίδια κινητική. Όπως φαίνεται στην εικόνα 33, ο VEGF προκαλεί την ενεργοποίηση της p38 MAPK με το υψηλότερο επίπεδο μεταξύ 10-15 λεπτών. Τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της p38 υποχωρούν σαφώς ταχύτερα από αυτά της MEK3/6, τα οποία διατηρούνται σε υψηλότερο επίπεδο για μακρύτερο διάστημα. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η ένταση και η διάρκεια ενεργοποίησης της p38 MAPK καθορίζεται και από άλλα μόρια, εκτός από την ενεργότητα των ανοδικών MAPKK, MEK3/6, ενδεχομένως από τις φωσφατάσεις DUSP.





**Εικόνα 33: Η κινητική της φωσφορυλίωσης των MEK3/6 και p38 MAPK παρουσία VEGF-A.** Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού και ECGS για 2 ώρες. Στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF-A (50 ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων μορφών των MEK3/6 και της p38 MAPK. Η ομαλοποίηση των τιμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των συνολικών MEK3/6 και της p38 MAPK. Η ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One (BioRad) και ο λόγος της ομαλοποιημένης έντασης κάθε ζώνης προς την ένταση του δείγματος-μάρτυρα (0λεπτά) παρουσιάζεται ενδιάμεσα κάθε σειράς δειγμάτων. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

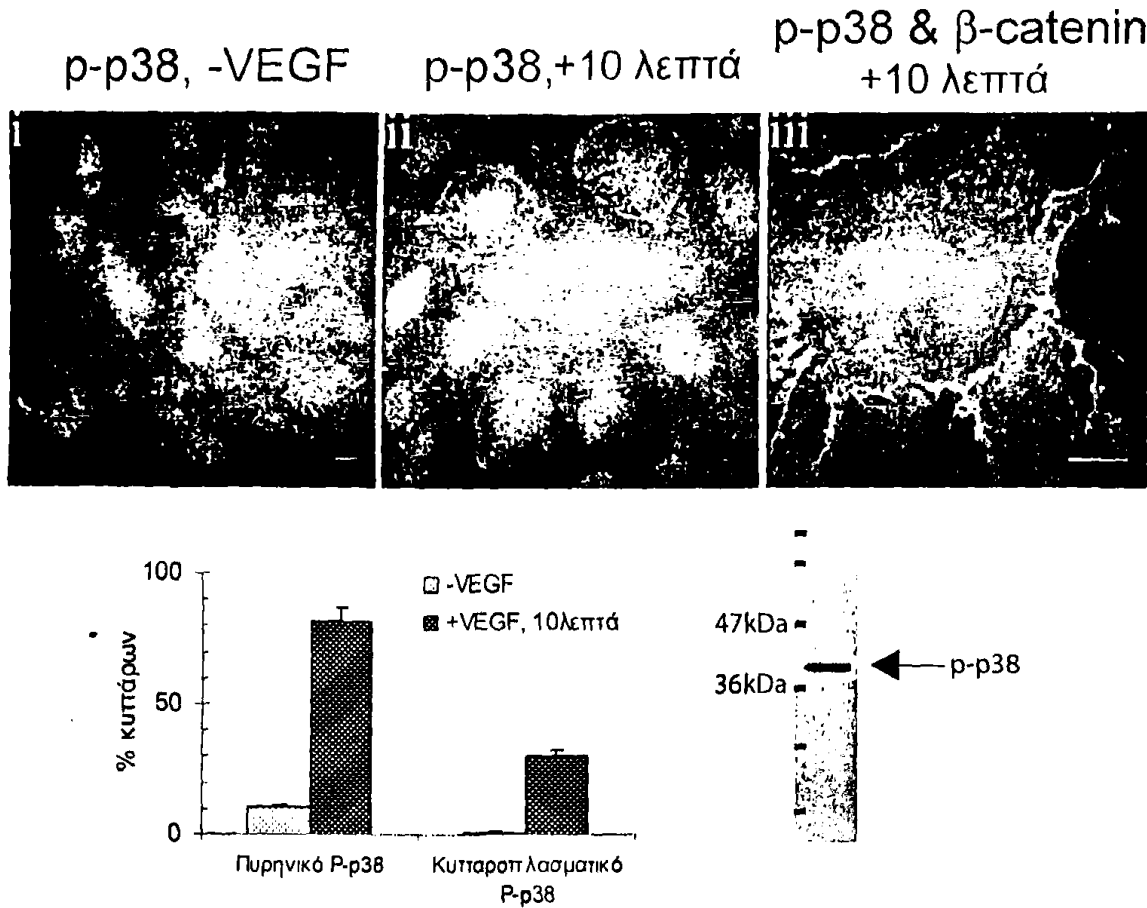
Ο εντοπισμός των MAPKs σε διαφορετικά κυτταρικά τμήματα αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που καθορίζει τη διάρκεια, την ένταση και τις βιολογικές συνέπειες της ενεργοποίησής τους [274]. Γι'αυτό το λόγο ερευνήσαμε τη θέση της p38 MAPK πριν και μετά την επαγωγή HUVE κυττάρων με VEGF-A. Όπως φαίνεται στην εικόνα 34, στα μη ενεργοποιημένα κύτταρα, η p38 MAPK εντοπίστηκε στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στη μεμβράνη των HUVE κυττάρων. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι στο σύνολο των κυττάρων (100%), η p38 MAPK εντοπίζεται στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Επιπλέον, στο 60% των κυττάρων η κινάση βρέθηκε στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς συνεντοπίστηκε με τη β-κατενίνη (Εικόνα 34). Το αντίσωμα έναντι της ενδογενούς πρωτεΐνης p38 MAPK εξετάστηκε σε εκχύλισμα κυττάρων HUVE, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η ειδικότητά του (Εικόνα 34, κάτω δεξιό μέρος).



**Εικόνα 34: Κυτταρική εντόπιση της p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε πλήρες μέσο. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της συνολικής p38 MAPK, σύμφωνα με τα Υλικά και Μέθοδοι (πάνω). Η ποσοτικοποίηση προέκυψε από τη μέτρηση τουλάχιστον 100 κυττάρων σε κάθε πείραμα από τα τρία ανεξάρτητα που πραγματοποιήθηκαν (κάτω αριστερά). Η ειδικότητα του αντισώματος ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα HUVE (κάτω δεξιά). Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10  $\mu\text{m}$ .

Στη συνέχεια εξετάσαμε τον κυτταρικό εντοπισμό της φωσφορυλιωμένης p38 MAPK πριν και μετά από επαγωγή με VEGF-A. Σύμφωνα με ανοσοαποτύπωση κατά Western παρουσία διεγέρτη τα επίπεδα φωσφορυλίωσης είναι πολύ χαμηλά (Εικόνα 33). Σε συμφωνία τα πειράματα μικροσκοπίας έδειξαν ότι μικρός αριθμός κυττάρων (10% του συνολικού αριθμού των κυττάρων) είναι θετικός στη χρώση με το αντίσωμα έναντι τη φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 MAPK (Εικόνα 35. i). Σε αυτά τα κύτταρα, η φωσφο-p38 MAPK παρουσίασε σχεδόν αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση. Επαγωγή με τον VEGF-A προκάλεσε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων θετικά στη χρώση με το ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 MAPK. Σε ποσοστό 70% τα συνολικού αριθμού των κυττάρων, η φωσφο-p38 MAPK βρέθηκε στον πυρήνα. Παρατήρηση αυτή έρχεται σε συμφωνία με τη γενικότερη αντίληψη ότι οι MAP κινάσες μετά τη φωσφορυλίωση και ενεργοποίησή τους μεταφέρονται από το κυτταρόπλασμα σε

πυρήνα με σκοπό να ενεργοποιήσουν τα πυρηνικά τους υποστρώματα. Επιπλέον, παρατηρήσαμε ότι στο 30% των κυττάρων η φωσφο-p38 MAPK παρουσίασε χρώση που παραπέμπει σε πιθανή μεμβρανική εντόπιση (Εικόνα 35, ii). Όμως, η χρησιμοποίηση αντισωμάτων έναντι της β-κατενίνης, ενός δείκτη της κυτταρικής μεμβράνης, έδειξε σαφώς ότι η φωσφο-p38 MAPK βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και όχι στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 35, iii).



**Εικόνα 35: Κυτταρική εντόπιση της φωσφο-p38 MAPK.** Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού και EGCS για 2 ώρες. Στη συνέχεια είτε μονιμοποιήθηκαν άμεσα (i) είτε ενεργοποιήθηκαν με VEGF-A (50 ng/ml) για 10 λεπτά και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν (ii, iii). Ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας είτε ειδικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 MAPK (i, ii, iii πράσινο) και έναντι της β-κατενίνης (iii, κόκκινο). Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό των κυττάρων με πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση της φωσφο-p38 MAPK, πριν και μετά από την ενεργοποίηση με VEGF. Η ειδικότητα του αντισώματος ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα HUVE μετά από επαγωγή με VEGF για 10 λεπτά (κάτω δεξιά). Το πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές και τα αποτελέσματα προέκυψαν από μέτρηση τουλάχιστον 100 κυττάρων σε κάθε πείραμα. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10 μm.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η ενεργοποίηση της p38 MAPK από τον VEGF-  
A έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση της ακτίνης και τη μετανάστευση των

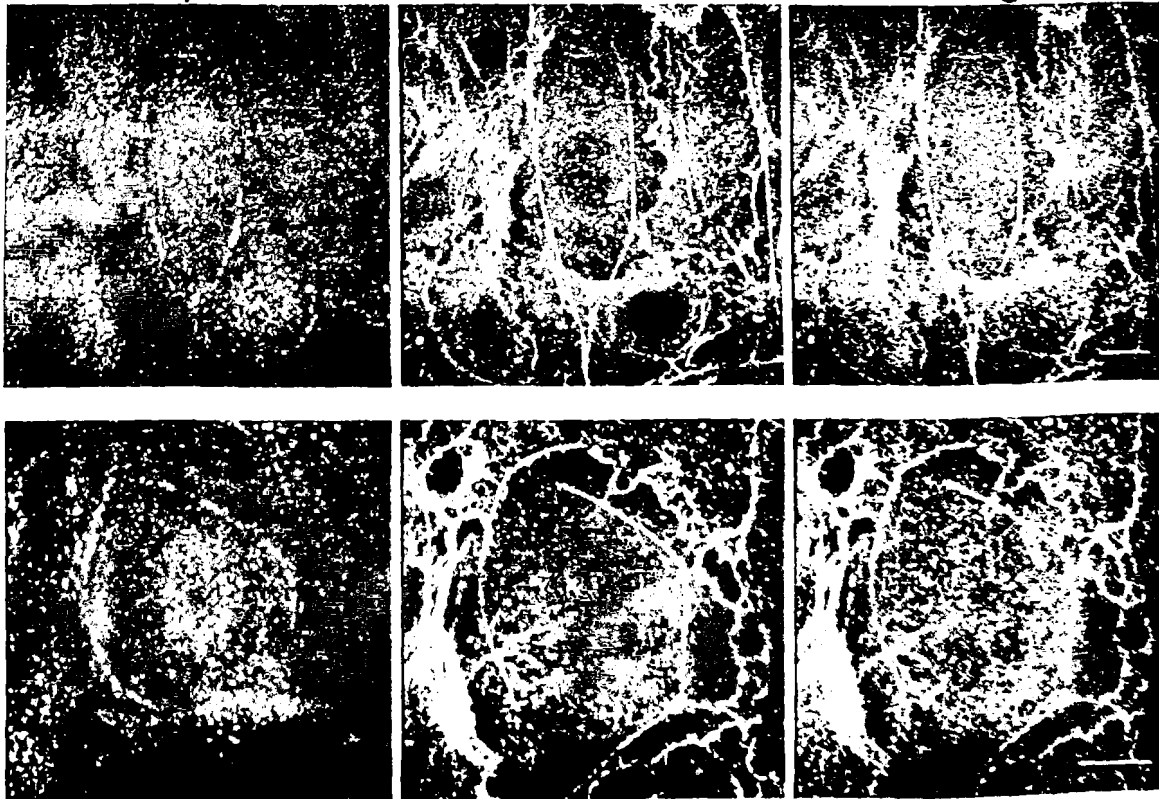


δοθηλιακών κυττάρων [198]. Επίσης, έχει δειχθεί ότι ο VEGF-A ενεργοποιεί τη μίση για ινιδίων του στρες (stress fibers), με αποτέλεσμα να προάγει τη μετακίνηση του κυττάρου. Πράγματι, περαιτέρω ανάλυση με τη βοήθεια της συνεστιακής μικροσκοπίας, έδειξε τελικά ότι η κυτταροπλασματική φωσφο-p38 MAPK συνεντοπίζεται με τη φαλλοϊδίνη (phalloidin), μία πρωτεΐνη που συνδέεται στην ακτίνη και εμποδίζει τον αποπολυμερισμό της. (Εικόνα 36). Φαίνεται λοιπόν ότι η φωσφορυλιωμένη από τον VEGF-A p38 MAPK συνεντοπίζεται με την ακτίνη του κυτταροσκελετού (actin cytoskeleton) των ενδοθηλιακών κυττάρων, εντόπιση η οποία πιθανά σχετίζεται με το ρυθμιστικό ρόλο του VEGF-A στη μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων.

P-p38

Phalloidin

Merge



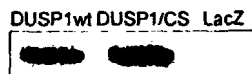
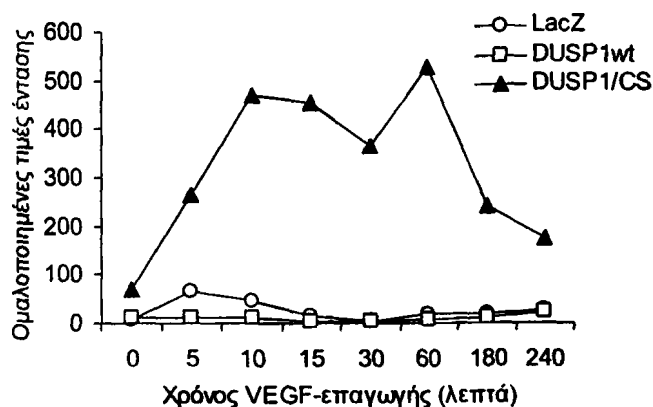
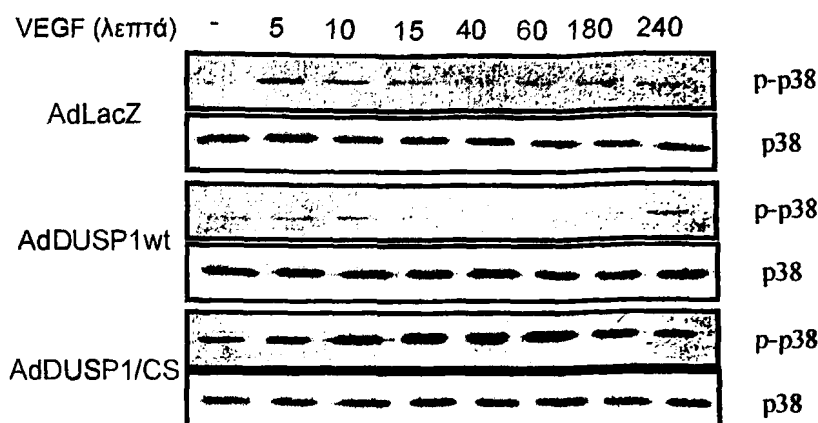
Εικόνα 36: Συνεντόπιση της φωσφορυλιωμένης p38 MAPK και της phalloidin μετά από ενεργοποίηση με VEGF-A. Κυττάρων HUVECs υπέστησαν στέρηση ορού και FCS για 2 ώρες, πριν την ενεργοποίηση με VEGF (50 ng/ml) για 10 λεπτά. Ακολούθησε έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 MAPK (πράσινο) και έναντι της phalloidin (κόκκινο). Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10 μm.

### 3.5. Ο ρόλος των πρωτεϊνών DUSP1 και DUSP5 στη ρύθμιση της VEGF-επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Όπως δείχθηκε προηγουμένως, ο VEGF επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων *DUSP1* και *DUSP5*. Επίσης, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK, μετά από επαγωγή με VEGF, υποχωρούν σαφώς ταχύτερα από αυτά της MEK3/6 υποδεικνύοντας ότι κάποιες φωσφατάσες, ενδεχομένως η *DUSP1*, και ίσως η *DUSP5*, ρυθμίζουν την παροδική φωσφορυλίωση της p-38 MAPK. Πράγματι, η *DUSP1* αναγνωρίζει και απενεργοποιεί και τις τρεις ομάδες των MAPK (ERK1/2, p38 και JNK) [244], ενώ η *DUSP5* φαίνεται να παρουσιάζει εκλεκτικότητα έναντι της ERK1/2 MAPK [255]. Προς το παρόν, δεν είναι γνωστές οι φωσφατάσες που ασκούν αρνητική ανάδραση στην ενεργοποίηση της p38 MAPK από τον VEGF. Για να διερευνήσουμε το ρόλο της *DUSP1* και *DUSP5* στη ρύθμιση της από τον VEGF επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK, χρησιμοποιήσαμε αδενοϊούς που εξέφραζαν είτε την αγρίου τύπου *DUSP1* (Ad*DUSP1*wt) και *DUSP5* (Ad*DUSP5*wt) είτε την καταλυτικά ανενεργή (αρνητικά επικρατούσα μορφή) *DUSP1* (Ad*DUSP1*/CS) και *DUSP5* (Ad*DUSP5*/CS), στις οποίες η υπεύθυνη κυστεΐνη για την ενζυματική τους δράση έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο σερίνης. Όπως φαίνεται από την εικόνα 37, στα κύτταρα-μάρτυρες (AdLacZ), η φωσφορυλίωση της p38 MAPK από τον VEGF παρουσιάζει μέγιστο μεταξύ 5-10 λεπτών ενεργοποίησης από τον αυξητικό παράγοντα. Η υπερέκφραση, όμως, της *DUSP1* στα HUVE κύτταρα είχε ως αποτέλεσμα τη ριζική αναστολή της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF σε όλες τις χρονικές στιγμές. Αντίθετα, η υπερέκφραση της καταλυτικά ανενεργής μορφής της φωσφατάσης (*DUSP1*/CS), ικανή να προσδένει την κινάση, αλλά να μην την αποφωσφορυλιώνει, προκάλεσε τη δραματική αύξηση τόσο της διάρκειας όσο και της έντασης της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF (Εικόνα 37).

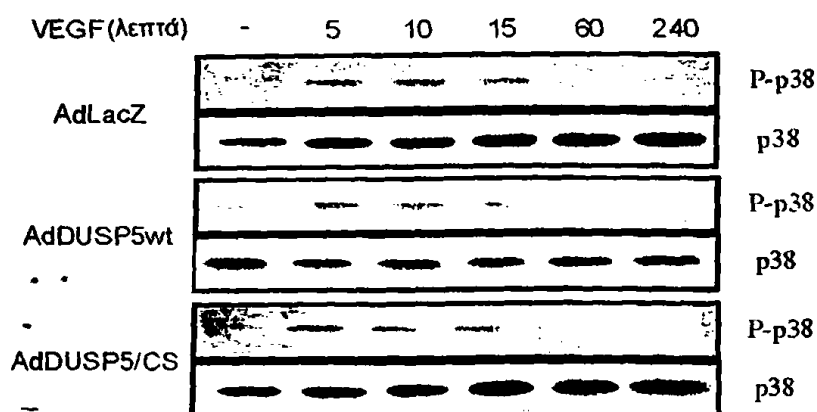
Αντίθετα, και οι δύο μορφές της *DUSP5*, αγρίου τύπου και καταλυτικά ανενεργή, δεν είχαν καμία επίδραση στην επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση της p38 MAPK (Εικόνα 38). Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σύμφωνα με την ήδη γνωστή εξειδίκευση της *DUSP5* έναντι των ERK1/2 και προβάλλουν την *DUSP1* ως κύρια, αν όχι τη μόνη, φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης για τη ρύθμιση της από τον VEGF επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK στα κύτταρα HUVE.





**Εικόνα 37:** Κινητική της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF μετά από υπερέκφραση των DUSP1wt ή DUSP1/CS. Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdLacZ, AdDUSP1wt ή AdDUSP1/CS σε MOI 300 για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δίωρη στέρηση ορού και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για 5, 10, 15, 30, 60, 180 και 240 λεπτά. Το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1%SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι είτε της φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 MAPK είτε της συνολικής p38 MAPK. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One και η ομαλοποίηση έγινε με βάση την τιμή της συνολικής p38 MAPK. Επίσης, ελέγχθηκε η έκφραση των DUSP1wt και DUSP1/CS μετά από την μόλυνση με τους αδενοϊούς, για 24 ώρες. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

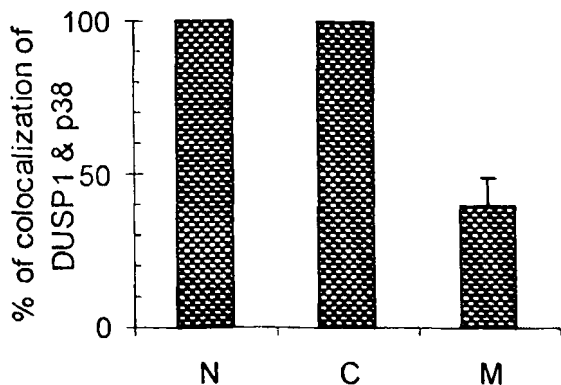
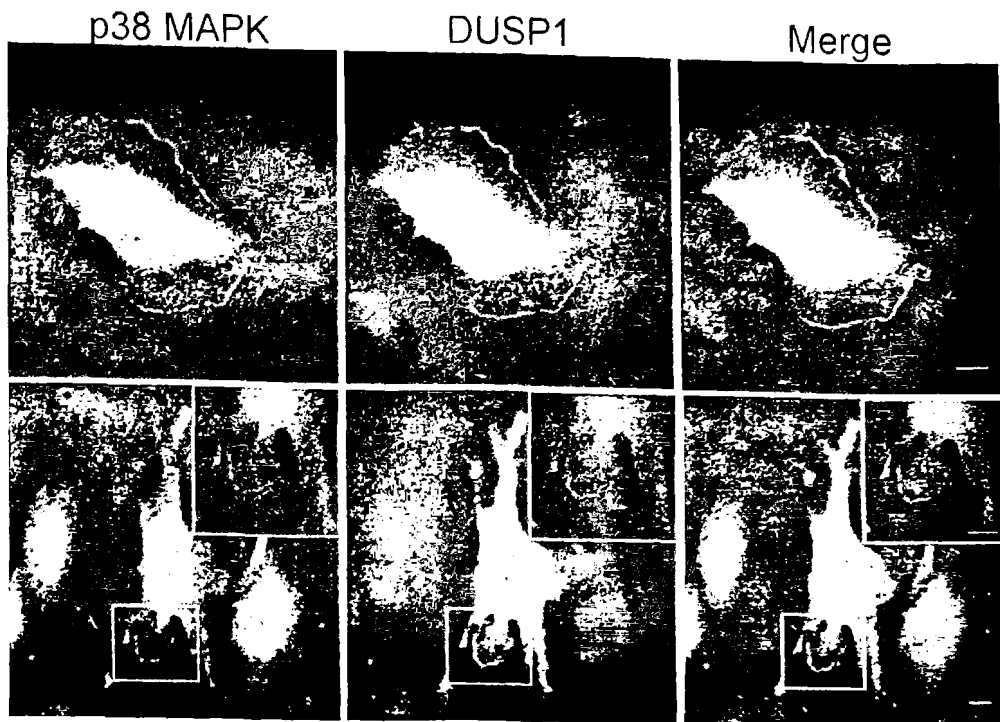




**Εικόνα 38:** Κινητική της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF, μετά από υπερέκφραση των DUSP5wt ή DUSP5/CS. Κύτταρα HUVE, επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdLacZ, AdDUSP5wt ή AdDUSP5/CS σε MOI 300 για 36 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δίωρη στέρηση ορού και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για 5, 10, 15, 30, 60, 180 και 240 λεπτά. Το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1%SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι είτε της φωσφορυλιωμένης μορφής της p38 MAPK είτε της συνολικής p38 MAPK. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

### 3.6. Συνεντόπιση των πρωτεϊνών p38 MAPK και DUSP1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα

Επόμενος στόχος ήταν να μελετήσουμε την κυτταρική εντόπιση της DUSP1 σε σχέση με την p38 MAPK. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η DUSP1 είναι πυρηνική πρωτεΐνη και κωδικοποιείται από άμεσα ανταποκρινόμενο γονίδιο. Ωστόσο, όπως δείξαμε προηγουμένως η DUSP1 εντοπίζεται και στο κυτταρόπλασμα και στην κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πραγματοποιήσαμε πειράματα συνεστιακής μικροσκοπίας χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι της υπερεκφρασμένης DUSP1-myc και της ενδογενούς p38 MAPK. Όπως φαίνεται στην εικόνα 39, οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται στο σύνολο των κυττάρων (100%) στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα, ενώ σε περισσότερο από το 30% των κυττάρων οι δύο πρωτεΐνες συνεντοπίζονται και στην κυτταρική μεμβράνη (Εικόνα 39), υποδηλώνοντας ότι η DUSP1 και η p38 MAPK πιθανά δημιουργούν σύμπλοκο σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Επίσης, αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τις παραπάνω παρατηρήσεις μας ότι η DUSP1, τουλάχιστον στα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου, κατανέμεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και την κυτταρική μεμβράνη.



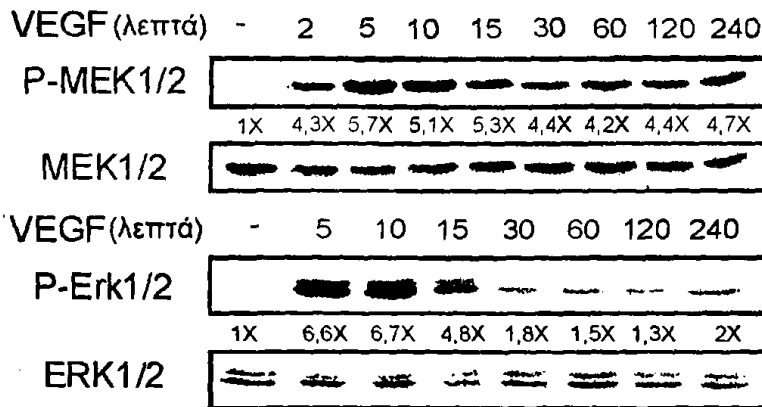
**Εικόνα 39: Συνεντόπιση των p38 MAPK και DUSP1 σε ενδοθηλιακά κύτταρα.** Τα κύτταρα HUVE μολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdDUSP1wt για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε έμμεσος ανοσοφθορισμός με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι είτε της ενδογενούς p38 MAPK είτε του ηγε (AdDUSP1wt, κόκκινο). Πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα, στο καθένα από τα οποία ελετήθηκαν τουλάχιστον 100 κύτταρα. Στο γράφημα παρουσιάζεται το ποσοστό των κυττάρων στα οποία συνεντοπίζονται οι πρωτεΐνες p38 MAPK και DUSP1. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Στις εικόνες μικροσκοπίας η κλίμακας αντιπροσωπεύει 10 μm.

**3.7. Ο VEGF ρυθμίζει τη φωσφορύλιωση και την κυτταρική εντόπιση των ERK1/2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα**

Ο VEGF-A επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω της φωσφορύλιωσης των ERK1/2 [121]. Με σκοπό να ελέγξουμε τη δράση του VEGF-A στην ενεργοποίηση των ERK1/2, εξετάσαμε την κινητική της φωσφορύλιωσης των ERK1/2 και

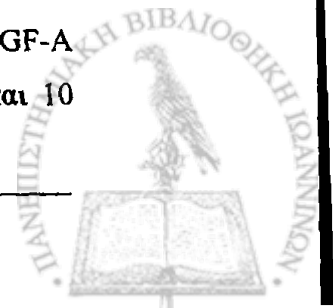


της ανοδικής κινάσης MEK1/2 από τον VEGF-A καθώς και την κυτταρική εντόπιση των κινασών παρουσία του ενδοθηλιακού παράγοντα. Όπως φαίνεται στην εικόνα 40, η παρουσία του αυξητικού παράγοντα προκάλεσε την άμεση ενεργοποίηση των MEK1/2 με μέγιστο στα 5 λεπτά διατηρώντας υψηλά επίπεδα φωσφορυλίωσης ακόμη και μετά από 4 ώρες. Ωστόσο, στα κύτταρα HUVE, ο VEGF-A προκάλεσε έντονη φωσφορυλίωση των ERK1/2, με κορύφωση στα 10 λεπτά επαγωγής, και ταχύτατη υποχώρηση της φωσφορυλίωσης αυτής μετά αυτό το χρονικό σημείο (Εικόνα 40). Επομένως, σε αντιστοιχία με την p38 MAPK, και οι ERK1/2 δεν ακολουθούν την κινητική της φωσφορυλίωσης των επαγωγέων τους υποδηλώνοντας την ύπαρξη φωσφατασών, οι οποίες ενδεχομένως να είναι υπεύθυνες για την γρήγορη αποφωσφορυλίωση τους.

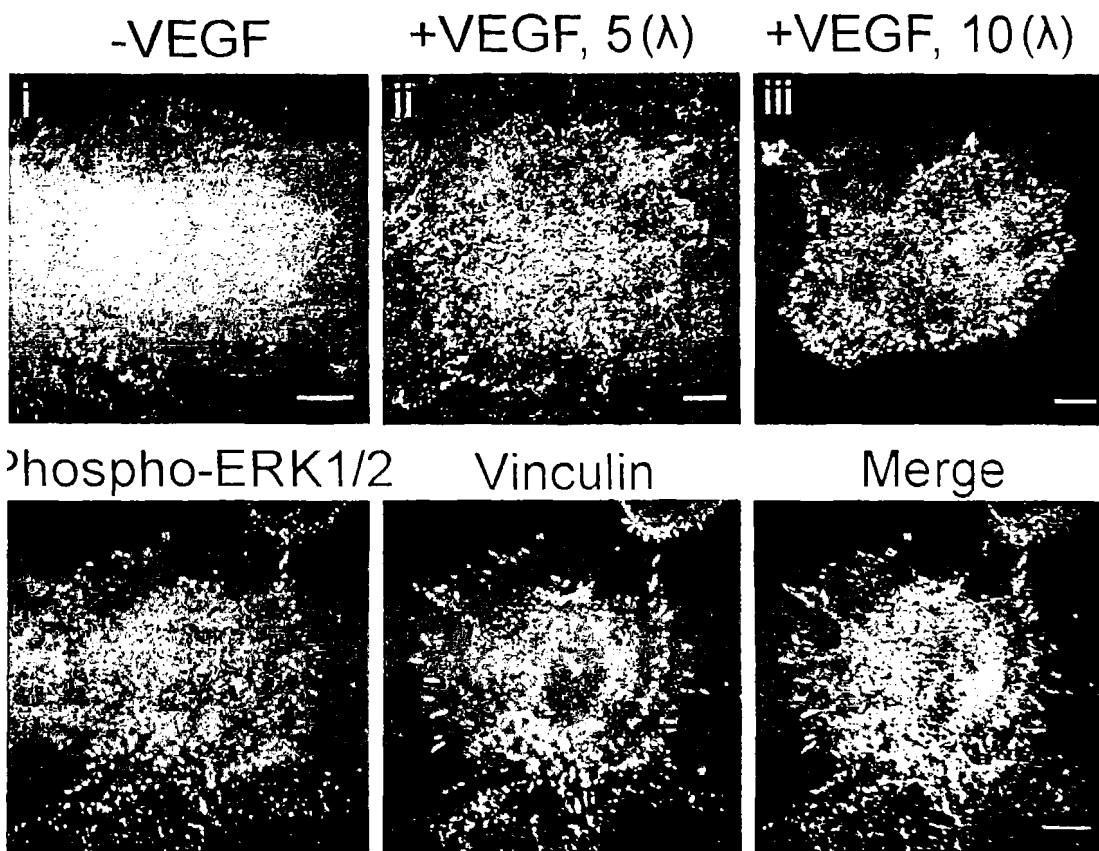


**Εικόνα 40:** Κινητική της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 και MEK1/2 από τον VEGF-A. Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού και ECGS για 2 ώρες, πριν την επαγωγή με VEGF-A (50 ng/ml) για διάφορα χρονικά διαστήματα. Κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας αντισώματα έναντι των φωσφορυλιωμένων μορφών των MEK1/2 και των ERK1/2. Η ομαλοποίηση των τιμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντισωμάτων έναντι των συνολικών MEK1/2 και ERK1/2. Η ποσοτικοποίηση της έντασης των ζωνών πραγματοποιήθηκε με το Quantity One (BioRad) και ο λόγος της ομαλοποιημένης έντασης κάθε ζώνης προς την ένταση του δείγματος-μάρτυρα (0 λεπτά) παρουσιάζεται ενδιάμεσα κάθε σετ δειγμάτων. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, οι φωσφορυλιωμένες MAPKs ενεργοποιούν σημαντικό αριθμό πυρηνικών και κυτταροπλασματικών υποστρωμάτων ανάλογα με την εντόπιση τους [137]. Μελετήσαμε, λοιπόν, την επίδραση του VEGF-A στην κυτταρική εντόπιση των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 με τη χρήση συνεστιακής μικροσκοπίας. Αρχικά, σε κύτταρα που δεν είχαν υποστεί επαγωγή τα επίπεδα των φώσφο-ERK1/2 ήταν πολύ χαμηλά και εντοπισμένα αποκλειστικά εκτός πυρήνα (Εικόνα 41, i). Η ενεργοποίηση με VEGF-A προκάλεσε έντονη φωσφορυλίωση των ERK1/2 με αυξανόμενη ένταση μεταξύ 5 και 10



ν (Εικόνα 41, ii και iii). Αξιοσημείωτο είναι ότι μόνο ένα μικρό μέρος των φωσφο-ERK1/2 ανευρίσκεται στον πυρήνα, μετά από χορήγηση VEGF-A, ενώ το μεγαλύτερο εντοπίζεται στην περιφέρεια του κυτταροπλάσματος εμφανίζοντας διάστικτη χρώση (Εικόνα 41).



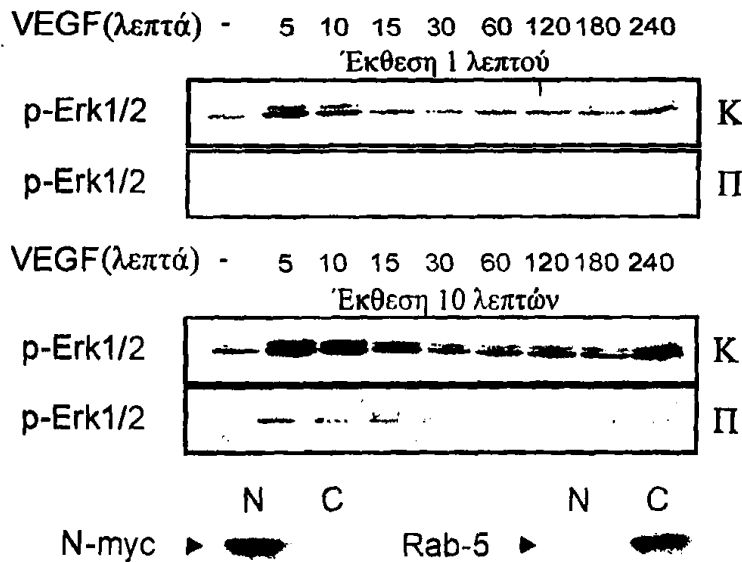
**Εικόνα 41:** Κυτταρική εντόπιση των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 μετά από χορήγηση VEGF-A. Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού και ECGS για 2 ώρες (i) είτε ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για 5 (ii) ή 10 λεπτά (iii και κάτω μέρος) και στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν. Ακολούθησε απλός έμμεσος ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής των ERK1/2 (i, ii, iii) ή διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός με ειδικό αντίσωμα έναντι της φωσφορυλιωμένης μορφής των ERK1/2 ή έναντι της βινκουλίνης (κάτω σειρά). Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10 μm.

Έχει δείχθει ότι η ERK συμμετέχει στη μετακίνηση των κυττάρων. Ειδικότερα, ο HGF ενεργοποιεί τη στρατολόγηση της ERK1/2 MAPK στις εστιακές προσφύσεις (focal adhesions), ενώ ο VEGF-A στρατολογεί σε αυτές τις πρωτεΐνες παξιλλίνη και βινκουλίνη, αλλά ο VEGF-A προκαλεί τη φωσφορυλίωση της FAK (Focal Adhesion Kinase) [195]. Ελέγξαμε, λοιπόν, την πιθανότητα συνεντόπισης των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 και της βινκουλίνης στις εστιακές προσφύσεις μετά από επαγωγή με VEGF-A. Όπως φαίνεται στην εικόνα 41,



πραιτέρω χαρακτηρισμός της κυτταροπλασματικής εντόπισης των ενεργοποιημένων ERK1/2 με έμμεσο ανοσοφθορισμό έδειξε συνεντόπιση των πρωτεϊνών φώσφο-ERK1/2 και βινκουλίνης, αποδεικνύοντας την εντόπιση των φώσφο-ERK1/2 στις εστιακές προσφύσεις του κυττάρου και υποδηλώνοντας τον πιθανό ρόλο των ERK1/2 στην κυτταρική μετακίνηση (Εικόνα 41, κάτω μέρος).

Με σκοπό να ελέγξουμε και βιοχημικά την κυτταρική εντόπιση των φώσφο-ERK1/2, πραγματοποιήσαμε πειράματα κλασματοποίησης εκχυλισμάτων κυττάρων HUVE πριν και μετά την ενεργοποίηση με VEGF. Για να εξασφαλίσουμε την απουσία διαρροής μεταξύ των δύο κλασμάτων, χρησιμοποιήσαμε ως πυρηνικό δείκτη την πρωτεΐνη N-myc ενώ ως κυτταροπλασματικό την Rab-5. Τα αποτελέσματα του πειράματος κλασματοποίησης των κυττάρων επιβεβαίωσαν τη μικροσκοπική παρατήρηση ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των ενεργοποιημένων μορφών των ERK1/2 ανευρίσκεται στον πυρήνα, ενώ το μεγαλύτερο μέρος παραμένει στο κυτταρόπλασμα και μάλιστα στις εστιακές προσφύσεις (Εικόνα 42).

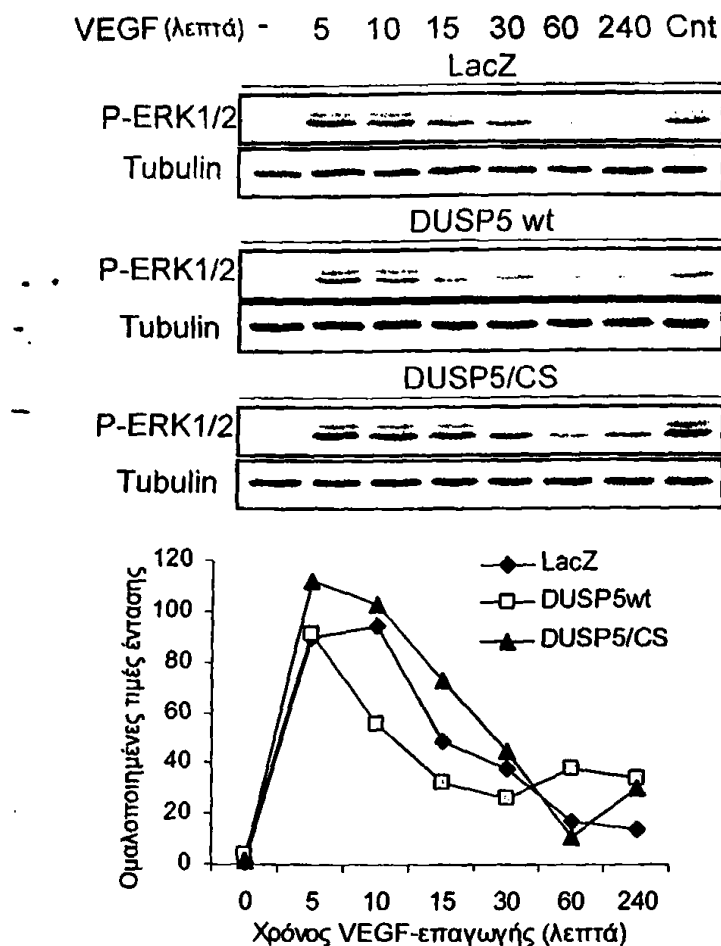


**Εικόνα 42: Κυτταρική εντόπιση των φώσφο-ERK1/2 μετά από επαγωγή με VEGF.** Κύτταρα HUVE υπέστησαν στέρηση ορού για 2 ώρες πριν από με VEGF-A για διάφορα χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε κυτταρική κλασματώση σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Η ανοσοαποτύπωση κατά Western πραγματοποιήθηκε με ειδικό αντίσωμα έναντι της φώσφο-ERK1/2. Παρουσιάζονται δύο εκθέσεις, μία του 1 λεπτού (πάνω μέρος) και μία των 10 λεπτών (μεσαίο μέρος). Οι πρωτεΐνες N-myc και Rab-5 χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο διαρροής μεταξύ των δύο κλασμάτων, καθώς η πρώτη εκφράζεται αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ η δεύτερη είναι κυτταροπλασματική (κάτω μέρος).

### 3.8. Ο ρόλος των πρωτεϊνών DUSP5 και DUSP1 στη ρύθμιση της VEGF-επαγόμενης φωσφορυλίωσης των ERK1/2 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα

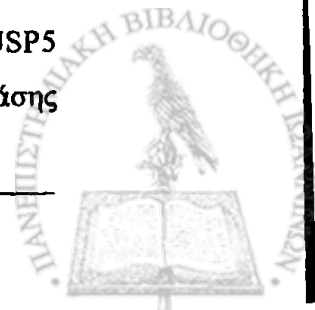
Όπως είδαμε παραπάνω, τα επίπεδα της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 MAPK υποχωρούν σαφώς ταχύτερα από αυτά της MEK1/2, τα οποία διατηρούνται σε υψηλότερο επίπεδο για μακρύτερο διάστημα. Έτσι, μελετήσαμε τον πιθανό ρόλο των φωσφατασών DUSP1 και DUSP5 στην ρύθμιση της ενεργοποίησης των ERK1/2 από τον VEGF-A. Όπως και στην περίπτωση της p38 MAPK, χρησιμοποιήσαμε αδenoϊούς που εξέφραζαν είτε την αγρίου τύπου DUSP1 (AdDUSP1wt) και DUSP5 (AdDUSP5wt) είτε την καταλυτικά ανενεργή DUSP1 (AdDUSP1/CS) και DUSP5 (AdDUSP1/CS), στις οποίες η υπεύθυνη κυστεΐνη για την ενζυματική τους δράση έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο σερίνης. Η υπερέκφραση της DUSP5 οδήγησε σε οριακή μείωση της διάρκειας αλλά όχι της έντασης της ενεργοποίησης της ERK1/2 από τον VEGF-A, σε σχέση με τον αδenoϊό-μάρτυρα, ενώ η υπερέκφραση της DUSP5/CS προκάλεσε μια μικρή αύξηση της έντασης της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 από τον VEGF (Εικόνα 43). Η ασθενής αυτή επίδραση που παρατηρήθηκε δεν οφείλεται σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης της DUSP5, καθώς μόλυνση των κυττάρων με μεγαλύτερη αναλογία ικών σωματίων/αριθμό κυττάρων έδωσε συγκρίσιμα αποτελέσματα. Μπορούμε να δώσουμε μία πρώτη εξήγηση λαμβάνοντας υπόψη ότι η διαμερισματοποίηση των DUSP5 και φώσφο-ERK1/2 είναι διαφορετική, καθώς η μεν φωσφατάση βρίσκεται αποκλειστικά στον πυρήνα, ενώ η ενεργοποιημένη από τον VEGF-A ERK1/2 MAPK βρίσκεται κυρίως, στις εστιακές προσφύσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 41).



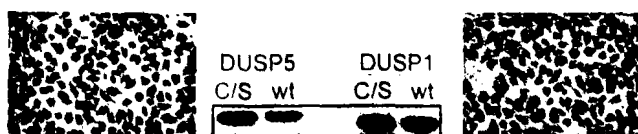
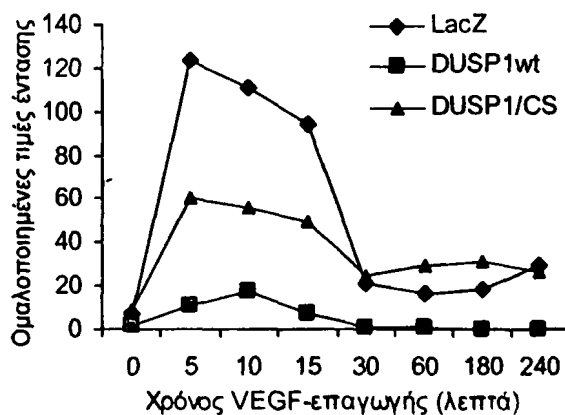
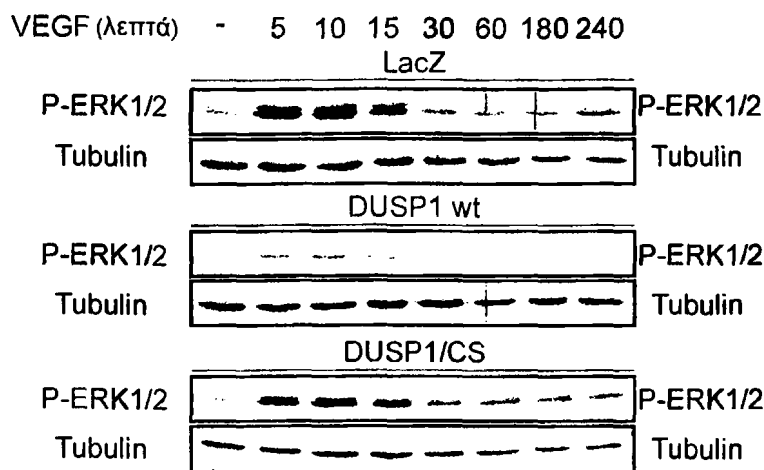


**Εικόνα 43: Επίδραση της DUSP5 στην επαγόμενη από τον VEGF-A φωσφορυλίωση των ERK1/2.** Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν είτε με τον αδενόιο AdLacZ, είτε τον AdDUSP5wt είτε τον AdDUSP5/CS σε MOI 300 για 36 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δίωρη στέρηση ορού και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF-A (50 ng/ml) για 5, 10, 15, 30, 60 και 240 λεπτά. Το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι είτε της φωσφορυλιωμένης μορφής των ERK1/2 είτε της τουμπουλίνης. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Η ομαλοποίηση των τιμών έντασης των φώσφο-ERK1/2 έγινε με βάση την έκφραση της τουμπουλίνης. Για ομαλοποίηση των τιμών μεταξύ διαφορετικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό δείγμα που ηλεκτροφορήθηκε στο τελευταίο φρεάτιο της κάθε σειράς δειγμάτων (Cnt).

Στη συνέχεια, εξετάσαμε την επίδραση της DUSP1 στην επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2 από τον VEGF καθώς, όπως δείχθηκε προηγουμένως, η DUSP1 εντοπίζεται σε όλο το κύτταρο και όχι αποκλειστικά στον πυρήνα, όπως η DUSP5. Πράγματι, η υπερέκφραση της DUSP1, είχε ως αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση των ERK1/2 (Εικόνα 44), παρά την ασθενέστερη αλληλεπίδρασή της με την ERK1/2, σε σχέση αυτή της DUSP5 [255]. Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση της καταλυτικά ανενεργής φωσφατάσης



DUSP1, DUSP1/CS, όχι μόνο δεν προκάλεσε υπερενεργοποίηση των ERK1/2, αλλά αντίθετα τα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 μετά από χορήγηση VEGF-A δεν ξεπέρασαν το 50% του δείγματος-μάρτυρα (Εικόνα 44). Αυτό σημαίνει ότι σε συνθήκες αναστολής της DUSP1 (έκφραση της DUSP1/CS), άλλες φωσφατάσες είναι σε θέση να αποφωσφορυλιώσουν ικανοποιητικά τις ERK1/2 MAPK.



**Εικόνα 44: Επίδραση της DUSP1 στην επαγόμενη από τον VEGF φωσφορυλίωση των ERK1/2.** Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν είτε με τον αδενοϊό AdLacZ, είτε τον AdDUSP1 wt είτε τον AdDUSP1/CS σε MOI 200 για 24 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δίωρη στέρηση ορού και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για 5, 10, 15, 30, 60 και 240 λεπτά. Το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι είτε της φωσφορυλιωμένης μορφής των ERK1/2 είτε της τουμπουλίνης. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Για ομαλοποίηση των τιμών έντασης μεταξύ διαφορετικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό δείγμα που παρουσιάζεται στο τέλος κάθε σετ δειγμάτων (Cnt).

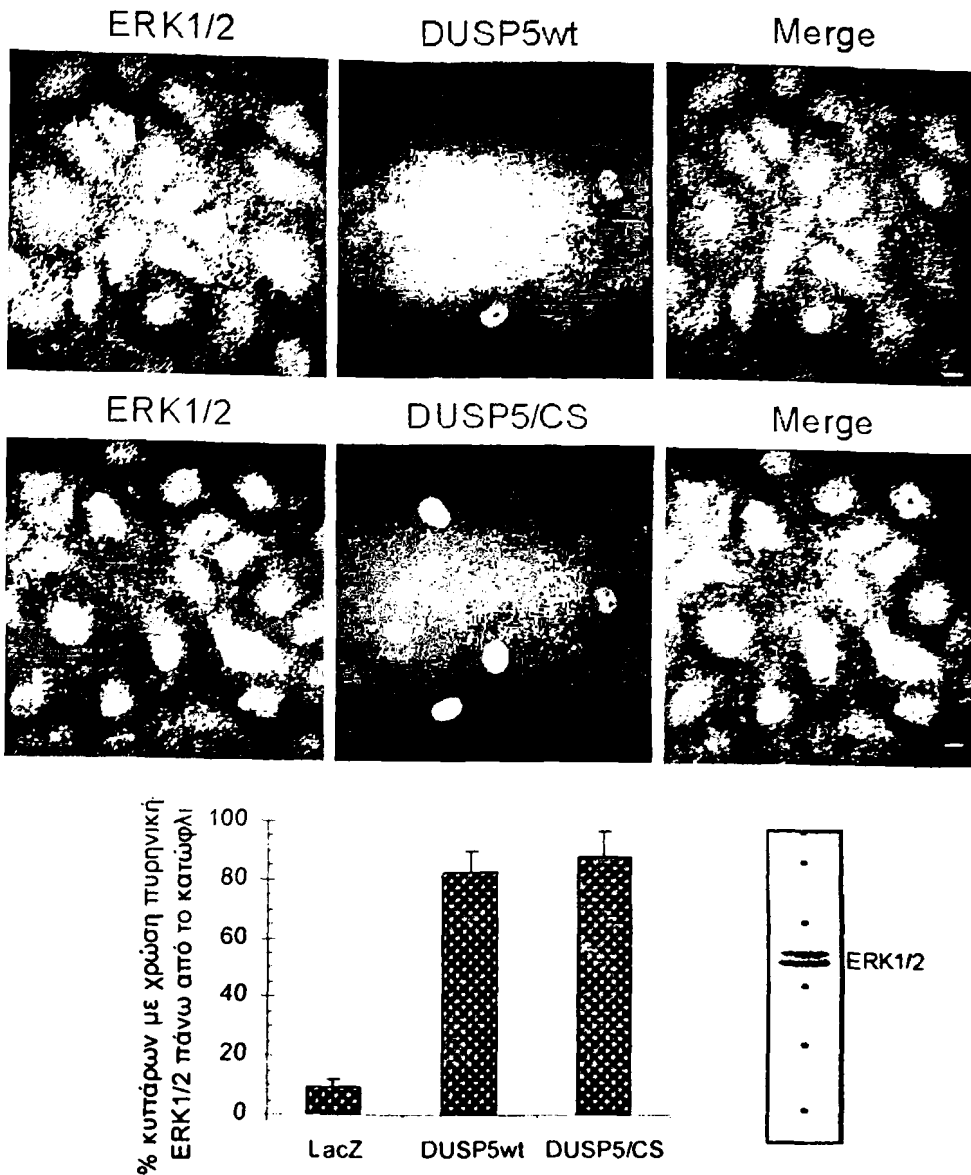


Σε καμία περίπτωση δεν εμφανίζεται η δραματική υπερενεργοποίηση που συμβαίνει στην περίπτωση της p38 MAPK (εικόνα 37) κατά την υπερέκφραση της DUSP1/CS. Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, τουλάχιστον στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η DUSP1 δεν είναι η κύρια φωσφατάση στη ρύθμιση της ERK1/2-φωσφορυλίωσης και ότι η DUSP5 πρέπει να παίζει έναν πιο σημαντικό ρόλο στην αποφωσφορυλίωση των φωσφο-ERK1/2.

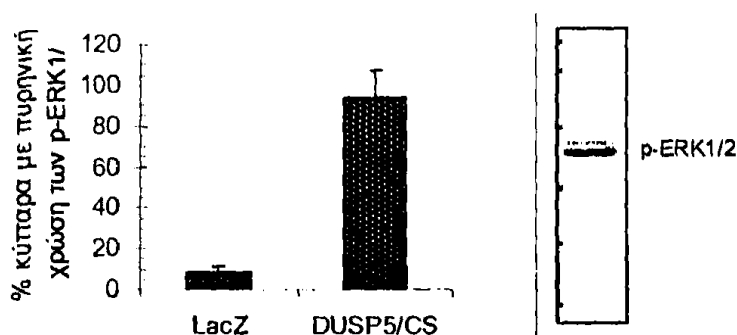
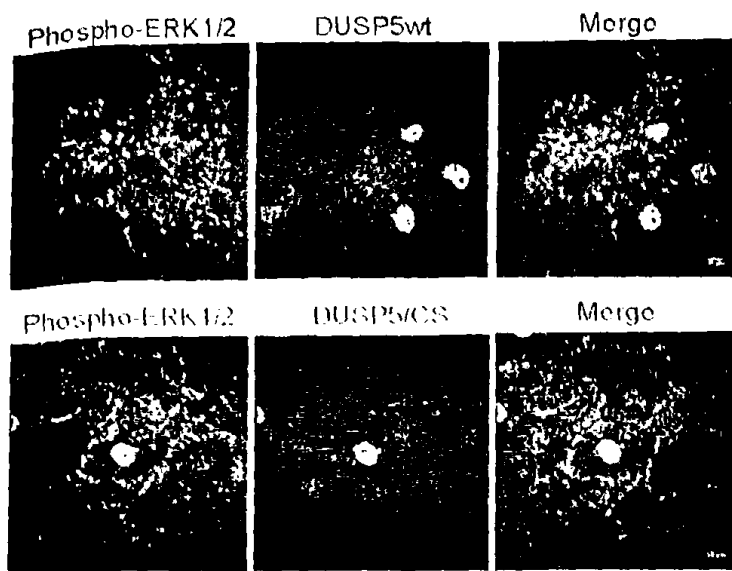
### **3.9. Η φωσφατάση DUSP5 προκαλεί την πυρηνική αγκυροβόληση και συσσώρευση των ERK1/2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα**

Η DUSP5, παράλληλα με την αποφωσφορυλίωση των πυρηνικών φωσφο-ERK1/2, έχει αναφερθεί ότι είναι υπεύθυνη για την πυρηνική αγκυροβόληση των αποφωσφορυλιωμένων ERK1/2 σε ινοβλάστες [255]. Πράγματι, η υπερέκφραση είτε της DUSP5 είτε της DUSP5/CS έδειξε σημαντική αύξηση στην ένταση της πυρηνικής χρώσης της ERK1/2 σε περισσότερο από το 80% των μολυσμένων ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 45). Επίσης, η DUSP5/CS, η οποία αλληλεπιδρά με την φωσφο-ERK1/2 αλλά δεν την αποφωσφορυλιώνει, προκαλεί συσσώρευση φωσφο-ERK1/2 στον πυρήνα ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 46). Πράγματι, στο 95% των μολυσμένων κυττάρων με DUSP5/CS παρουσιάστηκε ισχυρή πυρηνική χρώση της φωσφο-ERK1/2 μετά από επαγωγή με VEGF, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στα κύτταρα-μάρτυρες ήταν μόλις 9-10% (γράφημα εικόνας 46). Η τελευταία αυτή παρατήρηση, παράλληλα με την ενίσχυση του ρόλου της DUSP5 σαν πυρηνικού αγκυροβολητή των ERK1/2, δείχνει ότι η φωσφο-ERK1/2 αποφωσφορυλιώνεται με την είσοδό της στο πυρήνα, γεγονός που εξηγεί την ανεύρεση μικρών ποσών φωσφο-ERK1/2 στον πυρήνα ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από χορήγηση VEGF-A (Εικόνες 41 και 42).





**Εικόνα 45: Πυρηνική συσσώρευση των ERK1/2 παρουσία DUSP5wt ή DUSP5/CS.** Κυττάρα HUVE μολύνθηκαν είτε με τον αδενοϊό AdLacZ, είτε τον AdDUSP5wt είτε τον AdDUSP5/CS σε MOI 300 για 36 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υπέστησαν διώρυξη ορού, προτού ενεργοποιηθούν με VEGF- (50 ng/ml) για 10 λεπτά. Τα κύτταρα ανοσοχρησιμοποιήθηκαν και ακολούθησε διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας κροκάνα αντίσωμα έναντι της συνολικής ERK1/2 (πράσινο) και έναντι του myc για τη μελέτη των μολυσμένων κυττάρων (κόκκινο). Το γράφημα παρουσιάζει το ποσοστό των κυττάρων με πυρηνική χρώση των ERK1/2 μεγαλύτερη από το κατώφλι που ορίστηκε στο αριστερά. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τοπική απόκλιση των μετρήσεων. Το κροκάνα αντίσωμα έναντι των ERK1/2 δίνει με ανοσοαποτύπωση κατά Western μόνο τις αναμενόμενες ζώνες (p42/44) χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων HUVE (κάτω δεξιά). Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10 μm.



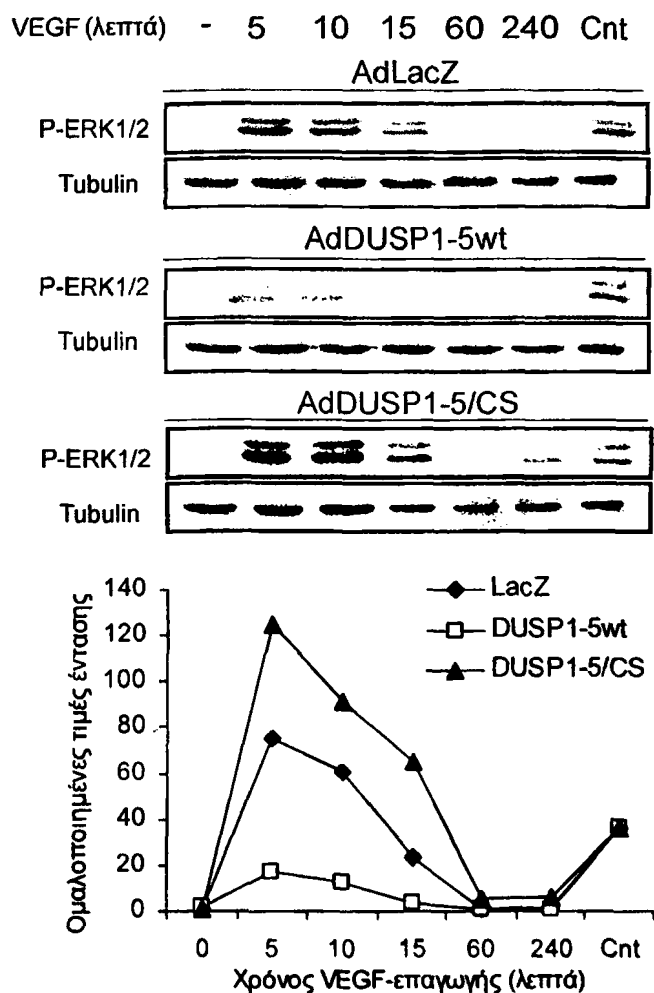
**Εικόνα 46: Κυτταρική εντόπιση των φώσφο-ERK1/2 παρουσία DUSP5wt ή DUSP5/CS.** Κύτταρα HUVE επιμολύνθηκαν με τον αδενοϊό DUSP5wt ή DUSP5/CS σε MOI 300 για 36 ώρες. Στη συνέχεια υπέστησαν δίωρη στέρηση ορού, προτού ενεργοποιηθούν με VEGF (50ng/ml) για 10 λεπτά. Τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και ακολούθησε διπλός έμμεσος ανοσοφθορισμός χρησιμοποιώντας ειδικά αντισώματα έναντι της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 (πράσινο) και έναντι του myc για τη χρώση των επιμολυσμένων κυττάρων (κόκκινο). Το γράφημα παρουσιάζει το ποσοστό των κυττάρων με πυρηνική χρώση των φώσφο-ERK1/2. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων. Η ειδικότητα του αντισώματος εξετάστηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κυτταρικό εκχύλισμα κυττάρων HUVE και το ειδικό αντίσωμα έναντι των φώσφο-ERK1/2 (κάτω δεξιά). Στις εικόνες μικροκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10 μm.

### 3.10. Συμπληρωματική δράση των φωσφατασών DUSP1 και DUSP5 στην αποφωσφορυλίωση των ERK1/2 παρουσία VEGF

Αν και η DUSP5 φαίνεται να παίζει ρόλο στην ρύθμιση των επιπέδων των φώσφο-ERK1/2, το γεγονός ότι κατά την υπερέκφραση της DUSP5/CS, η αύξηση της έντασης της φωσφορυλίωσης της ERK1/2 ήταν μικρή, υποδεικνύει ότι και άλλες φωσφατάσες ενδεχομένως να παίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των ERK1/2 από τον VEGF-A. Πράγματι, ταυτόχρονη υπερέκφραση των αγρίου τύπου DUSP1 και DUSP5, αλλά



και των αντιστοιχών καταλυτικά ανενεργών μορφών τους, έδειξε ότι υπάρχει συμπληρωματικότητα μεταξύ των δύο αυτών φωσφατασών στη ρύθμιση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERK1/2 από τον VEGF στα κύτταρα HUVE, ειδικά αναφορικά στην κυτταροπλασματική φώσφο-ERK1/2 που είναι προσβάσιμη μόνο στην DUSP1 (Εικόνα 47).



**Εικόνα 47: Επίδραση της ταυτόχρονης υπερέκφρασης των DUSP1 και DUSP5 στην επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2 από τον VEGF-A.** Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν με τον αδενοϊό AdLacZ ή τους AdDUSP1wt και AdDUSP5wt ή τους AdDUSP1/CS και AdDUSP5/CS σε MOI 300 για 36 ώρες. Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε δίωρη στέρηση ορού και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με VEGF (50 ng/ml) για 5, 10, 15, 30, 60 και 240 λεπτά. Το κυτταρικό εκχύλισμα συλλέχθηκε με διάλυμα 1% SDS εμπλουτισμένο με PMSF. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση ολικής πρωτεΐνης και ανοσοαποτύπωση κατά Western, χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι είτε της φωσφορυλιωμένης μορφής των ERK1/2 είτε της τουμπουλίνης. Η ποσοτικοποίηση της έντασης κάθε ζώνης πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα Quantity One. Το πείραμα είναι αντιπροσωπευτικό από πέντε ανεξάρτητα πειράματα. Για ομαλοποίηση των τιμών έντασης μεταξύ διαφορετικών μεμβρανών χρησιμοποιήθηκε ένα κοινό δείγμα που παρουσιάζεται στο τέλος κάθε σετ δειγμάτων (Cnt).



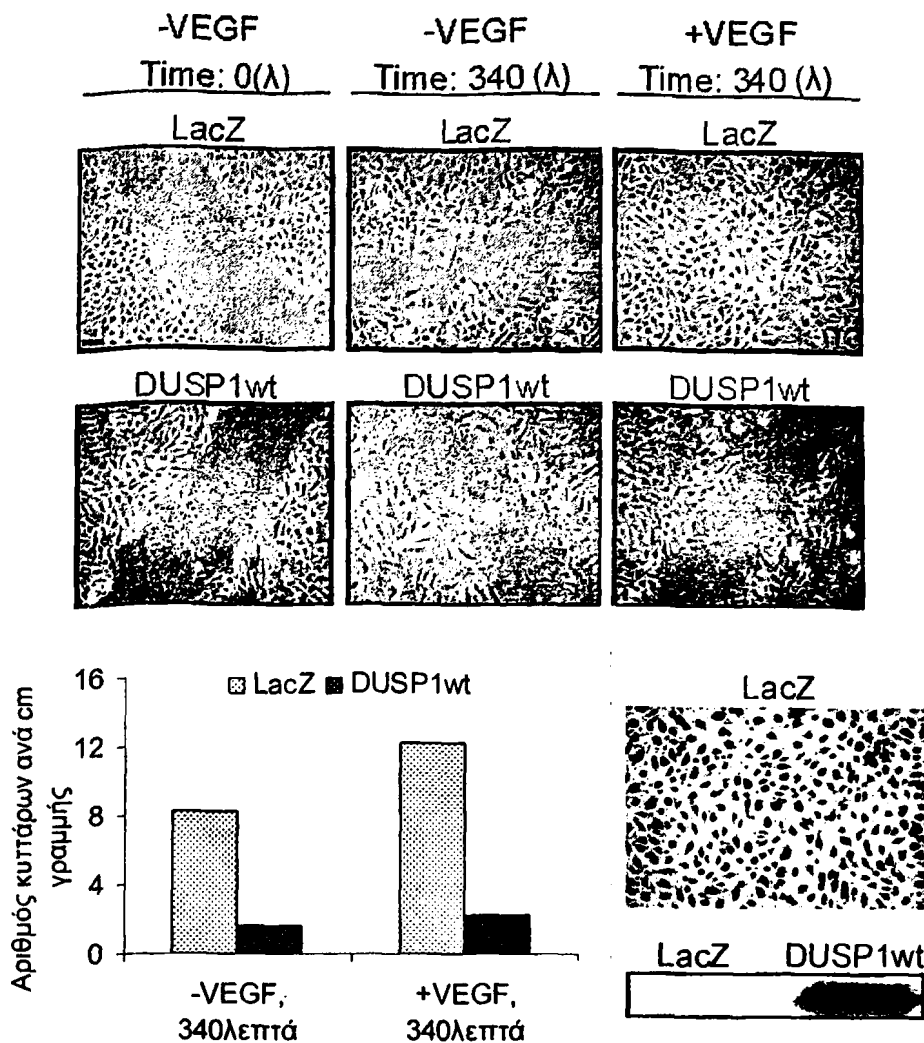
Πράγματι, η ταυτόχρονη έκφραση των DUSP1 και DUSP5 ανέστειλε σχεδόν ολοκληρωτικά την επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2 από τον VEGF-A, ενώ η υπερέκφραση των καταλυτικά ανενεργών μορφών DUSP1/CS και DUSP5/CS αύξησε εμφανώς τη φωσφορυλίωση των ERK1/2, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες. Η συμπληρωματικότητα αυτή πιθανά να επεκτείνεται και σε άλλες φωσφατάσες.

### **3.11. Η υπερέκφραση της DUSP1 αναστέλλει την προκαλούμενη από τον VEGF-A επαγωγή της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων**

Είναι γνωστό ότι η επαγωγή της p38 MAPK από τον VEGF-A στα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει τη μετανάστευση τους [94] [97]. Δείξαμε προηγουμένως ότι η DUSP1 εμφανίζει ειδικότητα προς την p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα (Εικόνα 37). Το επόμενο βήμα ήταν να μελετήσουμε, εάν η επίδραση της DUSP1 στην ενεργοποίηση της p38 MAPK από τον VEGF είχε αντίκτυπο στην από τον VEGF επαγόμενη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήσαμε βιντεοσκοπήση με τη χρήση μικροσκοπίου (video microscopy) με σκοπό να παρακολουθήσουμε την επούλωση τραύματος, το οποίο προκαλέσαμε σε μονοστιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων.

Όπως φαίνεται στο σχήμα 48, η μόλυνση των κυττάρων με τον αδενοϊό AdDUSP1wt είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της επαγόμενης από τον VEGF-A μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων, συγκριτικά με τα κύτταρα-μάρτυρες. Ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος (wound healing assay) έδειξε ότι η υπερέκφραση της DUSP1 ανέστειλε τόσο τη βασική (απουσία VEGF-A) όσο και την επαγόμενη από τον VEGF-A μετανάστευση των κυττάρων HUVE (Εικόνα 48, γράφημα). Αντίθετα, η υπερέκφραση της DUSP5 δεν είχε καμία επίδραση στην επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Έτσι, η DUSP1 εμφανίζεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρυθμίσση της από τον VEGF επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK και, ως εκ τούτου, στη ρύθμιση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF.



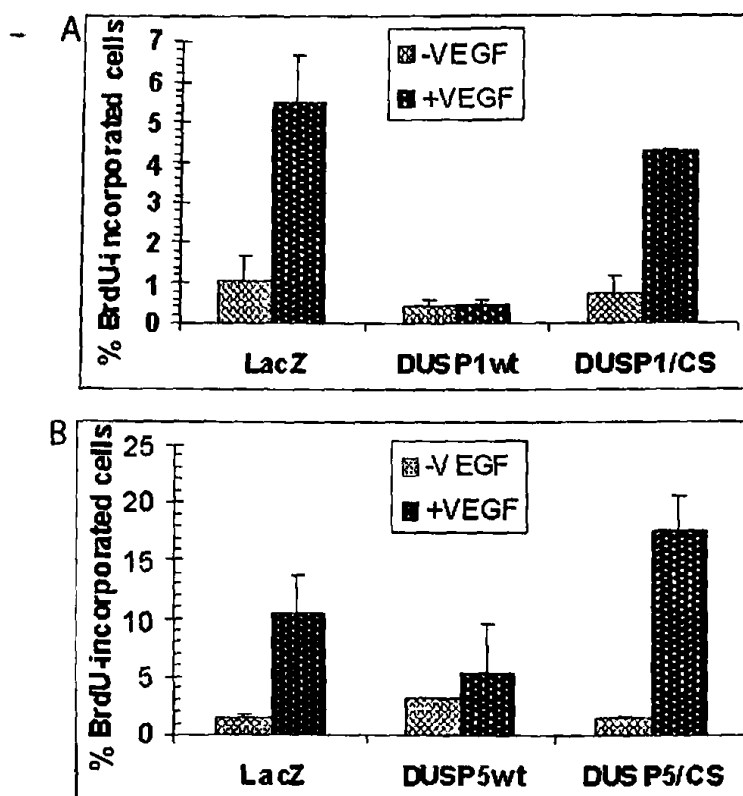


**Εικόνα 48:** Επίδραση της DUSP1 στην επαγόμενη μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF-A. Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν είτε με τον αδενοϊό AdLacZ είτε τον AdDUSP1wt σε MOI 200 για 24 ώρες. Στη συνέχεια, το πλήρες μέσο αντικαταστάθηκε από M199 εμπλουτισμένο με 5% FCS, η μονοστιβάδα των κυττάρων τραυματίστηκε με τη χρήση ενός πλαστικού και αποστειρωμένου ξύστη και ενεργοποιήθηκε από τον VEGF-A (10 ng/ml). Ακολούθησε βινεοσκόπηση με τη βοήθεια μικροσκοπίου σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Παρουσιάζονται εικόνες που ελήφθησαν στα χρονικά διαστήματα 0 και 340 λεπτά απουσία ή παρουσία VEGF-A. Τα κύτταρα που μετακινήθηκαν προς την τραυματισμένη περιοχή μετρήθηκαν και εκφράστηκαν ως αριθμός κυττάρων ανά cm<sup>2</sup> τραυματισμένης περιοχής (γράφημα, κάτω αριστερά). Η αποτελεσματικότητα της μόλυνσης από τον αδενοϊό-μάρτυρα και τα επίπεδα έκφρασης της DUSP1 εμφανίζονται κάτω δεξιά. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 100 μm. Το πείραμα που παρουσιάζεται είναι αντιπροσωπευτικό τριών ανεξάρτητων πειραμάτων.

### 3.12. Ο ρόλος της DUSP1 και DUSP5 στην προκαλούμενη από τον VEGF επαγωγή του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων

Είναι γνωστό ότι ο VEGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης των ERK1/2 [86]. Καθώς έχουμε δείξει ότι η υπερέκφραση των

DUSP1wt και DUSP5wt έχει συμπληρωματική δράση στην από τον VEGF-A επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2, ερευνήσαμε την επίδραση αυτών των φωσφατασών στον επαγόμενο από τον VEGF πολλαπλασιασμό των κυττάρων HUVE. Πράγματι, σε μολυσμένα ενδοθηλιακά κύτταρα με τους αδενοϊούς DUSP1 ή DUSP5 παρουσιάστηκε αναστολή της επαγόμενης από τον VEGF-A ενσωμάτωσης της βρωμοδεόξυ ουριδίνης (BrdU) συγκριτικά με τα κύτταρα που είχαν μολυνθεί με τον αδενοϊό-μάρτυρα LacZ (Εικόνα 49).



**Εικόνα 49: Επίδραση των DUSP1 και DUSP5 στον επαγόμενο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF-A.** Κύτταρα HUVE μολύνθηκαν είτε με τον αδενοϊό AdLacZ, είτε τον AdDUSP1wt είτε τον AdDUSP1/CS (A) ή αντίστοιχα με τους αδενοϊούς AdLacZ, ή AdDUSP5wt, ή AdDUSP5/CS (B) για 24 ώρες. Ακολούθησε δοκιμασία πολλαπλασιασμού με ενσωμάτωση BrdU σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Τα γραφήματα δείχνουν τα ποσοστά των επιμολυσμένων κυττάρων που ενσωμάτωσαν BrdU. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση των μετρήσεων μεταξύ τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων.

Ωστόσο, η υπερέκφραση της καταλυτικά ανενεργής φωσφατάσης DUSP5/CS κατέληξε σε υπερεπαγωγή (περίπου στο 170% του μάρτυρα) του πολλαπλασιασμού των HUVE κυττάρων από τον VEGF-A (Εικόνα 49B). Αντίθετα, η υπερέκφραση της DUSP1/CS οδήγησε σε υποεπαγωγή (περίπου στο 80% του μάρτυρα) του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων από τον VEGF-A (Εικόνα 49A). Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε πλήρη συμφωνία με τις προηγούμενες παρατηρήσεις σχετικά με την επίδραση



των DUSP1/CS και DUSP5/CS στην επαγόμενη από τον VEGF φωσφορύλιωση των ERK1/2 (Εικόνες 43 και 44) και υποδηλώνουν ότι ο ρόλος της DUSP5 είναι περισσότερο σημαντικός από το ρόλο της DUSP1 στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από επαγωγή με VEGF-A .

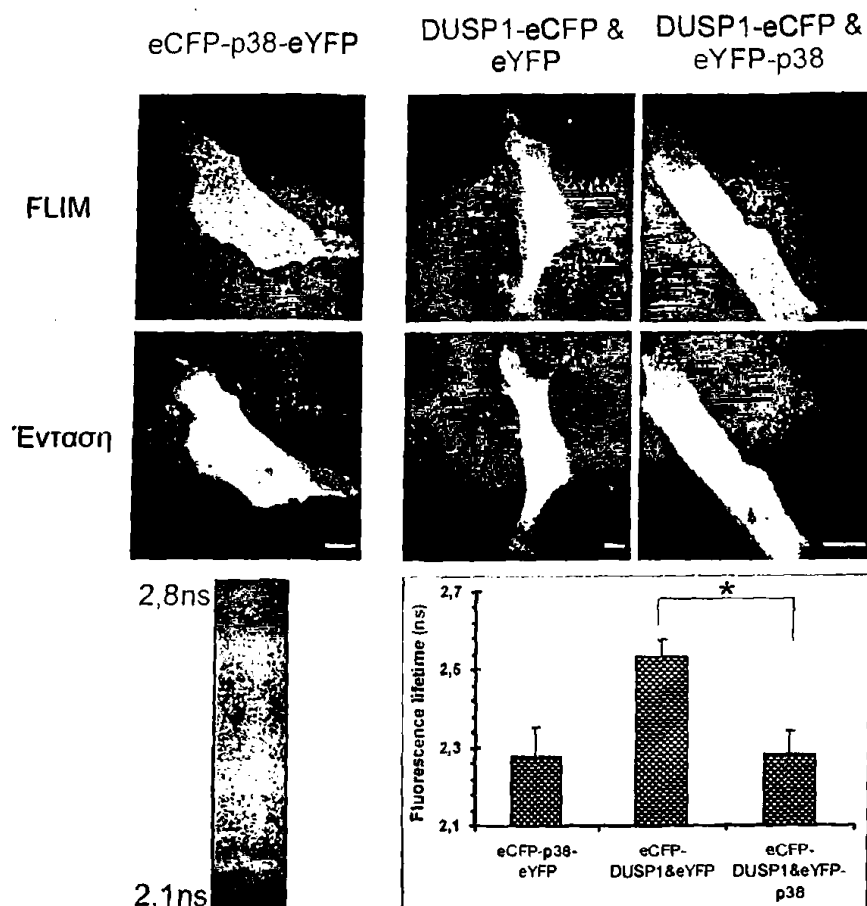
### **3.13. Οι MAPK p38 και ERK2 αλληλεπιδρούν με τις φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5 σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα**

Από τα προηγούμενα δεδομένα μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η DUSP1 αναστέλλει την επαγόμενη από τον VEGF μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων στοχεύοντας την φώσφο-p38. Από την άλλη πλευρά, η DUSP5 εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων που επάγεται από τον VEGF-A, μέσω της ρύθμισης των πυρηνικών επιπέδων των φώσφο-ERK1/2. αντίστοιχα. Με σκοπό να κατανοήσουμε καλύτερα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμων και υποστρωμάτων χρησιμοποιήσαμε την τεχνική FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy). Όπως αναπτύξαμε προηγουμένως, στην περίπτωση που οι σημασμένες φωσφατάσες με την πρωτεΐνη CFP (DUSP-CFP) αλληλεπιδρούν με τις σημασμένες κινάσες με την πρωτεΐνη YFP (MAPK-YFP), τότε παρατηρείται το φαινόμενο FRET, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου ζωής του φθορισμογόνου-δότη, CFP [275, 276]. Με αυτόν τον τρόπο μελετήσαμε το χρόνο ζωής φθορισμού της πρωτεΐνης CFP συντηγμένης με τη φωσφατάση DUSP1 (DUSP1-CFP) παρουσία της φθορίζουσας πρωτεΐνης YFP συντηγμένης με την p38 MAPK. Για την εξασφάλιση της σωστής λειτουργίας του συστήματος μικροσκοπίας χρησιμοποιήσαμε στην αρχή κάθε πειράματος κύτταρα που εξέφραζαν την DNA κατασκευή YFP-p38-CFP ως θετικό μάρτυρα. Αντίθετα, ως αρνητικό μάρτυρα χρησιμοποιήσαμε κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την πρωτεΐνη DUSP1-CFP και με το φορέα που εξέφραζε την πρωτεΐνη YFP.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 50, στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με την κατασκευή DUSP1-CFP και το φορέα που εξέφραζε την πρωτεΐνη YFP, ο χρόνος ζωής φθορισμού της CFP υπολογίστηκε σε  $2.53 \pm 0.04$  ns. Αντίθετα, παρουσία p38-YFP ο χρόνος ζωής φθορισμού της CFP υπολογίστηκε σε  $2.28 \pm 0.06$  ns σημειώνοντας μείωση 10% συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Σε συμφωνία με τα προηγούμενα πειράματα για την πυρηνική και κυτταροπλασματική εντόπιση της DUSP1, η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (CFP-DUSP1 και p38-YFP) παρατηρήθηκε τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα (Εικόνα 50).



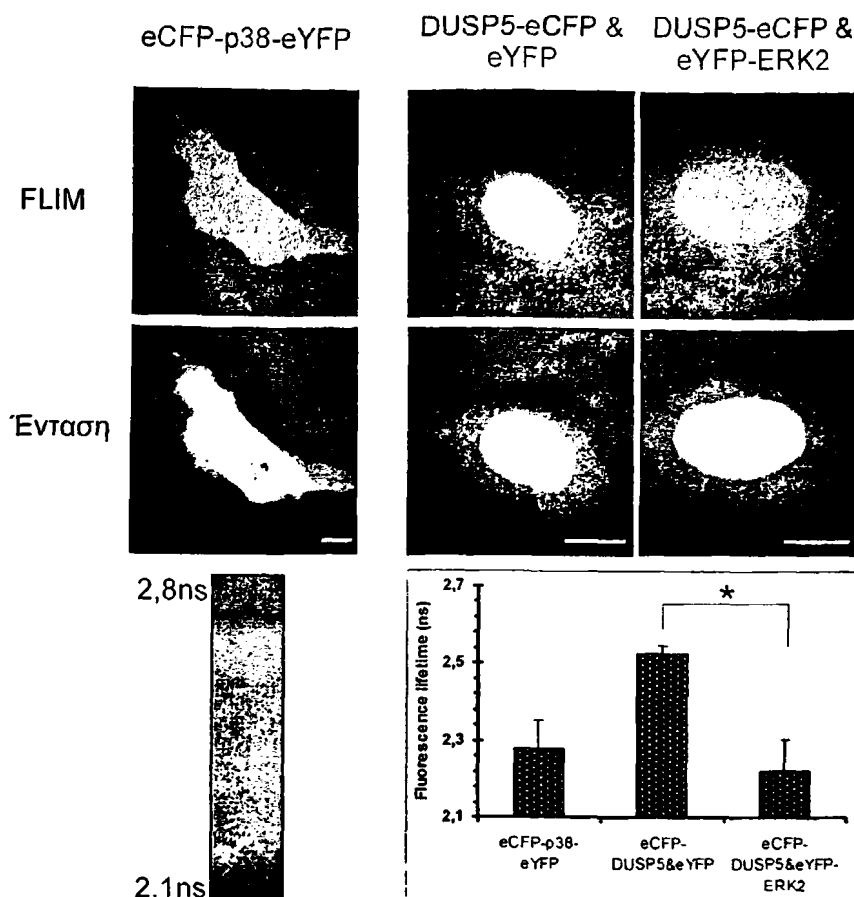




**Εικόνα 50: Προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ των DUSP1 και p38 MAPK με πειράματα FLIM σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο επικαλυμμένο με κολλαγόνο. Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων με τις DNA κατασκευές CFP-p38-YFP ή DUSP1-CFP και YFP ή DUSP1-CFP και YFP-p38. Μετά από 24 ώρες, ακολούθησαν πειράματα FLIM σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Παρουσιάζονται οι εικόνες έντασης της CFP και οι εικόνες χρόνου ζωής του φθορισμού σύμφωνα με τον αυθαιρέτο καθορισμό των χρωμάτων, όπως παρουσιάζεται στη ράβδο (κάτω αριστερά). Στο γράφημα παρουσιάζεται ο μέσος χρόνος ζωής φθορισμού  $\pm$  τυπική απόκλιση. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10  $\mu$ m. Το πείραμα που παρουσιάζεται είναι αντιπροσωπευτικό τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P < 0.0001$

Παρομοίως, ο χρόνος ζωής φθορισμού της DUSP5-CFP μειώθηκε στατιστικά σημαντικά κατά 12%, από  $2.53 \pm 0.02$  ns (παρουσία του φορέα YFP) σε  $2.22 \pm 0.07$  ns παρουσία της ERK2-CFP. Αυτή η αλληλεπίδραση ήταν αποκλειστικά περιορισμένη στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 51). Καταλήγουμε, λοιπόν, ότι οι φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5 αλληλεπιδρούν με τις κινάσες p38 και ERK2, αντίστοιχα, σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα.



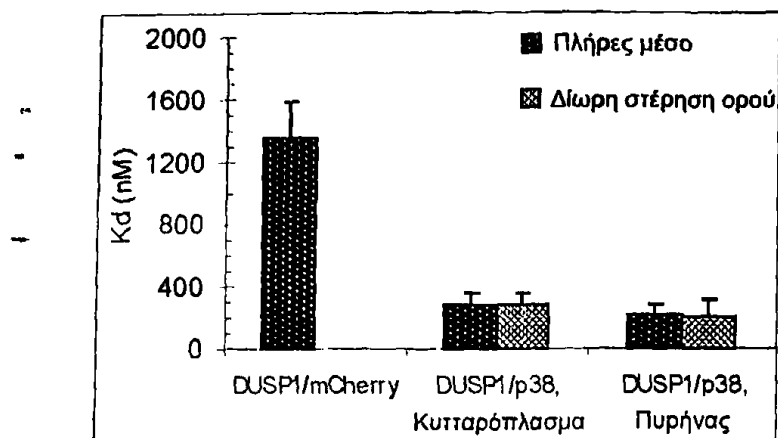


**Εικόνα 51: Προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης μεταξύ των DUSP5 και ERK2 με πειράματα FLIM σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο επικαλυμμένο με κολλαγόνο. Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων με τις DNA κατασκευές CFP-p38-YFP ή DUSP5-CFP και YFP ή DUSP5-CFP και YFP-ERK2. Μετά από 24 ώρες, ακολούθησαν πειράματα FLIM σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Παρουσιάζονται οι εικόνες έντασης της CFP και οι εικόνες χρόνου ζωής του φθορισμού σύμφωνα με τον αυθαίρετο καθορισμό των χρωμάτων, όπως παρουσιάζεται στη ράβδο (κάτω αριστερά). Στο γράφημα παρουσιάζεται ο μέσος χρόνος ζωής φθορισμού  $\pm$  τυπική απόκλιση. Στις εικόνες μικροσκοπίας η ράβδος αντιπροσωπεύει 10  $\mu$ m. Το πείραμα που παρουσιάζεται είναι αντιπροσωπευτικό τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $P < 0.0001$

### 3.14. Ο VEGF επηρεάζει την αλληλεπίδραση των p38 με DUSP1 και ERK2 με DUSP5 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων

Στη συνέχεια υπολογίσαμε την ισχύ της αλληλεπίδρασης μεταξύ DUSP1 και p38 MAPK χρησιμοποιώντας την τεχνική FCCS σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα HUVE. Μετά από την υπερέκφραση των πρωτεϊνών DUSP1-GFP και p38-mCherry και καλλιέργεια των κυττάρων για 24 ώρες σε πλήρες μέσο, υπολογίσαμε τη σταθερά διάστασης (Kd) ίση με  $291 \pm 62$  nM και  $209 \pm 27$  nM στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε για την αλληλεπίδραση των δύο παραπάνω πρωτεϊνών σε κύτταρα που

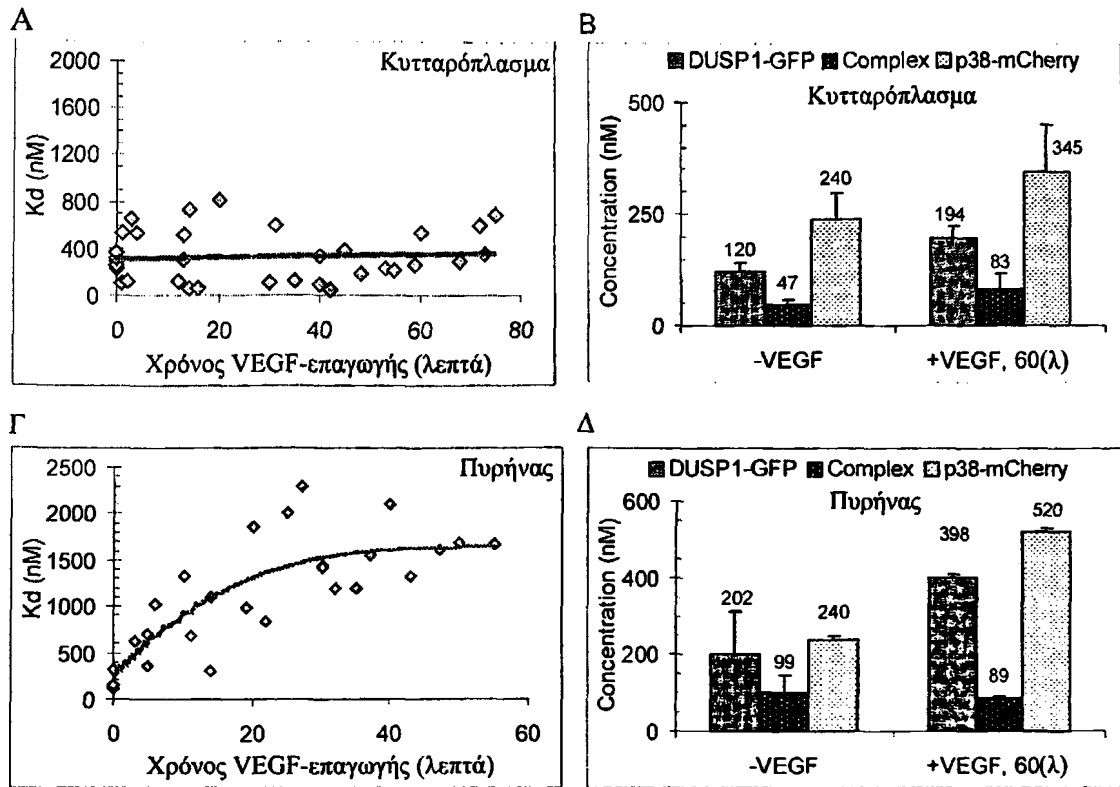
είχαν υποστεί έλλειψη ορού για 2 ώρες, όπου η τιμή Kd υπολογίστηκε σε  $294 \pm 23$  nM και  $197 \pm 66$  nM στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, αντίστοιχα (Εικόνα 52).



**Εικόνα 52: Προσδιορισμός της σταθεράς διάστασης (Kd) μεταξύ των DUSP1 και p38 MAPK με τη χρήση FCCS.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο επικαλυμμένο με κολλαγόνο. Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων με τις DNA κατασκευές GFP-p38-mCherry ή DUSP1-GFP και mCherry ή DUSP1-GFP και p38-mCherry. Μετά από 24 ώρες ακολούθησαν πειράματα FCCS σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Παρουσιάζονται οι τιμές μέσου όρου της Kd για τις αλληλεπιδράσεις DUSP1/mCherry και DUSP1/p38 σε 20-50 κύτταρα καλλιεργημένα σε πλήρες μέσο ή μετά από δίωρη στέρηση ορού. Στο γράφημα παρουσιάζεται ο μέσος όρος  $\pm$  τυπική απόκλιση της σταθεράς διάστασης.

Ακολούθως, εξετάσαμε την επίδραση του VEGF-A στην αλληλεπίδραση μεταξύ DUSP1 και p38 MAPK. Όπως φαίνεται στην εικόνα 53Γ η παρουσία του VEGF είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθεράς διάστασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών στον πυρήνα από  $197 \pm 66$  nM σε  $1505 \pm 256$  nM. Αντίθετα, στο κυτταρόπλασμα η αλληλεπίδραση μεταξύ DUSP1 και p38 MAPK δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του VEGF-A (Εικόνα 53, Α). Υπολογίζοντας τις συνολικές συγκεντρώσεις των DUSP1 και p38 MAPK στο κυτταρόπλασμα, καθώς και το ποσοστό αυτών που βρίσκονταν στο σύμπλοκο, το 39% της συνολικής DUSP1-GFP βρέθηκε συνδεδεμένο με το p38 MAPK και παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητο (42%) 60 λεπτά μετά από επαγωγή με VEGF (Εικόνα 53, Β). Αντίθετα, στον πυρήνα των κυττάρων, η παρουσία του VEGF μείωσε το ποσοστό της DUSP1-GFP που βρισκόταν στο σύμπλοκο με το p38 MAPK από 49% σε 22% μετά από 60 λεπτά ενεργοποίησης από τον αυξητικό παράγοντα (Εικόνα 53, Δ).

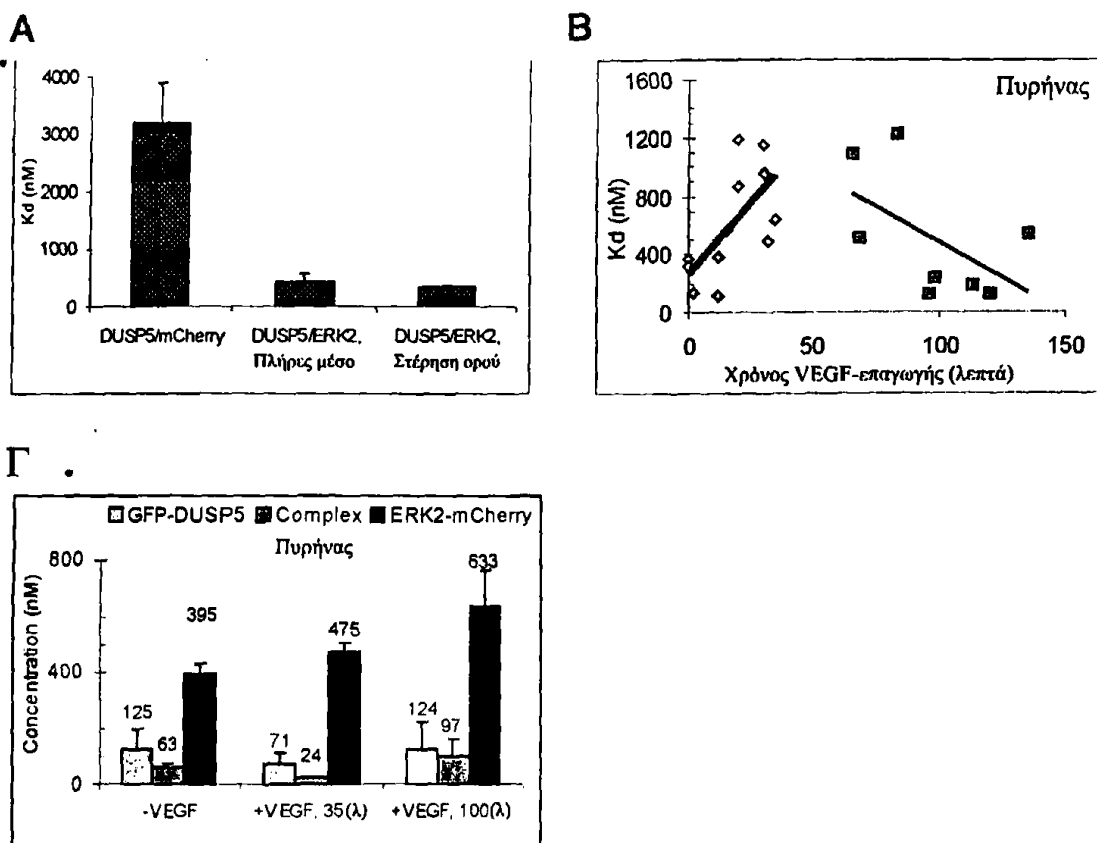




**Εικόνα 53: Προσδιορισμός της σταθεράς διάστασης (Kd) μεταξύ των DUSP1 και p38 MAPK με τη χρήση FCCS.** Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο επικαλυμμένο με κολλαγόνο. Ακολούθησε διαμόλυνση των κυττάρων με τις DNA κατασκευές GFP-p38-mCherry ή DUSP1-GFP και mCherry ή DUSP1-GFP και p38-mCherry. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF για χρονικά διαστήματα μέχρι 60 λεπτά και ακολούθησαν πειράματα FCCS σύμφωνα με τα Υλικά και Μέθοδοι. Παρουσιάζονται οι τιμές Kd για την αλληλεπίδραση DUSP1/p38 παρουσία VEGF σε κυτταρόπλασμα (A) και πυρήνα (Γ) κυττάρων HUVE. Επίσης, παρουσιάζονται οι συνολικές συγκεντρώσεις DUSP1-GFP και p38-mCherry μετά από διαμόλυνση των κυττάρων, καθώς και το ποσό των DUSP1-GFP και p38-mCherry που βρίσκονται στο σύμπλοκο στο κυτταρόπλασμα (B) και στον πυρήνα (Δ). Στα γραφήματα παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση μέσου όρου των συγκεντρώσεων.

Με ανάλογο τρόπο μελετήσαμε το σύμπλοκο των DUSP5 και ERK2 πριν και μετά από επαγωγή των κυττάρων με VEGF-A. Αρχικά, διαμολώναμε τα κύτταρα με τις DNA κατασκευές DUSP5-GFP και ERK2-mCherry και εξετάσαμε με FCCS τη σταθερά διάστασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα καλλιεργημένα σε πλήρες μέσο ή σε κύτταρα που είχαν υποστεί στέρηση ορού για 2 ώρες. Όπως φαίνεται στο σχήμα 54A, η σταθερά διάστασης υπολογίστηκε  $441 \pm 135$  nM και  $345 \pm 37$  nM στις δύο περιπτώσεις, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ DUSP1 και p38 MAPK είναι ισχυρότερη από την αλληλεπίδραση μεταξύ DUSP5 και ERK2. Βέβαια, στην τελευταία περίπτωση, μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μόνο στον πυρήνα των κυττάρων καθώς, όπως δείξαμε προηγουμένως, η DUSP5 έχει αποκλειστικά πυρηνική εντόπιση. Η ενεργοποίηση των κυττάρων από τον

VEGF-A είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθεράς διάστασης,  $K_d$ , σε  $816 \pm 310$  nM, στα πρώτα 35 λεπτά επαγωγής από τον αυξητικό παράγοντα (Εικόνα 54, Β). Ωστόσο, στη συνέχεια η σταθερά διάστασης μεταξύ των δύο πρωτεϊνών μειώθηκε και επανήλθε στα ακόμα χαμηλότερα από τα αρχικά επίπεδα ( $150 \pm 38$  nM), πριν την ενεργοποίηση των κυττάρων από τον VEGF-A (Εικόνα 54, Β). Συνεπώς, σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα το 50% της συνολικής GFP-DUSP5 συγκέντρωσης βρίσκεται σε σύμπλοκο με την ERK2-mCherry. Μετά από 35 λεπτά επαγωγής από τον VEGF-A, το ποσοστό της δεσμευμένης GFP-DUSP5 στο σύμπλοκο με την ERK2-mCherry μειώθηκε σε 34%, ενώ στα επόμενα 100 λεπτά (συνολικά 130 λεπτά επαγωγής) το ποσοστό αυξήθηκε στο 78% (Σχήμα 54, Γ).



**Εικόνα 54: Προσδιορισμός της σταθεράς διάστασης ( $K_d$ ) μεταξύ των DUSP5 και ERK2 με τη χρήση FCCS. Κύτταρα HUVE καλλιεργήθηκαν σε θάλαμο επικαλυμμένο με κολλαγόνο, Ακολούθησε διαμόλυση των κυττάρων με τις DNA κατασκευές GFP-p38-mCherry ή DUSP5-GFP και mCherry ή DUSP5-GFP και ERK2-mCherry. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα ενεργοποιήθηκαν με VEGF-A για χρονικά διαστήματα 35 και 100 λεπτών και ακολούθησαν πειράματα FCCS σύμφωνα με τα Υλικά και Μεθόδους. Παρουσιάζονται οι τιμές  $K_d \pm$  τυπική απόκλιση για την αλληλεπίδραση DUSP5/ERK2 σε πλήρες μέσο καλλιέργειας κυττάρων και μετά από 2ωρη στέρωση ορού (Α). Επίσης παρουσιάζονται οι τιμές  $K_d$  για την αλληλεπίδραση DUSP5/ERK2 παρουσία VEGF-A στον πυρήνα κυττάρων HUVE (Β). Στο γράφημα απεικονίζονται οι συνολικές συγκεντρώσεις DUSP5-GFP και ERK2-mCherry μετά από διαμόλυση των κυττάρων, καθώς και η συγκέντρωση των DUSP5-GFP και ERK2-mCherry που βρίσκονται σε σύμπλοκο πριν από την επαγωγή με VEGF, σε 35 και 130 λεπτά επαγωγής από VEGF-A (Γ). Στα γραφήματα παρουσιάζεται η τυπική απόκλιση μέσου όρου των συγκεντρώσεων.**

Συμπερασματικά, οι φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5 αλληλεπιδρούν με τις MAPKs p38 και ERK2, αντίστοιχα. Η παρουσία του VEGF-A επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα σύμπλοκα DUSP1/p38 και DUSP5/ERK2 συμπεριφέρονται διαφορετικά μετά από την επαγωγή των κυττάρων. Η σημαντική μείωση της σταθεράς διάστασης μεταξύ των DUSP5 και ERK2 μετά από διέγερση με VEGF είναι συμβατή με την πυρηνική αγκυροβόληση και συσσωρεύση των ERK1/2 από την DUSP5 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Εικόνα 45).



#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Την τελευταία δεκαετία οι μικροσυστοιχίες DNA χρησιμοποιήθηκαν εκτενώς με σκοπό την μαζική μελέτη της γονιδιακής έκφρασης σε πολλά είδη κυττάρων. Επίσης, έχει μελετηθεί η ρύθμιση γονιδίων από τον VEGF-A στα ενδοθηλιακά κύτταρα [78, 277] ωστόσο οι μελέτες αυτές εξέτασαν την έκφραση περιορισμένου αριθμού γονιδίων χωρίς μελέτη της κινητικής τους. Στην παρούσα διατριβή μελετήσαμε την έκφραση 22,000 γονιδίων μετά από ενεργοποίηση από τον VEGF σε πολλαπλά χρονικά διαστήματα (3, 6, 12, 17 και 22 ωρών). Από το σύνολο των γονιδίων που μελετήθηκε, τα 116 γονίδια ρυθμίστηκαν θετικά από τον VEGF, ενώ η έκφραση 30 γονιδίων αναστάλθηκε παρουσία του αυξητικού παράγοντα. Πάνω από 20 γονίδια ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της qRT-PCR, η οποία επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών DNA για το σύνολο των εξετασθέντων γονιδίων. Ανάμεσα στα γονίδια των οποίων η έκφραση αυξήθηκε από την παρουσία του VEGF-A ήταν και δύο φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης, οι DUSP1 και DUSP5, παρουσιάζοντας μέγιστα επίπεδα mRNA μετά από 30 και 60 λεπτά επαγωγής από τον VEGF-A, αντίστοιχα. Παρόλο που αρκετές εργασίες αναφέρονται στο ρόλο των παραπάνω φωσφατασών στη ρύθμιση των MAPK, μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν ερευνητικά αποτελέσματα που συνέδεαν την μεταγραφική ρύθμιση των DUSPs με τον VEGF και τις βασικές αγγειογενετικές αποκρίσεις των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση. Ανάμεσα στα 22,000 γονίδια που εξετάστηκαν με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών DNA ήταν και 15 άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας φωσφατασών, των οποίων η έκφραση δεν επηρεάστηκε από τον VEGF, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο VEGF-A ρυθμίζει, τουλάχιστον σε μεταγραφικό επίπεδο, αποκλειστικά τις φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5.

Η ισχυρή αύξηση στα επίπεδα του mRNA της DUSP1 (20-φορές σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες) από την παρουσία του VEGF δεν προκάλεσε ανάλογη αύξηση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της φωσφατάσης (μόλις 3-φορές). Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι ο VEGF-A μείωσε το χρόνο ημιζωής της DUSP1 εξισορροπώντας την αύξηση της μεταγραφής του γονιδίου *DUSP1*. Φαίνεται λοιπόν ότι ο VEGF-A αυξάνει τόσο την ενεργοποίηση του *DUSP1* γονιδίου όσο και την αποικοδόμηση της DUSP1 πρωτεΐνης, έτσι ώστε τα επίπεδα της DUSP1 να είναι το προϊόν μιας δυναμικής ισορροπίας μεταξύ των δύο αυτών διαδικασιών. Το συμπέρασμα αυτό υποστηρίζεται από βιβλιογραφικά δεδομένα όπου η πρόσδεση της φωσφορυλιωμένης ERK1/2 στο τμήμα DEF (docking site for ERK, FXFP) της DUSP1 οδηγεί στη διπλή φωσφορυλίωση της φωσφατάσης από την κινάση στα κατάλοιπα σερίνης 296 και 323, διευκολύνοντας τη σύνδεση του SCF<sup>Skp2</sup> που ενεργοποιεί τελικά την



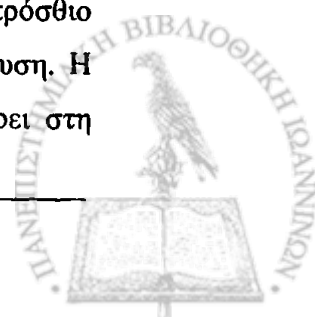
προτεόλυση της DUSP1 [212]. Ομοίως, η φωσφορυλίωση της DUSP6/MKP-3 από τις ERK1/2 οδηγεί στην αποικοδόμηση της φωσφατάσης [278]. Κατά τον ίδιο τρόπο, η επαγόμενη φωσφορυλίωση των ERK1/2 από τον VEGF είναι πιθανώς υπεύθυνη για τη ρύθμιση του χρόνου ημιζωής της DUSP1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Είναι ωστόσο πιθανό, ότι και η ενεργή p38 MAPK μπορεί να συμμετέχει στη ρύθμιση των πρωτεϊνικών επιπέδων της DUSP1. Εν τούτοις, μία τέτοιου είδους ρύθμιση δεν έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία. Θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο να πραγματοποιηθούν παρόμοια πειράματα και για τη δεύτερη φωσφατάση, DUSP5. Δυστυχώς, δεν υπάρχει κανένα εμπορικά διαθέσιμο και αξιόπιστο αντίσωμα και οι προσπάθειες που κάναμε για την κατασκευή ενός αποτελεσματικού αντισώματος δεν είχαν θετικό αποτέλεσμα.

Ο VEGF-A διεγείρει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενεργοποίησης της p38 MAPK, η οποία με τη σειρά της προκαλεί τη φωσφορυλίωση της HSP27 [94, 97] και της LIMK1 [198], με τελικό αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τη δημιουργία ινιδίων στρες, τα οποία είναι απαραίτητα για την μετακίνηση του κυττάρου. Η υπερέκφραση της DUSP1 σε κύτταρα HUVE είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη αναστολή της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF και τη δραματική μείωση της βασικής, αλλά και της επαγόμενης από τον VEGF μετανάστευσης των κυττάρων. Επιπλέον, η υπερέκφραση της αρνητικά επικρατούσας (καταλυτικά ανενεργής) μορφής της DUSP1 (DUSP1/CS) προκάλεσε την αύξηση των επιπέδων καθώς και της διάρκειας της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF-A. Από την άλλη πλευρά, η υπερέκφραση των αντιστοιχών μορφών της DUSP5 δεν είχε καμία επίδραση στη φωσφορυλίωση της p38 MAPK. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, συμπεραίνουμε ότι η DUSP1 είναι η βασική φωσφατάση που ρυθμίζει την ένταση και διάρκεια της από τον VEGF-A επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με ερευνητικά δεδομένα που δείχνουν εκλεκτικότητα της DUSP1 προς την p38 MAPK [279]. Όπως δείχνουν πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα, ο καταλυτικός στόχος της DUSP1, δηλ. η p38 MAPK, είναι συνάμα και ο διαβιβαστής του σήματος που ενεργοποιεί την μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου *DUSP1*. Πράγματι, η υπερέκφραση της καταλυτικά ενεργής MEK6 (MEK6E) προκαλεί την αύξηση της έκφρασης της DUSP1, ενώ η χορήγηση του αναστολέα της p38 MAPK, SB203580, αναστέλλει την επαγόμενη έκφραση της DUSP1 από την MEK6E σε κύτταρα HUVE [96]. Επιπλέον, η αύξηση της έκφρασης της DUSP1 από την p38 MAPK ρυθμίζεται από τον καθοδικό στόχο της p38 MAPK, MK2 [280]. Έτσι, η μεταγραφική ενεργοποίηση του γονιδίου της DUSP1 από τον VEGF-A φαίνεται να λειτουργεί ως αναδραστική ρύθμιση στη φωσφορυλίωση της p38 MAPK από τον ίδιο



αυξητικό παράγοντα. Πράγματι, τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DUSP1 επήχθησαν κατά 3 φορές μετά από 30 λεπτά παρουσίας του VEGF-A, χρονικό σημείο που συμπίπτει με τη μείωση των επιπέδων της φώσφο-p38 MAPK, παρά την ικανοποιητική ενεργοποίηση της ανοδικής κινάσης MEK3/6 στο χρονικό αυτό σημείο. Συμπερασματικά, η DUSP1 αποτελεί κρίσιμο συστατικό ενός μοριακού κυκλώματος που ελέγχεται από τον VEGF με τελικό σκοπό την αυτορύθμιση της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK και της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Η DUSP1 θεωρείται επαγόμενη φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης εντοπισμένη αποκλειστικά στον πυρήνα [220]. Ωστόσο, τα πειράματα ανοσοφθορισμού, μικροσκοπίας απεικόνισης χρόνου ζωής φθορισμού και φασματοσκοπίας συσχετισμού φθορισμού που πραγματοποιήσαμε, στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αποδεικνύουν αναμφισβήτητα ότι σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιου λώρου η DUSP1 εντοπίζεται όχι μόνο στον πυρήνα αλλά και στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Προφανώς, η κυτταροπλασματική DUSP1 είναι αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των ενδοθηλιακών κυττάρων που προάγει τις ιδιαίτερες λειτουργίες τους. Πράγματι, η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά την αγγειογένεση περιλαμβάνει κυρίως μεταβολές του κυτταροσκελετού, οι οποίες συμβαίνουν στο κυτταρόπλασμα. Οι πρωτεΐνες HSP27 και LIMK1, οι καθοδικοί στόχοι της ενεργοποιημένης p38 MAPK από τον VEGF-A που ρυθμίζουν τη μετανάστευση, είναι επίσης κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες. Πραγματοποιώντας πειράματα μικροσκοπίας φθορισμού δείχνουμε ότι μετά από ενεργοποίηση με VEGF-A, στο 30% των κυττάρων η φωσφορυλιωμένη p38 MAPK συνεντοπίζεται με τη φλοιώδη ακτίνη (cortical actin). Αυτή η παρατήρηση είναι ανάλογη της εντόπισης της φώσφο-p38 MAPK σε λεία μυϊκά κύτταρα παρουσία PDGF. Σε αυτά τα κύτταρα η φώσφο-p38 MAPK εντοπίζεται στη βάση των πτυχωτών προεκτάσεων (lamellipodia) του κυττάρου, όπου βρίσκεται και η HSP27, επιτρέποντας τον πολυμερισμό της ακτίνης και την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού [188]. Θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η μη-φωσφορυλιωμένη HSP27 είναι μία καλυπτήρια πρωτεΐνη (capping protein) της ακτίνης, η οποία συνεισφέρει στη δημιουργία βραχύ και διακλαδωμένου δικτύου ακτίνης στο πρόσθιο μέρος του μετακινούμενου κυττάρου. Η φωσφορυλίωση της HSP27 από την P-p38, στη βάση των πτυχωτών προεκτάσεων, καταργεί αυτή τη δράση-κάλυψης και οδηγεί στην αποκάλυψη των συν άκρων (Plus end) των ινιδίων ακτίνης. Με αυτόν τον τρόπο σταθεροποιείται το δίκτυο της ακτίνης, καθώς αποτελείται από μακριά, μη διακλαδωμένα ινίδια ακτίνης. Η αναδιαμόρφωση της ακτίνης, τόσο στο πρόσθιο άκρο όσο και στη βάση του κυττάρου, είναι σημαντική στην κυτταρική μετανάστευση. Η ενεργοποίηση της LIMK1 από τον VEGF-A, μέσω p38 MAPK, επίσης συνεισφέρει στη



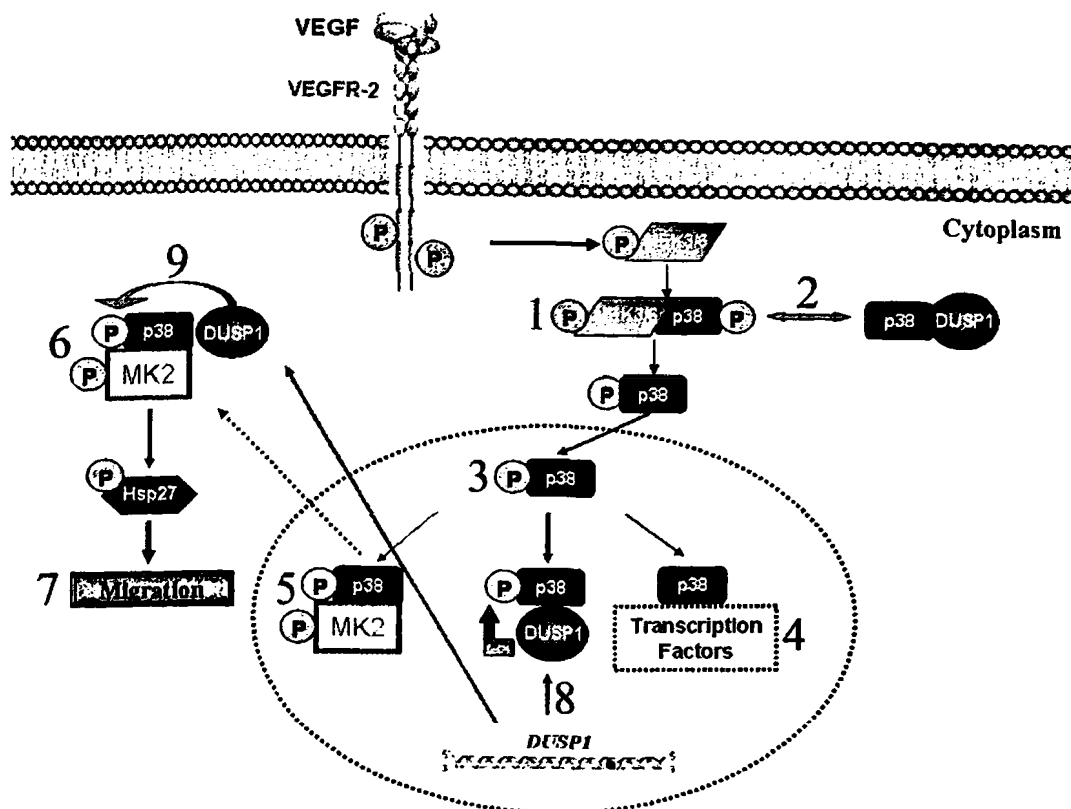
δυναμική της ακτίνης του κυτταροσκελετού, καθώς φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τον παράγοντα αποπολυμερισμού της ακτίνης, κοφιλίνη, με αποτέλεσμα τη διέγερση δημιουργίας ινιδίων στρες και τη μετακίνηση του κυττάρου [198]. Συμπερασματικά, η κυτταροπλασματική εντόπιση της DUSP1 στα ενδοθηλιακά κύτταρα πιθανώς να αποτελεί το ρυθμιστή της έντασης και διάρκειας της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK από τον VEGF και της επαγόμενης μετανάστευσης των κυττάρων.

Σύμφωνα με τα πειράματα FCCS και FLIM, η κυτταροπλασματική και πυρηνική DUSP1 βρίσκεται σε σύμπλοκο με τη μη-φωσφορυλιωμένη p38 MAPK, με  $K_D$  200 και 150 nM, αντίστοιχα. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η δεσμευμένη DUSP1 με τη p38 MAPK είναι καταλυτικά ενεργή [244]. Συνεπώς, η συγκέντρωση της κυτταροπλασματικής DUSP1 πιθανώς να λειτουργεί σαν κατώφλι ενεργοποίησης της p38 MAPK, με αποτέλεσμα να απαιτείται ικανή ενεργοποίηση των MEK3/6 από τον VEGF-A για να ξεπεραστεί η αποφωσφορυλιωτική της δράση. Τα υψηλότερα επίπεδα της κυτταροπλασματικής και πυρηνικής DUSP1 μετά από 30 λεπτά επαγωγής με VEGF-A προφανώς ανατρέπουν το συσχετισμό των καταλυτικών δραστηριοτήτων μεταξύ φωσφατασών και κινασών, με αποτέλεσμα τη μείωση της φωσφορυλίωσης της p38 MAPK. Θα πρέπει, ωστόσο, να τονίσουμε ότι εκτός από την ισορροπία μεταξύ της δραστηριότητας κινασών και φωσφατασών, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ κινασών, φωσφατασών, ικριωμάτων και υποστρωμάτων στο τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης της p38 MAPK. Πράγματι, όλες οι MAPKs έχουν μία περιοχή ελλιμενισμού (CD και ED περιοχές), στην οποία προσδέονται οι ανοδικές κινάσες ενεργοποίησης, οι καθοδικές πρωτεΐνες-στόχοι και οι φωσφατάσες απενεργοποίησης. Οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις MAPKs έχουν μία περιοχή υπεύθυνη για αυτή την αλληλεπίδραση που ονομάζεται περιοχή αλληλεπίδρασης με τις MAPKs (Kinase interacting motif, KIM). Οι KIM ανταγωνίζονται μεταξύ τους για την πρόσδεση στις MAPKs [129]. Για παράδειγμα, η πυρηνική p38 MAPK σχηματίζει ετεροδιμερές είτε με την DUSP1, όπως δείχθηκε στην παρούσα εργασία, είτε με την καθοδική πρωτεΐνη-στόχο MK2a [187], ένα μόριο που φωσφορυλιώνεται από την p38 MAPK και έχει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση των HSP27 και LIMK1 [198, 281]. Έτσι, η επαγόμενη από τον VEGF-A φώσφο-p38 MAPK, αφού εισέλθει στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων έχει τρεις επιλογές. (Α) Μπορεί να προσδεθεί σε μεταγραφικούς παράγοντες, όπως ο MEF2c, και να διεγείρει τη γονιδιακή έκφραση παρουσία VEGF-A. Αυτό αντικατροπτίζεται στην ισχυρή αύξηση του  $K_D$  για την αλληλεπίδραση p38/DUSP1 στα πειράματα FCCS, καθώς το φώσφο-p38-mCherry που εισέρει στον πυρήνα δεν εμφανίζει την ίδια κινητικότητα με την DUSP1-GFP. Ωστόσο, στη μείωση της αλληλεπίδρασης μεταξύ p38

και DUSP1 πιθανώς συνεισφέρει και η επαγωγή της έκφρασης πρωτεϊνών, όπως μεταγραφικών παραγόντων, από τον VEGF-A, οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένη συγγένεια για την p38 MAPK. Οι μεταγραφικοί παράγοντες μετά την φωσφορυλίωσή τους απευλευθερώνονται από το φώσφο-p38, το οποίο μπορεί να συνδεθεί με μία άλλη πρωτεΐνη.

(B) Η φωσφορυλιωμένη p38 MAPK προσδένει και ενεργοποιεί την MK2a σε θέσεις φωσφορυλίωσης που περιλαμβάνουν το κατάλοιπο Thr334 [187]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναδιαμόρφωση της πρωτεΐνης και την έκθεση του σήματος εξόδου από τον πυρήνα. Έτσι, το ετεροδιμερές φώσφο-p38/φώσφο-MK2a εξέρχεται του πυρήνα και ενεργοποιεί κυτταροπλασματικά υποστρώματα [187]. Στη συνέχεια, υποστρώματα όπως η HSP27 και η LIMK1 ρυθμίζουν την επαγόμενη μετανάστευση των κυττάρων από τον VEGF. Πριν εξέλθει από τον πυρήνα το φώσφο-p38/φώσφο-MK2a ετεροδιμερές ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της DUSP1 [280]. Η έξοδος του συμπλόκου φώσφο-p38/φώσφο-MK2a από τον πυρήνα, σταθεροποιεί τη σταθερά αλληλεπίδρασης  $K_D$  των δύο πρωτεϊνών, η οποία παύει να αυξάνεται. (Γ) Η φώσφο-p38 MAPK συναντά την DUSP1, με αποτέλεσμα την αποφωσφορυλίωση και απενεργοποίηση της κινάσης. Καθώς τα επίπεδα της DUSP1 στον πυρήνα αυξάνονται συνεχώς από τον VEGF-A, η φώσφο-p38 MAPK συναντά όλο και πιο συχνά την DUSP1 με επακόλουθο την αποφωσφορυλίωση της φώσφο-p38 MAPK και την παύση της ενεργοποίησης των υποστρωμάτων της. Επίσης διακόπτεται και η εξαγωγή του ετεροδιμερούς φώσφο-p38/MK2 από τον πυρήνα και, με αυτόν τον τρόπο, αναστέλλεται η μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με το ίδιο τρόπο, τα αυξανόμενα επίπεδα της κυτταροπλασματικής DUSP1 ανταγωνίζονται με την MK2a για πρόσδεση στο σύμπλοκο φώσφο-p38/φώσφο-MK2, το οποίο έχει προηγουμένως εξαχθεί από τον πυρήνα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της p38 MAPK και, επομένως, τον τερματισμό της ενεργοποίησης της MK2a και των υποστρωμάτων της, HSP27 και LIMK1. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφέρουμε ότι η αλληλεπίδραση της φώσφο-p38 με την MK2a είναι 10-φορές πιο ασθενής από την αλληλεπίδραση του αποφωσφορυλιωμένου p38, διευκολύνοντας την πρόσδεση της DUSP1 στη φώσφο-p38 MAPK. Εάν η DUSP1 εντοπιζόταν αποκλειστικά στον πυρήνα των κυττάρων θα ήταν απαραίτητη η δράση μίας επιπλέον φωσφατάσης για απενεργοποίηση. Επομένως, η πυρηνική και η κυτταροπλασματική DUSP1 εμφανίζονται με διακριτούς ρόλους στη ρύθμιση της ενεργοποίησης της p38 από τον VEGF-A (Εικόνα 56).





**Εικόνα 56:** Προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο της επαγωγής της DUSP1 από τον VEGF-A στη αυτορύθμιση της μετανάστευσης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο VEGF φωσφορυλιώνει τις MEK3/6, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν την p38 MAPK (1). Η υπάρχουσα κυτταροπλασματική DUSP1 λειτουργεί σαν κατώφλι ενεργοποίησης της p38 MAPK, απαιτώντας ικανή ενεργοποίηση των MEK3/6 από τον VEGF-A για να ξεπεραστεί η αποφωσφορυλιωτική της δράση (2). Η φωσφορυλιωμένη p38 MAPK που εισέρχεται στον πυρήνα έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιήσει μεταγραφικούς παράγοντες (4). Επίσης, μπορεί να αλληλεπιδράσει με την καθοδική πρωτεΐνη-στόχο MK2a, να τη φωσφορυλιώσει και να σχηματίσει ετεροδιμερές με αυτή (5), να ρυθμίσει την έκφραση του γονιδίου της *DUSP1* μέσω της MK2a (6), να εξέλθει στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιώντας τη NES περιοχή της MK2a (7) και να επάγει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης της HSP27 και LIMK1 πάλι διαμέσου της MK2a (8). Καθώς τα επίπεδα της DUSP1 στον πυρήνα αυξάνονται συνεχώς, η φώσφο-p38 συναντά όλο και πιο συχνά την DUSP1 (9) με επακόλουθο την αποφωσφορυλίωση της και την αναστολή της ενεργοποίησης των υποστρωμάτων της. Έτσι, παύει η εξαγωγή του ετεροδιμερούς φώσφο-p38/φώσφο-MK2a από τον πυρήνα και με αυτόν τον τρόπο, αναστέλλεται η μετακίνηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με το ίδιο τρόπο, τα αυξανόμενα επίπεδα της κυτταροπλασματικής DUSP1 ανταγωνίζονται με την MK2a για πρόσδεση στο σύμπλοκο φώσφο-p38/φώσφο-MK2a, το οποίο έχει προηγουμένως εξαχθεί από τον πυρήνα, αποφωσφορυλιώνοντας την φώσφο-p38 (10), συνεισφέροντας στην αναστολή της μετακίνησης των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Ο VEGF επάγει τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω ενεργοποίησης των ERK1/2 MAPK [55]. Στην παρούσα εργασία, ενεργοποίηση των κυττάρων με VEGF-A προκάλεσε ισχυρή αλλά παροδική (transient) ενεργοποίηση των ERK1/2 με μέγιστο στα 10 λεπτά και επαναφορά στα βασικά επίπεδα μετά από 30 λεπτά

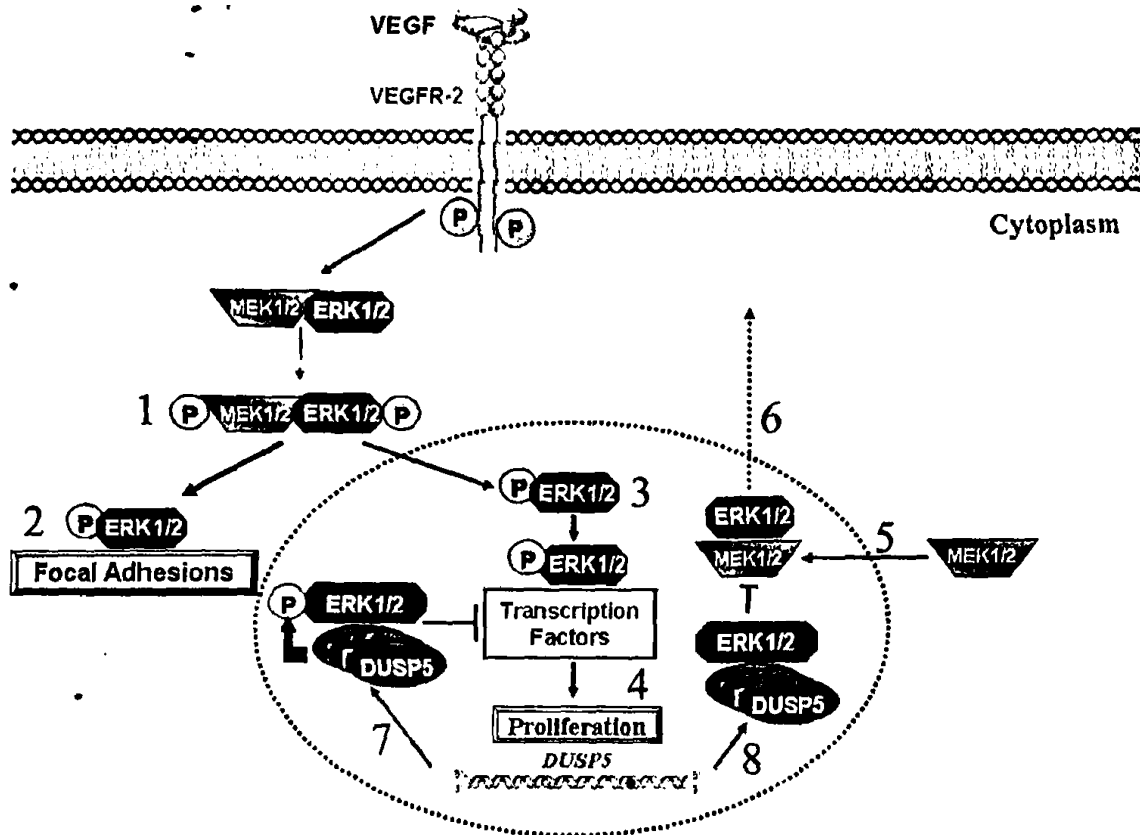
ενεργοποίησης από τον αυξητικό παράγοντα. Αντίθετα, ο VEGF-A προκάλεσε παρατεταμένη ενεργοποίηση των MEK1/2, τουλάχιστον για 4 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει ότι κάποιες φωσφατάσες πρέπει να είναι υπεύθυνες για την παροδική φωσφορυλίωση των ERK1/2. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το μεγαλύτερο μέρος των φωσφορυλιωμένων ERK1/2 εντοπίστηκε στις εστιακές προσφύσεις του κυττάρου και μόνο ένα μικρό μέρος βρέθηκε στον πυρήνα. Πράγματι, οι ERK1/2 μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα και το αντίστροφο [136, 140], ενώ η ταχύτατη αλλαγή θέσης σχετίζεται με την αποφωσφορυλίωση των ERK1/2 στον πυρήνα [282, 283]. Σε αυτό το εξαιρετικά δυναμικό σύστημα, οι φωσφο-ERK1/2 αποδεσμεύονται από τις ανοδικές MEK1/2, καθώς μόνο οι μη-φωσφορυλιωμένες ERK1/2 δένονται στις MEK1/2 [136]. Στη συνέχεια, οι ERK1/2 εισέρχονται στον πυρήνα με διάχυση και/ή με ενεργή μεταφορά [136]. Μετά από την αποφωσφορυλίωση τους, οι ERK1/2 προσδένονται ξανά στις MEK1/2, οι οποίες συνεχώς κινούνται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα με διάχυση [140]. Καθώς οι MEK1/2 έχουν σήμα εξόδου από τον πυρήνα στο αμινοτελικό τους άκρο, το ετεροδιμερές ERK/MEK εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την exportin CPM1 [140], όπου και περιμένει νέο κύκλο ενεργοποίησης από αυξητικούς παραγόντες. Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η φωσφατάση που είναι υπεύθυνη για την πυρηνική απενεργοποίηση των ERK1/2 είναι νεοσυντιθέμενη, παρουσιάζει εκλεκτικότητα προς κατάλοιπα τυροσίνης ή είναι διπλής εξειδίκευσης και αλληλεπιδρά με τις ERK1/2 μέσω περιοχής KIM [283]. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, έχει προταθεί ότι οι μόνες φωσφατάσες που εκπληρούν τα παραπάνω κριτήρια είναι οι DUSP1 και DUSP2/MKP-2 [283]. Με την παρούσα εργασία δείχνουμε ότι ο VEGF-A επάγει τις DUSP1 και DUSP5, προσθέτοντας την τελευταία στις φωσφατάσες που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια. Πράγματι, η DUSP5 νεοσυντίθεται από τον VEGF-A, έχει διπλή εξειδίκευση και στην αλληλουχία της περιλαμβάνει περιοχή KIM (Ref). Μάλιστα, η αλληλεπίδραση μεταξύ των ERK2 και DUSP5, μέσω της περιοχής KIM, είναι ισχυρότερη (περίπου 6-φορες) από την αλληλεπίδραση μεταξύ των ERK2 και DUSP1 [255], υποδεικνύοντας ότι η DUSP5 πιθανώς να είναι πιο σημαντική στην αποφωσφορυλίωση της ERK1/2 απ' ό,τι η DUSP1. Πράγματι, όταν υπερέκφρασαμε την καταλυτικά ανενεργή DUSP1 (DUSP1/CS), τα από τον VEGF επαγόμενα επίπεδα του φωσφο-ERK1/2 ήταν χαμηλά, υποδηλώνοντας ότι άλλες φωσφατάσες, πιθανώς η DUSP5, απενεργοποίησαν την φωσφο-ERK1/2. Από την άλλη πλευρά, όταν υπερέκφρασαμε την καταλυτικά ανενεργή DUSP5 (DUSP5/CS), τα από τον VEGF επαγόμενα επίπεδα του φωσφο-ERK1/2 ήταν υψηλότερα από αυτά το δείγματος-μάρτυρα, προσδίδοντας στην DUSP5 σημαντικότερο ρόλο από εκείνον της DUSP1, στην αποφωσφορυλίωση των ERK1/2 μετά από επαγωγή με VEGF-A.



Παρομοίως, σε συνθήκες αναστολής των DUSP1 και DUSP5, υπερ-εκφράζοντας τις καταλυτικά ανενεργές DUSP1/CS και DUSP5/CS, ο VEGF επήγε τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων κατά 80% και 170%, αντίστοιχα, σε σχέση με τα δείγματα-μάρτυρες. Αυτή η παρατήρηση έρχεται σε απόλυτη συμφωνία με την επίδραση των DUSP1/CS και DUSP5/CS στα επίπεδα φωσφορυλίωσης των ERK1/2 από τον VEGF-A. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η DUSP5 έχει σημαντικότερο ρόλο από την DUSP1 στη ρύθμιση των επιπέδων φωσφορυλίωσης των ERK1/2. Επιπλέον, η απενεργοποίηση του γονιδίου *dusp1* δεν επηρεάζει την κινητική της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 σε ποντίκια [268].

Η σημαντικότητα της DUSP5 στη ρύθμιση της ενεργοποίησης των ERK1/2 από τον VEGF αναδεικνύεται ακόμη περισσότερο από το γεγονός ότι η DUSP5 είναι υπεύθυνη για την αγκυροβόληση (anchor) της ERK2 στον πυρήνα των κυττάρων, ιδιότητα την οποία δεν έχουν άλλες DUSP φωσφατάσες [255]. Επομένως η DUSP5 αποφωσφορυλιώνει και αποσύρει (sequesters) την απενεργοποιημένη ERK2 στον πυρήνα. Με βάση τα δεδομένα αυτά, έχει προταθεί ότι ενώ η ERK1/2 παλινδρομεί (shuttles) μεταξύ κυτταρόπλασματος και πυρήνα κατά την διάρκεια μιτογόνου ενεργοποίησης, η σταδιακή απόσυρση (συσσώρευση) απενεργοποιημένης ERK1/2 στον πυρήνα, μακριά από τους κυτταροπλασματικούς διεγέρτες MEK1/2, αποτελεί ικανό μηχανισμό για τον τερματισμό της μετάδοσης σήματος [283]. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η επαγωγή της DUSP5 από τον VEGF-A δημιουργεί ένα τέτοιο «κέντρο απενεργοποίησης και αγκυροβόλησης» των ERK1/2, το οποίο συμμετέχει στην αυτορύθμιση της φωσφορυλίωσης των ERK1/2 από τον VEGF-A και, επομένως, στον έλεγχο του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Στην παρούσα εργασία δείξαμε ότι η υπερέκφραση της DUSP5 προκάλεσε τη συσσώρευση των απενεργοποιημένων ERK1/2 στον πυρήνα, ενώ η καταλυτικά ανενεργή DUSP5 (DUSP5/CS) προκάλεσε τη συσσώρευση των φωσφορυλιωμένων μορφών τους. Η ικανότητα της DUSP5 να αποφωσφορυλιώνει και να αποσύρει την ERK2 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων αποδεικνύεται και από τον καθορισμό της σταθεράς αλληλεπίδρασης για τις πρωτεΐνες ERK2 και DUSP5 με τα πειράματα FCCS. Μετά από επαγωγή με VEGF, η σταθερά αλληλεπίδρασης  $K_D$  της πυρηνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ ERK2 και DUSP5 αυξάνεται ως αποτέλεσμα της εισροής της φώσφο-ERK2-mCherry, η οποία αλληλεπιδρά με μεταγραφικούς παράγοντες και, επομένως, δεν κινείται μαζί με την DUSP5. Καθώς οι ενεργοποιημένοι μεταγραφικοί παράγοντες αποδεσμεύονται από την φώσφο-ERK2-mCherry, αυξανόμενα ποσά της κινάσης αποφωσφορυλιώνονται και αποσύρονται/συσσωρεύονται στον πυρήνα, με αποτέλεσμα τη μείωση της σταθεράς αλληλεπίδρασης  $K_D$  και την επαναφορά της στις αρχικές τιμές, πριν από

την διέγερση των κυττάρων με VEGF-A. Επομένως, η επαγωγή της DUSP5 από τον VEGF-A φαίνεται να συνεισφέρει στην αποφωσφορυλίωση και απόσυρση των ανενεργών ERK1/2 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων και επομένως να τερματίζει τη σηματοδότηση μέσω των ERK1/2 (Εικόνα 57).



**Εικόνα 57:** Προτεινόμενο μοντέλο για το ρόλο της επαγωγής της DUSP5 από τον VEGF-A στη αυτορύθμιση πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Ο VEGF φωσφορυλιώνει τις MEK1/2, οι οποίες με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν τις ERK1/2 (1). Ένα σημαντικό μέρος των φώσφο-ERK1/2 παραμένει στο κυτταρόπλασμα, και συγκεκριμένα στις εστιακές προσφύσεις των κυττάρων, συμμετέχοντας στη ρύθμιση της μετανάστευσης των κυττάρων (2). Οι φώσφο-ERK1/2 που εισέρχονται στον πυρήνα (3) ενεργοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες με αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (4). Παράλληλα, ήδη υπάρχουσες συγκεντρώσεις πυρηνικών φωσφατών, όπως οι DUSP1, DUSP4 και DUSP5, αποφωσφορυλιώνουν τις φώσφο-ERK1/2 διατηρώντας χαμηλό το επίπεδο των φώσφο-ERK1/2 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι απενεργοποιημένες ERK1/2 συνδέονται με τις MEK1/2, οι οποίες συνεχώς κινούνται μεταξύ κυτταροπλάσματος και πυρήνα με διάχυση (5), και καθώς οι MEK1/2 έχουν σήμα εξόδου από τον πυρήνα στο αμινοτελικό τους άκρο, το ετεροδιμερές ERK/MEK εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την exportin CPM1, όπου και περιμένει νέο κύκλο ενεργοποίησης από αυξητικούς παράγοντες. (6). Καθώς η συγκέντρωση της DUSP5 αυξάνεται σαν αποτέλεσμα της επαγωγής από τον VEGF, πιθανά μέσω φώσφο-ERK1/2, αν και αυτό δεν έχει δειχθεί, η DUSP5 αποφωσφορυλιώνει

πλήρως τις φώσφο-ERK1/2 με αποτέλεσμα την αναστολή του από τον VEGF επαγόμενου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (7). Παράλληλα, η δραστηριότητα της DUSP5 σαν πυρηνικού αγκυροβολητή επιτρέπει την σταδιακή συσσώρευση απενεργοποιημένων ERK1/2 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων αποσύροντάς τις από την κυτταροπλασματική δεξαμενή μειώνοντας τη διαθεσιμότητά τους για εκ νέου διεγερση (8).

Συμπερασματικά, ο VEGF-A επάγει τη μεταγραφή δύο φωσφατασών διπλής εξειδίκευσης, της DUSP1 και της DUSP5, στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Σε αντίθεση με την παραδοχή ότι η DUSP1 είναι αποκλειστικά πυρηνική πρωτεΐνη, στην παρούσα εργασία δείχνουμε ότι η DUSP1 εντοπίζεται και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, η DUSP5 εντοπίζεται μόνο στον πυρήνα των κυττάρων. Τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι η DUSP1 αποφωσφορυλιώνει κυρίως την από τον VEGF-A επαγόμενη φώσφο-p38 και, επομένως, αναστέλει τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ η DUSP5 αποφωσφορυλιώνει κυρίως την από τον VEGF-A επαγόμενη φώσφο-ERK1/2 αναστέλλοντας τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπλέον, η DUSP5 παρουσιάζει σημαντική δράση στην πυρηνική απενεργοποίηση και αγκυροβόληση των ERK1/2, με αποτέλεσμα την αναστολή της εξαγωγής των ανεργών ERK1/2 στο κυτταρόπλασμα, μειώνοντας την δυνατότητα για παραπέρα ενεργοποίηση. Επομένως, η επαγωγή των δύο φωσφατασών από τον VEGF-A χρησιμοποιείται ως μηχανισμός αυτορύθμισης που ελέγχει το βαθμό ενεργοποίησης των σηματοδοτικών καταρρακτών των ERK1/2 και p38 MAPK από τον ίδιο αυξητικό παράγοντα και ως εκ τούτου τη ρύθμιση των αγγειογενετικών αποκρίσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ

Τα μέλη της οικογένειας του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) αποτελούν τους πιο σημαντικούς παράγοντες στην αγγειακή διαφοροποίηση και αγγειογένεση. Η υπερέκφραση του VEGF παίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία παθολογικής αγγειογένεσης ανατρέποντας την ισορροπία διεγερτών και αναστολέων της. Πράγματι, οι περισσότεροι καρκίνοι εκφράζουν σε υψηλά επίπεδα το mRNA του VEGF-A, γεγονός το οποίο έχει σημαντική προγνωστική σημασία για την έκβαση του όγκου και επηρεάζει τις θεραπευτικές επιλογές. Οι υποδοχείς του VEGF-A έχουν δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης και φωσφορυλιώνουν δευτερογενείς διαμεσολάβητες, οι οποίοι μετάγουν το σήμα στον πυρήνα, όπου και τροποποιούν το μεταγραφικό πρόγραμμα.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας ελέγχθηκε η έκφραση 22,000 γονιδίων σε ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσία VEGF-A. Μεταξύ των γονιδίων που ρυθμίστηκαν από τον VEGF-A, αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά δύο φωσφατάσες διπλής εξειδίκευσης (Dual Specificity Phosphatases, DUSPs), οι DUSP1 και DUSP5. Οι DUSPs ρυθμίζουν τη δραστηριότητα των MAP κινασών μέσω αποφωσφορυλίωσης του «TXY-μοτίβου» και παρουσιάζονται ως ιδιαίτερος αρνητικοί ρυθμιστές της σηματοδότησης των MAP κινασών. Δείξαμε ότι η DUSP1 εντοπίζεται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα και στη μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ η DUSP5 είναι αποκλειστικά πυρηνική πρωτεΐνη. Στη συνέχεια μελετήσαμε την επίδραση του VEGF-A στα πρωτεϊνικά επίπεδα της DUSP1. Ο VEGF-A προκάλεσε την αύξηση της πρωτεΐνης DUSP1 φτάνοντας στο μέγιστο επίπεδο μετά από 2 ώρες και παρουσιάζοντας μία ασθενή ύφεση στη συνέχεια. Ωστόσο, πειράματα με αναστολέα της πρωτεϊνοσύνθεσης έδειξαν ότι η παρουσία του VEGF-A επιτάχυνε και την αποδόμηση της DUSP1. Έτσι λοιπόν μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι τα πρωτεϊνικά επίπεδα της DUSP1 μετά την προσθήκη του VEGF-A είναι το αποτέλεσμα της ισορροπίας μεταξύ της πρωτεϊνοσύνθεσης, η οποία ακολουθεί τη μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου *DUSP1*, και της πρωτεολυτικής αποδόμησης που ακολουθεί την αλληλεπίδραση των MAPK με την DUSP1.

Καθώς οι MAPK αποτελούν βασικά μόρια στη σηματοδότηση από τον VEGF-A, ελέγξαμε τον πιθανό ρόλο της μεταγραφικής ενεργοποίησης των DUSP1 και DUSP5 από τον VEGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Για το σκοπό αυτό μολύναμε ενδοθηλιακά κύτταρα με αδενοϊούς που εκφράζουν είτε τις αγρίου τύπου DUSP1 and DUSP5 είτε τις καταλυτικά ανενεργές (αρνητικά επικρατούσες) μορφές αυτών και ελέγξαμε την επίδρασή τους στην από τον VEGF-A επαγόμενη φωσφορυλίωση των p38 και ERK1/2 MAPK. Τα πειραματικά



δεδομένα προβάλλουν την DUSP1 ως κύρια, αν όχι τη μόνη, φωσφατάση διπλής εξειδίκευσης για τη ρύθμιση της από τον VEGF επαγόμενης φωσφορυλίωσης της p38 MAPK στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η DUSP5 παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφωσφορυλίωση των φωσφο-ERK1/2, αν και η συνεισφορά και άλλων φωσφατασών θεωρείται πιθανή. Ωστόσο, η DUSP5 προκαλεί έντονη πυρηνική αγκυροβόληση και συσσώρευση των απενεργοποιημένων ERK1/2 στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Με τον τρόπο αυτό η DUSP5 αποσύρει τις ERK1/2 από τους κυτταροπλασματικούς διεγέρτες MEK1/2, έτσι ώστε να μην είναι διαθέσιμες για παραπέρα ενεργοποίηση από τον VEGF-A συνεισφέροντας στο τερματισμό της μετάδοσης σήματος από τις ERK1/2 MAPK. Σε συμφωνία με τη ρύθμιση της δραστηριότητας των MAPK από τις DUSPs δείξαμε ότι η DUSP1 παίζει καθοριστικό ρόλο στη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων ενώ η DUSP5 ρυθμίζει τον επαγόμενο από τον VEGF-A κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Τέλος, εξετάσαμε τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των MAPK και DUSP σε ζωντανά ενδοθηλιακά κύτταρα. Πειράματα μικροσκοπίας απεικόνισης χρόνου ζωής φθορισμού (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) και φασματοσκοπίας σχετικού συσχετισμού φθορισμού (Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy (FCCS)) έδειξαν ότι οι φωσφατάσες DUSP1 και DUSP5 αλληλεπιδρούν με τις MAPK p38 και ERK2, αντίστοιχα. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η ισχύς των αλληλεπιδράσεων DUSP1/p38 και DUSP5/ERK2 μετρώντας την σταθερά διάστασης (Kd) τους, αλλά και η επίδραση της χορήγησης του VEGF-A στην Kd. Η παρουσία του VEGF-A επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τις παραπάνω αλληλεπιδράσεις στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα σύμπλοκα DUSP1/p38 και DUSP5/ERK2 συμπεριφέρονται διαφορετικά μετά από την επαγωγή των κυττάρων. Στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης DUSP5/ERK2 η κινητική της Kd στον πυρήνα των ενδοθηλιακών κυττάρων μετά από χορήγηση VEGF-A είναι συμβατή με την πυρηνική αγκυροβόληση που εξασκεί η DUSP5 στην ERK1/2.

Καταλήγουμε, λοιπόν, στο συμπέρασμα ότι η επαγωγή των DUSP1 και DUSP5 φωσφατασών από τον VEGF-A χρησιμοποιείται ως μηχανισμός αυτορύθμισης που ελέγχει το βαθμό ενεργοποίησης των σηματοδοτικών καταρρακτών των ERK1/2 και p38 MAPK από τον ίδιο αυξητικό παράγοντα και ως εκ τούτου τη ρύθμιση των αγγειογενετικών αποκρίσεων των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπως ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση.

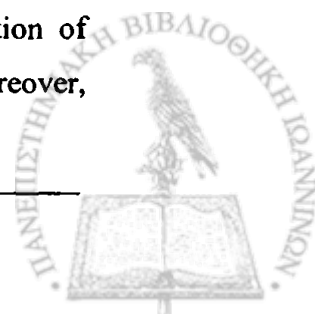


## ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ (SUMMARY)

Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) are the most important regulators of vessel morphogenesis. They not only participate in the regulation of both vasculogenesis and angiogenesis, but also are among the most important molecules involved in the pathogenesis of angiogenic diseases. Over-expression of VEGFs plays an important role in initiating pathological angiogenesis by altering the balance between angiogenic stimulators and inhibitors. In tumours, for instance, VEGFs are over-expressed playing a significant role in tumour prognosis and influencing the therapeutic strategy. VEGF ligands bind to three receptor tyrosine kinases (RTKs), known as VEGFR1-3, in order to transduce their signal and modify the transcriptional output.

In the present study, the expression pattern of approximately 22000 genes was examined in the presence of VEGF-A in endothelial cells. Among the genes that were regulated by VEGF-A, Dual Specificity Phosphatases 1 and 5 (*DUSP1* and *DUSP5*) mRNAs were dramatically induced following VEGF-A administration. DUSPs have been identified as specific regulators of the magnitude and duration of MAPK activation, since they are able to dephosphorylate both phospho-Tyr and phospho-Thr in the TXY-motif of MAPKs. We show here that *DUSP1* was present in the nucleus, cytoplasm and plasma membrane, whereas *DUSP5* is exclusively nuclear in endothelial cells. We next addressed the effect of VEGF on *DUSP1* protein levels. VEGF induced the level of *DUSP1* protein reaching a maximum at 2h and weakly declining thereafter. However, experiments with protein inhibitor revealed that VEGF also induces *DUSP1*-degradation. Thus, the concentration of VEGF-induced *DUSP1* is a reflection of the balance between protein synthesis, following transcriptional enhancement of *DUSP1* gene, and proteolytic degradation occurring because of MAPKs and *DUSP1* interaction.

As MAPKs are key molecules in signal transduction of VEGF, we examined the potential consequences of transcriptional induction of *DUSP1* and *DUSP5* genes by VEGF-A in endothelial cells. Towards this purpose, we have infected endothelial cells with adenoviruses expressing either wild type *DUSP1* and *DUSP5* or the dominant negative (catalytically inactive) forms these phosphatases and evaluated their effect on VEGF-A-induced phosphorylation of p38 and ERK1/2 MAPKs. Our data indicate that *DUSP1* is the main, if not the only, DUSP that regulates VEGF-A-induced phosphorylation of p38 MAPK. *DUSP5* plays a significant role in the inactivation of VEGF-induced phosphorylation of ERK1/2, however, additional phosphatases may also contribute to this regulation. Moreover,



DUSP5 has a strong nuclear anchoring activity on ERK1/2, thereby, accumulating inactive ERK1/2 in the nucleus of endothelial cell. Thus, DUSP5 sequesters ERK1/2 away from its cytoplasmic activator MEK1/2 rendering it unavailable for further phosphorylation, contributing to the termination of ERK1/2 signalling. In accordance to the above results, we have shown that DUSP1 is able to regulate VEGF-A-induced migration of endothelial cells, whereas, DUSP5 is the main phosphatase involved in the VEGF-A-induced proliferation of endothelial cells.

Finally, we tested possible interactions between the DUSPs and MAPKs in living endothelial cells. Experiments using fluorescence lifetime imaging (FLIM) and fluorescence cross-correlation spectroscopy (FCCS) revealed that DUSP1 and DUSP5 interact with p38 and ERK2, respectively. Moreover, we have evaluated the strength of the interaction by measuring the dissociation constant ( $K_d$ ) of DUSP1/p38 and DUSP5/ERK2 interactions and the influence of VEGF-A administration on it. VEGF-A affects differently the  $K_d$ s indicating that DUSP1/p38 and DUSP5/ERK1/2 have different fate after VEGF-A administration. The kinetics of the  $K_d$  of DUSP5/ERK1/2 interaction is compatible with the nuclear anchoring activity of DUSP5 on inactive ERK1/2.

In conclusion, VEGF-A-induction of DUSP1 and DUSP5 serves as an auto-regulatory circuit that controls activation of ERK1/2 and p38 MAPK cascades by the same growth factor, thereby regulating angiogenic responses of ECs, such a proliferation and migration.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932-6.
- [2] Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):435-9.
- [3] Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circulation research*. 2000 Feb 4;86(2):E29-35.
- [4] Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):439-42.
- [5] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in *Flk-1*-deficient mice. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):62-6.
- [6] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000 Sep 14;407(6801):242-8.
- [7] Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases *Tie-1* and *Tie-2* in blood vessel formation. *Nature*. 1995 Jul 6;376(6535):70-4.
- [8] Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev*. 1999 May 1;13(9):1055-66.
- [9] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for *Tie2* that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):55-60.
- [10] Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science (New York, NY)*. 1997 Jul 4;277(5322):48-50.
- [11] Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene*. 1999 Sep 20;18(38):5356-62.
- [12] Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967-74.
- [13] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
- [14] Gragoudas ES, Adamis AP, Cunningham ET, Jr., Feinsod M, Guyer DR. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine*. 2004 Dec 30;351(27):2805-16.
- [15] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*. 2004 Aug;25(4):581-611.
- [16] Dor Y, Porat R, Keshet E. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jun;280(6):C1367-74.
- [17] Safran M, Kaelin WG, Jr. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Mar;111(6):779-83.



- [18] Kaelin WG, Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Sep 15;10(18 Pt 2):6290S-5S.
- [19] Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000 Dec;5(1):24-33.
- [20] Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J.* 2002 Sep;16(11):1361-70.
- [21] Rak J, Mitsushashi Y, Erdos V, Huang SN, Filmus J, Kerbel RS. Massive programmed cell death in intestinal epithelial cells induced by three-dimensional growth conditions: suppression by mutant c-H-ras oncogene expression. *The Journal of cell biology.* 1995 Dec;131(6 Pt 1):1587-98.
- [22] Rak J, Mitsushashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer research.* 1995 Oct 15;55(20):4575-80.
- [23] Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Sukhatme VP. Wild-type p53 and v-Src exert opposing influences on human vascular endothelial growth factor gene expression. *Cancer research.* 1995 Dec 15;55(24):6161-5.
- [24] Mukhopadhyay D, Tsiokas L, Zhou XM, Foster D, Brugge JS, Sukhatme VP. Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature.* 1995 Jun 15;375(6532):577-81.
- [25] Slack JL, Bornstein P. Transformation by v-src causes transient induction followed by repression of mouse thrombospondin-1. *Cell Growth Differ.* 1994 Dec;5(12):1373-80.
- [26] Bein K, Ware JA, Simons M. Myb-dependent regulation of thrombospondin 2 expression. Role of mRNA stability. *The Journal of biological chemistry.* 1998 Aug 14;273(33):21423-9.
- [27] Meitar D, Crawford SE, Rademaker AW, Cohn SL. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 1996 Feb;14(2):405-14.
- [28] Fotsis T, Breit S, Lutz W, Rossler J, Hatzi E, Schwab M, et al. Down-regulation of endothelial cell growth inhibitors by enhanced MYCN oncogene expression in human neuroblastoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS.* 1999 Aug;263(3):757-64.
- [29] Pelengaris S, Littlewood T, Khan M, Elia G, Evan G. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Molecular cell.* 1999 May;3(5):565-77.
- [30] Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer metastasis reviews.* 1995 Dec;14(4):263-77.
- [31] Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1999 Feb;5(2):257-65.
- [32] Saez E, Rutberg SE, Mueller E, Oppenheim H, Smoluk J, Yuspa SH, et al. c-fos is required for malignant progression of skin tumors. *Cell.* 1995 Sep 8;82(5):721-32.
- [33] McGregor LM, McCune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, et al. Roles of trk family neurotrophin receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999 Apr 13;96(8):4540-5.
- [34] Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, Zagury JF, Bernard J, Ittele D, et al. HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie.* 1999 Oct;53(9):424-31.



- [35] Lopez MC, Stanley MA. Cytokine profile of draining lymph node lymphocytes in mice grafted with syngeneic keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. *The Journal of general virology*. 2000 May;81(Pt 5):1175-82.
- [36] Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C, Beecken W, Achilles-Gerte E, McDonnell T, et al. Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001 Feb 7;93(3):208-13.
- [37] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003 Jun;9(6):669-76.
- [38] Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nature medicine*. 1999 Dec;5(12):1359-64.
- [39] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*. 2000 Apr;6(4):389-95.
- [40] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997 Feb;18(1):4-25.
- [41] Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992 Dec 15;189(2):824-31.
- [42] Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R. In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Experimental cell research*. 1994 Feb;210(2):298-305.
- [43] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, NY)*. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.
- [44] Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. In vivo (Athens, Greece). 1994 Nov-Dec;8(6):961-5.
- [45] Bagli E, Stefaniotou M, Morbidelli L, Ziche M, Psillas K, Murphy C, et al. Luteolin inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis; inhibition of endothelial cell survival and proliferation by targeting phosphatidylinositol 3'-kinase activity. *Cancer research*. 2004 Nov 1;64(21):7936-46.
- [46] Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):946-53.
- [47] Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*. 2002 Dec 2;196(11):1497-506.
- [48] Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998 May 22;273(21):13313-6.
- [49] Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature medicine*. 1995 Oct;1(10):1024-8.
- [50] Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Nov 2;264(3):781-8.
- [51] Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development (Cambridge, England)*. 1999 Mar;126(6):1149-59.
- [52] Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Jan;103(2):159-65.



- [53] Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* (New York, NY. 1983 Feb 25;219(4587):983-5.
- [54] Bates DO, Curry FE. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway. *The American journal of physiology*. 1997 Aug;273(2 Pt 2):H687-94.
- [55] Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 May;7(5):359-71.
- [56] Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md. 1991 Dec;5(12):1806-14.
- [57] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999 Jan;13(1):9-22.
- [58] Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *The Journal of biological chemistry*. 1992 Dec 25;267(36):26031-7.
- [59] Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular biology of the cell*. 1993 Dec;4(12):1317-26.
- [60] Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Mar 29;271(13):7788-95.
- [61] Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nature medicine*. 1999 May;5(5):495-502.
- [62] Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Mar 19;93(6):2576-81.
- [63] Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Current opinion in biotechnology*. 1999 Dec;10(6):528-35.
- [64] Taipale J, Makinen T, Arighi E, Kukk E, Karkkainen M, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Current topics in microbiology and immunology*. 1999;237:85-96.
- [65] Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, et al. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* (New York, NY. 1997 May 30;276(5317):1423-5.
- [66] Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Oct 15;93(21):11675-80.
- [67] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist*. 2004;9 Suppl 1:2-10.
- [68] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005;69 Suppl 3:4-10.
- [69] Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1998 May 1;273(18):11197-204.

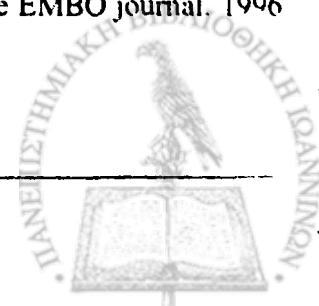




- [70] Gallicchio M, Mitola S, Valdembrì D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1970-6.
- [71] Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Ozes ON, Mayo LD, Kessler KM, et al. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Apr 14;275(15):11216-21.
- [72] Singh AJ, Meyer RD, Band H, Rahimi N. The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation. *Molecular biology of the cell*. 2005 Apr;16(4):2106-18.
- [73] Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *The Journal of biological chemistry*. 1994 Oct 28;269(43):26988-95.
- [74] Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *The Journal of biological chemistry*. 1998 Sep 4;273(36):23410-8.
- [75] Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*. 2001 Dec 11;2001(112):RE21.
- [76] Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2001 Apr;33(4):409-20.
- [77] Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. *Cellular signalling*. 2001 Nov;13(11):849-54.
- [78] Autiero M, Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost*. 2003 Jul;1(7):1356-70.
- [79] Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Aug 4;95(16):9349-54.
- [80] Hiratsuka S, Nakao K, Nakamura K, Katsuki M, Maru Y, Shibuya M. Membrane fixation of vascular endothelial growth factor receptor 1 ligand-binding domain is important for vasculogenesis and angiogenesis in mice. *Molecular and cellular biology*. 2005 Jan;25(1):346-54.
- [81] Zeng H, Dvorak HF, Mukhopadhyay D. Vascular permeability factor (VPF)/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 20;276(29):26969-79.
- [82] Roberts DM, Kearney JB, Johnson JH, Rosenberg MP, Kumar R, Bautsch VL. The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation. *The American journal of pathology*. 2004 May;164(5):1531-5.
- [83] Carmeliet P, Moons L, Lutun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature medicine*. 2001 May;7(5):575-83.
- [84] Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine*. 2003 Jul;9(7):936-43.



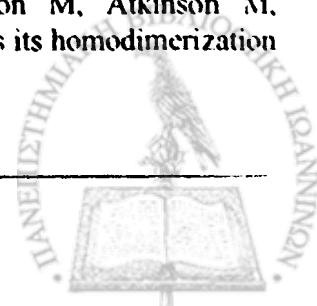
- [85] Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1992 Sep 30;187(3):1579-86.
- [86] Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO journal*. 2001 Jun 1;20(11):2768-78.
- [87] Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Jan 25;102(4):1076-81.
- [88] Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, et al. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *The Journal of biological chemistry*. 2004 May 21;279(21):22267-75.
- [89] Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, Rahimi N. Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May 25;276(21):17686-92.
- [90] Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jun 4;274(23):16349-54.
- [91] Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Dec 28;276(52):49289-98.
- [92] Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 1999 Apr 1;18(13):2221-30.
- [93] Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, et al. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *The EMBO journal*. 2005 Jul 6;24(13):2342-53.
- [94] Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*. 2004 Jan 15;23(2):434-45.
- [95] Issbrucker K, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, et al. p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. *Faseb J*. 2003 Feb;17(2):262-4.
- [96] McMullen ME, Bryant PW, Glembotski CC, Vincent PA, Pumiglia KM. Activation of p38 has opposing effects on the proliferation and migration of endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Jun 3;280(22):20995-1003.
- [97] Rousseau S, Houle F, Landry J, Huot J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*. 1997 Oct;15(18):2169-77.
- [98] Le Boeuf F, Houle F, Sussman M, Huot J. Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Molecular biology of the cell*. 2006 Aug;17(8):3508-20.
- [99] Hart MJ, Callow MG, Souza B, Polakis P. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *The EMBO journal*. 1996 Jun 17;15(12):2997-3005.



- [100] Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, Tojo T, et al. IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circulation research*. 2004 Aug 6;95(3):276-83.
- [101] Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, et al. Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nature genetics*. 2000 Jun;25(2):153-9.
- [102] Fournier E, Dubreuil P, Birnbaum D, Borg JP. Mutation at tyrosine residue 1337 abrogates ligand-dependent transforming capacity of the FLT4 receptor. *Oncogene*. 1995 Sep 7;11(5):921-31.
- [103] Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, et al. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Oct 17;278(42):40973-9.
- [104] Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation. *Trends in immunology*. 2004 Jul;25(7):387-95.
- [105] Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, et al. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal*. 2001 Sep 3;20(17):4762-73.
- [106] Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature immunology*. 2004 Jan;5(1):74-80.
- [107] Korpelainen EI, Karkkainen M, Gunji Y, Vikkula M, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway: mutant Tie-2 causing venous malformations signals a distinct STAT activation response. *Oncogene*. 1999 Jan 7;18(1):1-8.
- [108] Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, et al. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development (Cambridge, England)*. 2002 Oct;129(20):4797-806.
- [109] Soker S, Fidler IJ, Neufeld G, Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Mar 8;271(10):5761-7.
- [110] Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2002 Jan;12(1):13-9.
- [111] Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998 Mar 20;92(6):735-45.
- [112] Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development (Cambridge, England)*. 1999 Nov;126(21):4895-902.
- [113] Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J*. 2000 Dec;14(15):2532-9.
- [114] Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):426-31.
- [115] Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*. 2004 Jul;84(3):869-901.
- [116] Serini G, Valdembri D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Experimental cell research*. 2006 Mar 10;312(5):651-8.



- [117] Reynolds AR, Reynolds LE, Nagel TE, Lively JC, Robinson SD, Hicklin DJ, et al. Elevated Flk1 (vascular endothelial growth factor receptor 2) signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integrin-deficient mice. *Cancer research*. 2004 Dec 1;64(23):8643-50.
- [118] Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews*. 1999 Jan;79(1):143-80.
- [119] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, NY)*. 2002 Dec 6;298(5600):1911-2.
- [120] Ray LB, Sturgill TW. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988 Jun;85(11):3753-7.
- [121] Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS. MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3240-53.
- [122] Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*. 2001 Apr;22(2):153-83.
- [123] Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J. Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Sep 15;90(18):8319-23.
- [124] Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, et al. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science (New York, NY)*. 1994 Aug 12;265(5174):966-70.
- [125] Hornberg JJ, Binder B, Bruggeman FJ, Schoeberl B, Heinrich R, Westerhoff HV. Control of MAPK signalling: from complexity to what really matters. *Oncogene*. 2005 Aug 25;24(36):5533-42.
- [126] Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ. Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):859-69.
- [127] Lee SJ, Zhou T, Goldsmith EJ. Crystallization of MAP kinases. *Methods (San Diego, Calif)*. 2006 Nov;40(3):224-33.
- [128] Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, et al. MAP kinases. *Chemical reviews*. 2001 Aug;101(8):2449-76.
- [129] Tanoue T, Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cellular signalling*. 2003 May;15(5):455-62.
- [130] Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E. A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol*. 2000 Feb;2(2):110-6.
- [131] Tanoue T, Maeda R, Adachi M, Nishida E. Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *The EMBO journal*. 2001 Feb 1;20(3):466-79.
- [132] Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M. c-Jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):929-39.
- [133] Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip NY, Radziejewska E, Morgenbesser SD, et al. ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991 May 17;65(4):663-75.
- [134] Pages G, Guerin S, Grall D, Bonino F, Smith A, Anjuere F, et al. Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science (New York, NY)*. 1999 Nov 12;286(5443):1374-7.
- [135] Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, et al. Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*. 1998 May 15;93(4):605-15.



- [136] Adachi M, Fukuda M, Nishida E. Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *The EMBO journal*. 1999 Oct 1;18(19):5347-58.
- [137] Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Nov;6(11):827-37.
- [138] Kolch W, Kotwaliwale A, Vass K, Janosch P. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert reviews in molecular medicine*. 2002 Apr;4(8):1-18.
- [139] Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, et al. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *The EMBO journal*. 1994 Apr 1;13(7):1610-9.
- [140] Adachi M, Fukuda M, Nishida E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *The Journal of cell biology*. 2000 Mar 6;148(5):849-56.
- [141] Lee HY, Suh YA, Robinson MJ, Clifford JL, Hong WK, Woodgett JR, et al. Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Oct 13;275(41):32193-9.
- [142] Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, et al. Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol*. 1999 Apr 8;9(7):369-72.
- [143] Storm SM, Brennscheidt U, Sithanandam G, Rapp UR. raf oncogenes in carcinogenesis. *Critical reviews in oncogenesis*. 1990;2(1):1-8.
- [144] Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Nov;5(11):875-85.
- [145] Jaumot M, Hancock JF. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene*. 2001 Jul 5;20(30):3949-58.
- [146] Abraham D, Podar K, Pacher M, Kubicek M, Welzel N, Hemmings BA, et al. Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jul 21;275(29):22300-4.
- [147] Dhillon AS, Meikle S, Yazici Z, Eulitz M, Kolch W. Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *The EMBO journal*. 2002 Jan 15;21(1-2):64-71.
- [148] von Kriegsheim A, Pitt A, Grindlay GJ, Kolch W, Dhillon AS. Regulation of the Raf-MEK-ERK pathway by protein phosphatase 5. *Nat Cell Biol*. 2006 Aug 6.
- [149] Pritchard CA, Bolin L, Slattery R, Murray R, McMahon M. Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene. *Curr Biol*. 1996 May 1;6(5):614-7.
- [150] Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *The EMBO journal*. 2001 Apr 17;20(8):1952-62.
- [151] Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature genetics*. 1997 Jul;16(3):293-7.
- [152] Gonzalez FA, Raden DL, Davis RJ. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1991 Nov 25;266(33):22159-63.
- [153] Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):320-44.
- [154] Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 2007 Aug;1773(8):1299-310.
- [155] Lechner C, Zahalka MA, Giot JF, Moller NP, Ullrich A. ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Apr 30;93(9):4355-9.



- [156] Hu MC, Wang YP, Mikhail A, Qiu WR, Tan TH. Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Mar 12;274(11):7095-102.
- [157] Adams RH, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Molecular cell*. 2000 Jul;6(1):109-16.
- [158] Wang Q, Yerukhimovich M, Gaarde WA, Popoff IJ, Doerschuk CM. MKK3 and -6-dependent activation of p38alpha MAP kinase is required for cytoskeletal changes in pulmonary microvascular endothelial cells induced by ICAM-1 ligation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Feb;288(2):L359-69.
- [159] Deacon K, Blank JL. MEK kinase 3 directly activates MKK6 and MKK7, specific activators of the p38 and c-Jun NH2-terminal kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jun 4;274(23):16604-10.
- [160] Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 1998 May 22;273(21):12901-8.
- [161] Gallo KA, Johnson GL. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002 Sep;3(9):663-72.
- [162] Kim KY, Kim BC, Xu Z, Kim SJ. Mixed lineage kinase 3 (MLK3)-activated p38 MAP kinase mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in hepatoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Jul 9;279(28):29478-84.
- [163] Kim SI, Kwak JH, Zachariah M, He Y, Wang L, Choi ME. TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *American journal of physiology*. 2007 May;292(5):F1471-8.
- [164] Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, et al. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science (New York, NY)*. 2002 Feb 15;295(5558):1291-4.
- [165] Lu G, Kang YJ, Han J, Herschman HR, Stefani E, Wang Y. TAB-1 modulates intracellular localization of p38 MAP kinase and downstream signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Mar 3;281(9):6087-95.
- [166] Van Laethem A, Nys K, Van Kelst S, Claerhout S, Ichijo H, Vandenhede JR, et al. Apoptosis signal regulating kinase-1 connects reactive oxygen species to p38 MAPK-induced mitochondrial apoptosis in UVB-irradiated human keratinocytes. *Free radical biology & medicine*. 2006 Nov 1;41(9):1361-71.
- [167] Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, et al. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO reports*. 2001 Mar;2(3):222-8.
- [168] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular signalling*. 2000 Jan;12(1):1-13.
- [169] Waskiewicz AJ, Flynn A, Proud CG, Cooper JA. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *The EMBO journal*. 1997 Apr 15;16(8):1909-20.
- [170] Leoncini G, Bruzzese D, Signorello MG. Activation of p38 MAPKinase cPLA2 pathway in homocysteine-treated platelets. *J Thromb Haemost*. 2006 Jan;4(1):209-16.
- [171] Johnson GV, Bailey CD. The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease. *Experimental neurology*. 2003 Oct;183(2):263-8.
- [172] Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42mapk and p44mapk) but not of their

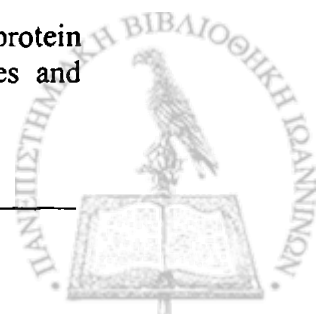
- activator MAP kinase kinase (p45mapkk) in fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1993 Sep;122(5):1079-88.
- [173] Fukuda M, Gotoh I, Adachi M, Gotoh Y, Nishida E. A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Dec 19;272(51):32642-8.
- [174] Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal*. 1999 Feb 1;18(3):664-74.
- [175] Casar B, Sanz-Moreno V, Yazicioglu MN, Rodriguez J, Berciano MT, Lafarga M, et al. Mxi2 promotes stimulus-independent ERK nuclear translocation. *The EMBO journal*. 2007 Feb 7;26(3):635-46.
- [176] Sharif A, Canton B, Junier MP, Chneiweiss H. PEA-15 modulates TNFalpha intracellular signaling in astrocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 Dec;1010:43-50.
- [177] Whitehurst AW, Robinson FL, Moore MS, Cobb MH. The death effector domain protein PEA-15 prevents nuclear entry of ERK2 by inhibiting required interactions. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Mar 26;279(13):12840-7.
- [178] Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, et al. PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Developmental cell*. 2001 Aug;1(2):239-50.
- [179] Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, et al. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Feb 27;98(5):2449-54.
- [180] Gervais M, Dugourd C, Muller L, Ardidie C, Canton B, Loviconi L, et al. Akt down-regulates ERK1/2 nuclear localization and angiotensin II-induced cell proliferation through PEA-15. *Molecular biology of the cell*. 2006 Sep;17(9):3940-51.
- [181] Torii S, Kusakabe M, Yamamoto T, Maekawa M, Nishida E. Sef is a spatial regulator for Ras/MAP kinase signaling. *Developmental cell*. 2004 Jul;7(1):33-44.
- [182] Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *Journal of cell science*. 2004 Sep 15;117(Pt 20):4619-28.
- [183] Turner CE. Paxillin interactions. *Journal of cell science*. 2000 Dec;113 Pt 23:4139-40.
- [184] Ishibe S, Joly D, Zhu X, Cantley LG. Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Molecular cell*. 2003 Nov;12(5):1275-85.
- [185] Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson HF, Marshall CJ. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol*. 1998 Sep 24;8(19):1049-57.
- [186] Ishibe S, Joly D, Liu ZX, Cantley LG. Paxillin serves as an ERK-regulated scaffold for coordinating FAK and Rac activation in epithelial morphogenesis. *Molecular cell*. 2004 Oct 22;16(2):257-67.
- [187] ter Haar E, Prabhakar P, Liu X, Lepre C. Crystal structure of the p38 alpha-MAPKAP kinase 2 heterodimer. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Mar 30;282(13):9733-9.
- [188] Pichon S, Bryckaert M, Berrou E. Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *Journal of cell science*. 2004 May 15;117(Pt 12):2569-77.
- [189] Seabra MC, Wasmeier C. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current opinion in cell biology*. 2004 Aug;16(4):451-7.



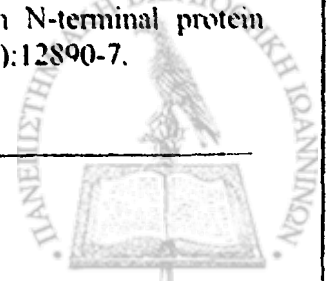
- [190] Mace G, Miaczynska M, Zerial M, Nebreda AR. Phosphorylation of EEA1 by p38 MAP kinase regulates mu opioid receptor endocytosis. *The EMBO journal*. 2005 Sep 21;24(18):3235-46.
- [191] Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 1997 May 1;14(17):2079-89.
- [192] McLaughlin AP, De Vries GW. Role of PLCgamma and Ca(2+) in VEGF- and FGF-induced choroidal endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Nov;281(5):C1448-56.
- [193] Qin L, Zeng H, Zhao D. Requirement of protein kinase D tyrosine phosphorylation for VEGF-A165-induced angiogenesis through its interaction and regulation of phospholipase Cgamma phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Oct 27;281(43):32550-8.
- [194] Li YS, Shyy JY, Li S, Lee J, Su B, Karin M, et al. The Ras-JNK pathway is involved in shear-induced gene expression. *Molecular and cellular biology*. 1996 Nov;16(11):5947-54.
- [195] Le Boeuf F, Houle F, Huot J. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Sep 10;279(37):39175-85.
- [196] McMullen M, Keller R, Sussman M, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor-mediated activation of p38 is dependent upon Src and RAFTK/Pyk2. *Oncogene*. 2004 Feb 12;23(6):1275-82.
- [197] Bernard O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(6):1071-6.
- [198] Kobayashi M, Nishita M, Mishima T, Ohashi K, Mizuno K. MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *The EMBO journal*. 2006 Feb 22;25(4):713-26.
- [199] Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation*. 2005 Mar 29;111(12):1556-66.
- [200] Ravingerova T, Barancik M, Strniskova M. Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol Cell Biochem*. 2003 May;247(1-2):127-38.
- [201] Sebolt-Leopold JS, Herrera R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):937-47.
- [202] Strohm C, Barancik T, Bruhl ML, Kilian SA, Schaper W. Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000 Aug;36(2):218-29.
- [203] Yue TL, Gu JL, Wang C, Reith AD, Lee JC, Mirabile RC, et al. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Dec 1;275(48):37895-901.
- [204] Ma XL, Kumar S, Gao F, Loudon CS, Lopez BL, Christopher TA, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1999 Apr 6;99(13):1685-91.
- [205] Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2000 Mar;35(3):474-83.
- [206] Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation research*. 2000 Mar 31;86(6):692-9.



- [207] Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E. Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Feb;280(2):H499-508.
- [208] Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2487-91.
- [209] Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*. 2004 Jun 8;109(22):2692-7.
- [210] Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005 Oct 20;353(16):1673-84.
- [211] Grumont RJ, Rasko JE, Strasser A, Gerondakis S. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway induces transcription of the PAC-1 phosphatase gene. *Molecular and cellular biology*. 1996 Jun;16(6):2913-21.
- [212] Lin YW, Yang JL. Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive-feedback regulation of proliferating signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Nov 14.
- [213] Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J, McKenzie FR. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Jan 10;272(2):1368-76.
- [214] Brondello JM, Pouyssegur J, McKenzie FR. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science (New York, NY)*. 1999 Dec 24;286(5449):2514-7.
- [215] Camps M, Nichols A, Gillieron C, Antonsson B, Muda M, Chabert C, et al. Catalytic activation of the phosphatase MKP-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, NY)*. 1998 May 22;280(5367):1262-5.
- [216] Kamata H, Honda S, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell*. 2005 Mar 11;120(5):649-61.
- [217] Bhalla US, Ram PT, Iyengar R. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science (New York, NY)*. 2002 Aug 9;297(5583):1018-23.
- [218] Masuda K, Shima H, Watanabe M, Kikuchi K. MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Oct 19;276(42):39002-11.
- [219] Karlsson M, Mathers J, Dickinson RJ, Mandl M, Keyse SM. Both nuclear-cytoplasmic shuttling of the dual specificity phosphatase MKP-3 and its ability to anchor MAP kinase in the cytoplasm are mediated by a conserved nuclear export signal. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Oct 1;279(40):41882-91.
- [220] Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature reviews*. 2007 May;6(5):391-403.
- [221] Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *Faseb J*. 2000 Jan;14(1):6-16.
- [222] Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin Cell Dev Biol*. 1998 Apr;9(2):143-52.
- [223] Dickinson RJ, Keyse SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *Journal of cell science*. 2006 Nov 15;119(Pt 22):4607-15.
- [224] Chu Y, Soliski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and



- reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Mar 15;271(11):6497-501.
- [225] Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current opinion in cell biology*. 2000 Apr;12(2):186-92.
- [226] Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases. *Genome biology*. 2002 Jun 26;3(7):REVIEWS3009.
- [227] Theodosiou A, Smith A, Gillieron C, Arkinstall S, Ashworth A. MKP5, a new member of the MAP kinase phosphatase family, which selectively dephosphorylates stress-activated kinases. *Oncogene*. 1999 Nov 25;18(50):6981-8.
- [228] Shin DY, Ishibashi T, Choi TS, Chung E, Chung IY, Aaronson SA, et al. A novel human ERK phosphatase regulates H-ras and v-raf signal transduction. *Oncogene*. 1997 Jun 5;14(22):2633-9.
- [229] Rahmouni S, Cerignoli F, Alonso A, Tsutji T, Henkens R, Zhu C, et al. Loss of the VHR dual-specific phosphatase causes cell-cycle arrest and senescence. *Nat Cell Biol*. 2006 May;8(5):524-31.
- [230] Zama T, Aoki R, Kamimoto T, Inoue K, Ikeda Y, Hagiwara M. Scaffold role of a mitogen-activated protein kinase phosphatase, SKRP1, for the JNK signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jun 28;277(26):23919-26.
- [231] Zama T, Aoki R, Kamimoto T, Inoue K, Ikeda Y, Hagiwara M. A novel dual specificity phosphatase SKRP1 interacts with the MAPK kinase MKK7 and inactivates the JNK MAPK pathway. Implication for the precise regulation of the particular MAPK pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jun 28;277(26):23909-18.
- [232] Hammer M, Mages J, Dietrich H, Schmitz F, Striebel F, Murray PJ, et al. Control of dual-specificity phosphatase-1 expression in activated macrophages by IL-10. *European journal of immunology*. 2005 Oct;35(10):2991-3001.
- [233] Jeffrey KL, Brummer T, Rolph MS, Liu SM, Callejas NA, Grumont RJ, et al. Positive regulation of immune cell function and inflammatory responses by phosphatase PAC-1. *Nature immunology*. 2006 Mar;7(3):274-83.
- [234] Muda M, Theodosiou A, Rodrigues N, Boschert U, Camps M, Gillieron C, et al. The dual specificity phosphatases M3/6 and MKP-3 are highly selective for inactivation of distinct mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Nov 1;271(44):27205-8.
- [235] Zhang Y, Blattman JN, Kennedy NJ, Duong J, Nguyen T, Wang Y, et al. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature*. 2004 Aug 12;430(7001):793-7.
- [236] Muda M, Boschert U, Smith A, Antonsson B, Gillieron C, Chabert C, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, MKP-4. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Feb 21;272(8):5141-51.
- [237] Christie GR, Williams DJ, Macisaac F, Dickinson RJ, Rosewell I, Keyse SM. The Dual-Specificity Protein Phosphatase DUSP9/MKP-4 Is Essential for Placental Function but Is Not Required for Normal Embryonic Development. *Molecular and cellular biology*. 2005 Sep;25(18):8323-33.
- [238] Camps M, Chabert C, Muda M, Boschert U, Gillieron C, Arkinstall S. Induction of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP3 by nerve growth factor in differentiating PC12. *FEBS Lett*. 1998 Mar 27;425(2):271-6.
- [239] Laderoute KR, Mendonca HL, Calaoagan JM, Knapp AM, Giaccia AJ, Stork PJ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression is induced by low oxygen conditions found in solid tumor microenvironments. A candidate MKP for the inactivation of hypoxia-inducible stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal protein kinase activity. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Apr 30;274(18):12890-7.



- [240] Dowd S, Sneddon AA, Keyse SM. Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *Journal of cell science*. 1998 Nov;111 ( Pt 22):3389-99.
- [241] Groom LA, Sneddon AA, Alessi DR, Dowd S, Keyse SM. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *The EMBO journal*. 1996 Jul 15;15(14):3621-32.
- [242] Muda M, Boschert U, Dickinson R, Martinou JC, Martinou I, Camps M, et al. MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Feb 23;271(8):4319-26.
- [243] Fjeld CC, Rice AE, Kim Y, Gee KR, Denu JM. Mechanistic basis for catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 by extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Mar 10;275(10):6749-57.
- [244] Slack DN, Seternes OM, Gabrielsen M, Keyse SM. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May 11;276(19):16491-500.
- [245] Zhang Q, Muller M, Chen CH, Zeng L, Farooq A, Zhou MM. New insights into the catalytic activation of the MAPK phosphatase PAC-1 induced by its substrate MAPK ERK2 binding. *Journal of molecular biology*. 2005 Dec 9;354(4):777-88.
- [246] Meng TC, Fukada T, Tonks NK. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Molecular cell*. 2002 Feb;9(2):387-99.
- [247] Tanoue T, Moriguchi T, Nishida E. Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jul 9;274(28):19949-56.
- [248] Tanoue T, Yamamoto T, Maeda R, Nishida E. A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 13;276(28):26629-39.
- [249] Hirsch DD, Stork PJ. Mitogen-activated protein kinase phosphatases inactivate stress-activated protein kinase pathways in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Feb 14;272(7):4568-75.
- [250] Zhao Q, Wang X, Nelin LD, Yao Y, Matta R, Manson ME, et al. MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Jan 23;203(1):131-40.
- [251] Hammer M, Mages J, Dietrich H, Servatius A, Howells N, Cato AC, et al. Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *The Journal of experimental medicine*. 2006 Jan 23;203(1):15-20.
- [252] Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3203-13.
- [253] Stewart AE, Dowd S, Keyse SM, McDonald NQ. Crystal structure of the MAPK phosphatase Pyst1 catalytic domain and implications for regulated activation. *Nature structural biology*. 1999 Feb;6(2):174-81.
- [254] Jeong DG, Cho YH, Yoon TS, Kim JH, Ryu SE, Kim SJ. Crystal structure of the catalytic domain of human DUSP5, a dual specificity MAP kinase protein phosphatase. *Proteins*. 2007 Jan 1;66(1):253-8.
- [255] Mandl M, Slack DN, Keyse SM. Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Molecular and cellular biology*. 2005 Mar;25(5):1830-45.



- [256] Nichols A, Camps M, Gillieron C, Chabert C, Brunet A, Wilsbacher J, et al. Substrate recognition domains within extracellular signal-regulated kinase mediate binding and catalytic activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-3. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Aug 11;275(32):24613-21.
- [257] Tanoue T, Yamamoto T, Nishida E. Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Jun 21;277(25):22942-9.
- [258] Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol*. 2002 Aug;4(8):556-64.
- [259] Fantz DA, Jacobs D, Glossip D, Kornfeld K. Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jul 20;276(29):27256-65.
- [260] Murphy LO, MacKeigan JP, Blenis J. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Molecular and cellular biology*. 2004 Jan;24(1):144-53.
- [261] Wang HY, Cheng Z, Malbon CC. Overexpression of mitogen-activated protein kinase phosphatases MKP1, MKP2 in human breast cancer. *Cancer letters*. 2003 Mar 10;191(2):229-37.
- [262] Xu S, Furukawa T, Kanai N, Sunamura M, Horii A. Abrogation of DUSP6 by hypermethylation in human pancreatic cancer. *Journal of human genetics*. 2005;50(4):159-67.
- [263] Givant-Horwitz V, Davidson B, Goderstad JM, Nesland JM, Trope CG, Reich R. The PAC-1 dual specificity phosphatase predicts poor outcome in serous ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology*. 2004 May;93(2):517-23.
- [264] Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Kapon D, Hantisteanu S, Burg T, Raanani P, et al. Dual-specificity phosphatase Pyst2-L is constitutively highly expressed in myeloid leukemia and other malignant cells. *Oncogene*. 2003 Oct 23;22(48):7649-60.
- [265] Levy-Nissenbaum O, Sagi-Assif O, Raanani P, Avigdor A, Ben-Bassat I, Witz IP. Overexpression of the dual-specificity MAPK phosphatase PYST2 in acute leukemia. *Cancer letters*. 2003 Sep 25;199(2):185-92.
- [266] Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J. A novel amplification target. DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene*. 2007 Feb 22;26(8):1178-87.
- [267] Li M, Zhou JY, Ge Y, Matherly LH, Wu GS. The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Oct 17;278(42):41059-68.
- [268] Dorfman K, Carrasco D, Gruda M, Ryan C, Lira SA, Bravo R. Disruption of the *erp/mkp-1* gene does not affect mouse development: normal MAP kinase activity in ERP/MKP-1-deficient fibroblasts. *Oncogene*. 1996 Sep 5;13(5):925-31.
- [269] Zhao Q, Shepherd EG, Manson ME, Nelin LD, Sorokin A, Liu Y. The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Mar 4;280(9):8101-8.
- [270] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*. 1973 Nov;52(11):2745-56.
- [271] He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(5):2500-14.
- [272] Bacía K, Kim SA, Schwille P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat Methods*. 2006 Feb;3(2):83-9.



- [273] Kim SA, Heinze KG, Bacia K, Waxham MN, Schwille P. Two-photon cross-correlation analysis of intracellular reactions with variable stoichiometry. *Biophysical journal*. 2005 Jun;88(6):4319-36.
- [274] Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of cell science*. 2005 Jul 15;118(Pt 14):2997-3002.
- [275] Verveer PJ, Squire A, Bastiaens PI. Improved spatial discrimination of protein reaction states in cells by global analysis and deconvolution of fluorescence lifetime imaging microscopy data. *Journal of microscopy*. 2001 Jun;202(Pt 3):451-6.
- [276] Wouters FS, Verveer PJ, Bastiaens PI. Imaging biochemistry inside cells. *Trends in cell biology*. 2001 May;11(5):203-11.
- [277] Abe M, Sato Y. cDNA microarray analysis of the gene expression profile of VEGF-activated human umbilical vein endothelial cells. *Angiogenesis*. 2001;4(4):289-98.
- [278] Marchetti S, Gimond C, Chambard JC, Touboul T, Roux D, Pouyssegur J, et al. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate mitogen-activated protein kinase phosphatase 3/DUSP6 at serines 159 and 197, two sites critical for its proteasomal degradation. *Molecular and cellular biology*. 2005 Jan;25(2):854-64.
- [279] Pratt PF, Bokemeyer D, Foschi M, Sorokin A, Dunn MJ. Alterations in subcellular localization of p38 MAPK potentiates endothelin-stimulated COX-2 expression in glomerular mesangial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Dec 19;278(51):51928-36.
- [280] Hu JH, Chen T, Zhuang ZH, Kong L, Yu MC, Liu Y, et al. Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cellular signalling*. 2006 Jul 25.
- [281] Zheng C, Lin Z, Zhao ZJ, Yang Y, Niu H, Shen X. MAPK-activated protein kinase-2 (MK2)-mediated formation and phosphorylation-regulated dissociation of the signal complex consisting of p38, MK2, Akt, and Hsp27. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Dec 1;281(48):37215-26.
- [282] Costa M, Marchi M, Cardarelli F, Roy A, Beltram F, Maffei L, et al. Dynamic regulation of ERK2 nuclear translocation and mobility in living cells. *Journal of cell science*. 2006 Dec 1;119(Pt 23):4952-63.
- [283] Volmat V, Camps M, Arkinstall S, Pouyssegur J, Lenormand P. The nucleus, a site for signal termination by sequestration and inactivation of p42/p44 MAP kinases. *Journal of cell science*. 2001 Oct;114(Pt 19):3433-43.

